

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

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**EFEITO RENAL DO VENENO DA *Bothrops erythromelas*
E BLOQUEIO INDUZIDO PELO FATOR ANTIBOTRÓPICO DO
*Didelphis marsupialis***

**FORTALEZA
2004**

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**EFEITO RENAL DO VENENO DA *Bothrops erythromelas*
E BLOQUEIO INDUZIDO PELO FATOR ANTIBOTRÓPICO DO
*Didelphis marsupialis***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

**FORTALEZA
2004**

S696e Sousa, Fabíola Carine Monteiro de
Efeito renal do veneno da *Bothrops erythromelas* e
bloqueio induzido pelo Fator antibotrópico do *Didelphis
marsupialis*/ Fabíola Carine Monteiro de Sousa. – Fortaleza,
2004.

xvii, 127 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Dissertação(Mestrado em Farmacologia)-Universidade
Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmaco-
logia.

1. Bothrops. 2. Nefrologia. 3. Venenos de serpente-toxici-
dade. 4. Gambás (*Didelphis marsupialis*). I. Título.

CDD 615.942

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**EFEITO RENAL DO VENENO DA *Bothrops erythromelas*
E BLOQUEIO INDUZIDO PELO FATOR ANTIBOTRÓPICO DO
*Didelphis marsupialis***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Data da Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
(Orientadora)**

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Pelo dom da vida

AOS MEUS PAIS

Pelo amor, estímulo e carinho os quais foram as armas desta vitória

AOS MEUS AVÓS (LUÍZ E RITA)

Por tudo o que sou, por todos os ensinamentos e pela constante presença em minha vida

ÀS MINHAS TIAS (GRAÇA E FALENA)

Pelo amor e extrema dedicação em todos os momentos

À PROFa. Dra. HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

Pela oportunidade de crescer cientificamente

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Manassés Claudino Fonteles** pelo exemplo de sabedoria e competência.

Ao professor **Marcos Toyama** por acreditar em nosso grupo.

À prof. Dra. **Mirian Guarniere** pela gentileza de nos ter cedido o veneno da *Bothrops erythromelas*.

Ao professor **Dalgimar Beserra de Menezes** pela imensa ajuda nos estudos histopatológicos e pelo exemplo de trabalho e competência.

Ao bioquímico **Domingos Barreto de Oliveira** pela realização cuidadosa nos ensaios bioquímicos e pela força e incentivo.

Aos amigos Dra. **Alice Maria Costa Martins**, **Alexandre Havt Bindá** e **Paulo Sérgio Ferreira Barbosa** pela participação em todos os momentos e pela colaboração científica indispensável.

À técnica do laboratório **Maria Silvia Helena França** pela realização cuidadosa do preparo da solução de perfusão e pela colaboração na fase experimental.

Aos amigos **Rondinelle Ribeiro Castro** e **Tiago Moura** pela amizade, companherismo e ajuda durante todo o Mestrado.

Aos estudantes de iniciação científica **Cleidiana Chaves**, **Daniel**, **João Paulo**, **Taís**, **Ticiane** e **Newton** pela contribuição na parte experimental.

Às bibliotecárias **Norma de Carvalho Linhares**, **Rosane Maria Costa** e **Francisca Maria de Oliveira** pela orientação nas referências bibliográficas.

Ao funcionário **Valder Cavalcante Maia Mendonça** pela gentileza e cooperação.

Às secretárias da pós-graduação **Sílvia Maria Azevedo de Lima** e **Aura Rhanes Yida** pela presteza.

A todos os **professores**, **colegas de mestrado** e **funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas e Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC** que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pelo financiamento do trabalho que gerou esta dissertação.

Dedico esta dissertação à meu pai que me ensinou a nunca desistir, a saber superar os momentos difíceis com força, fé e esperança.

Neste momento, o meu coração divide-se em dois sentimentos: saudade e alegria.

Queria que você estivesse aqui para compartilhar esta vitória.

Hoje “tudo se enche com a presença de tua ausência”, contudo agradeço à Deus pelo precioso tempo em que ele permitiu estarmos juntos.

“Que “O Mestre dos Mestres” o ensine que nas falhas e lágrimas se esculpe a sabedoria.
Que “O Mestre da Sensibilidade” o ensine a contemplar as coisas simples e navegar nas águas da emoção.
Que “O Mestre da Vida” o ensine a não ter medo de viver e a superar os momentos mais difíceis da sua história.
Que “O Mestre do Amor” o ensine que a vida é o maior espetáculo no teatro da existência.
Que “O Mestre Inesquecível” o ensine que os fracos julgam e desistem, enquanto os fortes compreendem e têm esperança.
Não somos perfeitos. Decepções, frustrações e perdas sempre acontecerão.
Mas Deus é o artesão do espírito e da alma humana. Não tenha medo.
Depois da mais longa noite, surgirá o mais belo amanhecer. Espere-o”.

Augusto Cury

RESUMO

Efeito renal da *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo Fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* – Fabíola Carine Monteiro de Sousa. Dissertação de Mestrado em Farmacologia do Depto de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Orientadora: Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Alguns animais apresentam resistência natural contra os efeitos de venenos de serpentes que pode ser explicada pela presença de fatores neutralizantes em seus soros. A resistência do *Didelphis marsupialis* da América do Sul contra venenos crotálicos, especialmente do gênero *Bothrops*, de maior importância médica no Brasil, tem sido objeto de investigação nos últimos anos. *Bothrops erythromelas*, conhecida como a jararaca-da-seca ou jararaca-malha-de-cascavel, é responsável por muitos acidentes no Nordeste do Brasil. O veneno desta serpente induz insuficiência renal aguda (Wen *et al.*, 1989). Neste trabalho, nós investigamos a ação do fator antibotrópico isolado do *Didelphis marsupialis* nos efeitos renais do veneno de *B. erythromelas* na ausência de interações sistêmicas. Rins isolados de ratos Wistar, pesando entre 260 a 300g, foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina, veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubado com veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL) e fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) incubado com veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL). Os parâmetros estudados incluem pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU), percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (%TNa⁺, %TK⁺ e %TCl⁻) e *clearance* osmótico (Cosm). O grupo controle perfundido com albumina foi funcionalmente estável durante os 120 min. A administração do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) não modificou os parâmetros funcionais renais quando comparado ao grupo controle. A infusão do veneno de *B. erythromelas* (10µg/mL) causou uma diminuição significativa ($p < 0,05^*$) na pressão de perfusão e na resistência vascular renal aos 60, 90 e 120 min. com efeito máximo aos 90 min. (PP \Rightarrow $ct_{90} = 108,70 \pm 5,1$ mmHg vs $vBE_{90} = 65,20 \pm 5,6^*$ mmHg) e (RVR \Rightarrow $ct_{90} = 5,76 \pm 0,65$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{90} = 3,10 \pm 0,45^*$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) O ritmo de filtração glomerular diminuiu aos 60 min. e aumentou aos 90 e 120 min ($ct_{120} = 0,72 \pm 0,10$ mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{120} = 1,24 \pm 0,26^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). Após a administração do veneno, o fluxo urinário aumentou aos 90 e 120 min. quando comparado ao grupo controle ($ct_{120} = 0,14 \pm 0,07$ mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{120} = 0,47 \pm 0,08^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). O percentual de sódio transportado diminuiu aos 90 e 120 min. ($ct_{90} = 79,18 \pm 0,88$ % vs $vBE_{90} = 58,35 \pm 4,86^*$ %). O percentual de potássio transportado diminuiu aos 90 e 120 minutos ($ct_{90} = 67,20 \pm 4,04$ % vs $vBE_{90} = 57,32 \pm 5,28^*$ %). O percentual de cloreto transportado diminuiu aos 60, 90 e 120 min. ($ct_{90} = 77,32 \pm 2,22$ % vs $vBE_{90} = 55,97 \pm 5,52^*$ %). O *clearance* osmótico (Cosm) aumentou aos 90 e 120 min. ($ct_{120} = 0,13 \pm 0,01$ mL.g⁻¹.min⁻¹ vs $vBE_{120} = 0,42 \pm 0,07^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubado com o veneno de *B. erythromelas* (10µg/mL) bloqueou apenas os efeitos promovidos pelo veneno na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, enquanto a concentração elevada do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) reverteu os efeitos na resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (%TNa⁺, %TK⁺ e %TCl⁻) e *clearance* osmótico. Concluímos que o veneno da *B. erythromelas* alterou todos os parâmetros funcionais avaliados e o fator antibotrópico de *D. marsupialis* foi capaz de inibir os efeitos induzidos pelo veneno em rim isolado de rato.

