



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA

EFEITOS RENAIIS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADOS PELO
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO SINTÉTICO DO VENENO DE
Crotalus durissus cascavella

FORTALEZA

2015

JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA

**EFEITOS RENAIIS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADOS PELO
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO SINTÉTICO DO VENENO DE
*Crotalus durissus cascavella***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Helena Serra Azul Monteiro.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S588e Silveira, João Alison de Moraes.
Efeitos renais e alterações morfológicas causados pelo peptídeo natriurético sintético do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. / João Alison de Moraes Silveira. – 2015.
90 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
1. Cascavel. 2. Natriurese. 3. Perfusão Renal. 4. Viabilidade Celular. I. Título.

CDD 615.942

JOÃO ALISON DE MORAES SILVEIRA

EFEITOS RENAIIS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADOS PELO
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO SINTÉTICO DO VENENO DE
Crotalus durissus cascavella

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
da Faculdade de Medicina, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.
Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 19 / 01 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Faculdade de Medicina pela oportunidade da realização do trabalho e pelo suporte docente, físico e administrativo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no custeio da bolsa e na realização do projeto.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Helena Serra Azul Monteiro, pelo meu acolhimento como orientando, por todos os conhecimentos compartilhados e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista, iniciadora desse trabalho e grande estimuladora para a realização do mestrado em Farmacologia; juntamente à equipe do HISTOVESP-UECE, em especial a minha amiga Glayciane de Moraes (Nina) pela colaboração na realização do processamento histológico.

À Prof.^a Dr.^a Alice Maria da Costa Martins, juntamente à equipe do LCC-UFC, especialmente aos colegas Clarissa Mello e Ramon Pessoa pelo auxílio na realização dos experimentos de cultura e viabilidade celular.

Ao Prof. MSc. Daniel de Araújo Viana, pela colaboração na leitura e interpretação das lâminas histológicas e conhecimentos passados.

Aos Professores integrantes das bancas de qualificação (Profs. Drs. Rodrigo José Bezerra de Siqueira, Lucília Maria Abreu Lessa e Daniel de Sousa Freire) e defesa (Profs. Drs. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, Gandhi Rádís Baptista e Antônio Rafael Coelho Jorge), pelas ideias e sugestões no aprimoramento do trabalho.

A toda a equipe de professores, pós-graduandos e alunos de iniciação científica do LAFAVET-UFC, juntamente à técnica Silvia Helena França, imprescindível na realização dos experimentos de perfusão renal.

Aos meus pais (Olavo e Filomena), minha namorada (Márcia Vieira), familiares próximos (especialmente a minha tia Angélica) e demais amigos pelo apoio durante a realização do trabalho.

Aos animais experimentais, verdadeiros heróis da ciência, que entregaram suas vidas para a realização deste trabalho e progresso do conhecimento científico.

"Vulgar é o ler, raro o refletir. O saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas, principalmente, nas ideias próprias, que se geram dos conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação, por que passam, no espírito que os assimila. Um sabedor não é armário de sabedoria armazenada, mas transformador reflexivo de aquisições digeridas." (Ruy Barbosa)

RESUMO

EFEITOS RENAIIS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADOS PELO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO SINTÉTICO DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella*

Os Peptídeos Natriuréticos (NPs) têm significativa participação na regulação na homeostasia cardiovascular, renal e endócrina, e têm sido descritos nos venenos de serpentes peçonhentas. A *Crotalus durissus cascavella*, uma serpente terrícola característica da caatinga do Nordeste do Brasil, possui em seu veneno total um NP (NPCdc), ao qual são relatados efeitos vasculares e renais. O objetivo desse trabalho foi sintetizar em fase sólida o NPCdc e avaliar suas ações renais através da perfusão de rim isolado e em cultura de células tubulares renais da linhagem MDCK e LLC-MK₂. Rins de ratos Wistar machos, pesando entre 250-300 g, foram excisados cirurgicamente e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada com 6% p/v de albumina bovina previamente dialisada. Foram investigados os efeitos do NPCdc em quatro concentrações (0,03 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,3 µg/mL e 1 µg/mL; n=6). As células MDCK e LLC-MK₂ foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal e então avaliadas na presença do NPCdc em diversas concentrações em um período de incubação de 24 horas. Após esse período, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Os dados foram comparados estatisticamente considerando P<0,05. Houve aumento na pressão de perfusão (PP) em 0,03 µg/mL e redução em 1 µg/mL. A resistência vascular renal (RVR) apresentou aumento em 0,03 µg/mL. O fluxo urinário (FU) aumentou em 0,03 µg/mL e diminuiu em 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. O ritmo de filtração glomerular (RFG) encontrou-se diminuído nas quatro concentrações testadas. O *clearance* osmolar (COsm) apresentou-se aumentado em 0,03 µg/mL e reduzido em 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. O percentual de transporte tubular total e proximal de sódio (%TNa⁺ e %TpNa⁺, respectivamente) e cloreto (%TCl⁻ e %TpCl⁻, respectivamente) apresentaram reduções nas quatro concentrações testadas. Já o percentual de transporte tubular total e proximal de potássio (%TK⁺ e %TpK⁺, respectivamente) apresentaram-se reduzidos em 0,03 µg/mL e 0,3 µg/mL. A análise histopatológica mostrou a presença de alterações morfológicas significativas, como degeneração hidrópica concentração-dependente em todas as concentrações, juntamente com discreta a moderada deposição de material proteáceo nos túbulos na concentração de 0,03 µg/mL. Na cultura de células MDCK e LLC-MK₂, porém, o NPCdc não foi capaz de diminuir a viabilidade celular. Esses resultados demonstram que o NPCdc modificou todos os parâmetros avaliados na perfusão de rim isolado, além de revelar alterações de caráter citotóxico na análise histopatológica dos mesmos, todavia, não as apresentando em culturas de células tubulares renais.

Palavras-chave: Cascavel. Natriurese. Perfusão Renal. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

RENAL EFFECTS AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS CAUSED BY SYNTHETIC NATRIURETIC PEPTIDE OF *Crotalus durissus cascavella* VENOM

Natriuretic Peptides (NPs) have significant interest in regulating the cardiovascular, renal and endocrine homeostasis, and have been described in the venom of venomous snakes. *Crotalus durissus cascavella*, a characteristic terrestrial snake of caatinga biome of northeastern Brazil, has in his whole venom an NP (NPCdc), of which are reported vascular and renal effects. The aim of this study was to synthesize NPCdc in solid phase and evaluate its renal actions through isolated kidney perfusion and culture of renal tubular cells of MDCK and LLC-MK₂ line. Kidneys from male Wistar rats weighing 250-300 g were surgically excised and perfused with modified Krebs-Henseleit solution with 6 g% of previously dialyzed bovine serum albumin. The effects of NPCdc were investigated in four concentrations (0.03 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.3 µg/mL and 1 µg/mL, n=6). MDCK and LLC-MK₂ cells were cultured in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% v/v Fetal Bovine Serum and then evaluated in presence of several concentrations of NPCdc at an incubation period of 24 hours. After this period, cell viability assays were performed. Data were statistically compared considering P<0.05. There was increase in perfusion pressure (PP) in 0.03 µg/mL and reduction in 1 µg/mL. Renal vascular resistance (RVR) was increased at 0.03 µg/mL. Urinary flow (UF) increased in 0.03 µg/mL and decreased in 0.1 µg/mL and 1 µg/mL. The glomerular filtration rate (GFR) was reduced at all the concentrations tested. Osmolar clearance (OsmC) was increased in 0.03 µg/mL and reduced in 0.1 µg/mL and 1 µg/mL. Percentage of the total and proximal tubular transport of sodium (%TNa⁺ and %pTNa⁺, respectively) and chloride (TCI% and pTCI%, respectively) showed reductions at all concentrations tested. Percentage of the total proximal tubular transport and potassium (%TK⁺ and pTK⁺%, respectively) were reduced in 0.03 µg/mL and 0.3 µg/mL. The histopathological analysis revealed the presence of significant morphological changes, such as concentration-dependent hydropic degeneration at all concentrations, along with mild to moderate deposition of proteinaceous material in the tubules in concentration 0.03 µg/mL. In the culture of MDCK and LLC-MK₂ cells, however, NPCdc was not able to lower cell viability. These results demonstrate that NPCdc modified all parameters assessed in renal perfusion of isolated kidney, and showed cytotoxic alterations in histopathological analysis, however, not presenting it in cultures of renal tubular cells.

Keywords: Rattlesnake. Natriuresis. Kidney Perfusion. Cell Viability.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
BPP	Peptídeo Potenciador da Bradicinina
CNP	Peptídeo Natriurético tipo C
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COsm	Clearance Osmolar
DNP	Peptídeo Natriurético da <i>Dendroaspis angusticeps</i>
FNA	Fator Natriurético Atrial
FU	Fluxo Urinário
GC	Guanilato Ciclase
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
HISTOVESP	Laboratório de Histologia de Venenos de Serpentes e Plantas Tóxicas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta <i>Performance</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IRA	Insuficiência Renal Aguda
LFAVET	Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas
LCC	Laboratório de Cultivo Celular
NEP	Endopeptidase Neutra
NO	Óxido Nítrico
NPs	Peptídeos Natriuréticos
NPCasca	Peptídeo Natriurético Isolado da Serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i>
NPCdc	Peptídeo Natriurético Sintético da Serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i>
NPRs	Receptores para Peptídeos Natriuréticos
PP	Pressão de Perfusão
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RVR	Resistência Vascular Renal
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
URO	Urodilatina
%T	Percentual de Transporte Tubular Total
%Tp	Percentual de Transporte Tubular Proximal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	<i>Crotalus durissus cascavella.....</i>	10
1.2	Venenos Ofídicos.....	12
1.2.1	<i>Composição do Veneno da Crotalus durissus cascavella.....</i>	13
1.3	Peptídeos Natriuréticos.....	14
1.3.1	<i>Receptores para Peptídeos Natriuréticos.....</i>	17
1.3.2	<i>Efeitos Biológicos dos Peptídeos Natriuréticos.....</i>	20
1.3.3	<i>Peptídeos Natriuréticos derivados de Venenos Ofídicos.....</i>	23
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Obtenção do NPCdc Sintético.....	30
4.2	Perfusão de Rim Isolado.....	30
4.2.1	<i>Animais de Experimentação.....</i>	30
4.2.2	<i>Sistema de Perfusão de Rim Isolado.....</i>	30
4.2.2.1	<i>Preparação do Sistema de Perfusão de Rim Isolado.....</i>	33
4.2.3	<i>Solução Perfusora.....</i>	35
4.2.4	<i>Técnica Cirúrgica.....</i>	35
4.2.5	<i>Protocolo Experimental.....</i>	36
4.2.5.1	<i>Grupos Experimentais.....</i>	37
4.2.6	<i>Análises Bioquímicas.....</i>	37
4.2.7	<i>Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais.....</i>	37
4.2.8	<i>Análise Histopatológica.....</i>	39
4.3	Ensaio de Cultura Celular.....	39
4.3.1	<i>Linhagens Celulares.....</i>	39
4.3.2	<i>Cultivo e Tratamento das Células MDCK e LLC-MK₂.....</i>	39
4.3.3	<i>Estudo da Viabilidade Celular in vitro.....</i>	41

4.3.3.1	<i>Ensaio com MTT</i>	41
4.4	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Síntese em Fase Sólida do NPCdc	43
5.2	Efeitos do NPCdc na Perfusão de Rim Isolado de Ratos	44
5.3	Análise Histológica dos Rins Perfundidos com NPCdc	58
5.4	Efeitos do NPCdc na Viabilidade Celular	61
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Crotalus durissus cascavella*

As serpentes do gênero *Crotalus* vem ganhando relevante espaço no campo médico-científico. Os acidentes ofídicos por serpentes deste gênero representam 13,14% (9.897) dos casos notificados no Brasil entre os anos de 2010 e 2014, dentre os quais estão inclusos 89 óbitos. No Ceará, considerando os 2.733 acidentes ocorridos entre os anos de 2010 e 2014, nos quais as serpentes envolvidas foram identificadas, 226 (8,26%) envolveram este gênero (BRASIL, 2014).

O veneno da *Crotalus sp.* tem sido alvo de diversas pesquisas devido a sua constituição e efeitos causados. O envenenamento crotálico caracteriza-se por manifestações clínicas locais: parestesias local ou regional, que persistem por tempo variável podendo ser acompanhada de edema discreto ou eritema no ponto da picada; e sistêmicas: prostração, xerostomia, náuseas, vômitos, sudorese, sonolência ou inquietação, faces miastênica, mialgias acompanhadas de discreto edema muscular e incoagulabilidade sanguínea ou aumento do tempo de coagulação (AMARAL et al., 1988; AZEVEDO-MARQUES, 1985; BRASIL, 2001).

No Brasil, esse gênero é representado por uma única espécie, *Crotalus durissus*, classificada em diferentes subespécies com diferentes características morfológicas e comportamentais. As subespécies crotálicas são encontradas principalmente em regiões secas, pedregosas, arenosas, em encostas de morros, cerrados e raramente na faixa litorânea ou florestas úmidas (NOGUEIRA; SAKATE, 2004).

Há uma distribuição geográfica particular para cada uma delas: *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*, observadas na região Norte; *Crotalus durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó; *Crotalus durissus collilineatus*, distribuída nas regiões secas do Centro-Oeste, em Minas Gerais e no norte de São Paulo; *Crotalus durissus terrificus*, encontrada nas regiões Sul Oriental e Meridional; e *Crotalus durissus cascavella*, encontrada nas áreas de caatinga da região Nordeste (PINHO; PEREIRA, 2001; PONCE-SOTO et al., 2007).

A *Crotalus durissus cascavella* (Figura 1) é uma serpente terrícola, característica de clima quente e seco. Tem seu habitat em áreas secas e pedregosas, de baixa vegetação, sendo facilmente encontradas em campos abertos (CAMPBELL; LAMAR, 1989; SOERENSEN, 1996). Podem atingir um comprimento máximo de 1,50 m e possuem dentição solenóglifa

(móvel), ou seja, suas presas são móveis e semelhantes a uma agulha de injeção que no momento do bote são projetadas para frente injetando veneno (GRANTS AU, 1991).

Figura 1 – Imagem ilustrativa da serpente *Crotalus durissus cascavella*.



Fonte: goo.gl/mmQO69

Tem sua atividade de caça caracteristicamente crepuscular e noturna, período que coincide com o pico da atividade de suas presas. Sua estratégia de forrageamento é caracterizada por permanecerem paradas próximas a locais onde há indícios de presas, aguardando sua passagem para, em seguida, realizar o bote (CHISZAR et al., 1990; REINERT; CUNDALL; BUSHAR, 1984).

A alimentação da *C. d. cascavella* compreende principalmente os roedores, devido à grande disponibilidade ao longo do ano, mamíferos não identificados, marsupiais e répteis. Aves e lagartos teiúdeos podem também fazer parte da dieta (ALMEIDA-SANTOS; GERMANO, 1996; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS; PUORTO, 1995). Habitualmente não costumam atacar seres humanos, mas, quando excitadas ou ameaçadas, denunciam sua presença pelo ruído característico de seu guizo ou chocalho (BRASIL, 2001).

1.2 Venenos Ofídicos

Os venenos são encontrados em várias espécies de seres vivos, de unicelulares a pássaros. De acordo com a presença ou a ausência de estruturas especializadas para injetá-lo, estes organismos podem ser classificados como animais peçonhentos ou não-peçonhentos, respectivamente (DUMBACHER; SPANDE; DALY, 2000; RUSSEL, 1996).

Os animais peçonhentos são todos aqueles que produzem veneno e têm estruturas especializadas para injetá-lo. O veneno é produzido por glândulas específicas e tem a finalidade principalmente digestivas, com atividades tóxicas que neutralizam e matam a presa durante a captura, acrescido de um efeito defensivo contra predadores (CALVETE et al., 2009; FRY et al., 2006; MACKESSY; BAXTER, 2006).

Os venenos das serpentes peçonhentas apresentam diversas substâncias de estruturas simples à complexas: enzimas, glicoproteínas complexas, polipeptídeos e componentes não-proteicos (MARKLAND, 1998; WARREL, 2010). A proporção e características específicas desses componentes variam entre as espécies (VARANDA; GIANNINI, 1994). 90 a 95% do peso seco dos venenos tem propriedade proteica, natureza estabelecida em 1843 por Lucien Bonaparte (BON, 2006).

Estas proteínas são as responsáveis pela quase totalidade dos efeitos biológicos encontrados, dentre as quais se destacam a ação enzimática e a presença de toxinas proteicas com efeitos específicos (KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006). As proteínas dentro de cada família de toxinas compartilham semelhanças notáveis em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, mas podem diferir entre si em seus efeitos farmacológicos (KANG, 2011).

A maioria dos venenos exerce seus efeitos em quase todas as células e tecidos, e suas propriedades farmacológicas são determinadas pela quantidade de um constituinte específico e biologicamente ativo que se acumula em um sítio de reconhecimento onde é capaz de produzir injúria (RUSSEL, 1996). Além disso, as toxinas de serpentes em sua maioria exibem suas atividades farmacológicas por conta própria (KANG, 2011). Dessa forma, estes componentes também podem ter muitas aplicações na biomedicina (KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006).

1.2.1 Composição do Veneno da *Crotalus durissus cascavella*

A peçonha crotálica é um complexo tóxico-enzimático de várias substâncias, dentre as quais podemos destacar enzimas, como: proteases, fosfodiesterase, L-amino ácido oxidase e 5'-nucleotidase; além de toxinas, tais como: crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina e serinoproteinases. Os diferentes constituintes do veneno refletem nas variações de suas propriedades biológicas, toxicidade e características de atividade (FONSECA et al., 2006; RANGEL-SANTOS et al., 2004).

A crotoxina é uma β -neurotoxina de duas subunidades, uma ácida, a crotapotina (crotoxina A) e outra básica, a fosfolipase A₂ (crotoxina B) que possui efeitos tóxicos bloqueadores pré e pós-sinápticos e também aumenta a permeabilidade de íons sódio. Pós-sinápticamente, atua por diminuir a ação da acetilcolina e impedir a despolarização da membrana; já pré-sinápticamente, interfere na liberação de acetilcolina, bloqueando a transmissão neuromuscular e impedindo a contração da musculatura estriada esquelética (BON, 2006; HENDON, 1971; MATSUBARA, 2009; RANGEL-SANTOS et al., 2004).

A crotapotina (crotoxina A), isoladamente, não possui a toxicidade e a atividade enzimática da crotoxina, mas potencializa a sua toxicidade (BON, 2006). Além disso, potencializa o edema inflamatório (induzido por carragenina) e possui efeito antimicrobiano principalmente contra bactérias Gram-negativas. Aumenta a pressão de perfusão e a resistência vascular renal em rins perfundidos, mantendo inalterados o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular, ao contrário da crotoxina (OLIVEIRA et al., 2003). Já a fosfolipase A₂ induz a um extravasamento de plasma, sendo capaz de aumentar a permeabilidade microvascular da pele na região dorsal de ratos (CÂMARA et al., 2003).

A crotamina é uma toxina que pertence à família de proteínas miotóxicas e possui toxicidade leve, com atividade sinérgica a da crotoxina (NICASTRO et al., 2003). É um polipeptídeo básico que possui a capacidade de penetração intracelular, através de mecanismos independentes de gasto energético, por interação com proteoglicanos da matriz extracelular (MATSUBARA, 2009). Atua principalmente provocando contrações musculares, dependentes da despolarização da membrana das células musculares estriadas esqueléticas, através do aumento da permeabilidade desta ao sódio (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003). Além de modificar especificamente os canais de sódio-voltagem dependentes, sugere-se que também exiba atividades analgésica e mionecrótica (NICASTRO et al., 2003).

A convulxina é uma toxina de alto peso molecular, pertencente à família das lectinas do tipo C, isolada de diversas subespécies do gênero *Crotalus*, e consiste em um potente

ativador plaquetário. Esta atividade consiste em uma reação dependente de cálcio, iniciada pela ligação da convulsina ao receptor GPVI de plaquetas (POLGÁR et al., 1997; KANAJI et al., 2003). Além disso, causa convulsões, alterações respiratórias e circulatórias em várias espécies de mamíferos (SANO-MARTINS et al., 2001).

A giroxina é um peptídeo trombina-símile com atividades amidásica, esterásica e fibrinolítica (MARTINS et al., 2002). A giroxina converte o fibrinogênio em fibrina, aumentando o tempo de coagulação sanguínea (SANO-MARTINS et al., 2001). Além dessa atuação, apresenta potente atividade neurotóxica (BARROS et al., 2011), produzindo uma síndrome convulsiva peculiar em camundongos, caracterizada por movimentos rápidos de rotação do corpo em torno de seu eixo longitudinal quando injetada por via intravenosa (PRADO-FRANCESCHI, 1990; SANO-MARTINS et al., 2001).

Recentemente, um novo peptídeo potenciador de bradicinina (BPP), denominado BPP-Cdc, foi isolado também do veneno total. Embora este tenha apresentado a sequência clássica dos BPPs na cauda C-terminal, sua sequência N-terminal apresentou-se completamente atípica, mostrando homologia muito baixa com todos os outros BPPs isolados. Ensaio utilizando ratos hipertensos sugeriram que o BPP-Cdc apresenta ação mais seletiva sobre o sistema arterial do que BPP9a, isolado da serpente *Bothrops jararaca*. Além da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), ainda especula-se que aja por outros mecanismos de ação ainda não elucidados (LOPES et al., 2014).

Outro importante componente do veneno total é um peptídeo natriurético que, ao ser isolado do veneno total da *Crotalus durissus cascavella*, foi capaz de desencadear efeitos renais e vasculares, com consequente efeito diurético e hipotensor (EVANGELISTA et al., 2008).

1.3 Peptídeos Natriuréticos

Os órgãos excretórios foram desenvolvidos para manter as concentrações desejadas de água e solutos no organismo. Os rins são os órgãos mais eficientes nesta função e constituem a principal via de excreção de sódio do corpo, sendo importantes para manutenção do equilíbrio corporal e regulação do volume do fluido extracelular (KOEPPEN; STATON, 2009; PANDEY, 2005).

Mecanismos fisiológicos muito bem regulados permitem que o excesso de sódio presente no organismo não seja retido. Estes incluem sinais neurais e hormonais, como: a atividade nervosa simpática, o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) e a

regulação induzida pela Guanilina, Uroguanilina e os Peptídeos Natriuréticos (KOEPPEN; STATON, 2009).

Os Peptídeos Natriuréticos (NPs) são uma família de peptídeos distintos geneticamente (CHEN; BURNETT JR, 2006). A estrutura bioquímica desta família é bastante semelhante: todos apresentam uma ponte dissulfeto que resulta em uma estrutura em forma de um anel de 17 aminoácidos; estes são amplamente conservados, pois essa estrutura é necessária para a ligação a receptores com atividade de guanilato ciclase ligados à membrana (VINK et al., 2012).

Os NPs são sintetizados como pré-pró-peptídeos e processados a pró-peptídeos de alta massa molecular no retículo endoplasmático. A clivagem proteolítica destes pró-peptídeos por serinoproteases resulta na formação de peptídeos maduros (NPativos) e fragmentos N-terminal (BOOMSMA et al., 2001; WU et al., 2002; YAN et al, 2000).

Os NPs foram identificados numa variada gama de espécies de vertebrados, incluindo seres humanos, ratos, suínos, rãs, répteis e peixes, com peptídeos homólogos sendo encontrados em plantas e, recentemente, bactérias (VINK et al., 2012).

Em mamíferos existem quatro NPs bem descritos: o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) (DE BOLD et al., 1981), o Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) (SUDOH et al., 1988), o Peptídeo Natriurético tipo C (CNP) (SUDOH et al., 1990) e a Urodilatina (URO) (SCHULZ-KNAPPE; FORSSMANN; HERBST, 1988), proveniente do mesmo precursor do ANP (Figura 2). Além destes, ainda existem os hormônios derivados do epitélio intestinal – guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) – que também compartilham semelhança estrutural com os NPs (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008; OMLAND; HAGVE, 2009).

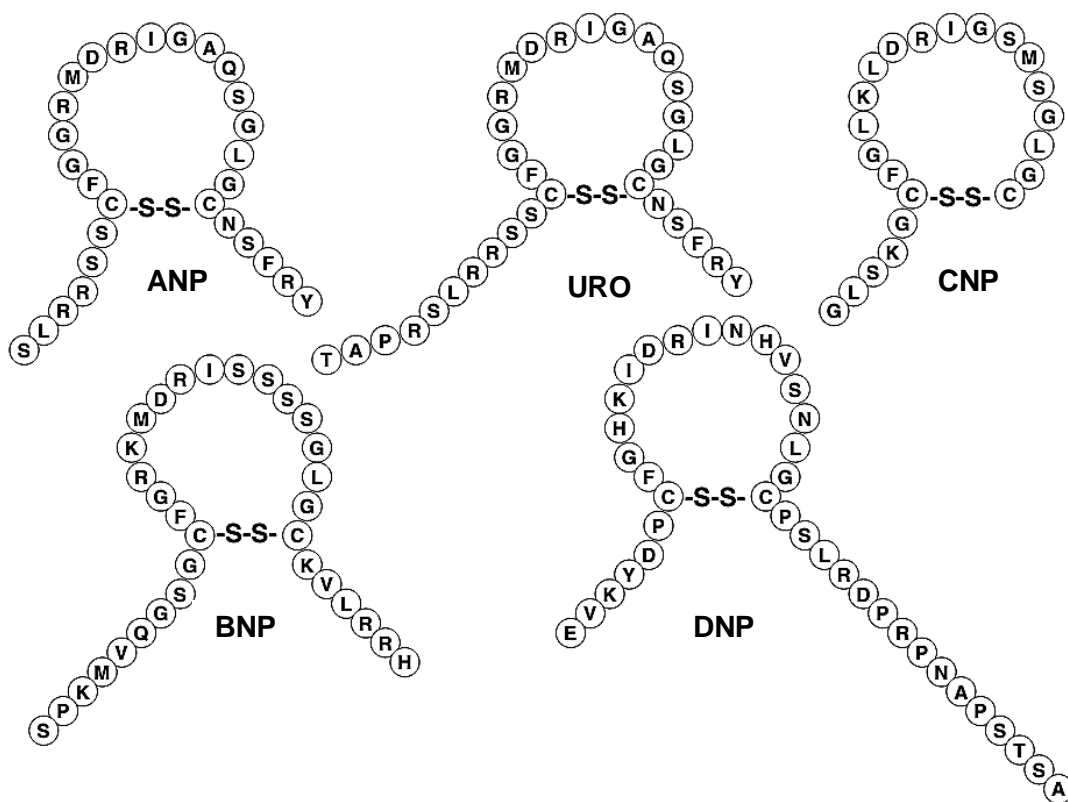
O Fator Natriurético Atrial (FNA), posteriormente denominado Peptídeo Natriurético Atrial, foi descoberto por de Bold e colaboradores em 1981 e, desde então, houve grande progresso no entendimento das funções fisiológicas, diagnósticas e terapêuticas dos NPs na saúde e na doença (LEE; BURNETT JR, 2007).