Palavras-chaves: *Bothrops erythromelas*. *Didelphis marsupialis*. Fator antibotrópico.

ABSTRACT

Renal effect of *Bothrops erythromelas* venom and blockage induced by antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis*. Fabíola Carine Monteiro de Sousa. Master Degree in Pharmacology of the Depart. Of Physiology and Pharmacology Federal University of Ceará. Guide: Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Some animals present natural resistance to the effects of snake venoms that can be explained by the presence of neutralizing factors in their blood serum. The resistance of South American *Didelphis marsupialis*, against crotalid venoms, especially of the genus *Bothrops*, of utmost medical importance in Brazil, has been object of investigation in the last few years. *Bothrops erythromelas*, known as “jararaca-da-seca” or “jararaca-malha-de-cascavel” is responsible for a great deal of snakebites in Northeastern Brazil. The venom of this snake induces acute renal failure (Wen *et al.*, 1989). In this work, we examined the action of the antithrombotic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on the renal effects of *B. erythromelas* venom in the absence of systemic interactions. Isolated kidneys from Wistar rats, weighing 260 to 300g, were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6g% of bovine serum albumin, *Bothrops erythromelas* venom (10µg/mL), antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubated with *Bothrops erythromelas* venom (10µg/mL) and antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) incubated with *Bothrops erythromelas* venom (10µg/mL). The parameters studied included perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR), urinary flow (UF), percent sodium, potassium and chloride tubular transport (%TNa⁺, %TK⁺ and %TCl⁻), and osmotic clearance (Cosm). The control group perfused with albumin was functionally stable for over 120 min. The administration of antithrombotic factor from *Didephis marsupialis* (10µg/mL) did not modify the functional kidney parameters when compared with control group. The infusion of *B. erythromelas* venom (10µg/mL) caused a significant decrease ($p < 0,05^*$) in perfusion pressure and renal vascular resistance at 60, 90 and 120 min. with maximum effect at 90 min. (PP \Rightarrow $ct_{90} = 108.70 \pm 5.1$ mmHg vs $vBE_{90} = 65.20 \pm 5.6^*$ mmHg) and (RVR \Rightarrow $ct_{90} = 5.76 \pm 0.65$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{90} = 3.10 \pm 0.45^*$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹). The glomerular filtration rate decreased at 60 min. and increased at 90 and 120 min ($ct_{120} = 0.72 \pm 0.10$ mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{120} = 1.24 \pm 0.26^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). After administration of the venom, the urinary flow increased at 90 and 120 min when compared with control group ($ct_{120} = 0.14 \pm 0.07$ mL.g⁻¹.min⁻¹. vs $vBE_{120} = 0.47 \pm 0.08^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). Sodium transport percent decreased at 90 and 120 min. ($ct_{90} = 79.18 \pm 0.88\%$ vs $vBE_{90} = 58.35 \pm 4.86^*\%$). Potassium transport percent decreased at 90 and 120 min. ($ct_{90} = 67.20 \pm 4.04\%$ vs $vBE_{90} = 57.32 \pm 5.28^*\%$). Chloride transport percent decreased at 60, 90 and 120 min. ($ct_{90} = 77.32 \pm 2.22\%$ vs $vBE_{90} = 55.97 \pm 5.52^*\%$). The osmotic clearance increased at 90 and 120 min. ($ct_{120} = 0.13 \pm 0.01$ mL.g⁻¹.min⁻¹ vs $vBE_{120} = 0.42 \pm 0.07^*$ mL.g⁻¹.min⁻¹). The antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubated with *B. erythromelas* venom (10µg/mL) blocked only the effects promoted by venom in the perfusion pressure and in the renal vascular resistance, whereas the highest concentration of the antithrombotic factor from *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) reversed the effects on renal vascular resistance, urinary flow, glomerular filtration rate, percent sodium potassium and chloride tubular transport (%TNa⁺, %TK⁺ and %TCl⁻), and osmotic clearance (Cosm). In conclusion, *B. erythromelas* venom altered all the renal functional parameters evaluated and the antithrombotic factor from *D.marsupialis* was able to inhibit the effects induced by the venom in rat isolated kidney.

Keywords: *Bothrops erythromelas*. *Didelphis marsupialis*. Antithrombotic factor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABF - Fator antibotrópico

ABF-Dm - Fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis*

B. - *Bothrops*

C.d. - *Crotalus durissus*

Cosm - Clearance osmótico

CPK - Creatina fosfoquinase

ENa⁺ - Excreção de sódio

EK⁺ - Excreção de potássio

ECI⁻ - Excreção de cloro

Fator Va – Fator V ativado

FU - Fluxo urinário

IP – Intraperitoneal

IM - Intramuscular

IRA - Insuficiência renal aguda

M. – *Micrurus*

Mt-I – Miotoxina I

Mt-II – Miotoxina II

PAF - Fator de agregação plaquetária

PE – Polietileno

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PG – Prostaglandina

PP - Pressão de perfusão

RVR - Resistência vascular renal

RFG - Ritmo de filtração glomerular

SVMPs – Metaloproteinases zinco dependentes presentes no veneno de serpentes

TC - Tempo de Coagulação

% TNa⁺ - Percentual de transporte tubular de sódio

% TK⁺ - Percentual de transporte tubular de potássio

%TCI⁻ - Percentual de transporte tubular de cloro

%pTNa⁺ - Percentual de transporte tubular proximal de sódio

%pTK⁺ - Percentual de transporte tubular proximal de potássio

%pTCI⁻ - Percentual de transporte tubular proximal de cloro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Tipos de dentição encontradas nas serpentes.	21
FIGURA 02 - Diferenças entre serpentes do gênero <i>Micrurus</i> (corais verdadeiras) e serpentes não venenosas (falsas corais).	22
FIGURA 03 -Diferenças entre serpentes do gênero <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis</i> e <i>Crotalus</i> e serpentes não venenosas.	22
FIGURA 04 - <i>Bothrops erythromelas</i>	28
FIGURA 05 - <i>Didelphis marsupialis</i>	47
FIGURA 06 - Sistema de perfusão de rim isolado.	57
FIGURA 07 - Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.	59
FIGURA 08 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Pressão de perfusão.	60
FIGURA 09 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxômetro.	61
FIGURA 10 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxo.	61
FIGURA 11 - Técnica cirúrgica.	63
FIGURA 12 - Rim controle apresentando glomérulos e túbulos normais.	91
FIGURA 13 - Rim tratado com 10µg/mL de veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> apresentando glomérulos com material protéico no espaço urinário.	92
FIGURA 14 - Rim tratado com 10µg/mL de veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> apresentando túbulos com degeneração hidrópico vacuolar.	93
FIGURA 15 - Rim tratado com 10µg/mL do fator antibotrópico de <i>Didelphis marsupialis</i> apresentando glomérulos e túbulos normais.	94
FIGURA 16 -Rim tratado com 10µg/mL do fator antibotrópico de <i>Didelphis marsupialis</i> incubado com 10µg/mL do veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> apresentando glomérulos e túbulos normais.	95
FIGURA 17 - Rim tratado com 30µg/mL do fator antibotrópico de <i>Didelphis marsupialis</i> incubado com 10µg/mL do veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> apresentando glomérulos e túbulos normais.	96

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 1.	76
GRÁFICO 2 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 2.	77
GRÁFICO 3 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 3.	78
GRÁFICO 4 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 4.	79
GRÁFICO 5 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 5.	80
GRÁFICO 6 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 6.	81
GRÁFICO 7 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 7.	82
GRÁFICO 8 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 8.	83
GRÁFICO 9 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 9.	84
GRÁFICO 10 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 10.	85
GRÁFICO 11 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 11.	86
GRÁFICO 12 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 12.	87
GRÁFICO 13 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 13.	88
GRÁFICO 14 - Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 14.	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Distinção das serpentes brasileiras de acordo com a dentição, presença de fosseta loreal e particularidades da cauda, corpo e biologia.	23
QUADRO 02 - Classificação e gravidade do acidente.	44

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **76**
- TABELA 2** - Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **77**
- TABELA 3** - Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **78**
- TABELA 4** - Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **79**
- TABELA 5** - Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **80**
- TABELA 6** - Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **81**
- TABELA 7** - Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **82**
- TABELA 8** - Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de

- Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **83**
- TABELA 9** - Efeitos no percentual de transporte tubular de cloro (%TCl) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **84**
- TABELA 10** - Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de cloro (%pTCl) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **85**
- TABELA 11** - Efeitos na excreção de sódio (ENa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **86**
- TABELA 12** - Efeitos na excreção de potássio (EK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). ... **87**
- TABELA 13** - Efeitos na excreção de cloro (ECl) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). **88**
- TABELA 14** - Efeitos no *clearance* osmótico (Cosm) na ausência (controle) e presença do veneno da *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno da *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL). ... **89**

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos gerais sobre ofidismo	18
1.2 Distribuição e características das serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	25
1.3 Composição dos venenos ofídicos	29
1.4 Alterações clínicas e patológicas	32
1.5 Tratamento e profilaxia	40
1.6 Resistência aos venenos ofídicos	45
1.7 <i>Didelphis marsupialis</i>	46
1.7.1 Descrição	46
1.7.2 Composição e ações do soro do <i>Didelphis marsupialis</i>	48
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Animais experimentais	52
3.2 Veneno	52

3.3 Fator Antibotrópico	52
3.4 Incubação do veneno com o fator antibotrópico	53
3.5 Grupos experimentais	53
3.6 Substâncias utilizadas	54
3.7 Solução perfusora e seu preparo	55
3.8 Sistema de perfusão renal	55
3.8.1 Componentes do sistema de perfusão	58
3.9 Preparo do sistema	60
3.10 Técnica cirúrgica	62
3.11 Protocolo experimental	64
3.12 Avaliação bioquímica	64
3.13 Análise histológica	65
3.14 Cálculo dos parâmetros renais	65
3.15 Análise estatística	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Estudo dos parâmetros funcionais renais	69
4.2 Análise histológica	90
5 DISCUSSÃO	97
6 CONCLUSÕES	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre ofidismo

As serpentes são animais temidos pela maior parte da população do planeta, principalmente da metade ocidental, de cultura cristã. Esta característica cultural está agregada à história do Cristianismo onde já em seu primeiro livro, a Gênese, deparamo-nos com a serpente oferecendo o fruto proibido aos pioneiros, Adão e Eva levando-os a cometer o pecado original e tendo como castigo o exílio do paraíso e a obrigação de trabalhar, procriar e morrer. Por outro lado, na população influenciada pela cultura budista, a serpente é respeitada como animal sagrado, sendo símbolo de prosperidade. (GOULART, 2002).

A verdade é que estes animais são muito importantes para a cadeia ecológica exercendo o papel de controladoras de pragas tais como ratos, insetos e até outras serpentes. Além da carne e da pele, as serpentes nos fornecem o veneno do qual são extraídas proteínas extremamente importantes, base de muitos medicamentos tais como colas cirúrgicas, medicamentos para o coração, anti-hipertensivos, anti-coagulantes, medicamentos para o câncer, e muito mais. Basta dizer que já foram identificadas mais de 400 proteínas diferentes nos venenos das diversas serpentes venenosas. (GOULART, 2002).

Ferreira et al. (1970), fracionaram do veneno de *Bothrops jararaca* nove peptídeos biologicamente ativos. Este trabalho promoveu uma das maiores descobertas brasileiras deste século, a presença de fatores potenciadores de bradicinina no veneno de *Bothrops jararaca*. Estes fatores inibem as enzimas proteolíticas que inativam a bradicinina e catalisam a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Este mecanismo foi o principal responsável pelo aparecimento de fármacos inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA) constituindo o mecanismo de ação do Captopril, um dos fármacos mais empregados atualmente no tratamento da hipertensão.

Segundo Jorge e Ribeiro (1990), os acidentes por animais peçonhentos representam um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, dada a incidência, a gravidade e as seqüelas que causam. (BARRAVIEIRA, 1991). Em países tropicais os acidentes representam problema significativo dada a freqüência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam. (PINHO; PEREIRA, 2001). A Organização Mundial de Saúde calcula que ocorram em nível mundial aproximadamente 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes. (CHIPPAUX, 1998). A

maioria desses casos ocorrem na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia com 25.000 a 35.000 óbitos por ano. (RIBEIRO et al., 1995).

Várias são as características que distinguem as serpentes peçonhentas das não peçonhentas. Desde 1986, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a notificação do acidente ofídico. A partir desta data a distinção entre serpentes venenosas e não venenosas ganhou maior importância no Brasil. Sabe-se hoje que no mundo existem cerca de 3.000 espécies de serpentes das quais 410 são classificadas como venenosas. (BARRAVIERA; PEREIRA, 1994). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS), ocorrem entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos por ano, com letalidade ao redor de 0,45%. A maioria destes acidentes se deve a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. Os dados demonstram que o sexo masculino é o mais acometido. A faixa etária coincide com a idade onde a força de trabalho no campo é maior. (BRASIL-Ministério da Saúde, 2001). Segundo Bochner e Struchiner (2002), a epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil se manteve inalterada nestes últimos 100 anos.

A notificação dos acidentes ofídicos no Ceará é realizada pela Secretaria de Saúde do Estado (SESA), através da Comissão Estadual de Controle de Zoonoses que recebe as fichas das microregionais do estado.

No Ceará existem poucos trabalhos sobre ofidismo. Foram notificados à Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, no período de 1992 a 1995, 688 acidentes causados por serpentes peçonhentas (média anual de 172 casos), com coeficiente de incidência variando entre 0,9 a 5,8 por 100.000 habitantes. Dentre 473 casos em que houve referência ao gênero de serpente 88,3% foram por *Bothrops*, 10,6% por *Crotalus*, 0,8% por *Micrurus* e 0,2% por *Lachesis*. O perfil clínico-epidemiológico dos acidentes ofídicos depende da distribuição das espécies dentro de cada região, dos hábitos destes animais e do grau de exposição das populações humanas a estes agentes. (FEITOSA et al., 1997).

O aumento do número de casos coincide com o aumento da atividade do setor agropecuário. Os meses de abril a setembro apresentaram maior incidência. Houve predominância de pacientes do sexo masculino (75,6%) e com idades de 10 a 49 anos (72,3%). As regiões anatômicas mais freqüentemente picadas foram os membros inferiores (81,9%) e superiores (14,7%). O atendimento na unidade de saúde que notificou o acidente ocorreu dentro de seis horas em 66,9% dos casos. A letalidade foi de 0,7%. Os acidentados foram, sobretudo, agricultores (62,7%), a maioria dos casos ocorreu no próprio local de trabalho. Os acidentes ofídicos no Estado do Ceará podem ser considerados acidentes de trabalho, acometendo principalmente os trabalhadores rurais e constituindo causa de óbito. (FEITOSA et al., 1997).

Nas regiões Sudeste e Sul observam-se um declínio dos acidentes de Maio a Agosto, coincidindo com inverno, onde as serpentes se movimentam menos e a atividade agrícola está diminuída. No Nordeste observa-se um incremento de casos entre Março e Setembro, coincidido com a época do plantio e colheita da safra agrícola, com o declínio de Outubro a Fevereiro. Portanto, as maiorias dos acidentes ocorrem nos meses quentes e chuvosos (FEITOSA et al., 1997).

Segundo o Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores, da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA), as estatísticas dos últimos cinco anos mostram que houve aumento de acidentes provocados por animais peçonhentos. Em 1998, foram registrados 344 casos; em 1999, 165; em 2000, 542; em 2001, 825; e em 2002, 1003. Esse aumento é resultado do trabalho de notificação que o Núcleo de Controle vem mantendo. Nestes anos, não houve registro de óbito. O maior número de acidentes registrados se deve ao gênero *Bothrops* enquanto o gênero *Crotalus* responde pelo maior número de óbitos. Os acidentes envolvendo o gênero *Micrurus* são raros, ocorrendo em menos de 0,5% dos casos. O gênero *Lachesis* é predominantemente encontrado no Maciço de Baturité sendo responsável pelos acidentes ocorridos nesta área. Algumas espécies já foram encontradas em Guaramiranga e Pacoti. (CEARÁ – Secretaria de Saúde do Estado, 2003).

A identificação das serpentes ocorre de acordo com suas características de dentição, presença ou não de fosseta loreal e particularidades da cauda, corpo, olhos e de sua biologia. (BARRAVIERA, 1991).

Quanto à dentição as serpentes podem ser divididas em áglifas, opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas, sendo as duas últimas peçonhentas. (TANUS; RIBEIRO, 1990), figura 01.

Os ofídios de dentição áglifa têm dentes aproximadamente do mesmo tamanho e não possuem canais ou sulcos. Temos como exemplo as serpentes da família Boidae. As espécies que apresentam dentição opistóglifa possuem dentes anteriores de tamanhos aproximadamente iguais e dentes posteriores de tamanhos diferenciados. Os dentes do maxilar superior posterior são maiores que os demais e são providos de sulcos por onde o veneno escorre e penetra no ferimento. Em virtude de sua localização torna-se difícil a inoculação do veneno em um animal que não pode ser deglutido, como exemplo teríamos algumas serpentes da família Colubridae. (JORGE; RIBEIRO, 1990). Tanto a classificação áglifa como a opistóglifa são características de serpentes não peçonhentas, porém existem algumas exceções.

As serpentes peçonhentas apresentam dois tipos de dentição. Os ofídios com dentição proteróglifa têm presas anteriores, sendo estas pequenas, fixas e sulcadas. A família Elapidae é um exemplo deste tipo de dentição. As serpentes classificadas com dentição tipo solenóglifa apresentam um ou mais pares de presas anteriores, grandes, canaliculadas e inseridas no osso maxilar que é móvel, permitindo a movimentação dessa presa para frente no ato do bote. O gênero Bothrops é exemplo deste tipo de dentição. (PUORTO, 1992).

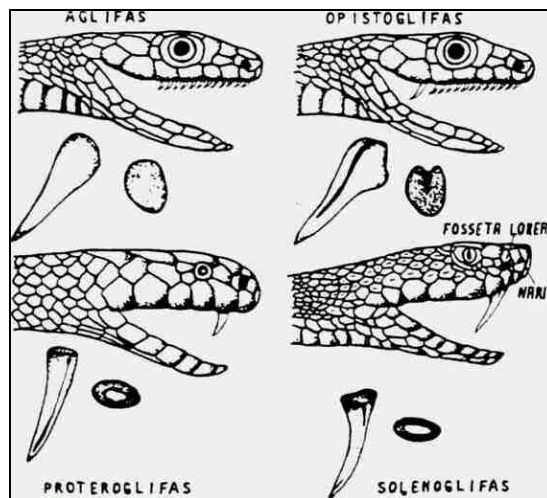


FIGURA 01 – Tipos de dentição encontradas nas serpentes

Fonte: Schvartsman, 1992.

A maioria das serpentes peçonhentas no Brasil apresenta fosseta loreal, com exceção para o gênero *Micrurus*. A fosseta loreal é caracterizada por um orifício entre a narina e o olho, uma de cada lado e tem função termosensitiva (figura 01).

Características da cauda também podem ajudar na identificação, principalmente dentre os gêneros da subfamília Crotalinae. O gênero *Crotalus* apresenta guizo ou chocalho característico das cascavéis. Na cauda do gênero *Lachesis* (surucucu) encontramos escamas eriçadas na porção final. Dentre os três gêneros desta família, o gênero *Bothrops* é o único que não tem característica marcante na cauda. (ROMANO-HOGE, 1990).

As serpentes venenosas tendem a ter o corpo de espessura grossa e não muito alongado, cabeça geralmente triangular e hábitos noturnos. Quando ameaçadas montam posição de defesa e não fogem. Têm deslocamento lento. Os olhos são pequenos e a pupila fendida.

As não venenosas têm o corpo fino e longo, com a cabeça geralmente arredondada. Na sua maioria apresentam hábitos diurnos e normalmente fogem quando molestadas, demonstrando grande agilidade. Dentre as de hábito diurno as pupilas são redondas enquanto as de hábito noturno apresentam pupilas fendidas. (BARRAVIERA, 1993).

As figuras 02 e 03 mostram as características que distinguem as serpentes peçonhentas das não peçonhentas.





GÊNERO	OLHO	CAUDA	PEÇONHA
Micrurus (Coral verdadeira)	PEQUENO 	CURTA 	SIM
Outros (falsa Coral)	GRANDE 	LONGA 	NÃO

FIGURA 02 – Diferenças entre serpentes do gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) e serpentes não venenosas (falsas corais).

Fonte: CEATOX/IJF- Ce, 2002




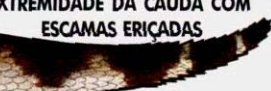



GÊNERO	CABEÇA	CAUDA	PEÇONHA
<i>Bothrops</i> (Jararaca)	FOSSETA LOREAL 	COM ESCAMAS REGULARES 	SIM
<i>Lachesis</i> (Surucucu)	FOSSETA LOREAL 	EXTREMIDADE DA CAUDA COM ESCAMAS ERIÇADAS 	SIM
<i>Crotalus</i> (Cascavel)	FOSSETA LOREAL 	CAUDA COM CHOCALHO 	SIM
Outras espécies (Salamanta etc.)	SEM FOSSETA LOREAL 	SEM CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS	NÃO

FIGURA 03 – Diferenças entre serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* e serpentes não venenosas.

Fonte: CEATOX/IJF- Ce, 2002.

Muitas exceções são encontradas no tocante às características do corpo, cabeça e olhos, quando tentamos distinguir as serpentes venenosas das não venenosas. Somente a classificação da dentição assegura uma melhor identificação. Um resumo destas características pode ser visto no quadro 01.

Características	Venenosas		Não Venenosas
	Família <i>Crotalidae</i>	Família <i>Elapidae</i>	
boca	triangular	arredondada	arredondada
olhos	pequenos – pupila em fenda	pequenos – pupila arredondada	redondos – diurnas noturnas – fenda
fosseta loreal	presente	ausente	ausente
escamas na cabeça	presente	ausente	geralmente ausentes
dentes	dentes inoculadores de veneno são grandes e implantados no osso maxilar superior, situados na parte anterior	dentes inoculadores de veneno são pequenos e situados no maxilar superior, mais para o interior da boca	dentes médios ou pequenos, mais ou menos iguais
cauda	guizo – cascavéis sem guizo – jararaca pequenas escamas arrepiadas no final da cauda - surucucu	em situação de perigo utilizam a cauda para dar a impressão de que se trata da cabeça	cauda mais roliça e longa nos machos e mais estreita e curta nas fêmeas
reconhecimento	relativamente fácil pela presença da fosseta loreal	difícil e perigoso por necessidade do exame dos dentes	geralmente fácil desde que não se assemelhem as corais
biologia	hábitos noturnos. Postam-se em posição de defesa quando molestadas. São vagarosas.		diurnas. Fogem quando molestadas e são ágeis
corpo	tende a ser grosso e não muito longo		fino e longo
pele		áspera	lisa

QUADRO 01 – Distinção das serpentes brasileiras de acordo com a dentição, presença da fosseta loreal e particularidades da cauda, corpo e biologia.

Fonte: Barraviera, 1991.

Em nosso país duas famílias de serpentes despertam interesse em saúde pública, a *Viperidae* e a *Elapidae*, as quais são representadas pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* pertencem à família *Viperidae*, enquanto o gênero *Micrurus* pertence à família *Elapidae*. Várias espécies pertencem ao gênero *Bothrops* e ao gênero *Micrurus*, enquanto que apenas uma faz parte do gênero *Crotalus* (*Crotalus durissus*) e uma do gênero *Lachesis* (*Lachesis muta*). (JORGE; RIBEIRO, 1990; BARRAVIERA, 1993;).

A maioria dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. As mais importantes espécies encontradas no Brasil são *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwieddi*, *B. cotiara*, *B. pradoi*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. atroz*, *B. bilineatus* e *B. erythromelas*. Elas habitam preferencialmente ambientes úmidos e possuem ampla distribuição geográfica no território nacional sendo responsáveis por 80 a 90% dos acidentes. (BARRAVIERA, 1993).

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente por cascavéis, encontram-se distribuídas no território brasileiro em seis sub-espécies, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus marajoensis* e *Crotalus durissus trigonicus*. (AZEVEDO-MARQUES, 1990; BARRAVIERA, 1990; JORGE; RIBEIRO, 1992). São responsáveis por 8 a 10% dos acidentes em nosso país. Apesar da baixa frequência, os acidentes crotálicos têm toxicidade bastante elevada, com mortalidade elevada chegando a 72% nos casos não tratados com soro anticrotálico e 11% nos casos tratados. (BARRAVIERA, 1993).

As serpentes do gênero *Lachesis*, conhecidas como surucucu, encontram-se distribuídas nas florestas tropicais, dentre elas, a Floresta Amazônica e a zona da Mata Atlântica. As serpentes que representam esse gênero fazem parte de uma única espécie, com duas sub-espécies, a *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctivaga*. Os acidentes relatados são raros, constituindo 1% do total de acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil.