O ANP (do inglês “Atrial Natriuretic Peptide”) é um peptídeo constituído de 28 aminoácidos com uma ponte dissulfeto cisteína-cisteína formando um anel de 17 resíduos que exerce poderosos efeitos sobre o rim e o sistema vascular (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009; VOLPE, 2014). A produção e liberação do ANP estão relacionadas ao estiramento da parede atrial e à sobrecarga resultante do aumento da pressão sanguínea ou volume vascular (VINK et al., 2012).

O ANP é estocado em grânulos secretórios que ocorrem em ambos os átrios de todos os vertebrados, os quais liberam seu conteúdo na circulação após estimulação (VESELY,

2003). Ventrículos de corações adultos produzem apenas uma pequena quantidade de ANP, mas essa produção é substancialmente aumentada em ventrículos de fetos/neonatos, em ventrículos hipertróficos e em situações de sobrecarga de volume (DE BOLD et al., 1981; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

Figura 2 – Sequência de aminoácidos e estruturas da família dos Peptídeos Natriuréticos. ANP: Peptídeo Natriurético Atrial; BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral; URO: Urodilatina; CNP-22: Peptídeo Natriurético tipo C, subtipo C-22; DNP: Peptídeo Natriurético da *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde).



Fonte: Adaptado de LEE e BURNETT JR (2007).

O BNP (do inglês “Brain Natriuretic Peptide”) é um polipeptídeo de 32 aminoácidos que formam um anel de 17 aminoácidos semelhantes ao ANP. Inicialmente isolado em 1988, do cérebro de suínos, daí seu nome, está presente em todo o tecido cardíaco, particularmente nos ventrículos (SUDOH et al., 1988).

Diferentemente do ANP, que possui meia vida *in vivo*, em humanos, de 3 min (YANDLE et al., 1986), por ter uma sensibilidade menor para o receptor de *clearance* e a enzima degradadora; o BNP é mais estável, com meia vida *in vivo*, em humanos, de 22 min, o que facilita a avaliação da sua concentração no plasma (HOLMES et al., 1993).

O BNP é rapidamente produzido por cardiomiócitos após estímulos como estiramento ou hipóxia. Os efeitos deste são semelhantes aos de outros membros da família, mas por ter a meia vida mais longa, é o membro mais bem estudado e descrito na literatura (OMLAND; HAGVE, 2009; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

O CNP (do inglês “C-type Natriuretic Peptide”) é um fator autócrino ou parácrino predominante no endotélio vascular (células endoteliais, monócitos/macrófagos), no sistema nervoso central (SNC), nos rins, condrócitos e glândula pituitária de mamíferos (HORIO et al., 2003; SUDOH et al., 1990). Apresenta duas isoformas principais: C-53 e C-22 (de acordo com o número de aminoácidos de cada) que também formam um anel de 17 aminoácidos, mas carecem do terminal carboxila. De forma similar ao BNP, sua concentração plasmática é baixíssima na ausência de doenças, enquanto sua expressão tecidual é alta, o que corrobora sua via parácrina (SCOTLAND; AHLUWALIA; HOBBS, 2005; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

Além da produção atrial, um análogo renal do ANP, a Urodilatina (URO), é produzida nos rins a partir do metabolismo do pró-ANP por aminoácidos 95-126. Considerada um quarto NP e isolada em 1988 na urina humana por Schulz-Knappe, Forssmann e Herbst; é um peptídeo de 32 aminoácidos que forma o mesmo anel dos tipos anteriores e apresenta um terminal carboxila. Esta é sintetizada nos túbulos distais e ductos coletores, circula em baixos níveis no plasma (9-12 pg/mL), e tem forte ação parácrina na regulação do sódio e do volume de água pelos rins (DRUMMER et al., 1996; MEYER et al., 1996).

Outros peptídeos além dos natriuréticos são sintetizados no intuito de regular a excreção de sódio, havendo a participação não só do rim e do coração, mas também do sistema gastrointestinal e sistema nervoso central. Entre esses podemos citar a UGN, que participa do mecanismo renal que regula o transporte tubular de sódio e contribui para a natriurese induzida pela ingestão aumentada de sal na dieta (MENETON et al., 2005).

1.3.1 Receptores para Peptídeos Natriuréticos

O GMPc, ou monofosfato cíclico de guanosina, é um segundo mensageiro importante que está envolvido em diversas funções do organismo. A concentração intracelular do GMPc regula a fisiologia celular pela ativação de proteínas quinases ou alteração da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos através da regulação de fosfodiesterases (PDEs) (LUCAS et al., 2000).

A guanilato ciclase (GC) representa um grupo de proteínas que possuem uma função enzimática comum, a produção de GMPc, mas diferem quanto a sua seletividade na ativação por ligantes (WALDMAN; MURAD, 1987). Essa enzima é encontrada em duas formas principais: Solúvel e Particulada. A ativação da forma solúvel ocorre em resposta ao óxido nítrico (NO). Já a ativação da forma particulada se dá em resposta aos NPs e às guanilinas, que atuam como agonistas para os receptores para Peptídeos Natriuréticos (NPRs), produzindo ações biológicas através desta ligação (DANIELS; MAISEL, 2007; KUHN, 2004).

Quatro subtipos de receptores para Peptídeos Natriuréticos (NPRs) foram identificados e chamados de NPR-A, NPR-B, NPR-C e NPR-D (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009). Os receptores NPR-A (ou GC-A) e NPR-B (ou GC-B) consistem de duas proteínas monoméricas transmembrana com uma massa molecular de 120-140 kDa (CHINKERS et al., 1989; KOLLER et al., 1991). Foram os primeiros clonados de tecidos de mamíferos, sendo que o NPR-A tem como agonistas o ANP e o BNP, enquanto o NPR-B tem o CNP como agonista (POTTER et al., 2009; SINDICE; SCHLATTER, 2006).

A estrutura geral dos NPRs consiste em quatro principais regiões: um domínio NH₂-terminal altamente variável (ECD), que funciona como ligante dos peptídeos endógenos; uma porção intracelular composta por um domínio conservado com homologia de quinase (KHD); uma hélice anfipática ou região de charneira; e um domínio catalítico altamente conservado localizada na região COOH terminal da proteína, com homologia de GC (CHD) (Figura 3) (CHINKERS et al., 1989; KRAUSE et al., 1997).

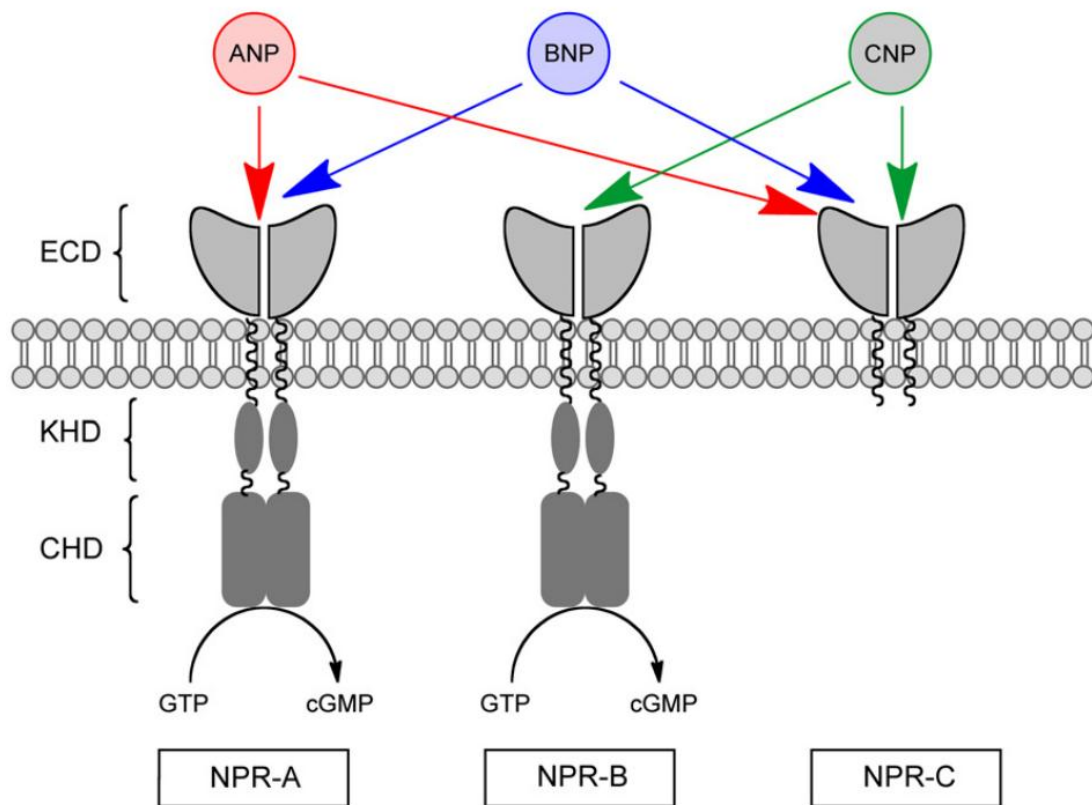
O KHD é responsável pela repressão da atividade enzimática e é necessário para a ativação ligante-dependente do CHD (CHINKERS; GARBERS, 1989). O GMPc é sintetizado pelo CHD ativado, que se baseia na dimerização do receptor controlado pela região de charneira entre o KHD e o CHD (THOMPSON; GARBERS, 1995; WILSON; CHINKERS, 1995).

Existem, contudo, certas diferenças entre os receptores. NPR-A e NPR-B possuem o KHD e o CHD, estando envolvidos na cascata de sinalização dependente de GMPc; NPR-C e NPR-D, entretanto, não possuem estes domínios. Outra característica é que receptores A, B e D são expressos como tetrâmeros e o receptor C como um dímero. Os estudos sobre o NPR-D ainda são muito limitados (ROSE; GILES, 2008; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

O NPR-C é uma proteína homodimérica de 60-70 kDa. É um receptor truncado que possui um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático curto, com ausência do KHD, da região de charneira e CHD (FULLER et al., 1988). Por não possuir o domínio intracelular de GC, este age como receptor de *clearance* (depuração), modulando a disponibilidade dos NPs endógenos nos órgãos-alvo através do

acoplamento à proteína-G, inibição da adenilato ciclase e ativação da fosfolipase C, provocando internalização desses (ANAND-SRIVASTAVA, 2005; MURTHY et al., 2000). Embora a função fisiológica exata deste receptor ainda não tenha sido completamente descoberta, sua potencial atividade biológica é tida principalmente como a capacidade de ligação ao CNP preferencialmente ao ANP ou BNP (RUBATTU et al., 2010).

Figura 3 – Receptores para os peptídeos natriuréticos NPR-A, NPR-B e NPR-C e seus respectivos peptídeos ligantes. A figura representa o domínio de ligação do ligante extracelular (ECD), o domínio conservado com homologia de quinase (KHD), a hélice anfipática (região de charneira) e o domínio catalítico com homologia de guanilato ciclase (CHD).



Fonte: VINK e colaboradores (2012).

Três são os mecanismos de depuração dos NPs: ligação a receptores de *clearance* na superfície celular (NPR-C), com subsequente internalização celular e degradação lisossomal (KOH et al., 1992), previamente descrita; clivagem proteolítica por endopeptidases, como endopeptidase neutra 24.11 (NEP) (KENNY; BOURNE; INGRAM, 1993) e filtração renal (BARGNOUX et al., 2008).

A NEP, também denominada neprilisina, é uma metaloprotease ligada à membrana de 87-96 kDa que é amplamente expressa nos rins, pulmões e paredes dos vasos. Hidrolisa ligações peptídicas no lado amino dos resíduos hidrofóbicos, inativando assim os NPs pela abertura da sua estrutura em anel de 17-resíduos (CHEN; BURNETT JR, 2006; RADEMAKER; RICHARDS, 2005; ROQUES et al., 1993). A ordem de afinidade desta enzima aos NPs é: CNP>ANP>BNP (KENNY; BOURNE; INGRAM, 1993). A URO, contraditoriamente, não é hidrolisada pela NEP (ABASI et al., 1994).

Já a filtração renal é responsável pela depuração de fragmentos amino-terminais de pró-NPs, como o NT-proBNP, uma vez que é necessário órgãos com alto grau de fluxo sanguíneo para eliminação dessas moléculas (DANIELS; MAISEL, 2007; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

1.3.2 Efeitos Biológicos dos Peptídeos Natriuréticos

Os NPs têm significativa participação na regulação na homeostasia cardiovascular, renal e neuroendócrina (CHEN; BURNETT JR, 2006; MORO; LAFONTAN, 2013; WOODARD; ROSADO, 2008). As ações fisiológicas e patológicas dos NPs diferem entre si, mas de uma forma geral, como o próprio nome indica, possuem: ação diurética e natriurética (importantes no controle do volume de líquido corporal e osmolaridade), ação inibidora de renina, vasodilatadora, lusitropica positiva, além de efeitos antiisquêmico e anti-mitogênico (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008; OMLAND; HAGVE, 2009).

Os efeitos dos peptídeos natriuréticos estão relacionados a ações centrais (inibição do centro da sede, inibição do apetite ao sal e dos hormônios ADH e ACTH) e periféricas (SUZUKI et al., 2001). O ANP e o BNP se ligam ao NPR-A e a estimulação deste receptor (bem como do NPR-B), induzem a produção do GMPc intracelular, a partir do GTP, necessário aos efeitos fisiológicos dos mesmos (BOERRIGTER; BURNETT JR, 2004; MORO; LAFONTAN, 2013).

O principal efeito renal dos NPs que agem por essa via (ANP e BNP) consiste em aumentar a excreção de sódio e de água pelo rim, contribuindo para o balanço hidroeletrólítico. A ação diurética destes se deve a hemodinâmica renal e a ações tubulares diretas (CURRY, 2005; SCOTLAND; AHLUWALIA; HOBBS, 2005; STABELI et al., 2004).

Os sítios renais da ação do ANP incluem: ducto coletor medular interno, glomérulo e células mesangiais. As ações intracelulares do ANP nas células renais incluem a estimulação

da atividade de GC e redução nas atividades de adenilato ciclase e fosfolipase C, o influxo de sódio, e concentrações intracelulares de cálcio (PANDEY, 2005).

O GMPc produzido regula o transporte de sódio e cloreto diurético-sensível em células do epitélio tubular renal. Desse modo, o ANP inibe a reabsorção tubular de água nos túbulos distais e coletores do néfron e produz natriurese através da inibição da reabsorção de sódio na porção medular do ducto coletor (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; POTTER et al., 2009).

Inibe tanto o transporte de sódio e água no túbulo proximal induzido por angiotensina II (ANG II), quanto o transporte tubular de água no túbulo coletor por antagonismo do ADH. Provoca aumento do aporte de sódio à mácula densa inibindo a secreção de renina e a produção de ANG II e endotelina-1 (POTTER et al., 2009; STABELI et al., 2004). O ANP também inibe as ações tubulares distais da aldosterona. Este mecanismo ocorre pela inibição da síntese e liberação deste hormônio a partir de células da zona glomerulosa adrenal, por ativação da GC e da condutância dos canais para potássio (PANDEY, 2005).

A infusão do ANP promove aumento significativo no fluxo sanguíneo da vasa recta, mas estudos *in vivo* da papila renal revelaram que tais incrementos podem apresentar atraso em relação ao início da natriurese e diurese, sugerindo que o efeito natriurético inicial do ANP resulta de outras ações que não sejam o aumento do fluxo sanguíneo (KIBERD et al., 1987; MÉNDEZ et al., 1988).

Um dos principais efeitos vasculares é o relaxamento o músculo liso e aumento da permeabilidade vascular. Este aumento contribui para a hipovolemia, promovendo redistribuição das proteínas plasmáticas e do fluido do espaço intravascular para o espaço intersticial (CURRY, 2005). No rim, o ANP, através do aumento de GMPc, causa relaxamento nas células mesangiais e vasodilatação da arteríola aferente, aumentando o ritmo de filtração glomerular e otimizando a função renal (MELO; ACKERMAN, 2000; SABRANE et al., 2005).

Outros efeitos dos NPs consistem atenuação e/ou inibição dos processos de remodelamento vascular e cardíaco (inflamação, hipertrofia e fibrose), ocorridos na maioria das doenças cardiorrenais, como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e doença renal crônica (BRIET; BURNS, 2012; CALVIERI; RUBATTU; VOLPE, 2012). Eles intervêm, em conjugação com NO e GMPc, na inibição dos efeitos promotores de crescimento produzidos pelo influxo de cálcio induzido pela norepinefrina sobre cardiomiócitos e fibroblastos (CALDERONE et al., 1998).

Em animais e nos seres humanos, infusões intravenosas sustentadas de ANP produzem uma redução dose-dependente da pressão arterial média, devido à queda do débito

cardíaco, contrária a um discreto aumento na resistência periférica total e sem alteração da frequência cardíaca (VINK et al., 2012). Essa diminuição do débito cardíaco se dá pela queda da pressão do átrio esquerdo, devido a uma redução do volume sanguíneo, efeito este, evidenciado por um aumento no hematócrito (WOODS; OLIVER; KORNER, 1989).

O ANP, além de aumentar a aumenta a capacitância venosa, se opõe a quase todas as ações da ANG II na regulação cardiovascular. Uma total ausência de NPR-A causa hipertensão em camundongos e leva a níveis de renina e ANG II alterados, hipertrofia cardíaca e fibrose, e eventos vasculares letais similares aqueles desenvolvidos por pacientes humanos hipertensos não-tratados (HUNT et al., 1996; PANDEY, 2005).

A liberação do BNP resulta na melhora do relaxamento do miocárdio e serve um como um importante papel regulador em resposta a aumentos agudos no volume ventricular, opondo-se a vasoconstrição, retenção de sódio, e os efeitos antidiuréticos do SRAA ativado (DANIELS; MAISEL, 2007). Adicionalmente, através da redução da pré-carga, ambos os peptídeos melhoram a função ventricular e interferem no desenvolvimento de fibroblastos, sendo vasodilatadores e inibindo o crescimento de células vasculares (LAINCHBURY et al., 2000).

Na ICC, pode haver elevação dos níveis de ANP circulante em até 10 vezes, quando ocorre excessiva distensão das paredes de ambos os átrios. Assim, aumento nas perdas renais de sódio e água, previne sintomas extremos nessa doença (GLOBITS et al., 1998). Além disso, a infusão intravenosa de BNP, em indivíduos com essa doença, promove redução, provavelmente secundária a alterações na pressão de enchimento cardíaco, do excesso de noradrenalina cardíaca e renal (BRUNNER-LA ROCCA et al., 2001).

O ANP e BNP também realizam regulação da homeostase energética (MORO; LAFONTAN, 2013; VOLPE, 2014). Via estimulação de NPR-A e consequentemente ativação de GMPc intracelular, promovem lipólise e mobilização dos ácidos graxos livres em adipócitos humanos. Ambos também aumentam a expressão e secreção de adiponectina, uma adipocina com propriedades de sensibilização à insulina (SENGENÈS et al., 2000; TSUKAMOTO et al., 2009).

O CNP, por sua vez, não tem um modo de ação completamente conhecido (SUZUKI et al., 2001). Sabe-se que é liberado pelo endotélio, perde as atividades diurética e natriurética, mas desempenha um papel central nos efeitos parácrinos e autócrinos dos NPs, via GC ligada ao NPR-B (CHEN; BURNETT JR, 2006; STINGO; CLAVELL; AAHURS, 1992).

Estes efeitos incluem a inibição do crescimento das células cardíacas, a apoptose e a proliferação de células do músculo liso e redução da secreção de matriz extracelular

(D'SOUZA; DAVIS; BAXTER, 2004). A rápida liberação de NPs durante breves períodos de isquemia também pode ser protetora ao miocárdio, em infartos de tamanho limitado, após oclusão e reperfusão coronarianas (TAKAGI et al., 2000).

Além disso, o CNP tem função neurotransmissora no SNC, na ativação de fibroblastos e na prevenção do desenvolvimento de fibrose maior que o ANP e o BNP. Também possui participação importante no processo de ossificação endocondral, na função endócrina dos testículos, espermatogênese e função placentária na gravidez (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

Todos os três NPs de mamíferos são também conhecidos por facilitar o reflexo de Bezold-Jarisch pela facilitação de aferentes quimiorreceptivos cardíacos (THOMAS et al., 2002). Este é um quimiorreflexo cardiopulmonar com aferência e eferência vagais – observado experimentalmente no coração – capaz de produzir bradicardia sinusal, vasodilatação periférica e hipotensão arterial, juntamente com sialorreia, náuseas e broncoespasmo (BEZOLD; HIRT, 1867; JARISCH; RICHERTER, 1939).

A URO, assim como o ANP, liga-se ao receptor NPR-A localizado no túbulo renal e músculo liso vascular renal e sua ação consiste em aumentar a diurese, natriurese e uma considerável queda da pressão arterial. Outros efeitos desse peptídeo consistem na broncodilatação pulmonar e inibição da secreção de renina e aldosterona (FORSSMANN et al., 2001). Como todos os NPs, a URO reduz a secreção de renina pela mácula densa e inibe a liberação de aldosterona pela zona glomerulosa e a reabsorção proximal de sódio e água estimulada pela ANG II (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008; VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

1.3.4 Peptídeos Natriuréticos derivados de Venenos Ofídicos

O efeito hipotensor potente produzido pelos NPs contribui para uma rápida perda de consciência em animais envenenados, assim, muitos NPs diferentes, que são equivalentes estruturais e funcionais dos NPs de mamíferos, foram descobertos em venenos de répteis, principalmente de serpentes e lagartos (FAVREAU et al., 2007; FRY et al., 2006; HIGUCHI et al., 2006).

O primeiro peptídeo natriurético proveniente de venenos ofídicos foi isolado por Schweitz e colaboradores em 1992 das glândulas de veneno da *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde) e, hoje, é o mais estudado dentre os NPs ofídicos. Denominado DNP (do inglês “*Dendroaspis* Natriuretic Peptide”), apresenta 38 aminoácidos e é encontrado também em

humanos (SCHIRGER et al., 1999), átrios caninos (LISY et al., 2001) e células musculares lisas de aorta de ratos (CAI et al., 2008; WOODWARD; ROSADO; BROWN, 2001).

O DNP compartilha uma homologia sequencial funcional importante com o ANP, BNP e CNP, sendo um membro da família dos NPs (PIECHOTTA et al., 2008). Possui maior estabilidade a NEP que os três peptídeos de mamíferos, atividade possivelmente atribuída a suas caudas N- e C-terminais alongadas (CHEN; LAINCHBURY; BURNETT JR, 2002).

Embora o DNP tenha sido originalmente identificado em espécies de répteis, o DNP sintético possui efeitos natriurético e diurético (LISY; BURNETT JR, 1999) e vasodilatador em artérias aortas e coronárias com uma potência semelhante à do ANP em mamíferos (COLLINS et al., 2000; LISY et al., 2001; SCHWEITZ et al., 1992). Além disso, a infusão do DNP sintético resulta em diminuição dose-dependente da pressão arterial média e da pressão da artéria pulmonar em cães normais anestesiados (LAINCHBURY et al., 2002).

Dessa forma, o DNP foi considerado como opção de possível fármaco para tratar a ICC. Os 15 resíduos C-terminais de DNP foram fundidos com CNP humano para produzir um peptídeo quimérico variante chamado CD-NP (LISY et al., 2008). O peptídeo resultante continha a sequência de comprimento completo CNP, formando o anel dissulfeto, e um C-terminal alongado originado a partir do DNP. Com isso era esperado um equilíbrio entre a redução da pressão arterial pelo CNP e os efeitos adversos renais causados pelo DNP íntegro.

O CD-NP subsequentemente demonstrou ligação a ambos os receptores fisiológicos NPR-A e NPR-B, devido à presença das duas estruturas: cauda DNP e anel CNP, respectivamente. Mais variantes do CD-NP também foram desenvolvidos para melhorar a sua afinidade de NPR-A (DICKY; BURNETT JR; POTTER, 2008). A primeira fase de ensaios clínicos com essa molécula, a Cenderitida, em indivíduos saudáveis foi bem sucedida, demonstrando uma nova e promissora perspectiva para a utilização de toxinas de venenos ofídicos na descoberta de medicamentos (LEE et al., 2009).