As serpentes do gênero *Micrurus*, conhecidas como corais verdadeiras, encontram-se amplamente distribuídas no Brasil e as espécies pertencentes a esse gênero são *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca*, *M. surinamensis*, *M. spixii* sendo responsáveis por 0,5% dos acidentes. Apesar da baixa incidência, os acidentes elapídicos são geralmente fatais. (SOERENSEN, 1990).

1.2 Distribuição e características das serpentes do gênero *Bothrops*

O Gênero *Bothrops* pertence à família *Crotalidae* constituindo o mais numeroso gênero, com 32 espécies catalogadas, apresentando grande variedade de cores (variando do verde ao negro), desenhos, tamanhos e hábitos. Ocorrem na América Central e América do Sul, ocupando todo território brasileiro. Em virtude do número de espécies há grande dificuldade na sua identificação por nome popular em todo o território nacional. Alguns nomes mais conhecidos são jararaca, jararacuçu, jararaca pintada, urutu e cotiara (PUORTO, 1992). Habitam preferencialmente ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, podendo ser encontradas penduradas em árvores, enterradas ou entocadas à beira de rios ou dentro d'água, além de zonas rurais, locais de proliferação de ratos e periferia de grandes cidades. Apresentam tamanhos que variam de 40 centímetros a 2 metros de comprimento. Têm hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas do país. (FRANÇA; FAN, 1992).

Algumas descrições das principais espécies do gênero *Bothrops* existentes no Brasil. (CAMPBELL; LAMAR, 1989; ANIMAIS peçonhentos: serpentes *Bothrops*, 2003;):

➤ *Bothrops alcatraz* – recentemente descoberta, presente na ilha de Alcatraz, litoral norte do estado de São Paulo chamada de Jararaca de Alcatrazes. A espécie foi batizada como *Bothrops alcatraz* (LIMA, 2001).

➤ *Bothrops alternatus* - conhecida como Urutu-Cruzeiro ou simplesmente Urutu. Apresenta desenhos em forma de gancho de telefone, medindo cerca de 1 metro de comprimento. É ágil, violenta, dar o bote meio de lado, do tipo chicote, extremamente voraz. É encontrada em vegetação rasteira, perto de rios e lagos ou em plantações. Aparece a partir do Estado de Minas Gerais para o Sul do país.

➤ *Bothrops atrox* - chamada de Jararaca, Surucucu, Surucucurana, Cambóia, conforme a área da Região Norte em que aparece (sendo mais conhecida por Jararaca do Norte). Possui porte médio sendo que os indivíduos grandes podem alcançar quase 1,50 metros de comprimento. Apresenta atividade noturna, mas também é ativa durante o dia. Com ampla distribuição geográfica e predomínio progressivo, habita tanto as florestas como áreas desmatadas, locais inundados, áreas com atividades agropastoris, adaptando-se facilmente. É a maior responsável pelos acidentes ofídicos no Norte do Brasil sendo a espécie responsável pela maioria dos acidentes na Amazônia.

➤ *Bothrops bilineatus* - Tem cor verde clara e é arborícola. Conhecida por Jararaca-verde, é muito confundida com a cobra-papagaio (*Corallus caninus*), que também é arborícola, porém não venenosa. Encontrada na Zona da Mata e na Amazônia.

➤ *Bothrops brasiliensis* – conhecida como jararaca vermelha e surucucu vermelha, pode ser encontrada no Amazonas, Amapá, Pará e Mato Grosso.

➤ *Bothrops castelnaudi* – possui o nome popular de Jararaca-cinza sendo encontrada no Amapá, Goiás e Mato Grosso.

➤ *Bothrops cotiara* - conhecida como Jararaca, Jararaca-da-barriga-preta e cotiara. É encontrada do sul do Estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul.

➤ *Bothrops erythromelas* - conhecida por Jararaca-da-seca por habitar áreas xerófilas como a caatinga. Encontrada no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Maranhão, Bahia e Minas Gerais. Apresenta porte pequeno, aproximadamente 0,50 metros de comprimento. Sua coloração vai do marrom avermelhado até o cinza, com manchas dorsais irregulares, lembrando trapézios. Possui faixa postocular, ventre ligeiramente manchado em tons escuros, objeto do estudo em questão.

➤ *Bothrops fonsecai* – popularmente chamada de jararaca, aparece nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

➤ *Bothrops iglesi* – conhecida como jararaquinha, existe apenas no estado do Piauí.

➤ *Bothrops insularis* – chamada de jararaca ilhoa, é encontrada somente na Ilha de Queimada Grande no estado de São Paulo.

➤ *Bothrops itapetiningae* – conhecida como cotiarinha, boipeva, jararaca-do-campo e pequena cotiara, encontrada nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina.

➤ *Bothrops jararaca* – conhecida popularmente por Jararaca, é a responsável pelo maior número de acidentes ofídicos por ser a mais abundante, por viver no campo e nos lugares comuns ao homem. Apresenta coloração esverdeada com desenhos semelhantes a um “V” invertido, medindo aproximadamente 1 metro de comprimento. Aparece em todo

território nacional principalmente na Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

➤ *Bothrops jararacussu* - conhecida popularmente por Jararacuçu que significa "jararaca-grande". Encontrada nas regiões baixas e alagadiças, margens de rios e lagoas, podendo alcançar tamanho avantajado. É capaz de secretar até 4 mililitros de veneno, o que corresponde aproximadamente a 1 grama de veneno seco. Constitui enorme perigo para pescadores, caçadores e para os gados bovino e equino. É uma espécie freqüente no litoral, sendo encontrada no Espírito Santo, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Grantsau (1991), descreveu dois padrões de cores para esta espécie, uma preta com amarela (fêmea) e outra marrom com manchas triangulares de marrom mais escuro (macho).

➤ *Bothrops leucurus* – conhecida como jararaca, existindo somente no estado da Bahia.

➤ *Bothrops marajoensis* – conhecida como jararaca, encontrada nos estados do Amapá, Pará e Ilha de Marajó.

➤ *Bothrops microphthalmus* – chamada de jararaca, encontrada na região da Amazônia.

➤ *Bothrops moojeni* - é chamada de Caiçaca ou Jararacão. Possui porte médio sendo que alguns indivíduos podem ultrapassar 1,50 metros de comprimento. Tem pele de cor característica marrom, a combinação de cores e desenhos empresta à pele um aspecto aveludado. Extremamente perigosa, rápida, valente, dá uma sucessão de botes, projetando praticamente todo o corpo, o que dificulta sua captura com laço ou gancho. Habita as regiões mais quentes e secas, tendo por distribuição geográfica os Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, Maranhão, Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal.

➤ *Bothrops neuwiedi* - conhecida como Jararaca-pintada e Jararaca-de-rabo branco. São 12 as subespécies encontradas no Brasil. Amplamente distribuída pelo território nacional (com exceção da Amazônia), habita principalmente as regiões secas, sendo considerada espécie das mais perigosas. É encontrada em Rondônia, Maranhão, Piauí, Ceará, Goiás, Mato Grosso e em todos os estados do Sul com exceção de Santa Catarina.

➤ *Bothrops pradoi* - popularmente chamada de Jararaca do Estado do Espírito Santo ou Bahia, sendo encontrada predominantemente em determinadas regiões desses estados.

➤ *Bothrops pirajai* - de tamanho avantajado para o gênero, podendo competir em tamanho com *Bothrops jararacussu*. É encontrada no Sul da Bahia e em Minas Gerais.



FIGURA 04 – *Bothrops erythromelas*

1.3 Composição dos venenos ofídicos

O veneno das serpentes peçonhentas é composto de várias substâncias, cuja proporção e características específicas variam entre as diferentes espécies conhecidas. (BARRAVIERA, 1994).

A maioria dos componentes tóxicos e biologicamente ativos dos venenos ofídicos é de natureza protéica, embora possam também apresentar componentes orgânicos não protéicos como aminoácidos livres e pequenos peptídeos; carboidratos (glicoproteínas); lipídios, principalmente fosfolipídios; e aminas biogênicas. (VARANDA; GIANNINI, 1994). As proteínas são responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados e constituem entre 90 e 95% do peso seco dos venenos ofídicos. (BON, 1997).

Os venenos ofídicos contêm substâncias inorgânicas como sódio, cálcio, potássio, magnésio, fósforo e pequenas quantidades de metais como zinco, ferro, cobre, cobalto e manganês que constituem a parte não protéica. (FRIEDERICH; TU, 1971).

A PLA2 catalisa a hidrólise de um éster graxo ligado a diacil fosfatídeo, formando lisofosfatídeo e liberando ácidos graxos saturados e insaturados. (RUSSEL; DART, 1991). A hidrólise ocorre nas ligações 2-acilas das fosfatidicolinas e das fosfatidiletanolaminas liberando ácidos graxos e formando lisolectinas, uma espécie de lisofosfolipídios, que alteram a permeabilidade das membranas celulares, promovendo hemólise indireta. (HAVT, 1999). Porém, para que isto ocorra, é necessária a presença de substratos como lipoproteínas séricas. (VITAL BRAZIL, 1982).

Eritrócitos são resistentes ao efeito lítico direto das PLA2 miotóxicas de uma variedade de venenos crotálicos. (FLETCHER et al., 1997; GUTIÉRREZ et al., 1997;). Díaz et al. (2001), demonstraram a ocorrência de hemólise direta. Foi sugerida a existência de dois diferentes tipos de sítios de ligação para as PLA2 miotóxicas em membranas, conforme proposto por Bon (1997) e Lomont et al. (1999). Muitas células apresentam domínios constituídos de fosfolipídios carregados negativamente, especialmente L- α -Fosfatidil-L-serina (PS), na superfície de suas membranas. Esses domínios negativos constituem sítios aceptores de baixa afinidade para miotoxinas. Eritrócitos apresentam em sua superfície um conteúdo baixo de fosfolipídios carregados negativamente. Quando enriquecidos com fosfolipídios carregados negativamente, estas células passaram a apresentar elevada afinidade para PLA2 em suas membranas o que pode explicar a elevada susceptibilidade à miotoxinas botrópicas.

Além da ação hemolítica, a PLA2 pode induzir vários efeitos incluindo neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, iniciação ou inibição

da agregação plaquetária, ação anticoagulante, convulsivante, hipotensiva e edematogênica, embora nem todas as PLA2 exibam tais atividades farmacológicas. A fosfolipase de diversos venenos, mesmo quando administrada na mesma dose, pode induzir a diferentes efeitos farmacológicos. (KINI; EVANS, 1989; SOARES et al., 1998).

A atividade proteolítica tem sido relacionada a enzimas identificadas como serino ou metaloproteinases. Elas são responsáveis por intensas reações locais como edema hemorrágico e necrose; ação hemorrágica promovida pelas hemorraginas ou fatores hemorrágicos; ação coagulante e formação de bradicinina. (IWANAGA; SUZUKI, 1979).

As metaloproteinases são proteínas com atividade proteolítica que contêm cálcio e zinco em suas moléculas, sendo responsáveis pela hemorragia no envenenamento botrópico. (VARANDA; GIANINNI, 1994).

As enzimas isoladas do veneno, que possuem atividade tipo "trombina-símile" ou trombina (serinoproteinase), apresentam a capacidade de atuar sobre a molécula de fibrinogênio encontrada no sangue humano, transformando-a diretamente em fibrina. (KAMIGUTI et al., 1988). Essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A ou B, enquanto a trombina sérica libera ambos. Isso caracteriza a formação de um complexo de fibrina facilmente degradada por plasmina, gerando, assim, um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio e diminuição do tempo de coagulação. (RUSSEL, 1983; HAVT et al., 1999). Esta enzima encontra-se presente nos venenos das serpentes crotálicas e botrópicas. No Brasil, os estudos têm sido realizados principalmente com os venenos da *B. jararacussu* (HOMSI-BRANDERBURGO et al., 1988; HAVT et al., 2001), *B. jararaca* (TANIZAKI et al. 1989), *C. d. terrificus* (RAW, 1986) e *C. d. cascavella* (MARTINS et al., 2002).

Ativadores de protrombina têm sido isolados de venenos de uma ampla variedade de espécies de serpentes, particularmente aquelas pertencentes à família Viperidae. Existem, entretanto, grandes diferenças entre os mecanismos os quais os componentes de venenos ativam protrombina. (ROSING; TANS, 1991; YAMADA; MORITA, 1997). De acordo com as diferenças estruturais e funcionais os ativadores de protrombina podem ser classificados em quatro grupos. (ROSING; TANS, 1992). KINI et al. (2001), propuseram uma nova classificação em grupos A, B, C e D.

Grupo A incluem metaloproteinases que eficientemente ativam protrombina sem requerer nenhum cofator, como Ca^{2+} , fosfolipídios ou Fator Va (Fator V ativado), por exemplo, ativadores de *Echis carinatus*, (KORNALIK; BLOMBACK, 1975), *Bothrops atrox* (HOFMANN; BON, 1987) e *Bothrops neuwiedi* (GOVERS-RIEMSLAG et al., 1987).

Grupo B contém metaloproteínas Ca^{2+} dependente como carinactivase-1 de *E. carinatus leukogaster* (YAMADA et al., 1996) e multiactivase de *E. multisquamatus* (YAMADA; MORITA, 1997). Este grupo requer concentrações milimolares de Ca^{2+} e não possuem atividade na ausência deste íon.

Grupo C são serinoproteases que requerem apenas Ca^{2+} e fosfolípidios carregados negativamente, mas nenhum Fator Va para atividade máxima. Tem sido purificado e caracterizado de venenos de *Oxyuranus scutellatus* (OWEN; JACKSON, 1973; WALKER, OWEN; ESMON, 1980) e *Pseudonaja textiles* (MASCI; WHITAKER; JERSEY, 1988).

Grupo D são serinoproteases encontradas nos venenos elapídicos na Austrália e suas atividades são altamente estimuladas por Ca^{2+} , Fator Va e fosfolípidios (JOBIN; ESNOUF, 1966; MARSHALL; HERMANN, 1983).

Além da variada gama de fatores presentes no próprio veneno, um grande número de substâncias farmacologicamente ativas são liberadas no envenenamento. Dentre elas, podemos citar histamina, bradicinina, 5-hidroxitriptamina, lisofosfatídios, prostaglandinas, catecolaminas e anafilatoxinas entre outras. (VITAL BRAZIL, 1982).

Venenos ofídicos contêm toxinas específicas, que constituem a parte protéica não enzimática, as quais afetam intensamente processos vitais como a função de nervos e músculos, a ação cardíaca, o sangue e a permeabilidade das membranas. (KARLSON, 1979).

Neurotoxinas são as toxinas mais amplamente estudadas e também os constituintes mais tóxicos dos venenos ofídicos. São divididas, de acordo com o sítio de atuação, em pós-sinápticas e pré-sinápticas.

As pós-sinápticas mimetizam a ação do curare, ligando-se aos receptores colinérgicos sem provocar despolarização, inibindo a transmissão neuromuscular. Ocorrem nas serpentes da família Elapidae. (VITAL BRAZIL, 1980). As toxinas pré-sinápticas agem possivelmente inibindo o influxo de cálcio, evitando assim a liberação de acetilcolina. Têm letalidade maior que as toxinas pós-sinápticas, são estruturalmente relacionadas a fosfolipase A2 e podem agir como toxinas mionecróticas. Foram encontradas também em serpentes da subfamília Crotalinae. (HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979).

As cardiotoxinas são denominações usadas para toxinas de membrana que causam a despolarização persistente das membranas celulares, excitáveis ou não, acarretando distúrbios celulares como hemólise e citotoxicidade. Só têm sido isoladas de venenos elapídicos, e são responsabilizadas, em associação com fosfolipases, pelas lesões locais como edema e necrose, nos acidentes com *Najas*. (REID, 1964; VITAL BRAZIL, 1982).

1.4 Alterações clínicas e patológicas

A maioria dos venenos exerce provavelmente seus efeitos sobre quase todas as células ou tecidos e suas propriedades farmacológicas são determinadas por muitos componentes biologicamente ativos. A ação do veneno ou de seus componentes no organismo é dependente de um número de variáveis, incluindo taxas de administração, absorção, distribuição, acumulação e ação no sítio receptor, metabolismo e excreção. (RUSSELL; DART, 1991).

As ações fisiopatológicas causadas pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são proteolítica, coagulante, hemorrágica, miotóxica, neurotóxica e nefrotóxica. (JORGE; RIBEIRO, 1990). Foram descritas atividade anticoagulante da *Bothrops castelnaudi* e *Bothrops erythromelas* (NAHAS et al., 1979), atividade sobre as plaquetas da *Bothrops atrox* (NIEWIAROWSKI et al., 1977) e atividade hemolítica “in vitro” (ROSENFELD et al., 1960/62).

Segundo Cupo et al. (1988), a atividade proteolítica do veneno decorre da atividade de múltiplos componentes com ações diversas tais como a liberação de mediadores químicos que são basicamente os responsáveis pelas lesões no local da picada, como edema inflamatório, bolhas e necrose. Enzimas proteolíticas como proteases, fosfolipases e hialuronidases promovem a liberação de substâncias farmacologicamente ativas (bradicinina, serotonina e histamina), que atuam no efeito hipotensor. Estimulam ainda a liberação dos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária – PAF. (FRANÇA; FAN, 1992).