Três outros NPs foram isolados do veneno da Taipan do Interior (*Oxyuranus microlepidotus*), designados TNPa, TNPb e TNPc (FRY et al., 2005). Estes peptídeos contêm 35-39 resíduos e possuem a estrutura em anel de 17 membros, com característica de caudas C-terminais longas. Apesar de todos os peptídeos apresentarem atividade natriurética, apenas o TNPc mostrou potência semelhante ao ANP humano e ao DNP no relaxamento da musculatura lisa e produção de GMPc através de NPR-A de rato (FRY et al., 2005).

NPs em que a sequência de aminoácidos é homóloga à família NP, mas de atividades incomuns têm sido encontrados em peptídeos de venenos ofídicos. Alguns destes incluem a inibição da agregação plaquetária exibida pela Lebetina, isolada da *Macrovipera*

lebetina (BARBOUCHE et al., 1996) e inibição da ECA exibido por um PtNP-a PaNP-c, isolados de dez espécies de elapídeos australianos (FRY et al., 2005; ST. PIERRE et al., 2006). Em alguns casos, nestes peptídeos também não está presente a atividade estimulatória de GMPc, responsável pela natriurese e diurese, podendo ser utilizados para identificar resíduos importantes para ligação e ativação do NPR-A (ST. PIERRE et al., 2006).

Diversos outros NPs derivados de venenos ofídicos de diversas espécie também foram relatados: *Agkistrodon halys blomhoffii* (HIGUCHI et al., 1999; MICHEL et al., 2000), *Bothrops jararaca* (MURAYAMA et al., 1997), *Bitis atropos*, *Bungarus candidus* (TRINH et al., 2010), *Bungarus flaviceps* (SIANG et al., 2010), *Micrurus corallinus* e *Micrurus lemniscatus* (HO et al., 1997), *Pseudocerastes persicus* (AMININASAB et al., 2004) e *Trimeresurus flavoviridis* e *Trimeresurus gramineus* (KOH; KINI, 2012; SITPRIJA, 2012).

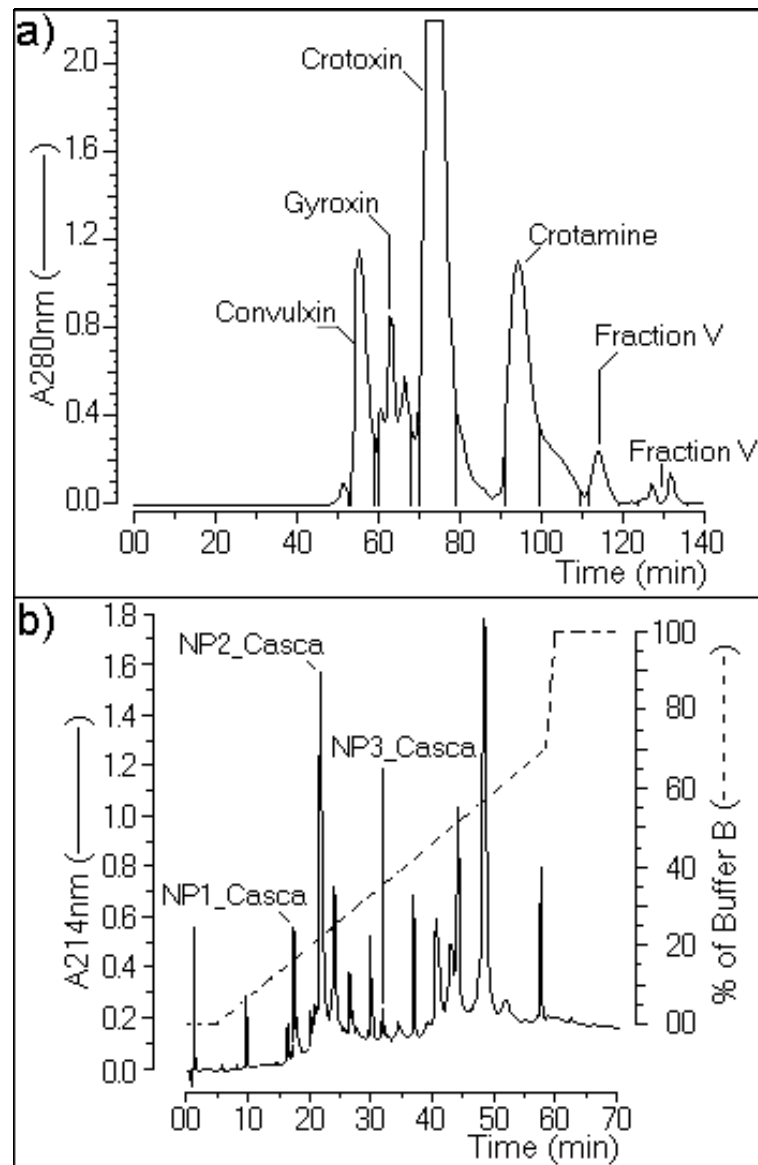
Em 2008, Evangelista e colaboradores, conseguiram isolar um novo peptídeo natriurético do veneno total da serpente *Crotalus durissus cascavella*, que foi denominado NPCasca. O veneno total foi fracionado por uma combinação de dois procedimentos cromatográficos descritos por Toyama e colaboradores (2000). Na primeira etapa foi realizado HPLC de exclusão molecular, seguido de HPLC de fase reversa das frações resultantes V e VI (Figura 4 a/b). Foi realizada então a caracterização de proteínas e peptídeos de baixo peso molecular e a fração resultante foi diretamente submetida a um sequenciamento em um sequenciador automático de aminoácidos (Figura 5 a/b).

Os pesquisadores relataram efeitos vasculares e renais do NPCasca. Em experimentos de perfusão em rim isolado de ratos Wistar, este reduziu o transporte tubular total e proximal de sódio, com aumento na excreção de sódio, demonstrando conseqüentemente um efeito diurético e natriurético.

Nos ensaios de pressão arterial sistêmica *in vivo* com o NPCasca foram observados uma diminuição na pressão arterial média, no débito cardíaco e na frequência respiratória, juntamente com um uma produção aumentada de nitrito, sugerindo uma ação vasoativa. Já nos ensaios de reatividade vascular com anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, o NPCasca apresentou uma ação endotélio-dependente e aparentemente sem envolvimento dos NPRs, sugerindo uma ação possivelmente mediada por canais para potássio.

Figura 4 – Perfis dos dois procedimentos cromatográficos realizados para o fracionamento do NPCasca, segundo Toyama e colaboradores (2000).

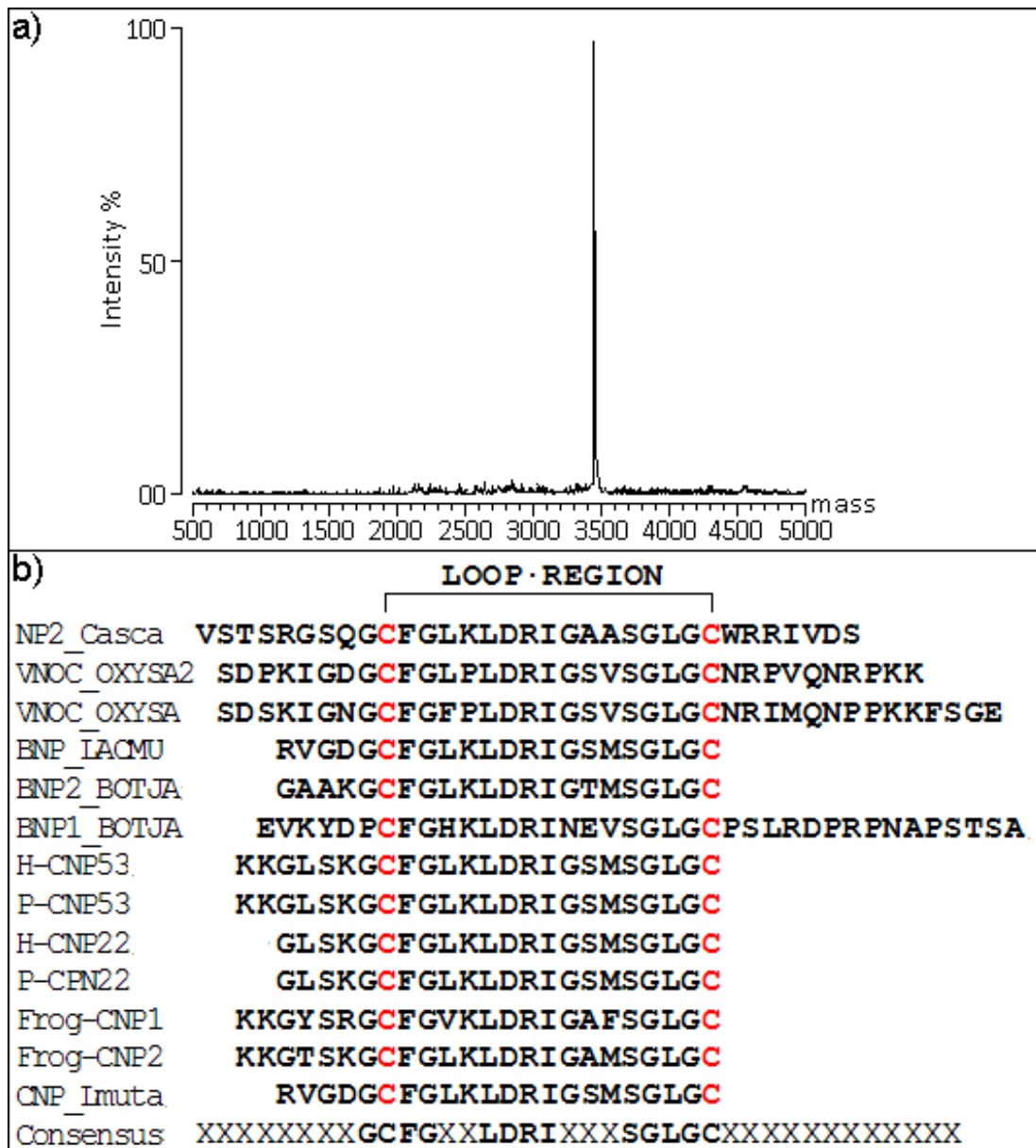
- a) Perfil cromatográfico em HPLC de exclusão molecular do veneno total.
- b) Perfil cromatográfico da fração VI em HPLC de Fase Reversa, identificando NP isolado da Fração VI do veneno bruto, NP2_Casca.



Fonte: EVANGELISTA (2008).

Figura 5 – Perfil de espectrometria de massas e Sequência de aminoácidos do NPCasca.

- a) Espectrometria de massa MALD-TOFF do NP2_Casca;
- b) Sequência completa de aminoácidos do peptídeo, com alinhamento sequencial comparativo entre o NPCasca e outros NPs. VNOC_OXYSA2 e VNOC_OXYSA (Peptídeos Natriuréticos de *Oxyuranus microlepidotus*); BNP_LACMU (BPP/CNP de *Lachesis muta*); BNP2_BOTJA e BNP1_BOTJA (BPP/CNP de *Bothrops jararaca*); H-CNP53 e 22 (CNP humano isoformas 53 e 22); P-CNP (CNP porcino isoformas 53 e 22); Frog-CNP1 e Frog-CNP2 (CNPs isolados de sapo); CNP_Lmuta (CNP de *Lachesis muta*). Abaixo é demonstrada a região consensual entre os NPs em questão.



Fonte: EVANGELISTA (2008).

2 JUSTIFICATIVA

Os NPs tem importante papel como ferramentas diagnósticas auxiliares em pacientes com dispneia, insuficiência cardíaca diastólica, síndrome aguda coronária, doença pulmonar, estados de alto débito cardíaco (sepse, cirrose e hipertireoidismo), fibrilação atrial e doenças renais (DANIELS; MAISEL, 2007). Atualmente, são aprovados para uso na manutenção da insuficiência cardíaca aguda descompensada (CHEN et al., 2000).

O potencial terapêutico desta classe de substâncias, contudo, está além desta indicação e inclui o tratamento crônico da ICC e hipertensão; a prevenção de remodelamento do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio; e a proteção renal durante cirurgias com *bypass* cardiopulmonar (CHEN; BURNETT JR, 2006). Desta forma, aumentar os efeitos fisiológicos benéficos mediados por estas moléculas é visto como uma potencial abordagem terapêutica para o tratamento das doenças cardiorrenais (VOLPE, 2014).

Os NPs encontrados no coração de animais superiores apresentam estrutura muito conservada, com poucas variações, o que não permite estudos de relação estrutura-atividade visando à obtenção de NPs mais atrativos farmacologicamente e na prática clínica (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008). Neste contexto, os venenos de serpentes, principalmente da subfamília *Crotalinae*, são importantes fontes de peptídeos bioativos, como os BPPs (HABERMEHL; FERREIRA, 2000). Além disso, uma ampla variedade de NPs, com grande variedade estrutural, foram descobertos nestes venenos, o que os tornam muito atrativos a comunidade científica (HIGUCHI et al., 1999; LEE HO, 2000).

Muitas pesquisas são realizadas com o intuito de analisar os efeitos das frações derivadas de venenos e toxinas ofídicas nos tecidos (efeitos coagulativos, hemorrágicos, neurotóxicos, miotóxicos, entre outros) e também para a descoberta de novas ferramentas fisiológicas e farmacológicas para o estudo das células animais (KOH; KINI, 2012; MARSH; WILLIAMS, 2005). Entretanto, apenas um único trabalho foi realizado sobre ações diretas ou indiretas deste peptídeo natriurético isolado do veneno total da *C. d. cascavella* (EVANGELISTA et al., 2008).

Diante do exposto, confirma-se a relevância do estudo das ações renais decorrentes desta molécula em modelos experimentais *ex vivo* e *in vitro* e suas conseqüentes alterações morfológicas em tecido renal.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Sintetizar em fase sólida o Peptídeo Natriurético isolado do Veneno Total de *Crotalus durissus cascavella* (NPCdc) e avaliar suas ações renais, na busca de uma ferramenta farmacológica e perspectiva de um novo agente terapêutico.

3.2 Específicos

- Realizar a síntese em fase sólida de NPCdc, necessária aos ensaios biológicos posteriores.
- Estudar os potenciais efeitos do NPCdc sobre a fisiologia renal através de perfusão de rim isolado de rato, comparando esses aos resultados obtidos previamente com o NPCasca.
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas em tecido renal provocadas pelo NPCdc através de microscopia óptica.
- Estudar os efeitos promovidos pelo NPCdc em cultura de células renais MDCK e LLC-MK₂

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do NPCdc Sintético

A síntese em fase sólida do NPCasca, agora denominado em sua forma sintética, NPCdc, foi realizada pela empresa brasileira GenOne[®] Biotechnologies (<http://www.genone.com.br>). A empresa norte-americana LifeTein[®] (<http://www.lifetein.com/>) ficou responsável pela certificação de análise de peptídeo personalizado e também pela dessalificação das amostras e o seu respectivo envio.

4.2 Perfusão de Rim Isolado

4.2.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 280 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os mesmos foram acondicionados em caixas de polipropileno, climatizados entre 22±0,5 °C, permanecendo sob sistema controlado de circulação de ar, umidade e luminosidade (12h de ciclo claro/escuro).

Esses animais receberam ração padrão (Biotec[®]) e água “*ad libitum*”, com exceção das 12h que precederam os experimentos de perfusão renal, nas quais foram mantidos em jejum alimentar e água “*ad libitum*”. Toda a metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo 79/08.

4.2.2 Sistema de Perfusão de Rim Isolado

Os rins isolados permitem o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas (NIZET, 1975). O método de perfusão de rim isolado consiste em acoplar um rim a um sistema desenvolvido para simular as condições encontradas por esse órgão no organismo vivo. Dessa forma, pode-se observar a atividade renal de substâncias sem que haja qualquer interferência endógena. Nos últimos 40 anos, essa técnica tem sido utilizada para investigar os aspectos da fisiologia, farmacologia e farmacocinética renais (WANG, 2004).

As primeiras perfusões foram realizadas por Löbell em 1849. Desde então, várias alterações foram realizadas no sistema e este foi sendo modificado (BOWMAN, 1970; COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; FONTELES, 1980; FONTELES et al., 1983; ROSS et al., 1973). Essas mudanças advieram dos avanços no conhecimento da fisiologia renal e da descoberta de novas substâncias, permitindo a melhoria das perfusões.

Figura 6 – Foto do sistema de perfusão de rim isolado.



Fonte: LAFAVET – UFC.

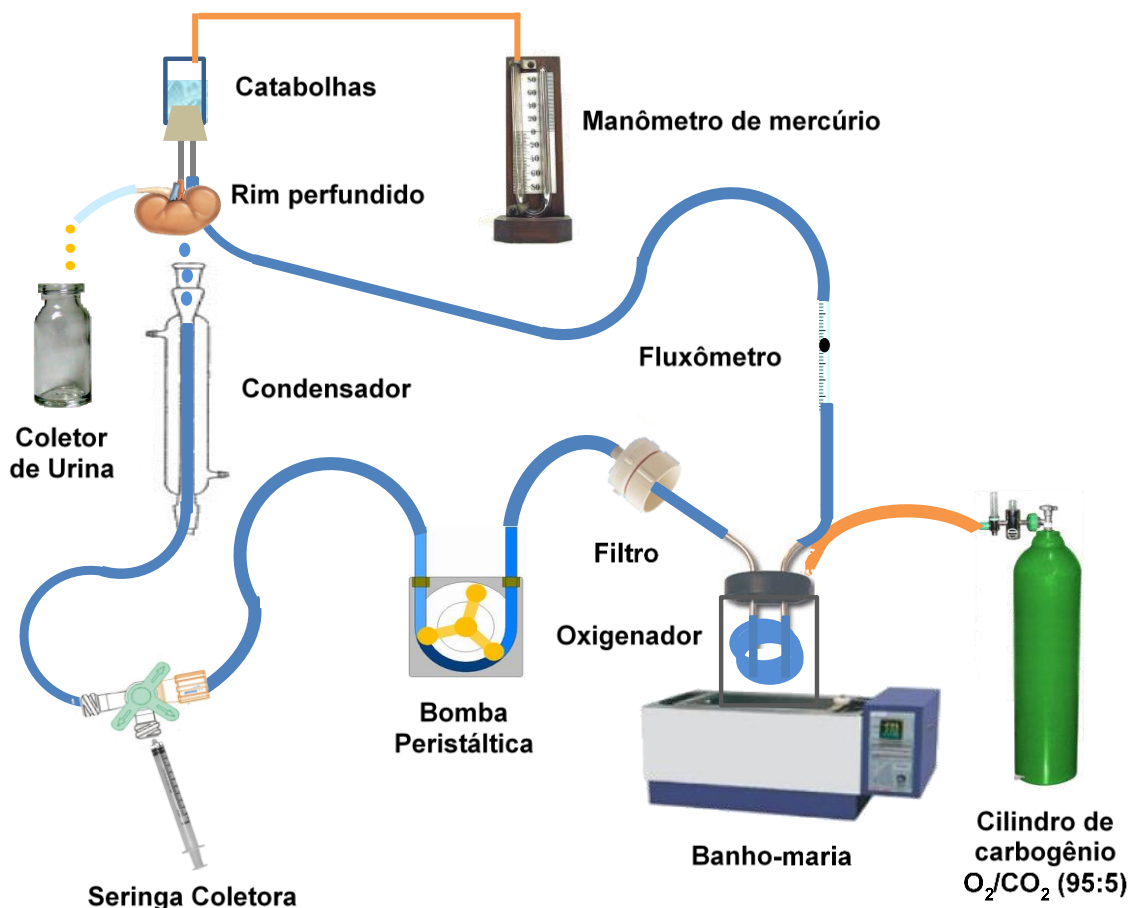
Existem dois tipos de sistema de perfusão renal: aberto, no qual o perfusato não recircula pelo rim; e fechado, onde ocorre a recirculação. O sistema utilizado no presente trabalho consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES et al., 1983) e dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à mesma temperatura de 37 °C (Figura 6). Este sistema foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978), modificado em nosso laboratório

pela adição de um pulmão artificial para melhorar a oxigenação (HAMILTON et al., 1974) e pela utilização de um filtro miliporo de 1,2 μm (PEGG, 1971).

Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização, em menor volume, de albumina bovina (fração V, 6g%) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema (LIMA; MONTEIRO; FONTELES, 1992; MONTEIRO, 1990). Desse modo, esse sistema é mais econômico, já que o perfusato liberado pela veia renal é reutilizado. Portanto, menos albumina é utilizada, diminuindo o custo do projeto.

O sistema utilizado é constituído dos seguintes componentes (Figura 7):

Figura 7 – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.



Fonte: Adaptado de LAFAVET – UFC.

- Banho-maria – manutenção de uma temperatura constante do pulmão tipo silástico entre 36-37 °C.
- Bomba peristáltica – bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema.
- Catabolhas – evita a entrada de bolhas nos rins (embolia).

- d) Cilindro de carbogênio – cilindro contendo mistura gasosa carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂).
- e) Coletor de urina – frasco que coleta a urina. É trocado a cada 10 min.
- f) Condensador – mantém a solução aquecida na temperatura de 37 °C durante todo o experimento.
- g) Filtro (Millipore 5 µm) – promove a filtração da solução perfusora.
- h) Fluxômetro – medida do fluxo de perfusão (L/h).
- i) Manômetro de mercúrio – medida da pressão de perfusão (mmHg).
- j) Oxigenador – pulmão artificial tipo silástico para promoção das trocas gasosas (95% O₂ e 5% CO₂).
- k) Seringa coletora – seringa coletora de perfusato. Realizada coleta a cada 10 min.

4.2.2.1 Preparação do Sistema de Perfusão de Rim Isolado

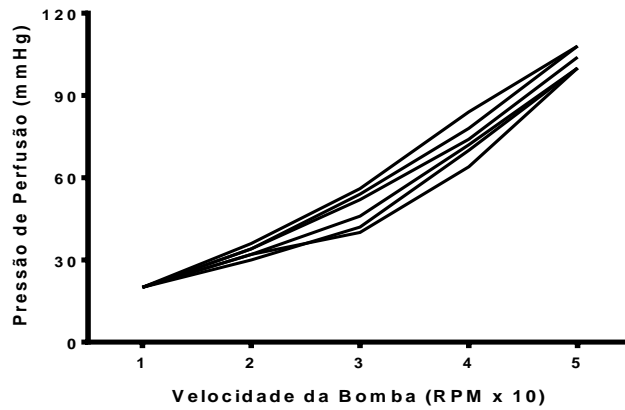
Antes de cada experimento, o sistema foi cuidadosamente limpo, montado e calibrado. A presença de qualquer vazamento ou obstrução de fluxo foi sempre verificada e, quando encontrada, solucionada.

A calibração do sistema se deu sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37 °C, coletada por um minuto em proveta milimetrada. O objetivo deste procedimento foi verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema.

Foi avaliado em cada uma das bombas (1, 2, 3, 4 e 5) a Pressão de Perfusão (mmHg); o Volume de NaCl 0,9% (mL/min); e o Valor Registrado pelo Fluxômetro (L/h). Para tanto, os resultados dessas calibrações foram compilados em curvas, onde foi plotada a velocidade da bomba no eixo das abscissas (x) em relação às variáveis supracitadas no eixo das ordenadas (y).

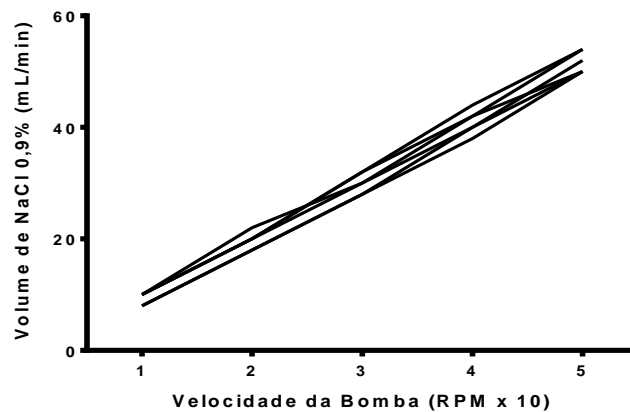
Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 min. As figuras 8, 9 e 10 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

Figura 8 – Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).



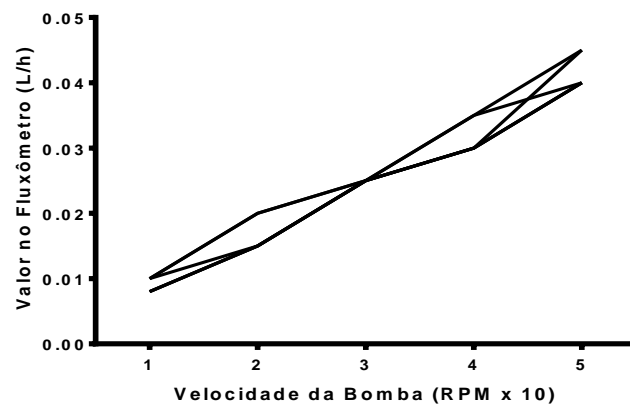
Fonte: LAFAVET – UFC.

Figura 9 – Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).



Fonte: LAFAVET – UFC.

Figura 10 – Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6).



Fonte: LAFAVET – UFC.

4.2.3 Solução Perfusora

A solução empregada no sistema de perfusão renal é a de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES et al., 1998), concentrada 20 vezes, cuja composição é: NaCl = 138 g; KCl = 7 g; NaH₂PO₄.H₂O = 3,2 g; MgSO₄.7H₂O = 5,8 g e Ureia = 10 g. 48h antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO₃ = 4,2 g; CaCl₂.2H₂O = 0,74 g; Glicose = 2 g e Penicilina G potássica cristalina = 0,05 g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada.

Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina fração V (6 g%) (LIMA; MONTEIRO; FONTELES, 1992; MONTEIRO, 1990). Esta solução final foi dialisada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK; LITTLE, 1977; HANSON; BALLARD, 1968; ROSS, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24h. No final, após 48h de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15 g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 a 7,4.

4.2.4 Técnica Cirúrgica

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Tiopental Sódico (Thiopentax, Cristália[®]) na dose de 50 mg/Kg de massa corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Bahlmann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978) e Fonteles e colaboradores (1983). A figura 11 ilustra sucintamente o protocolo descrito abaixo.

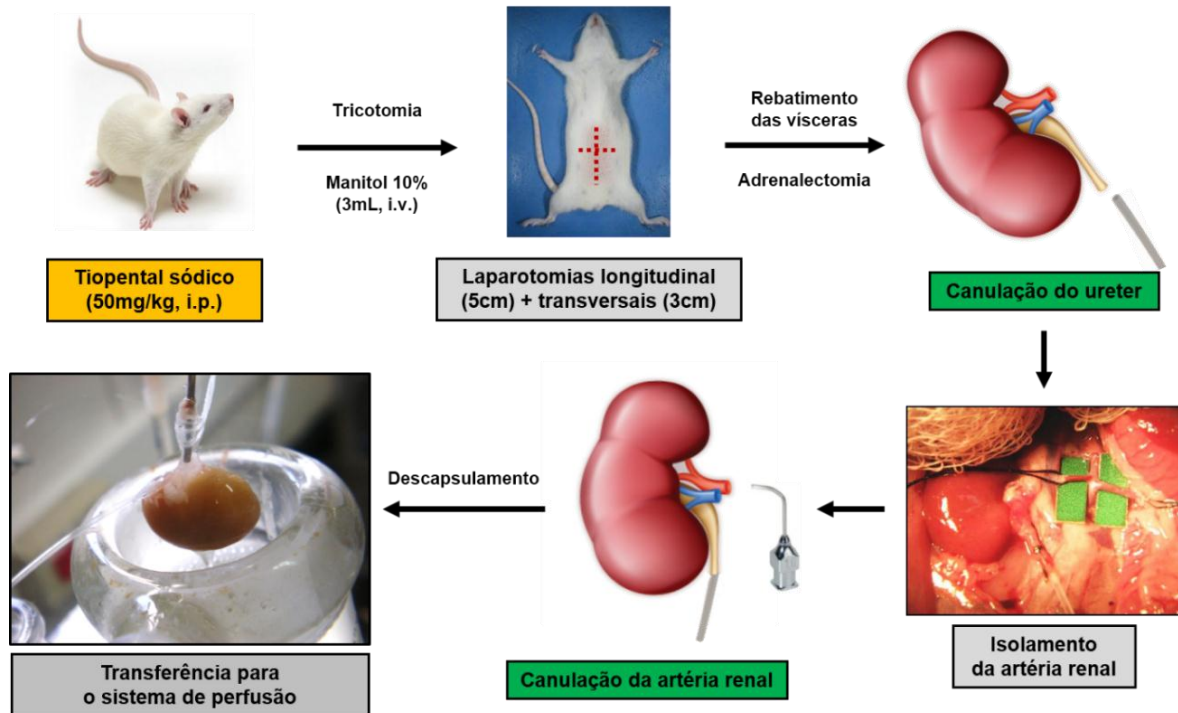
Inicialmente, a veia femoral foi isolada e 3 mL de Manitol 10% foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter. Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana de aproximadamente 5 cm, seguida de duas incisões perpendiculares à linha alba de aproximadamente 3 cm para uma melhor observação das estruturas anatômicas.

Rebateu-se as vísceras para a esquerda, permitindo a visualização do rim direito e amarrou-se e retirou-se a glândula suprarrenal a fim de que nenhum de seus hormônios viesse a influenciar os resultados do experimento. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30.

A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica anterior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada

para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *ex vivo*, sem a interrupção do fluxo.

Figura 11 – Desenho esquemático do procedimento anestésico e cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.5 Protocolo Experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. A pressão de perfusão e o fluxo foram mantidos constantes durante os 30min iniciais, período considerado como controle interno. Após este, foi adicionada a substância-teste e observadas as mudanças nos parâmetros renais até os 120min. A cada 5min foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min.

Amostras do perfusato (1,5 mL) e da urina foram coletadas a cada 10min durante os 120min totais e depois congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), ritmo de filtração

glomerular (RFG), *clearance* osmolar (COsm) e transporte tubular total e proximal de sódio (%TNa⁺ e %pTNa⁺), potássio (%TK⁺ e %pTK⁺) e cloreto (%TCl⁻ e %pTCl⁻).

4.2.5.1 Grupos Experimentais

O estudo dos efeitos do NPCdc sobre a função renal foi iniciado após o período de controle interno de 30min e as observações foram feitas durante os 90min seguintes. Cada grupo experimental foi composto por seis experimentos (n=6). Os cinco grupos analisados foram os seguintes:

- a) Grupo Controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada;
- b) Grupo 0,03 µg/mL: rins perfundidos com NPCdc na concentração de 0,03 µg/mL;
- c) Grupo 0,1 µg/mL: rins perfundidos com NPCdc na concentração de 0,1 µg/mL;
- d) Grupo 0,3 µg/mL: rins perfundidos com NPCdc na concentração de 0,3 µg/mL.
- e) Grupo 1 µg/mL: rins perfundidos com NPCdc na concentração de 1 µg/mL.

4.2.6 Análises Bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos-seletivos (RapidChem 744, Bayer[®] Diagnostica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles e colaboradores (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – Vapro 5520, WESCOR[®]).

4.2.7 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais

As fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais são apresentadas no quadro 1 (FONTELES, 1980; MARTINEZ-MALDONADO; OPAVA-STITZER, 1978).

Quadro 1 – Parâmetros utilizados para determinação das funções renais (contendo símbolos, unidade de medidas, forma de cálculo empregando fórmulas, aparelhos ou método de dosagem ou inferência).

Parâmetros renais	Fórmula
PP (mmHg): Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro de mercúrio
FU (mL.g⁻¹.min⁻¹): Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹): Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} /DOP _{in}) x FU, onde DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato
FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹): Fluxo de Perfusão Renal	Registrado a cada 10min/peso do rim/intervalo de tempo
RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹): Resistência Vascular Renal	RVR = PP (mmHg) / FPR
FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Sódio Filtrado	FNa⁺ = RFG x PNa ⁺
ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Sódio Excretado	ENa⁺ = FU x UNa ⁺
TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Sódio Transportado	TNa⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺
%TNa⁺: Percentual de Sódio Transportado	%TNa⁺ = TNa ⁺ / FNa ⁺ x 100
%TpNa⁺: Percentual Proximal de Sódio Transportado	%TpNa⁺ = pTNa ⁺ /FNa ⁺ x 100
FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Potássio Filtrado	FKa⁺ = RFG x PKa ⁺
EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Potássio Excretado	EK⁺ = FU x UKa ⁺
TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Potássio Transportado	TK⁺ = FK ⁺ - EK ⁺
%TK⁺: Percentual de Potássio Transportado	%TK⁺ = TK ⁺ / FK ⁺ x 100
%TpK⁺: Percentual Proximal de Potássio Transportado	%TpK⁺ = pTK ⁺ /FK ⁺ x 100
FCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Cloreto Filtrado	FCl⁻ = RFG x PCl ⁻
ECl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Cloreto Excretado	ECl⁻ = FU x UCl ⁻
TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹): Cloreto Transportado	TCl⁻ = FCl ⁻ - ECl ⁻
%TCl⁻: Percentual de Cloreto Transportado	%TCl⁻ = TCl ⁻ / FCl ⁻ x 100
%TpCl⁻: Percentual Proximal de Cloreto Transportado	%TpCl⁻ = pTCl ⁻ /FCl ⁻ x 100
COsm (mL.g⁻¹.min⁻¹): Clearance osmolar	COsm = (U _{osm} / P _{osm}) x FU, onde U _{osm} = osmolaridade urinária e P _{osm} = osmolaridade do perfusato

Fonte: Adaptado de LFAVET – UFC.

4.2.8 Análise Histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados inicialmente em formol 10% por 24h, seguido de armazenamento em álcool 70% até o posterior exame histológico.

Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 2 µm. Foi realizada coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico trinocular BA310 (Motic®) com câmera acoplada (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e uso do programa Motic® Image Plus 2.0.

Todas as lâminas dos rins submetidos à perfusão foram confeccionadas e avaliadas no Laboratório de Histologia Veterinária, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

4.3 Ensaios de Cultura e Viabilidade Celular

4.3.1 Linhagens Celulares

Duas linhagens celulares foram utilizadas: células tubulares epiteliais renais MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) e LLC-MK₂ (Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Kidney Epithelial Cells). Ambas foram cedidas pela Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins e os experimentos desta etapa foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LCC – UFC).

4.3.2 Cultivo e Tratamento das Células MDCK e LLC-MK₂

A figura 12 ilustra sucintamente o protocolo descrito a seguir. As células MDCK e LLC-MK₂ foram cultivadas em frascos plásticos com meio RPMI 1640 (contendo insulina, hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, transferrina, prostaglandinas e L-glutamina) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 95% e umidade e 5% de CO₂. Em seguida, foi realizada a observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24h (BUTLER; DAWSON, 1992).

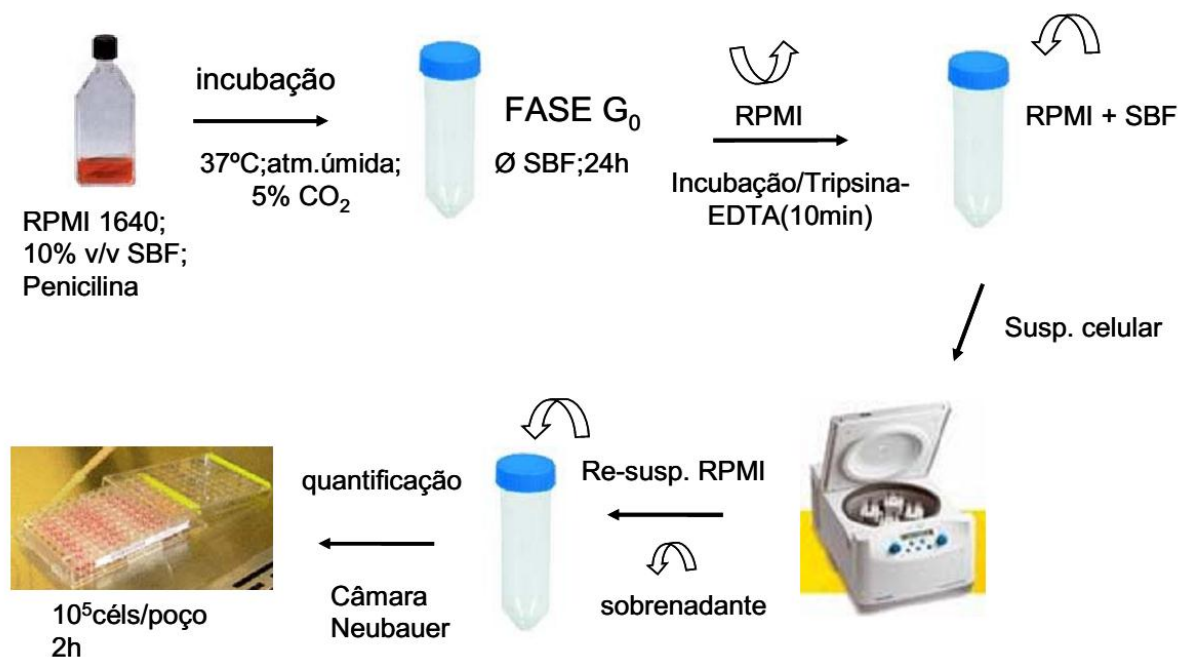
Estas linhagens celulares são aderentes e formam uma monocamada sobre a superfície da garrafa de cultivo. Após confluência, onde toda a superfície de cultivo foi

preenchida, as células foram deslocadas utilizando tripsina-EDTA (0,05%/0,02%) e a suspensão celular foi redistribuída para outras garrafas de cultivo, expandindo a cultura celular. As alíquotas de células para estoque foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENEY, 2010).

As células MDCK e LLC-MK₂ foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24h para sincronizá-las entre as fases G₀ e G₁ do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10min em estufa de CO₂ a 37 °C, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5min a 4000 rpm.

Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas a 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24h do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do NPCdc (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL). Durante o experimento as placas foram avaliadas com 24h de cultivo, usando microscópio de inversão. Após esse período, foi realizado ensaio de viabilidade celular descrito a seguir.

Figura 12 – Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK e LLC-MK₂.



Fonte: PEREIRA (2009).

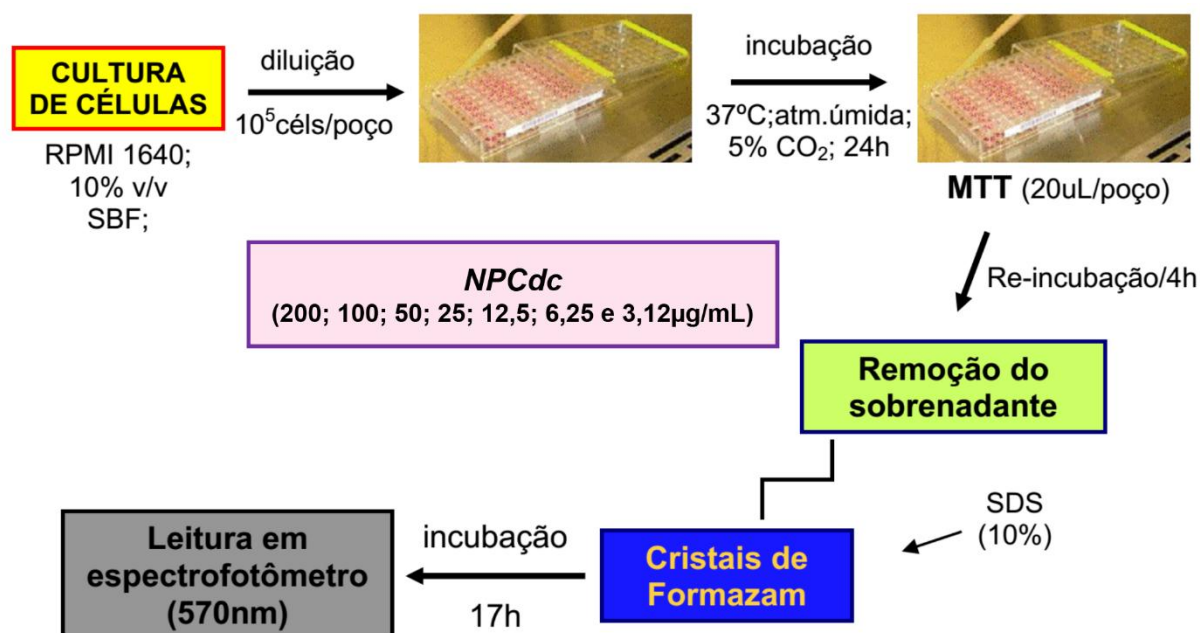
4.3.3 Estudo da Viabilidade Celular *in vitro*

4.3.3.1 Ensaio com MTT

Este ensaio consistiu em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossômicas. A figura 13 ilustra sucintamente este protocolo.

O MTT não interage diretamente com as desidrogenases, mas com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570nm de absorbância. A intensidade da coloração do produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH et al., 2005).

Figura 13 – Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular.



Fonte: Adaptado de PEREIRA (2009).

Ambas as linhagens celulares foram adicionadas às placas de 96 poços com densidade de 1×10^5 células/mL e tratadas com diferentes concentrações do NPCdc descritas anteriormente. Após 24h deste tratamento, foi removido 100 μ L do sobrenadante do meio de cultura e adicionado 10 μ L da solução do MTT (Sigma[®]) dissolvido em PBS.

Após incubação por 4h em estufa com 5% de CO₂ à 37 °C, foi adicionado 90 μ L da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ à 37 °C e após 17h foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

O controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência das células MDCK e LLC-MK₂ tratadas apenas com o veículo de diluição da substância teste e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

4.4 Análise Estatística

Para análise de dados foi utilizado o software estatístico GraphPad[®] Prism v6.0. Nos ensaios de perfusão renal e viabilidade celular, os resultados foram apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.), sempre considerando estatisticamente significativos aqueles que alcançaram a probabilidade de ocorrência da hipótese nula inferior a 5% ($P < 0,05$).

Nos ensaios de perfusão renal, todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo e os dados compilados em intervalos de 30min (30, 60, 90 e 120). As diferenças entre os tempos de um mesmo grupo foram comparadas utilizando teste t de Student. Já as diferenças entre tempos iguais entre os grupos foram comparadas por Análise de Variância Fator Duplo (Two-Way ANOVA), seguida de pós-teste de Bonferroni.

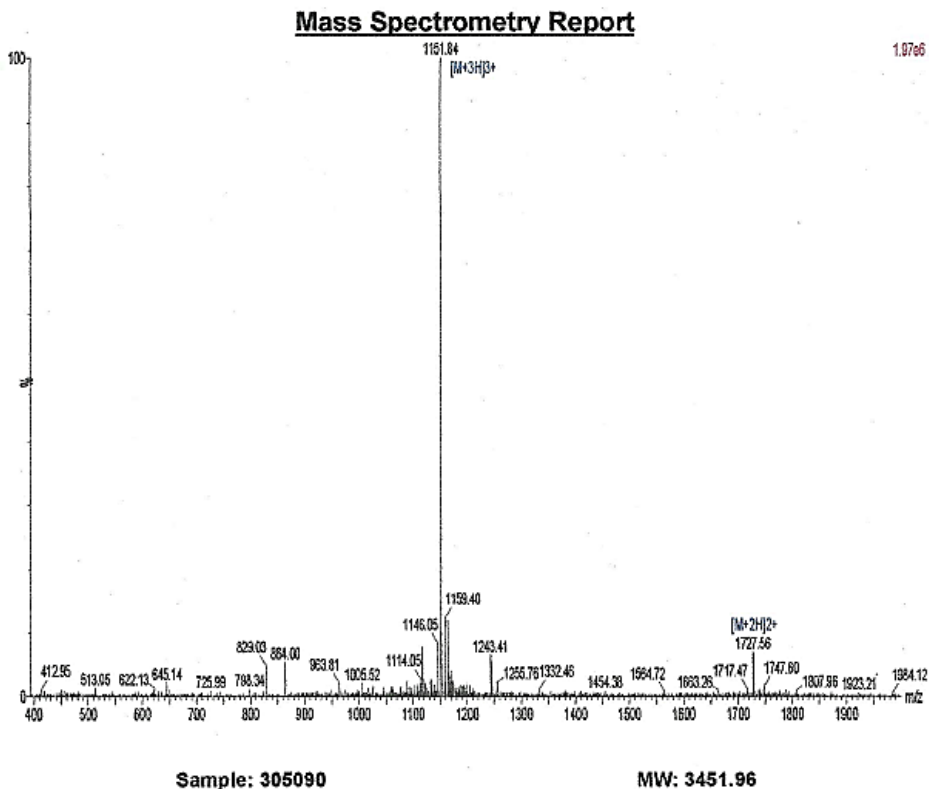
Para os ensaios de viabilidade celular, os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular *versus* concentração do NPCdc. Esses foram comparados por Análise de Variância Fator Único (One-Way ANOVA), seguida de pós-teste de Dunett.

5 RESULTADOS

5.1 Síntese em Fase Sólida do NPCdc

A certificação de análise de peptídeo personalizado do NPCdc realizada pela empresa LifeTein revelou uma pureza de 95,62%, massa molecular de 3.451,96 Da e sequência “VSTSRGSQGCFLKLDRIGAASGLGCWRRIVDS”. O NPCdc apresentou 33 resíduos de aminoácidos, contendo um ponte dissulfeto-cisteína entre os resíduos 10 e 26 (Figura 14).

Figuras 14: Cima – Perfil de espectrometria de massas do NPCdc por MALDI-TOFF. Baixo – Parte do Certificado de Análise de Peptídeos Personalizados, emitido pela LifeTein, do NPCdc, contendo: código, sequência de aminoácidos, observações estruturais, massa total produzida, pureza, fórmula molecular e massa molecular.



Cat. No.	Name	Sequence	Modification	Weight	Purity	Formula	M.W.
305090	VS-33	VSTSRGSQGCFLKLDRIGAASGLGCWRRIVDS{Mono Disulfide bridge}	1mg/vial*50; One disulfide bridge between residues 10-26	60.0mg	95.62%	C ₁₄₆ H ₂₄₀ N ₄₈ O ₄₅ S ₂	3451.96

Fonte: GenOne® Biotechnologies.

5.2 Efeitos do NPCdc na Perfusão de Rim Isolado de Ratos

Após a administração do NPCdc foram observadas alterações na fisiologia renal nos parâmetros avaliados. Com relação aos parâmetros vasculares, a PP apresentou, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, aumento aos 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e diminuição aos em todos os tempos de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1 e Figura 15).

Já a RVR, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, apresentou aumento significativo aos 60, 90 e 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, houve apenas aumento aos 90 e 120min da mesma concentração (Tabela 2 e Figura 16).

Em relação aos parâmetros funcionais renais, o NPCdc provocou, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, aumento do FU aos 90 e 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e redução aos 90 e 120min de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$. Na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, houve aumento do FU aos 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e diminuição aos 90 min e 120min em 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3 e Figura 17).

Já o RFG, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, encontrou-se reduzido em quase todos os tempos das concentrações estudadas, à exceção dos 90min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$. Na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, houve redução em todos os tempos das quatro concentrações testadas (Tabela 4 e Figura 18).

Em relação ao COsm, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, houve aumento nos tempos de 90 e 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e redução nos tempos de 120min de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$. Na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, aumento aos 120min de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e redução aos 90min de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 90 e 120min de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5 e Figura 19).

Tabela 1 – Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>PP (mmHg)</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	106,7±1,40	101,0±3,89	100,2±2,27	100,20±2,27	103,80±2,23
60	104,7±2,68	107,8±5,15	105,3±3,74	96,99±2,84	97,19±2,09*
90	104,3±2,65	110,5±5,26	106,0±5,84	100,70±3,27	95,32±1,74*
120	104,2±0,94	116,2±5,61*	102,2±8,00	100,70±3,59	93,06±1,82*

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 15 – Efeitos promovidos pelo NPCdc na Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

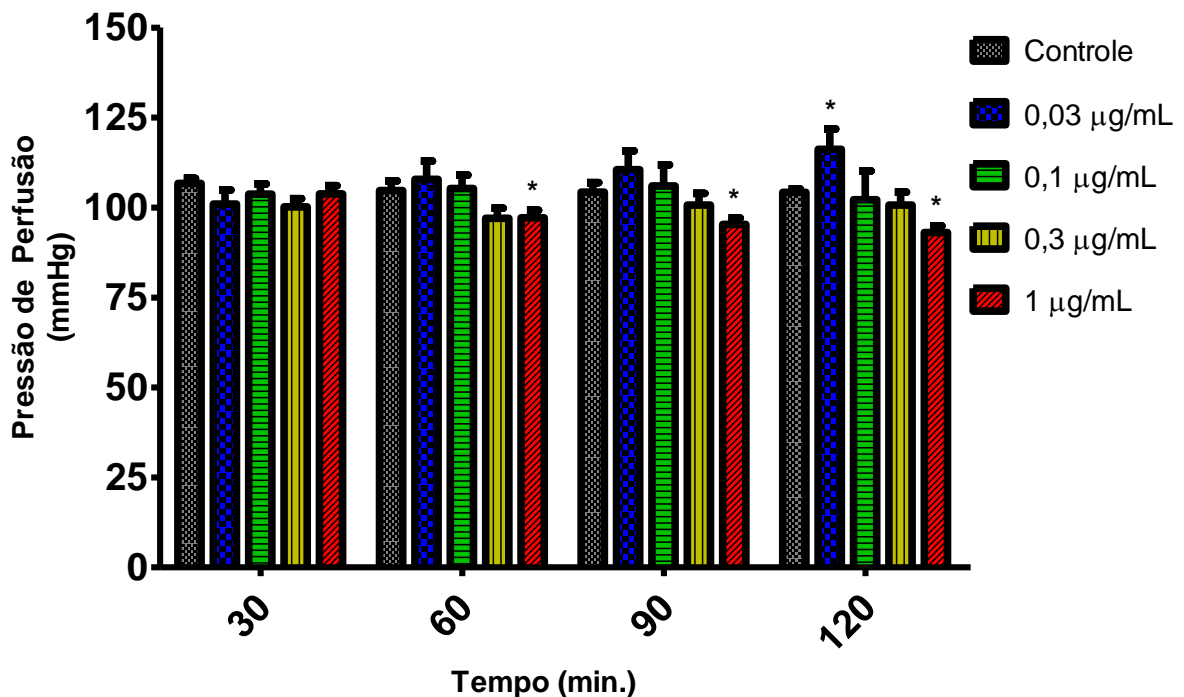
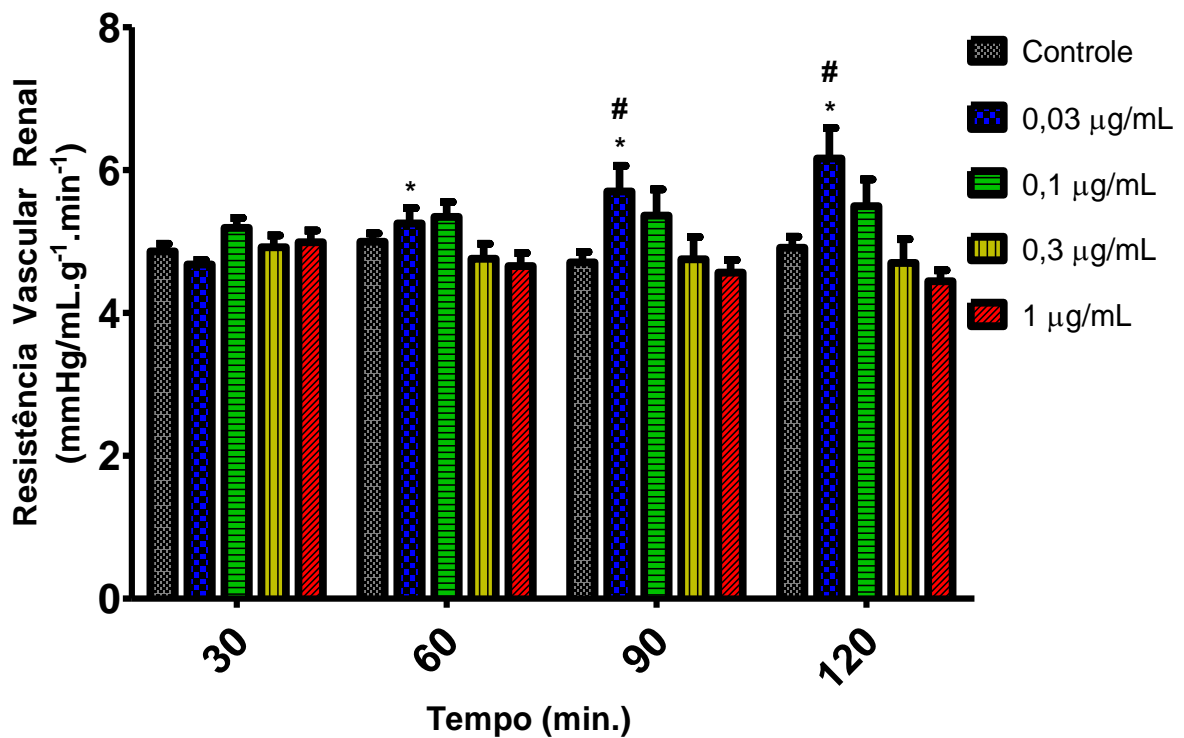