A ação coagulante é responsável por um consumo de fatores de coagulação, principalmente do fibrinogênio, causando um quadro de incoagulabilidade sanguínea. (RIBEIRO; JORGE, 1988). Essa ação coagulante pode ocorrer por ativação de protrombina e do fator X, ambos ocorrendo na presença de fosfolípido e cálcio, e atividade sobre o fibrinogênio conhecido como efeito trombina-like, descrito na seção anterior. (JORGE; RIBEIRO, 1990).

Nahas et al. (1979), ao estudarem vinte e seis venenos botrópicos demonstraram que a ação coagulante do veneno de *B. erythromelas* era devido a ativadores de protrombina e Fator X levando a produção normal de trombina. A ausência de atividade trombina-like no veneno era devido ao efeito fibrinogenolítico.

A hemorragia no envenenamento botrópico é atribuída a componentes específicos chamados hemorraginas. São proteínas com atividade proteolítica que contêm cálcio e zinco

em suas moléculas, denominadas de metaloproteinases. (VARANDA; GIANINNI, 1994). Ohsaka (1979), atribuiu à atividade das hemorraginas uma ação sobre a membrana basal do endotélio vascular decorrente de um aumento da permeabilidade inicial, seguida da perda da função entre as células, resultando na ruptura da integridade vascular.

As metaloproteinases do veneno atuam diretamente sobre as estruturas dos vasos sanguíneos, provocando extravasamento de sangue (RUIZ DE TORRENT et al., 1999), sendo provável que neste efeito também participem enzimas com atividade proteolítica que em conjunto atuam sobre a lâmina basal, destruindo a matriz extracelular, cercado as células endoteliais dos capilares e degradando *in vitro* fibronectina, laminina, colágeno e elastina (OWNBY et al., 1978; SERRANO et al., 1993).

Uma enzima ativadora de protrombina purificada e caracterizada como uma proteína de cadeia simples de 78 kDa denominada beritrativase foi isolada recentemente do veneno de *Bothrops erythromelas*. Esta enzima compreende cerca de 5% do veneno bruto e possui propriedades funcionais e estruturais semelhantes aos ativadores de protrombina do Grupo A, com atividade enzimática típica de uma metaloproteinase. Beritrativase é capaz de desencadear respostas proinflamatória endotelial e procoagulante. Contêm metaloproteinases, desintegrina-like e domínios ricos em cisteína, entretanto não possui nenhuma atividade hemorrágica. (SILVA et al., 2003).

A ação mionecrótica se deve as miotoxinas de estrutura fosfolipásica (destituída ou não de atividade enzimática), que levam a transtornos vasculares e hemostáticos, podendo causar um processo tissular isquêmico levando a uma amputação de membro ou lesão músculo tendinosa permanente. (ROODT et al., 2000).

Comparando as seqüências de miotoxinas e fosfolipases isoladas de venenos de serpentes, Kini e Iwanaga (1986), sugeriram que o sítio catiônico associado com a região hidrofóbica é responsável pela miotoxicidade, sendo independente da atividade fosfolipásica, sugerindo que esta atividade não é essencial para o efeito farmacológico. Gutiérrez et al. (1989), afirmaram que o “sítio miotóxico” nessas toxinas pode ser responsável pela ligação e penetração à membrana plasmática do músculo esquelético possivelmente por interações hidrofóbicas, enquanto o sítio catiônico pode ligar fosfolipídios ácidos ou proteínas ácidas do retículo sarcoplasmático. Isto resulta na desorganização da bicamada lipídica resultando no influxo de cálcio para a célula através dos canais de cálcio alterando de forma generalizada a membrana plasmática, sendo o provável mecanismo para as lesões causadas por estas toxinas.

Moura-da-Silva et al. (1991), demonstraram que o veneno de *Bothrops erythromelas* tem baixa capacidade de ligação ao tecido muscular o qual é consistente com a baixa miotoxidade do veneno.

Dentre as inúmeras atividades exercidas pelos componentes protéicos, destacamos a ação enzimática e a presença de toxinas protéicas específicas, sendo a maioria delas hidrolases. Algumas são encontradas em todas as espécies, como a fosfolipase A2. (HAVT, 1999).

A fosfolipase A2 (PLA2) é encontrada em venenos de mais de 20 espécies de serpentes e parece estar amplamente distribuída em todos os venenos de elapídeos e viperídeos, sendo amplamente encontrada nos venenos botrópicos. As serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox* apresentam alta atividade fosfolipásica (VIDAL; STOPPANI, 1971; VIDAL et al., 1972) quando comparada com a *Bothrops erythromelas* a qual possui considerável atividade de fosfolipase A2 (FLORES et al., 1993). Contudo, já foram isoladas fosfolipasas A2 dos venenos de *Bothrops neuwiedi* (VIDAL; STOPPANI, 1971), *Bothrops asper* (GUTIERREZ et al., 1984), *Bothrops alternatus* (NISENBOM et al., 1986) e *Bothrops moojeni* (REICHL et al., 1989).

Além da ação hemolítica, enzimas com atividade de fosfolipase A2 também apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas e miotóxicas, dando origem à necrose e mioglobinúria. (FOHLMAN; EAKER, 1977). As PLA2, de veneno de serpentes são capazes de induzir efeitos biológicos severos como cardiotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, edema, anticoagulação, convulsão e hipotensão. (KINI; IWANAGA, 1986; SOARES et al., 1998).

A atividade fosfolipásica pode produzir prostaglandinas vasodilatadoras renais, PGE1, PGE2, PGA1, PGA2, PGH2, PGI2, PGG2, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese ou produz PGF2 α cuja ação é vasoconstritora. Além das prostaglandinas, a PLA2, através da ciclooxigenase, pode ativar o tromboxano A2 que também possui ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. (BYDLOWSKI, 2000).

Bothrops erythromelas, comumente conhecida como “jararaca da seca” ou “jararaca malha-de-cascavel”, é responsável por muitos acidentes no Nordeste do Brasil. (WEN et al., 1989; ROMANO-HOGE, 1990). O veneno é destituído de atividade trombina-like (NAHAS et al., 1979; MARUYAMA et al., 1992), porém exibe poderosa ação procoagulante nos fatores X e II (NAHAS et al., 1979; VASCONCELOS, 1996). Pacientes com envenenamento sistêmico podem desenvolver coagulação intravascular disseminada

seguida por incoagulabilidade sangüínea devido ao consumo de fatores coagulantes (MARUYAMA et al., 1992). O veneno também possui considerável atividade hemorrágica (MARUYAMA et al., 1992; VASCONCELOS, 1996), fibrinolítica, proteolítica (FURTADO et al., 1991; SANCHEZ et al., 1992), e fosfolipase A2 (FLORES et al., 1993), induz edema e necrose (SANCHEZ et al., 1992; VASCONCELOS, 1996) e inibe agregação plaquetária (ZAPPELLINI; PRADO-FRANCESCHI, 1990). A atividade miotóxica direta do veneno é baixa (MOURA-DA-SILVA et al., 1991) sugerindo que a fosfolipase abrange outros alvos biológicos. Recentes estudos em cães mostraram que o veneno induz mudanças hemostáticas envolvendo hipercoagulabilidade sangüínea seguida por incoagulabilidade sangüínea (VASCONCELOS, 1996) e intensa hemorragia nos pulmões, rins e fígado. (VALENÇA et al., 1996).

O quadro clínico causado pelo acidente botrópico se caracteriza por uma sintomatologia local, alterações no tempo de coagulação, hemorragias sistêmicas e complicações locais e/ou sistêmicas. Existe uma relação direta entre a sintomatologia local e a quantidade de veneno inoculado. (BARRAVIERA, 1993).

Trinta minutos após a picada observamos dor, edema e eritema causados pelas atividades enzimáticas e proteolíticas do veneno, que serão mais intensos de acordo com a quantidade de veneno inoculado durante a picada. A dor é imediata e o edema se forma nas primeiras 6 horas. (BARRAVIERA, 1993).