Tabela 2 – Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹)</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	4,86±0,11	4,68±0,06	5,19±0,14	4,92±0,17	4,99±0,17
60	5,00±0,12	5,25±0,22*	5,34±0,21	4,76±0,21	4,66±0,18
90	4,71±0,15	5,70±0,36*#	5,36±0,37	4,75±0,31	4,57±0,18
120	4,91±0,15	6,16±0,43*#	5,50±0,37	4,70±0,33	4,45±0,15

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 16 – Efeitos promovidos pelo NPCdc na Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 3 – Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>FU (mL.g⁻¹.min⁻¹)</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	0,09±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
60	0,09±0,01	0,11±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01
90	0,10±0,01	0,13±0,01*	0,06±0,01*#	0,08±0,01	0,07±0,01*#
120	0,09±0,01	0,16±0,01*#	0,06±0,01*#	0,08±0,01	0,04±0,005*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 17 – Efeitos promovidos pelo NPCdc no Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

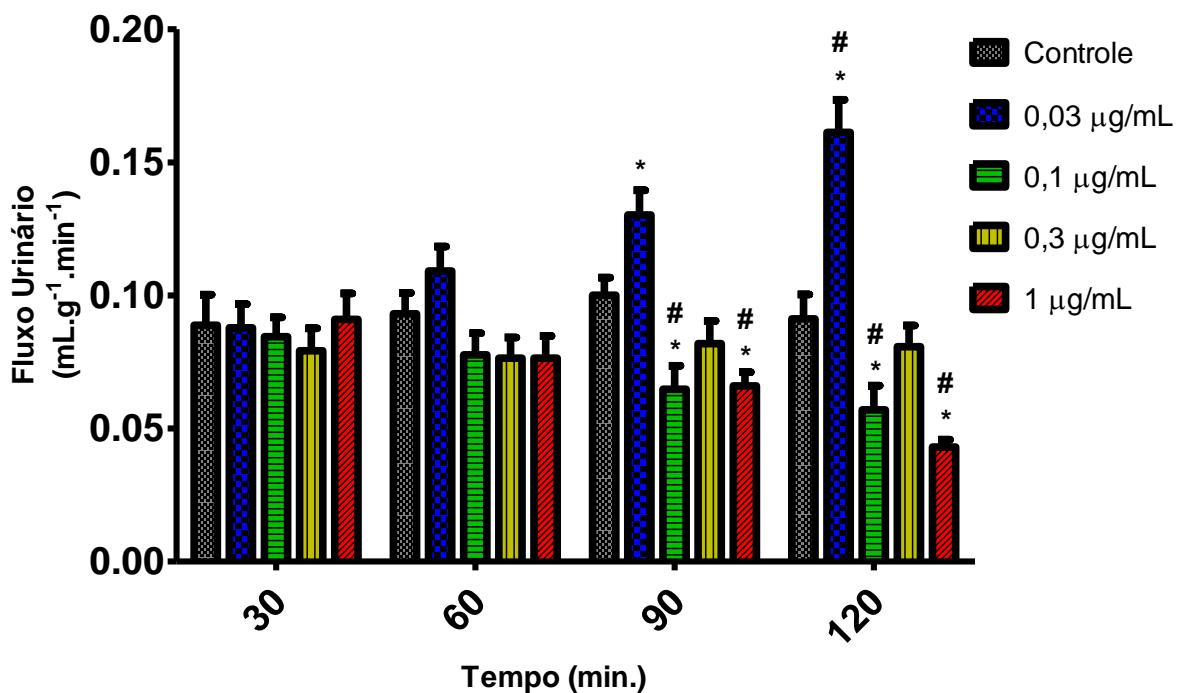
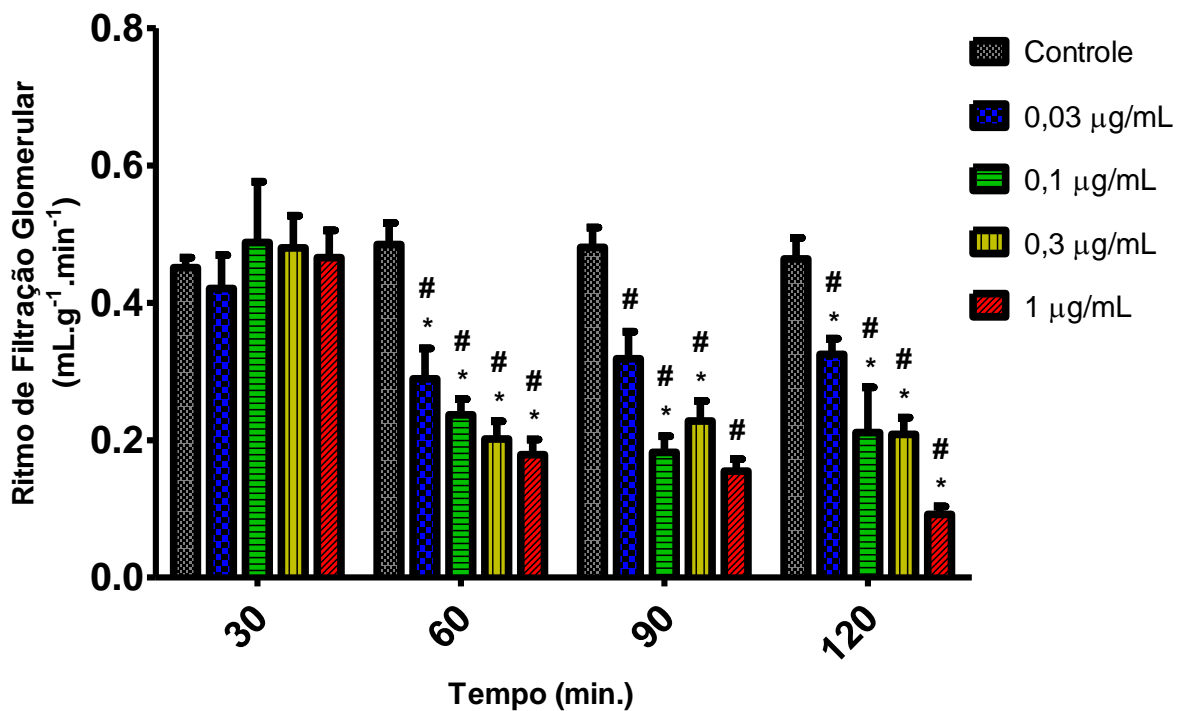


Tabela 4 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹)</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	0,45±0,01	0,42±0,05	0,49±0,09	0,48±0,05	0,47±0,04
60	0,48±0,03	0,29±0,04*#	0,24±0,02*#	0,20±0,03*#	0,18±0,02*#
90	0,48±0,03	0,32±0,04#	0,18±0,02*#	0,23±0,03*#	0,16±0,02#
120	0,46±0,03	0,33±0,02*#	0,21±0,07*#	0,21±0,02*#	0,09±0,01*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 18 – Efeitos promovidos pelo NPCdc no Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



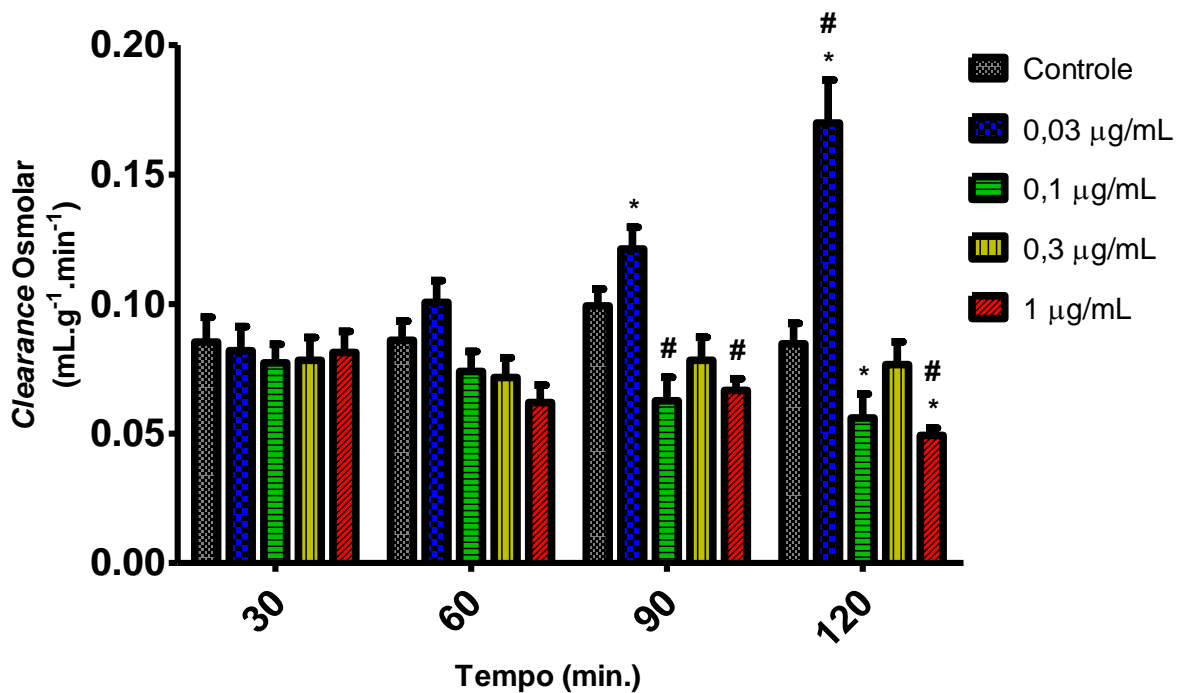
Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 5 – Clearance Osmolar (COsm) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>COsm (mL.g⁻¹.min⁻¹)</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	0,09±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01
60	0,09±0,01	0,10±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01
90	0,10±0,01	0,12±0,01*	0,06±0,01#	0,08±0,01	0,07±0,004#
120	0,08±0,01	0,17±0,02*#	0,06±0,01*	0,08±0,01*	0,05±0,003*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 19 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Clearance Osmolar (COsm) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



Fonte: LAFAVET – UFC.

Em relação ao transporte de eletrólitos, o %TNa⁺, na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno, foi reduzido em todos os tempos das quatro concentrações testadas. Já na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, houve também diminuição do %TNa⁺ em todos os tempos de 0,03 µg/mL e 0,3 µg/mL; aos 120min de 0,1 µg/mL e aos 90 e 120min de 1 µg/mL (Tabela 6 e Figura 20).

O %TpNa⁺ também apresentou redução em todos os tempos das quatro concentrações testadas na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno. Entretanto, na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo, não houve redução do %TpNa⁺ apenas no tempo de 60min de 0,1 µg/mL (Tabela 7 e Figura 21).

O %TK⁺ e %TpK⁺, apresentaram-se reduzidos em todos os tempos de 0,03 µg/mL e 0,3 µg/mL e aos 60min de 1 µg/mL na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno (Tabela 8 e 9; Figuras 22 e 23).

O %TCl⁻ e o %TpCl⁻ foram reduzidos em todos os tempos das quatro concentrações testadas na comparação dos diferentes tempos com o tempo de controle interno e na comparação com controle externo na mesma faixa de tempo (Tabelas 10 e 11; Figuras 24 e 25).

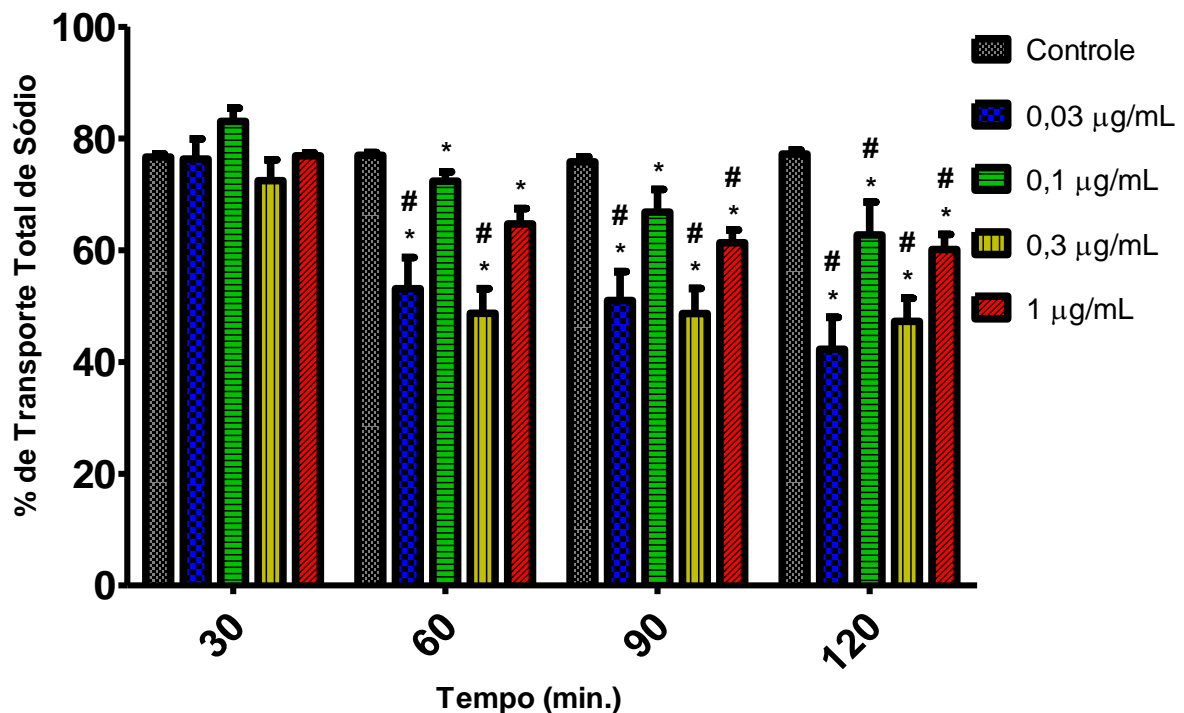
O quadro 2 mostra a comparação dos resultados obtidos nas diferentes concentrações e tempos da perfusão em rim de rato isolado entre o Peptídeo Isolado do Veneno Total da *C. d. cascavella* (NPCasca), realizado por Evangelista e colaboradores (2008) e o Peptídeo Sintético do Veneno Total da *C. d. cascavella* (NPCdc).

Tabela 6 – Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	% TNa ⁺				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	76,70±0,54	76,32±3,61	83,05±2,40	72,48±3,73	76,89±0,58
60	77,00±0,48	53,14±5,56*#	72,36±1,68*	48,70±4,41*#	64,71±2,77*
90	75,82±0,89	51,02±5,18*#	66,84±4,03*	48,67±4,49*#	61,37±2,27*#
120	77,22±0,70	42,27±5,75*#	62,76±5,90*#	47,26±4,16*#	60,14±2,68*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 20 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



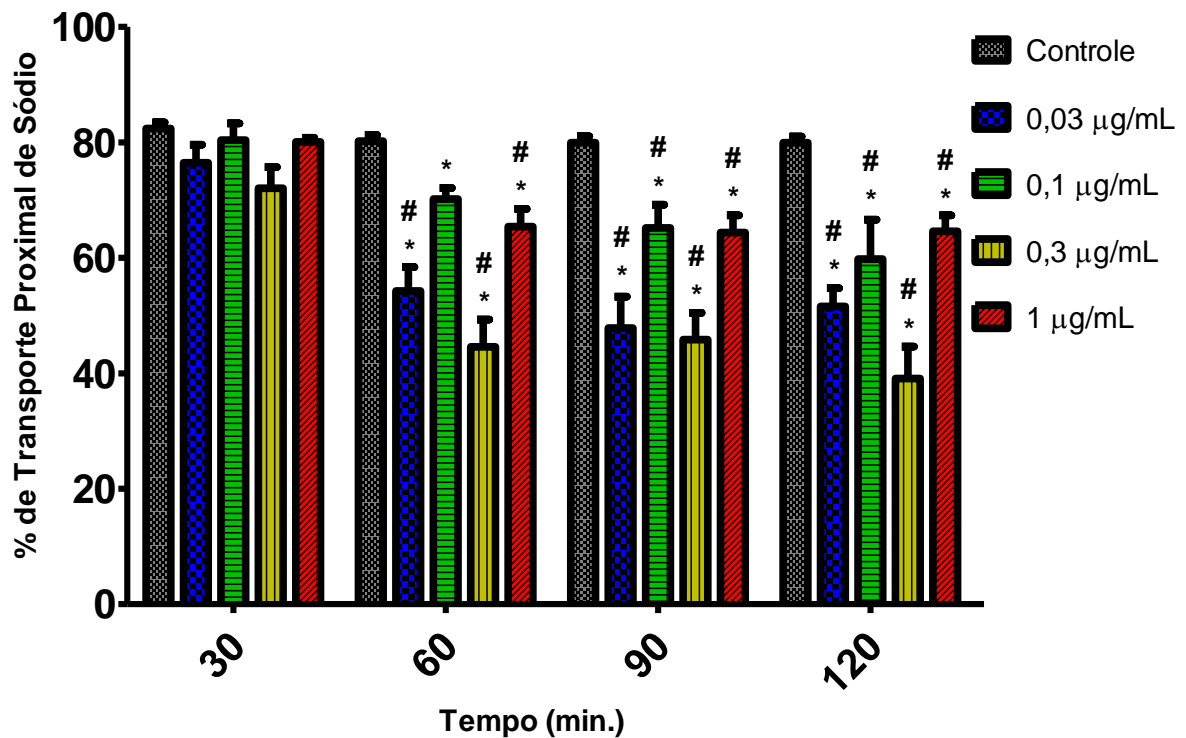
Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 7 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%TpNa⁺) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	% <i>TpNa</i> ⁺				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	82,41±1,07	76,49±3,11	80,40±2,90	72,07±3,66	80,07±0,75
60	80,21±1,08	54,26±4,16*#	70,19±1,91*	44,60±4,72*#	65,41±3,10*#
90	79,95±1,10	47,84±5,43*#	65,18±4,04*#	45,82±4,64*#	64,39±2,99*#
120	79,94±1,08	51,59±3,16*#	59,77±6,83*#	39,09±5,52*#	64,62±2,76*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 21 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Proximal de Sódio (%TpNa⁺) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



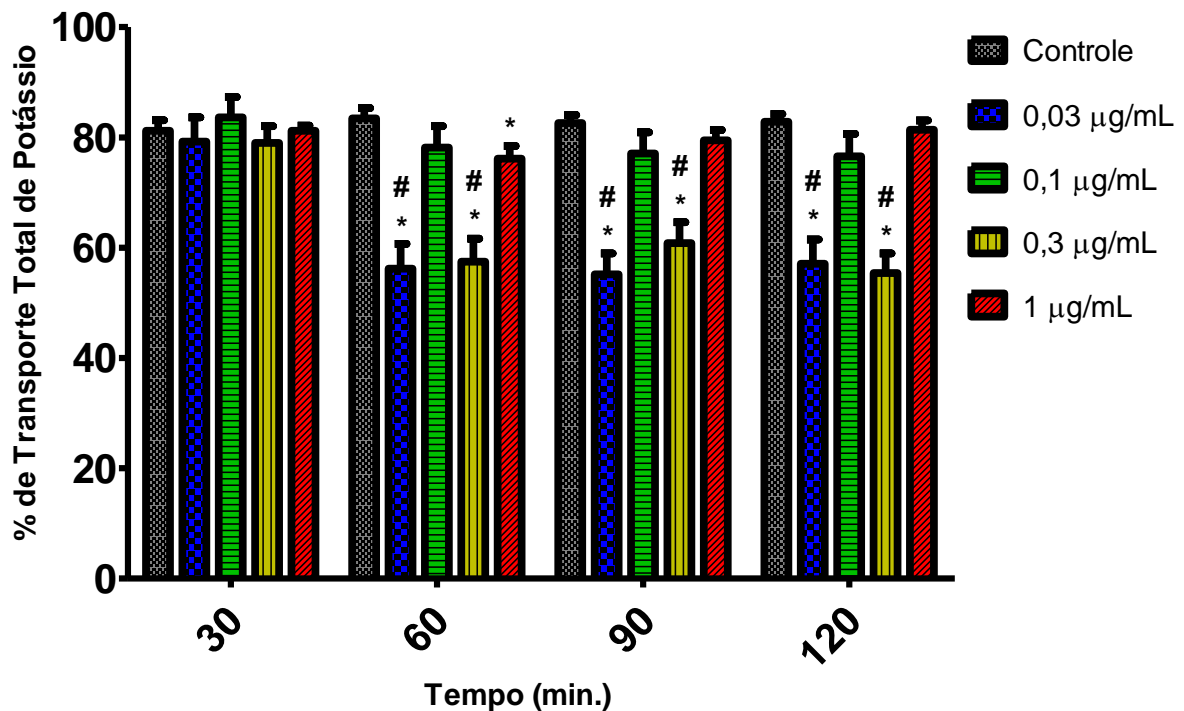
Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 8 – Percentual de Transporte Tubular Total de Potássio (%TK⁺) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	% TK ⁺				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	81,18±1,95	79,23±4,43	83,62±3,70	79,01±3,03	81,20±0,93
60	83,45±1,88	56,22±4,48* [#]	78,16±3,90	57,47±4,17* [#]	76,17±2,25*
90	82,61±1,44	55,15±3,80* [#]	77,07±3,85	60,85±3,79* [#]	79,49±1,84
120	82,83±1,41	57,09±4,38* [#]	76,59±4,04	55,40±3,57* [#]	81,37±1,71

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 22 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Total de Potássio (%TK⁺) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



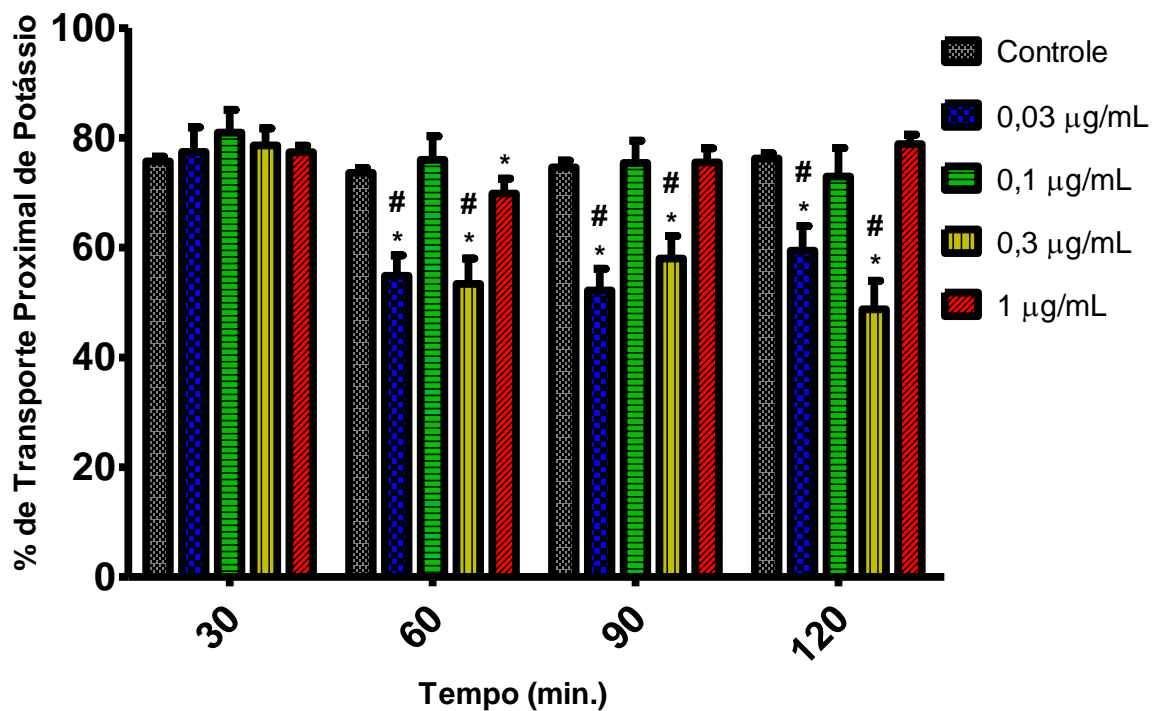
Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 9 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%TpK⁺) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	% <i>TpK</i> ⁺				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	75,72±0,86	77,40±4,49	80,97±4,13	78,60±3,12	77,39±1,15
60	73,62±0,88	54,86±3,72* [#]	76,00±4,26	53,38±4,63* [#]	69,86±2,69*
90	74,63±1,20	55,18±3,99* [#]	75,41±4,08	58,00±4,13* [#]	75,51±2,58
120	76,24±0,95	59,45±4,47* [#]	72,92±5,22	48,77±5,18* [#]	78,85±1,73

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 23 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Proximal de Potássio (%TpK⁺) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



Fonte: LAFAVET – UFC.

Tabela 10 – Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>% TCl</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	80,90±0,60	72,56±4,01	79,86±2,77	73,68±3,72	78,40±0,74
60	82,26±1,41	46,49±5,58*#	66,25±1,90*#	46,09±4,53*#	61,93±3,23*#
90	78,99±0,91	46,57±5,15*#	59,33±4,72*#	47,87±4,62*#	57,15±2,48*#
120	80,03±1,09	41,74±4,96*#	55,81±6,35*#	44,38±4,51*#	55,91±2,50*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 24 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

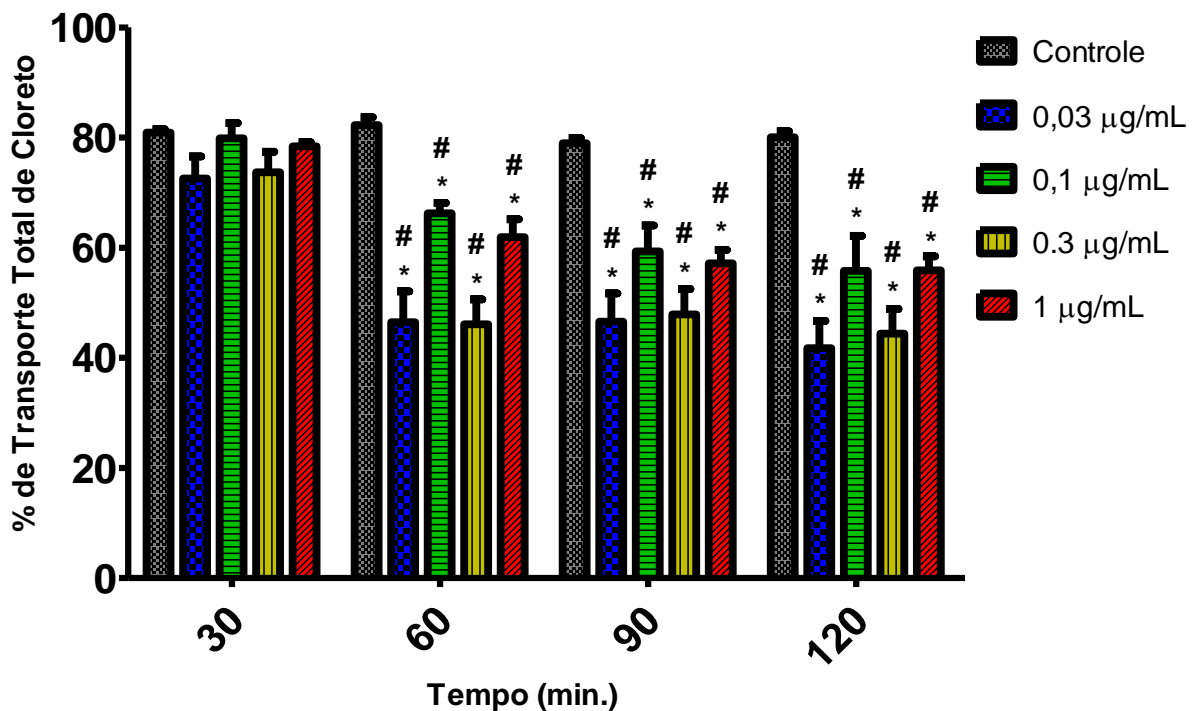
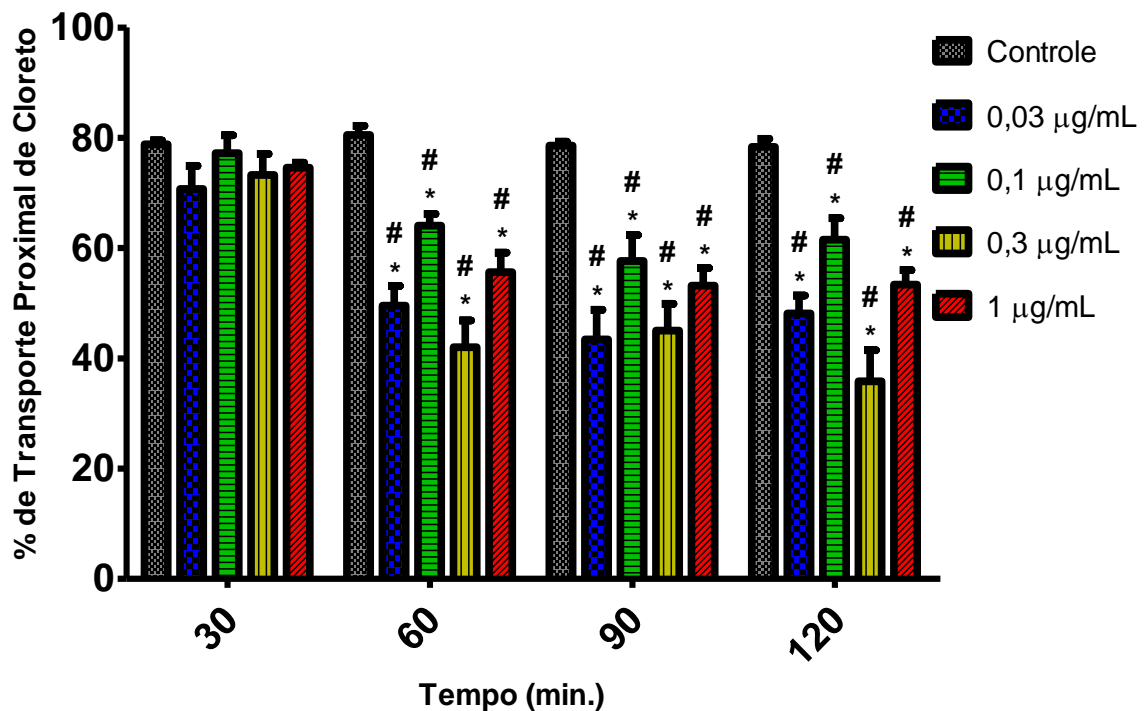


Tabela 11 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%TpCl) em rim isolado de rato na presença do NPCdc (0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL).

<i>Tempo</i>	<i>% TpCl</i>				
	Controle	0,03 µg/mL	0,1 µg/mL	0,3 µg/mL	1 µg/mL
30	78,81±0,72	70,73±4,15	77,21±3,27	73,27±3,78	74,58±0,91
60	80,50±1,67	48,57±3,56*#	64,09±2,12*#	42,00±4,84*#	55,63±3,54*#
90	78,58±0,69	43,42±5,36*#	57,67±4,71*#	45,03±4,83*#	53,18±3,18*#
120	78,36±1,43	48,15±3,22*#	61,50±3,91*#	35,83±5,67*#	53,38±2,65*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

Figura 25 – Efeitos promovidos pelo NPCdc sobre o Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%TpCl) em rim isolado de rato nas concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL e 1 µg/mL. *P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30); #P<0,05, comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.



Fonte: LAFAVET – UFC.

Quadro 2 – Comparação qualitativa dos resultados obtidos em sistema de perfusão de rim isolado de rato entre o Peptídeo Isolado do Veneno Total da *C. d. cascavella* (NPCasca), realizado por Evangelista e colaboradores (2008), e o Peptídeo Sintético do Veneno Total da *C. d. cascavella* (NPCdc) nos diferentes parâmetros renais e concentrações. As diferenças nos parâmetros em cada intervalo de tempo (compilados em blocos de 30min (30, 60, 90 e 120)) foram avaliadas através de teste t de Student ou Two-Way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, sempre considerando $P < 0,05$ e comparando os demais intervalos ao controle interno (intervalo de 30min).

	PP	RVR	FU	RFG	%TNa ⁺	%TpNa ⁺	%TK ⁺	%TpK ⁺	%TCl ⁻	%TpCl ⁻
NPCdc 0,03 µg/mL	↑ 120	↑ 60, 90, 120	↑ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120
NPCdc 0,1 µg/mL			↓ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120			↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120
NPCasca 0,1 µg/mL	↑ 60, 90, 120	↑ 60, 90, 120	↑ 90, 120	↑ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120				
NPCdc 0,3 µg/mL				↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120
NPCasca (0,3 µg/mL)	↑ 60, 90, 120	↑ 60, 90, 120	↑ 60, 90, 120	↑ 60, 90, 120	↓ 120	↓ 120				
NPCdc 1 µg/mL	↓ 60, 90, 120		↓ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60	↓ 60	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120

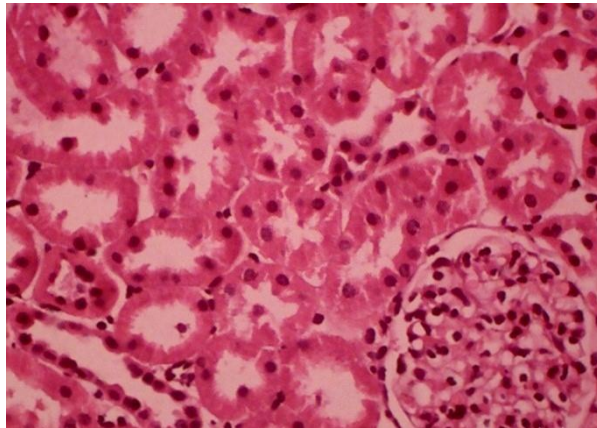
5.3 Análise Histológica dos Rins Perfundidos com NPCdc

Nos rins do grupo controle externo (rins direitos perfundidos apenas com solução Krebs-Henseleit) e rins esquerdos dos grupos teste (não perfundidos) não foram observadas alterações de arquitetura e nenhum dos órgãos exibiu qualquer outra alteração digna de nota (Figura 26).

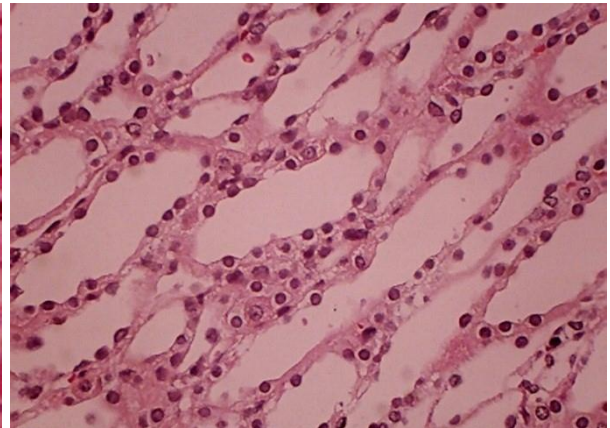
Já nos rins dos grupos experimentais (direitos), pode-se destacar a degeneração hidrópica concentração-dependente, encontrada em praticamente todos os grupos, mas com maior intensidade nos animais do grupo perfundido com 1 $\mu\text{g/mL}$ (maior concentração) de NPCdc. Esta alteração citotóxica não gerou nenhuma mudança estrutural (arquitetural) em nenhum dos órgãos examinados.

Observou-se também, apenas no grupo de menor concentração (0,03 $\mu\text{g/mL}$), discreta e moderada deposição proteácea a nível glomerular e tubular (Figura 27). Não houveram outras alterações dignas de nota nesse grupo.

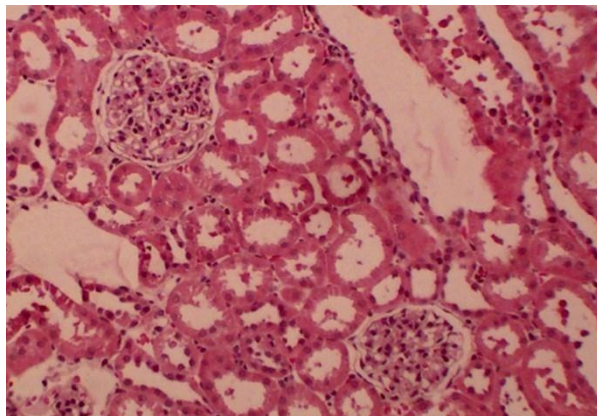
Figura 26: Fotomicrografias de rim direito perfundido (RD) com solução Krebs-Henseleit (controle externo) e rins esquerdos não-perfundidos (RE) das concentrações testadas (0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$) em aumentos de 200x e 400x. Coloração por Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic[®], Software Moticam[®].



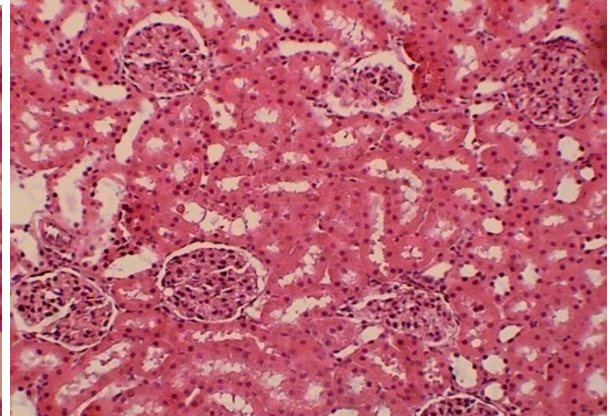
RD Controle Externo (CórTEX - 400x)



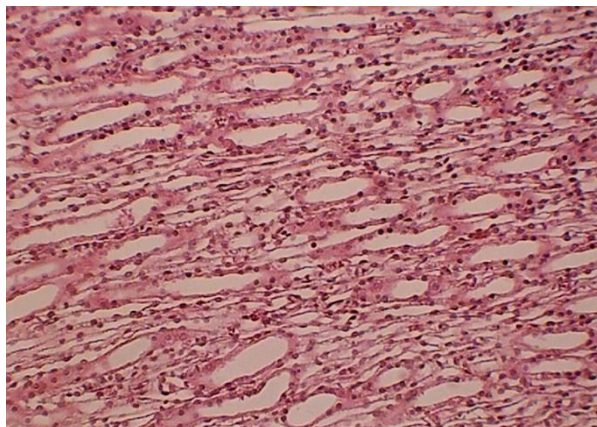
RD Controle Externo (Medula - 400x)



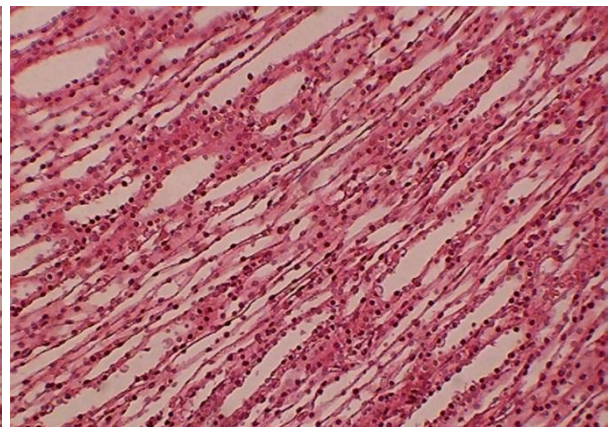
RE 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (CórTEX - 200x)



RE 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (CórTEX - 200x)

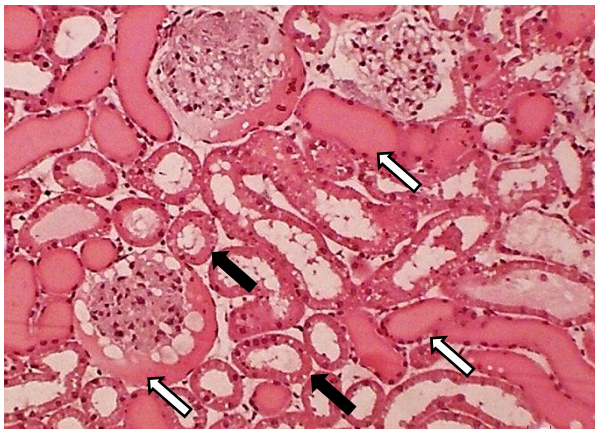


RE 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (Medula - 200x)

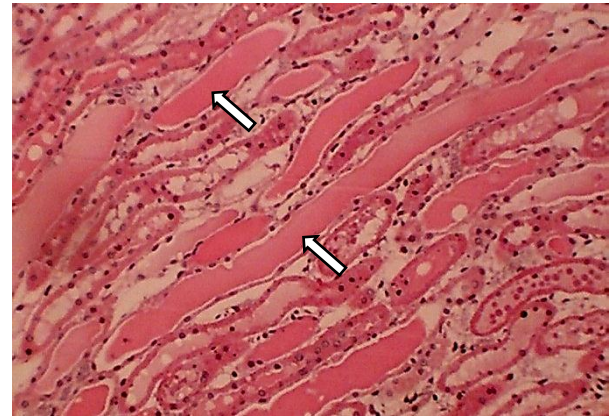


RE 1 $\mu\text{g/mL}$ (Medula - 200x)

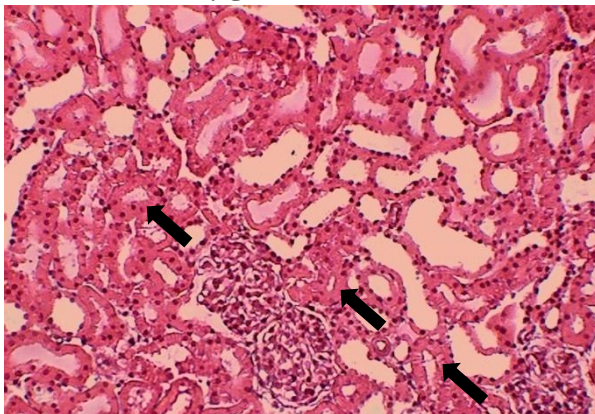
Figura 27: Fotomicrografias de rins direitos perfundidos (RD) por NPCdc (0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$) em aumentos de 200x e 400x, evidenciando alterações renais. Discreta e moderada deposição de material proteáico na concentração de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (setas brancas). Degeneração hidrópica em todas as concentrações testadas (setas pretas). Coloração por Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic®, Software Moticam®.



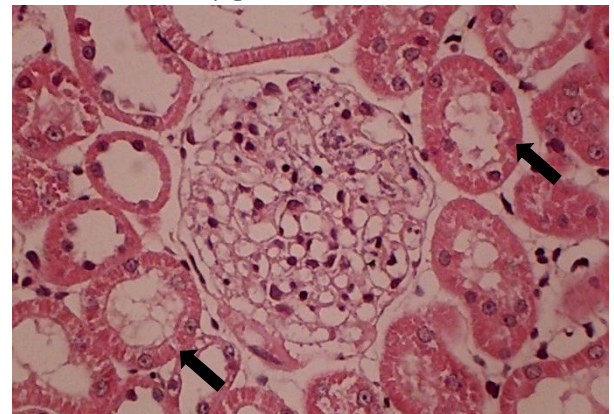
RD 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (Córtex - 200x)



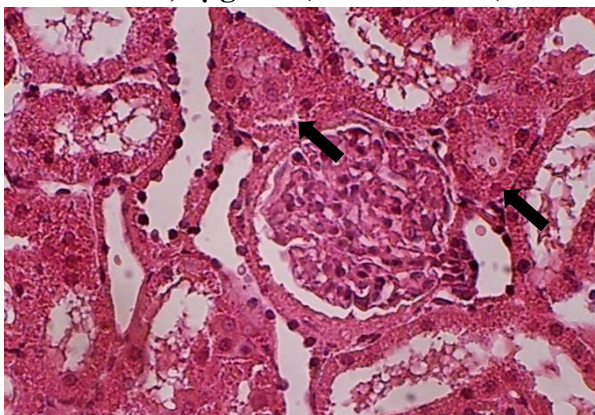
RD 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (Medula - 200x)



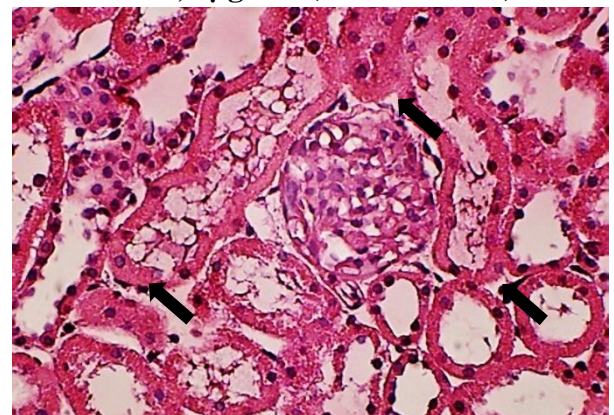
RD 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (Córtex - 200x)



RD 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (Córtex - 400x)



RD 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (Córtex - 400x)



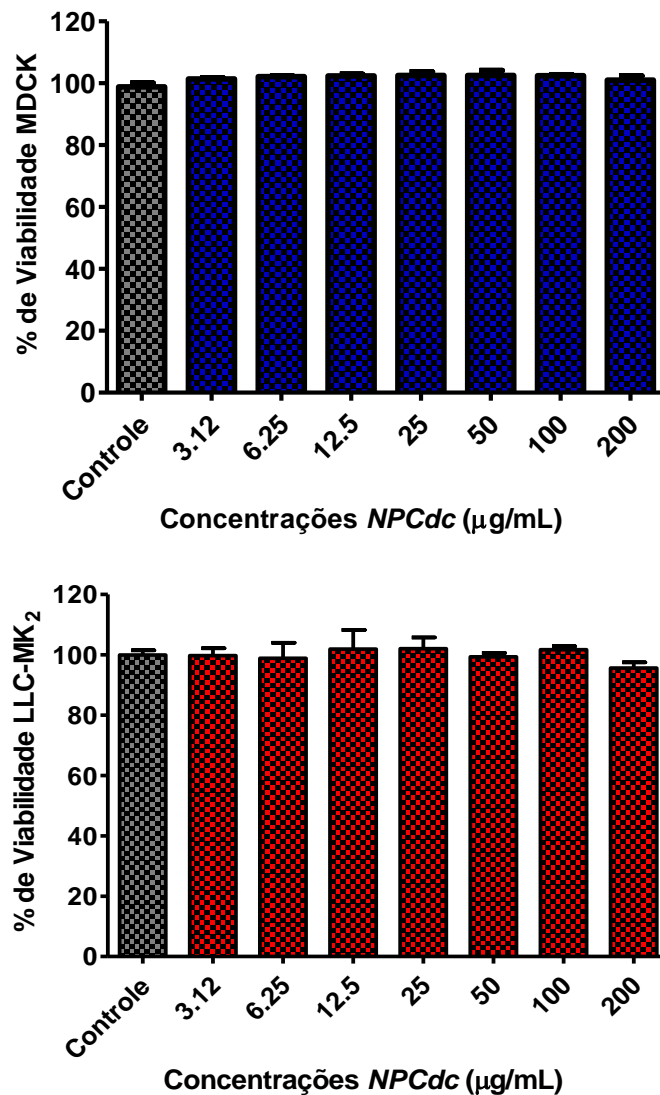
RD 1 $\mu\text{g/mL}$ (Córtex - 400x)

Fonte: HISTOVESP – UECE.

5.4 Efeitos do NPCdc na Viabilidade Celular

O potencial citotóxico do NPCdc avaliado após 24h de exposição a diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). No ensaio com o MTT sobre células MDCK e LLC-MK₂ foi possível observar que o NPCdc não foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade destas linhagens celulares em nenhuma das concentrações testadas quando comparadas ao controle (figura 28).

Figura 28: Efeito do NPCdc em diferentes concentrações sobre as células MDCK (cima) e LLC-MK₂ (baixo). Representação da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%. Dados avaliados por One-Way ANOVA e pós-teste de Dunnet, e expressos por média \pm E.P.M, $P < 0,05^*$.



Fonte: LCC – UFC.

6 DISCUSSÃO

O isolamento de NPs a partir da fonte nativa é um trabalho intensivo e oneroso, uma vez que sua forma madura está presente somente em pequenas quantidades nos tecidos e no plasma. Nas fases iniciais de pesquisa dos NPs, por exemplo, o rendimento de isolamento do BNP porcino era estimado em 1,5 mg a partir de 18,6 kg de tecido cerebral (SUDOH et al., 1988). Ou seja, para produção de quantidades significativas destes NPs e o desempenho de testes funcionais e produção comercial, requer-se a utilização de outras estratégias, como a síntese de peptídeos.

No presente trabalho, foi realizada a síntese química do NPCdc, o método mais comum dos dois métodos principais aplicados com sucesso na síntese de NPs (NILSSON; SOELLNER; RAINES, 2005; ST PIERRE et al., 2006). O outro método sendo a expressão do gene heterólogo em sistemas procariotos ou eucariotos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Durante a síntese, à pureza de 95,62%, o NPCdc apresentou massa molecular experimental de 3.451,96 Da, igual à massa molecular teórica de 3.453,94 Da do peptídeo isolado por Evangelista e colaboradores em 2008 (NPCasca). A diferença de duas unidades de massa se deveu aos dois átomos de hidrogênio da ponte dissulfeto-cisteína não representadas na massa experimental do mesmo.

A sequência “VSTSRGSQGCFLKLDTRIGAASGLGCWRRIVDS” se manteve conservada, com 33 resíduos de aminoácidos e ponte dissulfeto-cisteína entre os resíduos 10 e 26. Os NPs com caudas N- e C-terminais estendidas têm maior resistência à hidrólise por NEP (CHEN; LAINCHBURY; BURNETT JR, 2002). Essa característica, possuída por muitos NPs reptilianos, indica um fator que deve ser levada em consideração na projeção de fármacos baseados em NPs para melhorar a estabilidade da molécula peptídica (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009).

A cauda N-terminal do NPCdc (“VSTSRGSQG-”) possui maior número de resíduos que a do ANP e CNP humanos (“SLRRSS-” e “GLSKG-”, respectivamente) e do DNP (“EVKYDP-”), mas um menor número que a do BNP (“SPKMOVQSGS-”). Da mesma forma, sua cauda C-terminal “-WRRIVDS”, tem maior número de resíduos que as caudas do ANP, BNP (“-NSFRY” e “-KVLRRH”, respectivamente) e CNP humanos (que não apresenta resíduos nesta região). Entretanto, sua cauda C-terminal é bem menor que a do DNP (“-PSLRDPRPNAPSTSA”) (KOH; KINI, 2012).

Phe8 e Arg14 e a sequência C-terminal do ANP humano (OGAWA et al., 2004) e Phe7, Arg13 e Met17 do CNP humano (HE et al., 2001), principalmente, são conservadas ao

longo de todos os membros da família NP, com a exceção de alguns NPs reptilianos. Estes resíduos, juntamente com a estrutura central em anel, são críticos para a ligação ao receptor, sendo essenciais para os efeitos natriuréticos e diuréticos desejados, evidente pela interação com NPR-A, juntamente com a depuração mediada por NPR-C (MISONO et al., 1984; VINK et al., 2012).

O NPCdc também apresenta estes resíduos na região do anel dissulfeto conservados, sendo representados por Phe11 e Arg17. Isto possivelmente corrobora para o seu efeito diurético e natriurético via NPR-A, apresentado nos ensaios *ex vivo* do presente estudo; e/ou sua capacidade de perda de efeito, mediada pela depuração via NPR-C.

Apesar da conformação molecular levar a acreditar numa possível ação mediada por NPRs, Evangelista (2008), entretanto, sugere que possivelmente não há envolvimento destes no mecanismo de ação do NPCasca. Isso se dá devido aos resultados encontrados nos experimentos de reatividade vascular com anéis de aorta isolados na presença ou ausência de endotélio intacto pré-contraídos com fenilefrina. O NPCasca foi capaz de realizar um efeito relaxante vascular significativo com o endotélio intacto e na presença de Isatin, um antagonista não-peptídico endógeno da GC particulada (NPRs) e sua isoforma solúvel (MEDVEDEV et al., 2002; 2005).

Neste estudo, também é sugerida uma ação possivelmente mediada por canais para potássio, pois utilizando uma solução isosmótica de potássio-Krebs-Henseleit (K^+ 80mM) pré-contraída com fenilefrina e na ausência de endotélio, evidenciou-se aumento da contratilidade da musculatura vascular. Estudos de quase vinte anos já demonstravam que NPs aumentam a condutância de íons potássio em células mesangiais de ratos (CERMAK et al., 1996).

Um estudo mais recente, utilizando preparações com artérias aorta e renal, demonstrou a primeira evidência de que o recrutamento de canais Kv7, através da via GMPc, é um componente-chave nas vasodilatações dependentes dos NPs (STOTT et al., 2014). Com isso, para o NPCdc também é proposto um comportamento de forma similar à molécula original, visto que este é uma cópia exata do NPCasca. Explicando, em parte, os resultados encontrados e discutidos a seguir.

Os estudos *in vivo* são importantes para compreensão das alterações das funções renais após a administração de uma substância-teste. Todavia, certos mecanismos não conseguem ser elucidados adequadamente devido à grande complexidade de mediadores e órgãos envolvidos em uma resposta fisiológica. Além disso, no caso do rim, evidências diretas de nefrotoxicidade através de estudos clínicos e histopatológicos não são conclusivas.

Evidências convincentes são melhores produzidas por estudos com perfusão isolada e cultura de células (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

Faz-se necessário, portanto, estudos de órgão isolado com o objetivo de entender as alterações fisiológicas promovidas no órgão-alvo do estudo. Neste, se fez uso de rim isolado de rato para a elucidação das alterações renais promovidas pelo NPCdc, pois este modelo é ideal para compreensão da fisiologia renal de forma isolada.

Mesmo sendo um estudo *ex vivo*, o rim é órgão que ainda mantém diversas das suas propriedades, como a autorregulação renal. Nesta um aumento da pressão de perfusão é acompanhado por um equivalente aumento da resistência vascular, tornando-se inalterado o fluxo sanguíneo renal total (RIELLA, 2010).

Esse é um fenômeno intrínseco que ocorre dentro do rim e que só não está presente quando existem grandes alterações da pressão de perfusão arterial (variações da pressão arterial entre 80 e 180 mmHg). Está presente mesmo após denervação renal, em rim isolado e perfundido *in vitro* e após retirada da medula adrenal (que previne a produção de catecolaminas) (RIELLA, 2010). Além disso, a participação de substâncias vasoativas, como a Histamina e o Fator de Agregação Plaquetária, ainda podem ser liberadas no rim isolado (PIROTZKY et al., 1984).

Neste modelo experimental, a análise urinária, do perfusato e o exame histopatológico são úteis para estabelecer um perfil razoável dos efeitos funcionais e morfológicos de uma substância sobre o rim. Com as informações obtidas dessas análises, pode-se estabelecer a identificação do local, da natureza e da extensão das possíveis lesões.

Pode-se comprovar, neste trabalho, que a preparação de rim isolado de rato é um modelo experimental bastante estável e consolidado, como relatado por Santos-Neto (2006). No grupo controle, durante todo o tempo experimental (120min), não houve significância estatística entre quaisquer dos tempos para os todos os parâmetros de função renal avaliados, apresentando-se estáveis e desprovidos de alterações do tipo tempo-efeito.

O trabalho de Evangelista e colaboradores, realizado em 2008 com o Peptídeo Natriurético Isolado do Veneno da *C. d. cascavella* (NPCasca) demonstrou, no mesmo sistema de perfusão, os efeitos renais de duas concentrações, 0,1 e 0,3 µg/mL, desta molécula. O NPCasca promoveu aumento significativo na PP e RVR em todos os tempos de 0,1 e 0,3 µg/mL. O FU e o RFG aumentaram significativamente em todos os tempos de 0,3 µg/mL e aos 90 e 120min da concentração de 0,1 µg/mL. Houve redução no %TNa⁺ e %pTNa⁺ aos 60, 90 e 120min em 0,1 µg/mL; e apenas aos 120min de 0,3 µg/mL. O %TK⁺ e o %TCl⁻, juntamente com seus transportes proximais (%TpK⁺ e %TpCl⁻), não apresentaram alterações significativas.

Ao realizarmos a perfusão isolada de rim rato com o mesmo peptídeo, mas desta vez, sintético (NPCdc), ampliamos o estudo destes efeitos para uma concentração abaixo (0,03 µg/mL) e uma acima (1 µg/mL), seguindo progressão em escala logarítmica.

Com o NPCdc, a PP e a RVR apresentaram aumento em 0,03 µg/mL, com redução da PP em 1 µg/mL. O FU aumentou em 0,03 µg/mL e diminuiu em 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. O RFG se encontrou reduzido nas quatro concentrações testadas. O COsm foi aumentado em 0,03 µg/mL e reduzido em 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. Houve redução no %TNa⁺ e %TpNa⁺, juntamente com %TCl⁻ e %TpCl⁻, nas quatro concentrações testadas; e apenas em 0,03 µg/mL e 0,3 µg/mL no %TK⁺ e %TpK⁺.

Em primeiro momento, logo é notada a disparidade entre os resultados encontrados neste trabalho com o NPCdc e os resultados de Evangelista (2008) com o NPCasca; quando se leva em consideração as duas concentrações (0,1 µg/mL e 0,3 µg/mL) testadas e avaliadas de igual forma no mesmo sistema de perfusão de rim isolado.

Esperava-se que o NPCdc, nas mesmas concentrações, conseguisse reproduzir as ações da molécula original: aumentando o FU, o RFG e a excreção de sódio urinária, similar aos efeitos provocados pela maioria dos NPs (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009). Entretanto, estas mesmas concentrações foram incapazes de provocar alterações na RVR, e contrariamente promoveram redução do RFG, levando também à redução do FU em 0,1 µg/mL. Os transportes, apesar disto, encontraram-se diminuídos. Estimou-se, então, que algum mecanismo intrínseco renal estivesse realizando esta resposta compensatória.

Fisiologicamente, seguindo o conceito de autorregulação renal previamente descrito, a pressão arterial renal pode variar no intuito de manter o fluxo sanguíneo renal constante. O FU e o RFG estão relacionados à PP renal, provavelmente, pela ativação de receptores adrenérgicos presentes nas arteríolas renais e em outros leitos vasculares (RIELLA, 2010).

Evangelista (2008), porém, atribui o aumento na PP durante a perfusão em rim isolado com o NPCasca a um mecanismo diferente de uma ação vasoconstritora direta, pois veneno total da *C. d. cascavella* não apresentou efeitos no leito vascular arteriolar mesentérico. Este mecanismo diferenciado pode também servir de base para explicar o aumento na PP e, conseqüentemente, no FU em 0,03 µg/mL.

Além disso, sabe-se que muitos venenos ofídicos e suas frações promovem redução do RFG quando ocorre aumento na RVR (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012). Desse modo, a existência de uma resposta vasoconstritora indireta induzida pelo NPCdc confirma uma possível explicação para estes efeitos, pois o aumento da PP e RVR em 0,03 µg/mL

provavelmente estiveram envolvidos diretamente à redução do RFG, através de um decréscimo nas forças de favorecimento à ultrafiltração.

O RFG é considerado um dos parâmetros mais importantes para a avaliação funcional renal (WANG, 2004). É determinado pelo *clearance* de um marcador glomerular que deve ser livremente filtrado através dos capilares glomerulares, não ser reabsorvido ou secretado pelos túbulos renais e, quando em infusão, não provoque alterações (KOEPPEN; STANTON, 2009).

O marcador glomerular padrão-ouro é a inulina, um polímero de frutose com peso molecular de aproximadamente 5.200 Da que não se liga às proteínas plasmáticas e é livremente filtrada através da parede do capilar glomerular passando completamente inerte pelos túbulos renais. Assim, a quantidade de inulina filtrada é exatamente igual à quantidade excretada na urina (KIRSZTAJN, 2007).

A perdas significativas de eletrólitos causadas pelo NPCdc podem explicar, em parte, a redução do RFG através da ativação do sistema de *feedback* túbulo-glomerular, com intuito de alcançar à autorregulação renal; uma vez que os mecanismos vasculares para a queda deste parâmetro normalmente estão relacionados a este *feedback*. Esse mecanismo de defesa é ativado em situações nas quais a concentração de eletrólitos é muito elevada nas porções finais dos túbulos distais, mais especificamente na mácula densa (KOEPPEN; STANTON, 2009; OLDROYD et al., 2000).

Esta estrutura determina a concentração de eletrólitos do filtrado que deixa a alça de Henle, enviando um sinal químico à arteríola aferente. Isto leva à vasoconstrição de início rápido, redução da pressão hidrostática e do fluxo sanguíneo predominantemente do córtex externo e conseqüente redução persistente no RFG e na perda de sódio e água pelos rins (MUNGER et al., 2012). Esse mecanismo também pode ser realizado, em menor extensão, pela indução de vasodilatação da arteríola eferente. Isto aumenta a saída de sangue do glomérulo, levando à queda na resistência dos capilares glomerulares e, conseqüentemente, diminuição do filtrado glomerular (OLDROYD et al., 2000; RIELLA, 2010).

Ambos os mecanismos propostos para a redução do RFG, entretanto, mostram-se contrários aos esperados por NPs, como o ANP e a URO, que aumentam o RFG por indução da vasodilatação pré-glomerular (em arteríolas aferentes, interlobulares e arqueadas) mesmo quando receptores de ANG II estão bloqueados e a PP renal está controlada; juntamente com vasoconstrição em arteríolas eferentes (ENDLICH; STEINHAUSEN, 1997; MUNGER et al., 2012).

Outro mecanismo renal que pode estar envolvido com a queda do RFG, também contrário ao esperado, é mediado pelas endotelinas. Estas são secretadas no compartimento basolateral do endotélio pelas células mesangiais e tubulares renais, se comportando também como mediador de liberação de outros hormônios (BRAGA, 2006). Sua ação ocasiona uma vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes aumentando a resistência vascular renal e provocando, conseqüentemente, queda no RFG (ZANATTA et al., 2008).

Os NPs infraregulam canais de sódio nos ductos coletores da medula renal e, no processo, suprimem o SRAA, o fluxo simpático e a liberação de catecolaminas (VAN KIMMENADE; JANUZZI, 2009). Este recurso desempenha papel central no controle da excreção renal sódio e volume de líquido, bem como do tônus vascular (WEIR; DZAU, 2007). Essa ação de inibição no transporte de sódio se dá através da geração de GMPc, podendo levar a hiponatremia com hipernatriúria (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

O NPCasca apresentou redução apenas no %TNa⁺ e %TpNa⁺, sugerindo que este altera os parâmetros de transporte de sódio, sem interferir na fisiologia renal dos transportes de potássio e cloreto (EVANGELISTA et al., 2008). Diferentemente, o NPCdc provocou redução em todos os transportes.

Para isso, foi observado conjuntamente os resultados obtidos no *clearance* osmolar, que é o volume de urina necessário para excretar todos os solutos urinários numa proporção isosmótica (RIELLA, 2010). Este resultado confirma a especulação de que a lesão a nível tubular tenha sido responsável pelos efeitos renais. Esse aumento na menor concentração testada pode ser devido a disfunção tubular promovida pela perda de viabilidade das células tubulares, não permitindo a reabsorção dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto.

O comportamento de outros NPs especificamente na função renal pode variar de acordo com os diversos parâmetros renais avaliados. O próprio ANP, juntamente com seu análogo renal URO, no mesmo sistema de perfusão isolado mostraram aumento do FU e RFG, mas sem efeito na PP; juntamente com excreção urinária significativa de sódio, potássio e cloreto (KIRCHOFF et al., 1994). A UGN também produz diurese, natriurese, caliurese e clorurese de maneira dose-dependente na perfusão de rim isolado (SANTOS-NETO et al., 2006).

O ANP sintético modifica a função renal de ratos anestesiados. Embora a resistência periférica total se mantenha estável durante sua infusão, a RVR diminui consistentemente, mesmo quando a PP é mantida a um nível constante, denotando, assim, um efeito vasodilatador renal preferencial *in vivo* (DUNN et al., 1986).

A Anaritida, uma versão de 25 resíduos do ANP humano que não possui os três primeiros resíduos, causa natriurese e diurese, diminuição da pressão arterial sistêmica e pressão capilar pulmonar em indivíduos saudáveis. Entretanto, provoca efeitos natriuréticos e diuréticos discretos (FIFER et al., 1990), ou mesmo não provoca efeitos significativos, quando administrado a pacientes com ICC (CODY et al., 1986).

A Carperitida, a forma integral do ANP humano, possui efeitos semelhantes (SAITO et al., 1987). Apesar de ter sido aprovado para o tratamento de ICC descompensada no Japão, em 1995, provocava hipotensão grave e perturbações da função renal, limitando seu uso como uma terapia para pacientes nefropatas e cardiopatas (SUWA et al., 2005).

Ao contrário do ANP, a infusão de Nesiritida, a forma recombinante do BNP humano, resulta em natriurese e diurese, tanto em voluntários saudáveis quanto em pacientes com ICC (YOSHIMURA et al., 1991). Apesar de aprovada nos Estados Unidos em 2001, relatos mostraram piora da função renal e morte dos pacientes comparados à terapia controle. Entretanto, um estudo clínico posterior demonstrou que não possuía quaisquer impactos na taxa de mortalidade, muito menos na piora da função renal (VOLPE, 2014).

O DNP sintético, por infusão intravenosa de 10 e 50 ng/kg, resulta em natriurese e diurese em cães normais. Estas são associadas com a ativação do sistema GMPc e localizadas no néfron terminal, independentes de mudanças no fluxo sanguíneo renal, RFG ou concentrações plasmáticas de ANP, BNP, ou CNP (LISY et al., 1999).

O NP quimérico CD-NP, a Cenderitida, em estudos com modelos de insuficiência cardíaca experimental em cães, mostrou que sua infusão produz diurese e natriurese (LISY et al., 2008; VOLPE, 2014), enquanto aumenta a descarga cardíaca, o fluxo sanguíneo renal e o RFG (LISY; CHEN; BURNETT JR, 2009). Outro NP quimérico, CU-NP, uma forma alternativa do CD-NP construída usando o núcleo do CNP e caudas da URO induz natriurese, aumentando o RFG e suprimindo o SRAA. Ensaios preliminares *in vivo* usando modelos caninos sugerem efeitos renais e cardíacos benéficos deste (LEE; BURNETT JR, 2007).

O PNP (*Pseudocerastes persicus* Natriuretic Peptide), um peptídeo de 37 resíduos isolado do veneno da víbora iraniana também apresentou sequência de aminoácidos e os efeitos fisiológicos renais (aumento do FU e excreção de sódio) consistentes com a família dos NPs. Além disso, células PC12 tratadas com PNP induziram uma resposta de GMPc similar às tratadas com ANP, sugerindo que o PNP age via o receptor NPR-A (AMININASAB et al., 2004).

O TsNP (*Tityus serrulatus* Natriuretic Peptide), isolado do veneno do escorpião amarelo, testados por Alves e colaboradores (2013) no sistema de perfusão de rim isolado de

rato também foram similares aqueles reportados com o NPCasca no trabalho de Evangelista e colaboradores (2008). Além disso, a excreção urinária de sódio, potássio e cloreto apresentaram-se aumentadas no tratamento com o TsNP, de forma similar ao ANP e a URO (SANTOS-NETO et al., 2006).

Mediante os resultados provenientes de outros trabalhos, podemos comprovar que as ações renais do NPCdc, frente as de outros NPs, se comportam de forma similar em alguns casos, principalmente em relação a sua atividade diurética (em 0,03 µg/mL) e natriurética e clorurética (em todas as concentrações testadas). Contudo, esta mesma atividade é contraditória em outros, principalmente no que diz respeito a redução persistente do RFG em todos os tempos das concentrações testadas.

As alterações na redução desta variável, acompanhadas da perda da função de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto em todas as concentrações estudadas, sugere que o NPCdc exerça efeitos potentes sobre os túbulos renais. Sabe-se que o declínio agudo do RFG, juntamente com a disfunção tubular, são as características principais de danos renais, sendo um importante prognóstico na insuficiência renal aguda (IRA) (DAGHER et al., 2003).

Esta nefrotoxicidade se torna ainda mais evidente na maior concentração estudada (1 µg/mL). Além de possuir diminuição significativa do RFG e transportes, possui características funcionais indicativas de IRA, como a oligúria ou anúria; neste caso representada pela diminuição significativa do FU em quase todos os tempos avaliados. Ainda é importante ressaltar que esta é uma complicação grave e potencialmente recuperável marcante do envenenamento crotálico e botrópico (AMARAL et al., 1986).

Assim, todas estas observações terminaram por demonstrar uma injúria a nível tubular comprovada no exame histopatológico. Estes danos diretos nos túbulos renais podem ser, dependendo de sua intensidade, irreversíveis (VIKRANT et al., 2005). Alterações como presença de células edemaciadas, vacúolos, cilindros hialinos e massas proteáceas amorfas no lúmen dos túbulos são sinais comuns de injúria e disfunção renais, particularmente de necrose tubular aguda (CRUZ-HÖFLING et al., 2001).

A degeneração hidrópica encontrada presente nos túbulos renais em praticamente todos os rins dos grupos estudados, e com maior intensidade nos animais do grupo perfundido com 1 µg/mL (maior concentração) de NPCdc, representa, então, uma alteração de citotoxicidade concentração-dependente e real; uma vez que tal alteração não foi detectada no grupo controle, como já descrito anteriormente.

Esta alteração enfatiza a injúria renal causada pelo NPCdc já que a retenção de eletrólitos no citoplasma celular é a causa deste tipo de degeneração. Esta diminui a reabsorção

tubular, promovendo maior retenção de solutos nos túbulos renais, causando aumento do volume urinário devido à maior concentração de solutos na urina (KUMAR et al., 2013). Isto pode explicar o aumento da excreção e redução do transporte dos íons sódio, potássio e cloreto em todas as concentrações, assim como o aumento do *clearance* osmolar na concentração de 0,03 µg/mL.

Outro motivo para a diminuição no RFG, observada nos rins perfundidos com NPCdc na concentração de 0,03 µg/mL, é a discreta a moderada deposição de material proteáceo nos túbulos. O aumento na PP nesta concentração pode explicar o extravasamento de proteína para o espaço urinário observado apenas nos rins deste grupo.

Esses resultados também corroboram com os achados de Alves e colaboradores (2005), que, ao trabalhar com o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, observaram que rins que apresentavam picos pressóricos na perfusão de rim isolado, também apresentavam depósito proteáceo nas estruturas renais, achados similares aos encontrados na concentração de 0,03 µg/mL do presente trabalho.

Evangelista (2008) também relata que esse achado histológico foi presente em 25% dos rins perfundidos pelo NPCasca. Isto leva a crer que estes peptídeos induziram aumento na pressão hidrostática levando, potencialmente, a um extravasamento de perfusato para o parênquima. Isto poderia explicar a diminuição permanente do RFG e FU, principalmente na maior concentração do NPCdc (1 µg/mL).

Segundo Braga e colaboradores, 2007, estes fenômenos degenerativos reversíveis, representados pelo discreto depósito de material proteáceo no glomérulo renal e túbulos contorcidos proximais e distais, são achados comuns na maioria dos estudos de perfusão renal com venenos e frações de venenos; porém este achado não se repete em todos os rins, fato este também observado esporadicamente em alguns controles.

Mesmo assim, de forma similar ao NPCasca, estes resultados diferem dos encontrados após infusão com o veneno total da *C. d. cascavella*, no qual as alterações histológicas renais mostraram-se mais intensas, irreversíveis e presentes na maioria dos rins perfundidos (MARTINS et al., 2002).

Os ensaios com culturas celulares podem promover um maior entendimento da toxicidade de diferentes compostos (OLIVEIRA, et al., 2002). Em relação à pesquisa com venenos e frações de venenos ofídicos, particularmente nos estudos de nefrotoxicidade, estes ensaios permitem que seja avaliado um possível efeito tóxico direto em um curto período de tempo (GIRÓN et al., 2005). Desse modo, devido aos achados histopatológicos, tornou-se interessante investigar o potencial citotóxico do NPCdc sobre as células tubulares renais.

As linhagens celulares utilizadas na cultura foram células epiteliais tubulares renais MDCK e LLC-MK₂. Ambas constituem linhagens bem estabelecidas, em termos de propriedades morfológicas e funcionais correspondendo – respectivamente – às células epiteliais do túbulo coletor (e/ou distal) e proximal de mamíferos. Dessa forma constituem um excelente modelo para avaliação de citotoxicidade *in vitro* (COLLARES-BUZATO; DE PAULA LE SUEUR; CRUZ-HÖFLING, 2002; PEIXOTO, 2003).

No presente trabalho, o NPCdc não causou nenhuma redução na viabilidade das células MDCK e LLC-MK₂ nas concentrações estudadas quando avaliadas pelo método do MTT, indicando a ausência de efeito citotóxico direto dessa molécula sobre essas linhagens celulares tubulares renais. É comum algumas toxinas e frações isoladas de venenos não apresentarem alterações na viabilidade celular, sugerindo que as diferentes toxinas presentes nos venenos totais podem agir individualmente ou por sinergismo no aparecimento de lesões renais (GIRÓN et al., 2005).

Dessa forma, a degeneração hidrópica concentração-dependente apresentada apenas nos rins perfundidos leva a crer que a toxicidade causada pelo NPCdc tenha dependência do funcionamento integral do órgão, por algum mecanismo urodinâmico ainda não elucidado. O efeito nefrotóxico pode ter sido indireto também, a partir da ação do peptídeo sobre células endoteliais e mesangiais presentes no órgão íntegro, induzindo a liberação de mediadores com potencial atividade citotóxica e a degeneração das células tubulares (PINTO, 1998).

Uma das possibilidades para continuidade do estudo e diminuição da potencial nefrotoxicidade apresentada pelo NPCdc é a produção de um peptídeo quimérico, uma vez que estes representam uma escolha atrativa para o desenvolvimento moderno de fármacos. A exemplo do CD-NP e CU-NP, produzidos para evitar os efeitos hipotensores do ANP e BNP, mantendo preservados seus efeitos natriuréticos e diuréticos (DICKKEY; BURNETT JR; POTTER, 2008; LISY et al., 2008; VOLPE, 2014).

Este trabalho apresentou os primeiros resultados de um peptídeo natriurético sintético isolado do veneno da *C. d. cascavella* na função renal. Apesar de manter uma homologia estrutural com o peptídeo original, isolado do veneno ofídico em questão, os dados encontrados diferem dos resultados previamente relatados, indicando uma provável potencialização do efeito da toxicidade do mesmo.

Mesmo com a grande gama de informações acumulada nas duas últimas décadas de estudo dos NPs e seus sistemas de receptores em diversas respostas celulares e fisiológicas, há muito a ser desvendado sobre estas moléculas (PANDEY, 2005). Da mesma forma, com o

NPCdc, ainda existem muitos obstáculos a superar, como a elucidação desta potencial toxicidade renal e os mecanismos de depuração mediados por NPR-C.

Diante disto, torna-se importante a continuidade de ensaios experimentais com a molécula agindo por outras frentes metodológicas complementares, como técnicas de hemodinâmica e microperfusão renal, imunohistoquímica e biologia molecular. Assim, os estudos com o NPCdc tem de ser continuados a fim de se verificar e esclarecer a participação dos diversos mecanismos fisiológicos nas respostas induzidas pelo mesmo.

7 CONCLUSÕES

- Na Perfusão em Rim Isolado de rato:
 - Na concentração de 0,03 µg/mL, o NPCdc alterou os parâmetros vasculares renais com aumento da PP, RVR, FU e Cosm. Esta concentração, apesar de diminuir o RFG, mostrou mais similaridade aos resultados obtidos nos estudos com o NPCasca.
 - Os resultados nas concentrações de 0,1 µg/mL e 0,3 µg/mL, testadas no peptídeo isolado, não foram equivalentes aos esperados. Nestas houve sinais de nefrotoxicidade evidenciados pelo RFG e transportes persistentemente diminuídos.
 - A concentração de 1 µg/mL apresentou os maiores sinais de nefrotoxicidade, com redução severa em todos os parâmetros renais avaliados.
 - O NPCdc em todas as concentrações testadas reduziu os Percentuais de Transportes Tubulares Totais e Proximais de Sódio e Cloreto.
- A análise histopatológica dos rins perfundidos com as diferentes concentrações de NPCdc revelou: degeneração hidrópica concentração-dependente e alterações a nível tubular (esta, apenas na menor concentração testada).
- O NPCdc não foi capaz de diminuir a viabilidade celular em células MDCK e LLC-MK₂, nas condições de estudo, evidenciando para um possível efeito citotóxico indireto e/ou dependente do funcionamento integral do órgão.

REFERÊNCIAS

- ABASSI, Z. A. et al. Pharmacokinetics of ANF and urodilatin during cANF receptor blockade and neutral endopeptidase inhibition. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 870-886, 1992.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; GERMANO, V. J. *Crotalus durissus* (Neotropical Rattlesnake) prey. **Herpetol. Rev.**, v. 27, n. 3, p. 143, 1996.
- ALVES, R. S. et al. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 271-276, 2005.
- ALVES, R. S. et al. Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). **Toxicon**, v. 74, p. 19-26, 2013.
- AMARAL et al. Insuficiência Renal Aguda Secundária a Acidentes Ofídicos Botrópico E Crotálico. Análise de 63 Casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, n. 28, p. 220-227, 1986.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; PEDROSA, T. N. G. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, p. 288-292, 1988.
- AMININASAB, M. et al. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *Pseudocerastes persicus*. **FEBS Lett.**, v. 557, p. 104-108, 2004.
- ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. **Peptides**, v. 26, n. 6, p. 1044-1059, 2005.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 169-208, 2004.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, Myoglobinuria and acute renal failure induced by South America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-636, 1985.
- BAHLMAN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARBOUCHE, R. et al. Novel anti-platelet aggregation polypeptides from *Vipera lebetina* venom: isolation and characterization. **FEBS Lett.**, v. 392, p. 6-10, 1996.
- BARGNOUX, A. S. et al. Prohormone brain natriuretic peptide (proBNP), BNP and Nterminal-proBNP circulating levels in chronic hemodialysis patients. Correlation with ventricular function, fluid removal and effect of hemodiafiltration. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 46, p. 1019-1024, 2008.

BARROS, L. C. et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 17, n. 1, p.23-33, 2011.

BELTOWSKI, J. et al. Nitric oxide decreases renal medullary Na⁺-K⁺-ATPase activity through cyclic GMP-protein kinase G dependent mechanism. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 191-210, 2003.

BEZOLD, A. V.; HIRT, L. **Über die Physiologischen Wirkungen des Essigsäuren Veratrins**. Untersuchungen aus dem Physiologischen Laboratorium Wurtzberg, v. 1, p. 75-156, 1867.

DE BOLD, A. J. et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci.**, v. 28, p. 89-94, 1981.

BOERRIGTER, G.; BURNETT JR, J. C. Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 13, p. 643-652, 2004.

BON, C. Snake venom and pharmacopoeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.) **Snakes: A Natural History**. New York: Sterling Publishing Company, 2006. p. 194-209.

BOOMSMA, M.; VAN DEN MEIRACKER, A. H. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. **Cardiovasc. Res.**, v. 51, p. 442, 2001.

BOWMAN, R. H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 7, p. 1604-1612, 1970.

BOWMAN, R. H.; MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte in perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 2, p. 426-430, 1974.

BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 240 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRAGA, M. D. M. et al. Purification and biological effects of L- amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 199-207, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Relatórios Gerenciais**. Acidente por animais peçonhentos – Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/8HtwrJ>>. Acesso em 08 out 2014.

BRIET, M.; BURNS, K. D. Chronic kidney disease and vascular remodelling: molecular mechanisms and clinical implications. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 123, p. 399-416, 2012.

BRUNNER-LA ROCCA, H. P. et al. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 37, p. 1221-1227, 2001.

CAI, C. Y. et al. Dendroaspis natriuretic peptide relaxes gastric antral circular smooth muscle of guinea-pig through the cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 5461-5466, 2008.

CALDERONE, A. et al. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 812-818, 1998.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 11, p. 1736-1743, 2009.

CALVIERI, C.; RUBATTU, S.; VOLPE, M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. **J. Mol. Med.**, v. 90, p. 5-13, 2012.

CÂMARA, P. et al. Inflammatory edema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus sp.* in the rat dorsal skin: A role for mast cells and sensory c-fibers. **Toxicon**, v. 41, p. 823-829, 2003.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University, 1989. 440 p.

CERMAK, R. et al. Natriuretic peptides increase a K⁺ conductance in rat mesangial cells. **Pflugers Arch.**, v. 431, n. 4, p. 571-577, 1996.

CHEN, H. H. et al. Subcutaneous administration of brain natriuretic peptide in experimental heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 36, p. 1706, 2000.

CHEN, H. H.; BURNETT JR., J. C. Therapeutic potential of existing and novel forms of natriuretic peptides. **Heart Fail. Clin.**, v. 2, p. 365-373, 2006.

CHEN, H. H.; LAINCHBURY, J. G.; BURNETT JR., J. C. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 40, p. 1186-1191, 2002.

CHINKERS, M. et al. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. **Nature**, v. 338, p. 78-83, 1989.

CHINKERS, M.; GARBERS, D. L. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. **Science**, v. 245, p. 1392-1394, 1989.

CHISZAR, D. et al. Chemical cues used by prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis*) to follow trails of rodent prey. **J. Chem. Ecol.**, v. 16, n. 1, p. 79-85, 1990.

- CODY, R. J. et al. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. **J. Clin. Invest.**, v. 78, p. 1362-1374, 1986.
- COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 226, p. 103-121, 1977.
- COLLARES-BUZATO, C. B.; DE PAULA LE SUEUR, L.; CRUZ-HOFLING, M. A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 181, n. 2, p. 124-132, 2002.
- COLLINS, E. et al. Mechanism of relaxations to dendroaspis natriuretic peptide in canine coronary arteries. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, p. 614-618, 2000.
- CRUZ-HÖFLING, M. A. et al. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa) venom and a phospholipase-A₂ containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 185-195, 2001.
- CURRY, F. R. Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1458-1461, 2005.
- DAGHER, P. C. et al. Newly developed techniques to study and diagnose acute renal failure. **J. Am. Soc Nephrol.**, v. 14, p. 2188-2198, 2003.
- DANIELS, L. B.; MAISEL, A. S. Natriuretic Peptides. **JACC**, v. 50, n. 25, p. 2357-2368, 2007.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 297-306, 2009.
- D'SOUZA, S. P.; DAVIS, M.; BAXTER, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacol. Ther.**, v. 101, p. 113-129, 2004.
- DICKEY, D. M.; BURNETT JR., J. C.; POTTER, L. R. Novel bifunctional natriuretic peptides as potential therapeutics. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 35003-35009, 2008.
- DRUMMER, C. et al. Postprandial natriuresis in humans: further evidence that urodilatin, not ANP, modulates sodium excretion. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 301-310, 1996.
- DUMBACHER, J. P.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) from New Guinea. **PNAS**, v. 97, n. 24, p. 12970-12975, 2000.
- DUNN, B. R. et al. Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anesthetized rat. **Circ. Res.**, v. 59, p. 237-246, 1986.
- ENDLICH, K.; STEINHAUSEN, M. Natriuretic peptide receptors mediate different responses in rat renal microvessels. **Kidney Int.**, v. 52, p. 202-207, 1997.

EVANGELISTA, J. S. A. M. **Estudo de Efeitos Vasculares, Renais e Citotoxicidade do Veneno da Serpente *Crotalus durissus cascavella***. 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

EVANGELISTA, J. S. A. M. et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 737-744, 2008.

FAVREAU, P. et al. The venom of the snake genus *Atheris* contains a new class of peptides with clusters of histidine and glycine residues. **Rapid. Commun. Mass. Spectrom.**, v. 21, n. 3, p. 406-412, 2007.

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará-Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

FIFER, M. A. et al. Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. **Am. J. Cardiol.**, v. 65, p. 211-216, 1990.

FONSECA, F. V. et al. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. **Protein J.**, v. 25, p. 183-192, 2006.

FONTELES, M. C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal**. 1980. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C. et al. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 235-246, 1983.

FONTELES, M. C. et al. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 191-197, 1998.

FORSSMANN, W. G.; MEYER, M.; FORSSMANN, K. The renal urodilatin system: clinical implications. **Cardiovasc. Res.**, v. 51, p. 450-462, 2001.

FRESHENEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques**. 6. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. 796 p.

FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584-588, 2006.

FRY, B. G. et al. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterisation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 327, p. 1011-1015, 2005.

FULLER, F. et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 9395-9401, 1988.

GIRÓN, M. E. et al. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 47, n. 3, p. 147-152, 2005.

GLOBITS, S. et al. Atrial natriuretic peptide release is more dependent on atrial filling volume than on filling pressure in chronic congestive heart failure. **Am. Heart J.**, v. 135, n. 4, p. 592-597, 1998.

GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. Tradução Ilse Grantsau. São Bernardo do Campo: Bandeira, 1991. 101 p.

HABERMEHL, G.; FERREIRA, L. A. F. Structure activity relationship of small peptides from snake venoms. Abstracts/**Toxicon**, v. 38, p. 487-595, 2000.

HAMILTON, R. L. et al. Simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 667-668, 1974.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid. Res.**, v. 9, n. 5, p. 667-668, 1968.

HE, X. et al. Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. **Science**, v. 293, p. 1657-1662, 2001.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H.; Biological role of the two components of CrTX. **PNAS**, v. 68, n. 7, 1560-1563, 1971.

HIGUCHI, S. et al. Bradykinin potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. **Immunopharmacology**, v. 44, p. 129-135, 1999.

HIGUCHI, S. et al. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 144, n. 2, p. 107-121, 2006.

HO, P. L. et al. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 250, p. 144-149, 1997.

HOLMES, S. J. et al. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 76, p. 91-96, 1993.

HORIO, T. et al. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. **Endocrinology**, v. 144, p. 2279-2284, 2003.

HUNT, P. J. et al. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 3871-3876, 1996.

JARISCH, A.; RICHERTER, H. Die afferenten Bahnen des Veratrine Effeckets in den Herznerven. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v. 193, p. 355-371, 1939.

KANAJI, S. et al. Convulxin binds to native, human glycoprotein IB α . **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 41, p. 39452-39460, 2003.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.**, v. 6, p. 1-33, 2011.

- KENNY, A. J.; BOURNE, A.; INGRAM, J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. **Biochem. J.**, v. 291 (Pt. 1), p. 83-88, 1993.
- KIBERD, B. A. et al. Effect of atrial natriuretic peptide on vasa recta blood flow in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. 112-117, 1987.
- KIRCHOFF, K. et al. Urodilatin inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused rat kidney. **Exp. Nephrol.**, v. 2, p. 231-237, 1994.
- KIRSZTAJN, G. M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 4, p. 257-264, 2007.
- KOH, C. Y. et al. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 11987-11994, 1992.
- KOEPPEN, B. M.; STATON, B. A. **Berne & Levy – Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 864 p.
- KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, p. 497-506, 2012.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.
- KOLLER, K. J. et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). **Science**, v. 252, p. 120-123, 1991.
- KUAN, C. J.; HERZER, W. A.; JACKSON, E. K. Cardiovascular and Renal Effects of Blocking A1 Adenosine Receptors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 21, p. 822-828, 1993.
- KUHN, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. **Basic Res. Cardiol.**, v. 99, p. 76-82, 2004.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins – Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.
- LAINCHBURY, J. G. et al. Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 278, n. 1, p. 33-40, 2000.
- LAINCHBURY, J. G. et al. Actions of a novel synthetic natriuretic peptide on hemodynamics and ventricular function in the dog. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 282, p. 993-998, 2002.
- LEE, C. Y. et al. Pharmacodynamics of a novel designer natriuretic peptide, CDNP, in a first-in-human clinical trial in healthy subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, n. 49, p. 668-673, 2009.
- LEE, C. Y.; BURNETT JR., J. C. Natriuretic peptides and therapeutic applications. **Heart Fail. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 131-142, 2007.

- LEE, C. Y.; BURNETT JR., J. C. Discovery of a novel synthetic natriuretic peptide, CU-NP. **J. Card. Fail.**, v. 13, p. 74, 2007.
- LEE HO, P. Is natriuretic peptide a snake venom component? Abstracts/**Toxicon**, v. 38, p. 487-595, 2000.
- LIMA A. A. M.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 70, p. 163-167, 1992.
- LISY, O. et al. Renal actions of synthetic *Dendroaspis* natriuretic peptide. **Kidney Int.**, v. 56, p. 502-508, 1999.
- LISY, O. et al. Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, *Dendroaspis* natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. **Hypertension**, v. 37, p. 1089-1094, 2001.
- LISY, O. et al. Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 52, p. 60-68, 2008.
- LISY, O.; BURNETT JR, J. C. Potential future therapies: natriuretic peptides. **Coron. Artery Dis.**, v. 10, p. 389-394, 1999.
- LISY, O.; CHEN, H. H.; BURNETT JR, J. C. Cardiorenal actions of new designer natriuretic peptide CD-NP in experimental heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, n. 53, p. 149, 2009.
- LÖBELL, C. E. **De conditionibus, quibus secretiones in glandulis perficiuntur.** Dissertatio Inauguralis Marburg. 1849. 37 p.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.
- LOPES, D. M. et al. A new structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom (South American rattlesnake). **Toxicon**, v. 90, p. 36-44, 2014.
- LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 375-414, 2000.
- MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zool. Anz.**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, 2006.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171-1181, 2005.

- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPAVA-STITZER, S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MARTINEZ-RUMAYOR, A. et al. Biology of the natriuretic peptides. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, s. 3-8, 2008.
- MARTINS, A.M.C. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced renal toxicity in isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 40, p. 1165-1171, 2002.
- MATSUBARA, M. H. **Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina em monocamadas de células endoteliais em cultura**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.
- MÉNDEZ, R. E. et al. Atrial natriuretic peptide and furosemide effects on hydraulic pressure in the renal papilla. **Kidney Int.**, v. 34, p. 36-42, 1988.
- MEDVEDEV, A. et al. Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 4, p. 763-766, 2002.
- MEDVEDEV, A. et al. Natriuretic peptide interaction with [3H]isatin binding sites in rat brain. **Brain Res.**, v. 1042, n. 2, p. 119-124, 2005.
- MELO, L. G.; ACKERMAN, U. ANP in regulation of arterial pressure and fluid-electrolyte balance: lessons from genetic mouse models. **Physiol. Genomics**. v. 3, p. 45-58, 2000.
- MENETON, P. et al. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. **Physiol. Rev.**, v. 85, p. 679-715, 2005.
- MEYER, M. et al. Urodilatin is involved in sodium homeostasis and exerts sodium-state dependent natriuretic and diuretic effects. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 489-497, 1996.
- MICHEL, G. H. et al. Two N-terminally truncated forms of C-type natriuretic peptide from habu snake venom. **Peptides**, v. 21, p. 609-615, 2000.
- MISONO, K. S. et al. Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 119, p. 524-529, 1984.
- MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da ciclooxigenase no rim perfundido de rato**. 1990. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- MORO, C.; LAFONTAN, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 304, p. 358-368, 2013.
- MUNGER, K. A. et al. The Renal Circulations and Glomerular Ultrafiltration. In: TAAL, M. W. et al. (Eds.) **Brenner & Rectors – The Kidney**. 9. ed. Philadelphia: Saunders, 2012. p. 94-137.

- MURAYAMA, N. et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **PNAS**, v. 94, p. 1189-1193, 1997.
- MURTHY, K. S. et al. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278p. 974-980, 2000.
- NICASTRO, G. et al. Solution structure of crostamine, a Na⁺-channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 1969-1979, 2003.
- NILSSON, B. L.; SOELLNER, M. B.; RAINES, R.T. Chemical synthesis of proteins. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 34, p. 91-118, 2005.
- NIZET, A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. **Kidney Int.**, v. 7, p. 1-11, 1975.
- NOGUEIRA, R. M. B; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Rev. CFMV**, v. 31, p. 47-56, 2004.
- OGAWA, H. et al. Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 28625-28631, 2004.
- OGUNGBADE, G. O. et al. Role of epoxyeicosatrienoic acids in renal functional response to inhibition of NO production in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 285, p. 955-964, 2003.
- OLDROYD, S. D. et al. Effects of adenosine receptors antagonists on the responses the contrast media in the rat isolated kidney. **Clin. Sci.**, v. 98, p. 303-311, 2000.
- OLIVEIRA, J. C. R. et al. Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. **Toxicon**, v. 40, p. 321-325, 2002.
- OLIVEIRA, D. G. et al., Structural and biological characterization of a crostapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 53-62, 2003.
- OMLAND, T.; HAGVE, T. A. Natriuretic Peptides: Physiologic and Analytic Considerations. **Heart Fail. Clin.**, v. 5, p. 471-487, 2009.
- PANDEY, K. N. Biology of natriuretic peptides and their receptors. **Peptides**, v. 26, p. 901-932, 2005.
- PEGG E. D. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. **Cryobiology**, v. 8, p. 431-440, 1971.
- PEREIRA, T. P. **Estudo dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e crotoxina**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PIECHOTA, M. et al. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 13, p. 155-181, 2008.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PINTO, L. M. O. Células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **J. Bras. Nefrol.**, v. 20, n. 2, p. 178-185, 1998.

PIROTZKY, E. et al. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance vasoactives, amines from isolated rat kidney. **Kidney Int.**, v. 25, p. 404-410, 1984.

POLGÁR, J. et al. Platelet activation and signal trans by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 21, p. 13576-13583, 1997.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Structural and biological characterization of two crotamine isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venoms. **Protein J.**, v. 26, p. 533-540, 2007.

POTTER, L. R. et al. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 191, p. 341-366, 2009.

PRADO-FRANCESCHI, J. On the pharmacology of convulxin and giroxin. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 25-26, 1990.

RADEMAKER, M. T.; RICHARDS, A. M. Cardiac natriuretic peptides for cardiac health. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 108, p. 23-36, 2005.

RANGEL-SANTOS, A. et al. Comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2004.

REINERT, H. K.; CUNDALL, D.; BUSHAR, L. M., Foraging behavior of the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. **Copeia**, v. 4, p. 976-981, 1984.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1264 p.

ROQUES, B. P. et al. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 87-146, 1993.

ROSE, R. A.; GILES, W. R. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. **J. Physiol.**, v. 586, p. 353-366, 2008.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.

RUBATTU, S. et al. NPR-C: a component of the natriuretic peptide family with implications in human diseases. **J. Mol. Med.**, v. 88, p. 889-897, 2010.

- RUSSEL, F. E. Toxic effects of animal toxins. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 801-839.
- SABRANE, K. et al. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1666-1674, 2005.
- SAITO, Y. et al. Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: beneficial effects on left ventricular function. **Circulation**, v. 76, p. 115-124, 1987.
- SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G., Activity patterns of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. **Stud. Neotrop. Fauna E.**, v. 30, n. 2, p. 101-106, 1995.
- SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake in Brazil. **J. Q. Med.**, v. 94, n. 10, p. 551-559, 2001.
- SANTOS-NETO M. S. et al. Interaction of atrial natriuretic peptide, urodilatin, guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Regul. Pept.**, v. 136, p. 14-22, 2006.
- SCHIRGER, J. A. et al. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. **Mayo Clin. Proc.**, v. 74, p. 126-130, 1999.
- SCHULZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, K.; HERBST, F. Isolation and structural analysis of 'urodilatin', a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. **Klin. Wochenschr.**, v. 66, p. 752-759, 1988.
- SCHWEITZ, H. et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 13928-13932, 1992.
- SCOTLAND, R. S.; AHLUWALIA, A.; HOBBS, A. J. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 105, p. 850-853, 2005.
- SENGENÈS, C. et al. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. **FASEB J.**, v. 14, p. 1345-1351, 2000.
- SIANG, A. S. et al. Transcriptomic analysis of the venom gland of the red-headed krait (*Bungarus flaviceps*) using expressed sequence tags. **BMC Mol. Biol.**, v. 11, n. 24. 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/u4xOiQ>>. Acesso em: 08 out 2014.
- SINDICE, A.; SCHLATTER, E. Cellular effects of guanylin and uroguanylin. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, p. 607-616, 2006.
- SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicol.**, v. 60, p. 943-953, 2012.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**. Reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos. Rio de Janeiro/São Paulo: Atheneu, 1996. 138 p.

ST PIERRE, L. et al. Cloning and characterisation of natriuretic peptides from the venom glands of Australian elapids. **Biochimie**, v. 88, p. 1923-1931, 2006.

STABELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of na I-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

STINGO, A. J.; CLAVELL, A. L.; AARHUS, L. L. Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 308-312, 1992.

STOLTE, H.; SCHUREK, H. J.; ALT, J. M. Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with *in vivo* experimental conditions. **Kidney Int.**, v. 16, p. 377-384, 1979.

STOTT, J. B. et al. Contribution of Kv7 Channels to Natriuretic Peptide Mediated Vasodilation in Normal and Hypertensive Rats. **Hypertension**, Online Data Supplement, 2014. Disponível em: < <http://goo.gl/LyxHMg>>. Acesso em 02 jan 2015.

SUDOH, T. et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v. 332, p. 78-81, 1988.

SUDOH, T. et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 168, p. 863-870, 1990.

SUWA, M. et al. Multicenter prospective investigation on efficacy and safety of carperitide for acute heart failure in the 'real world' of therapy. **Circ. J.**, v. 69, p. 283-290, 2005.

SUZUKI, T.; YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. **Cardiovasc. Res.**, v. 51, p. 489, 2001.

TAKAGI, G. et al. Alpha-human atrial natriuretic peptide, carperitide, reduces infarct size but not arrhythmias after coronary occlusion/reperfusion in dogs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 36, p. 22-30, 2000.

THOMAS, C. J. et al. ANP potentiates nonarterial baroreflex bradycardia: evidence from sinoaortic denervation in rats. **Auton. Neurosci.**, v. 97, p. 89-98, 2002.

THOMPSON, D. K.; GARBERS, D. L. Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 425-430, 1995.

TOYAMA, M. H. et al. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, p. 56-60, 2000.

TRINH, K. X. et al. Hyponatraemia, rhabdomyolysis, alterations in blood pressure and persistent mydriasis in patients envenomed by Malayan kraits (*Bungarus candidus*) in southern Vietnam. **Toxicon**, v. 56, p. 1070-1075, 2010.

TSUKAMOTO, O. et al. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 53, p. 2070-2077, 2009.

VAN KIMMENADE, R. R.; JANUZZI, J. L. The evolution of the natriuretic peptides - Current applications in human and animal medicine. **J. Vet. Cardiol.**, v. 11, p. 9-21, 2009.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de Venenos de Serpentes. *In*: BARRAVIERA, B. (Org.). **Venenos Animais: Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro, EPUC, 1994. 205 p.

VESELY, D. L. Natriuretic peptides and acute renal failure. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p. 167-177, 2003.

VIKRANT, S. et al. Wasp envenomation-induced acute renal failure: a report of three cases (case report). **Nephrology**, v. 10, p. 548-552, 2005.

VINK, S. et al. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon**, v. 59, p. 434-445, 2012.

VOLPE, M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. **Int. J. Cardiol.**, v. 176, p. 630-639, 2014.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, n. 3, p. 163-196, 1987.

WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1955.

WANG, W. Renal potassium channels: recent developments. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 13, p. 549-555, 2004.

WARELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WEIR, M. R.; DZAU, V. J. The renin-angiotensin-aldosterone system: A specific target for hypertension management. **Am. J. Hypertens.**, v. 12, p. 205-213, 2007.

WILSON, E. M.; CHINKERS, M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. **Biochemistry**, v. 34, p. 4696-4701, 1995.

WOODARD, G. E.; ROSADO, J. A. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. **Int. Rev. Cell. Mol. Biol.**, v. 268, p. 59-93, 2008.

WOODARD, G. E.; ROSADO, J. A.; BROWN, J. Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity and its regulation in rat aortic vascular smooth muscle. **Peptides**, v. 23, p. 23-29, 2002.

WOODS, R. L.; OLIVER, J. R.; KORNER, P. I. Direct and neurohumoral cardiovascular effects of atrial natriuretic peptide. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 13, p. 177-185, 1989.

WU, F. et al. Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 16900-16905, 2002.

YAN, W. et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **PNAS**, v. 97, p. 8525-8529, 2000.

YANDLE, T. G. et al. Metabolic clearance rate and plasma half-life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. **Life Sci.**, v. 38, p. 1827-1833, 1986.

YOSHIMURA, M. et al. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 84, p. 1581-1588, 1991.

ZANATTA, C. A. et al. Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 4, p. 581-588, 2008.