Inflamação e dor estão freqüentemente associadas com o envenenamento botrópico. (ROCHA et al., 2000; CHACUR et al., 2001). Teixeira et al. (1994), demonstraram que a hiperalgesia causada pelo veneno da *Bothrops jararaca* é independente da resposta edematogênica induzida pelo veneno e mediada por mediadores lipídicos como as prostaglandinas, leucotrienos e PAF. Rocha et al. (2000), também comprovou a participação de aminas biogênicas e metaloproteinases na hiperalgesia induzida pelo veneno da *Bothrops jararaca*. A hiperalgesia depende da ativação de nociceptores quimiosensitivos através da liberação de uma cascata de vários mediadores. (DRAY, 1995, 1997). Bradicinina inicia a cascata e estimula a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) o qual induz a formação de interleucinas (IL-1- β , IL-6 e IL-8). Subseqüentemente, IL-1 e IL-6 estimulam a produção de eicosanóides, enquanto IL-8 estimula a produção de aminas simpatomiméticas. Eicosanóides e aminas simpatomiméticas são considerados os mediadores finais da cascata hiperalgésica (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; CUNHA et al., 1991, 1992; FERREIRA et al., 1993; POOLE et al., 1999). Chacur et al. (2002), demonstrou que a bradicinina, agindo em receptores B2, era um importante mediador envolvido na hiperalgesia induzida pelo veneno

da *Bothrops jararaca*, e poderia agir em conjunto com os outros mediadores hiperalgésicos (prostaglandinas, leucotrienos e PAF) conforme descrito por Teixeira et al. (1994). Serotonina, histamina, aminas simpatomiméticas, citocinas (IL-1- β , e TNF- α) e metaloproteinases não eram relevantes para a gênese da hiperalgisia induzida pelo veneno da *Bothrops jararaca* contrastando com as afirmações dos autores acima.

O edema é mediado por metaloproteinase, fosfolipase A2 e produtos eicosanóides. (RUIZ DE TORRENT et al., 1999). Estes efeitos locais tendem a progredir para bolhas, equimoses e necrose as quais surgem geralmente após 12 horas do acidente (BOER-LIMA, 1999). Pode ocorrer também liberação de peptídios para a circulação com choque periférico e eventualmente óbito. (KOUYOUMDJIAN, J.A; KOUYOUMDJIAN, N.C.V., 1986).

Dentre as complicações locais e/ou sistêmicas mais comuns encontramos necrose e insuficiência renal aguda. Os efeitos renais provocados por envenenamento ofídico revelam uma via complexa. Vários componentes tóxicos dos venenos podem agir direto ou indiretamente nas células renais. (RAAB; KAISER, 1966).

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Entre elas podemos citar glomerulonefrite (SEEDAT et al., 1974), glomerulite e nefrite intersticial (SANT; PUNDARE, 1972), arterite e necrose tubular (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979), necrose cortical (VARAGUNAM; PANABOKKE, 1970) e insuficiência renal. (RAAB; KAISER, 1966). De todos, o mais relatado tem sido a insuficiência renal. Ainda foram descritas a ocorrência de hematúria, mioglobinúria, hemoglobinúria e proteinúria. (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979).

A insuficiência renal aguda (IRA) descrita por vários autores (AMORIM; MELO, 1954; AMORIM et al., 1969; SHASTRY et al., 1977; AUNG-KHIN, 1978; SILVA et al., 1979) é a principal causa de mortes nos acidentes ofídicos mesmo após o tratamento com soro antiofídico. O tratamento com soro não previne o surgimento de insuficiência renal embora ele melhore o estado geral dos pacientes (AMARAL et al., 1986).

A IRA ocorre secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda (SEEDAT et al., 1974), necrose tubular aguda (CHUCH et al., 1975) e necrose cortical renal (DATE; SHASTRY, 1981), sendo usualmente atribuída ao sangramento, hipotensão, colapso circulatório, hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada. (SOE-SOE, 1990). Contudo a sua patogênese secundária aos acidentes botrópicos não está esclarecida.

Os venenos ofídicos causam a nível glomerular uma proliferação do endotélio e células mesangiais, com deposição de fibrina e crescimento epitelial ocasional, sem provocar alterações na membrana basal. Três teorias foram propostas para explicar a patogênese da

lesão glomerular. A presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente ao processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica. Sitprija e Boonpucknavig (1979), avaliaram tais hipóteses e afirmaram que possivelmente todos os mecanismos propostos trabalham sinergicamente na patogênese glomerular, com predominância entre as três hipóteses dependentes da gravidade do acidente.

Vários fatores são responsabilizados pelo desenvolvimento ou intensificação do processo de insuficiência renal após o envenenamento. A hipotensão provocada pela liberação de histamina e cininas (VITAL BRAZIL et al., 1966), o processo de coagulação intravascular associado à necrose tubular, relatado por Clarkson et al. (1970), o quadro de mioglobínúria secundário à mionecrose, comum nos acidentes por serpentes marinhas (SITPRIJA et al., 1971), e a possível ação de uma nefrotoxina direta já citado por Hadler e Vital Brazil (1966), nos estudos com crotoxina.

Embora o veneno da *Bothrops erythromelas*, a jararaca seca, como é conhecida em todo o sertão do Nordeste inclusive no Estado da Ceará (BELLUOMINI, 1984; CAMPBELL; LAMAR, 1989), possa induzir a insuficiência renal aguda (WEN et al., 1989) e intensa hemorragia pulmonar (VALENÇA et al., 1996) este veneno tem uma baixa capacidade de ligar-se a estes órgãos sugerindo que estes efeitos observados ocorrem principalmente através de mecanismos indiretos talvez através da formação de microembolia na circulação (VASCONCELOS et al., 1998).

Em estudos usando como modelo rim isolado, Pirotzky et al. (1984), demonstraram que o rim seria capaz de produzir substâncias como histamina, serotonina e indiretamente, fator de agregação plaquetária (PAF).

Embora muitos destes mediadores não estejam envolvidos diretamente no sistema de perfusão de rim, as células renais, sob o efeito do veneno, podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, fração de complemento e fator de agregação plaquetária. (BARRAVIERA et al., 1995; WHATLY, 1989).

Rezende (1989), trabalhando com dose letal 50% do veneno de *Bothrops jararaca* administrado em ratos constatou insuficiência renal com decréscimo na filtração glomerular, no clearance osmolar, na fração de sódio urinário excretado, e aumento da creatinina plasmática. Observou ainda proliferação da matriz mesangial, degeneração tubular por redução das bordas em escova e vacuolização citoplasmática.

Burdmann et al. (1993), demonstraram que a inoculação intravenosa do veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos induz falência renal aguda como uma conseqüência de alterações funcionais e morfológicas. Ocorreu diminuição significativa no ritmo de filtração

glomerular, na diurese e no fluxo renal. Os níveis de fibrinogênio no soro diminuíram significativamente. Ocorreu hemólise intravascular e um aumento nos níveis de lactato desidrogenase no plasma e hemoglobina livre. A pressão sanguínea e os níveis de creatinina fosfoquinase não foram afetados. A microscopia eletrônica revelou deposição de fibrina nos capilares glomerulares, necrose tubular proximal e distal e a presença de glóbulos vermelhos hemolisados nos túbulos renais. A isquemia relacionada com a coagulação glomerular e hemólise intravascular foram os mais importantes fatores patogênicos causando uma diminuição no ritmo de filtração glomerular, embora a nefrotoxicidade direta do veneno não possa ser excluída.

Monteiro (1990), tendo como método de estudo o modelo de perfusão de rim isolado de rato analisou as alterações provocadas pelo veneno de *Bothrops jararaca* e observou queda dos parâmetros renais como pressão de perfusão, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, resistência vascular renal, transporte total e percentual de sódio e potássio bem como diminuição dos íons sódio e potássio no tecido renal após exposição. O veneno da *Bothrops jararaca* causa uma nefrotoxicidade direta no modelo acima, alterando os parâmetros funcionais renais no qual o PAF foi atribuído como sendo um dos possíveis responsáveis. (MONTEIRO; FONTELES, 1999).

O PAF promove uma vasoconstrição renal com diminuição do fluxo sanguíneo, reduz a taxa de filtração glomerular, determina a excreção reduzida de sódio pela urina, produz oligúria e retenção hidroeletrólítica, apresenta um efeito compensador que é a liberação de prostaglandinas vasodilatadoras no rim. (DOUGLAS, 2000).

Havt et al. (2001), concluíram que alterações nos parâmetros funcionais de pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR) em rim isolado de rato utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*, não foram promovidas pelo fator de agregação plaquetária (PAF).

Boer-Lima et al. (1999), citam que observações histopatológicas após inoculação intravenosa do veneno de *Bothrops moojeni* em camundongos, causavam as seguintes lesões renais: vacuolização celular, descontinuidade da borda em escova, edema tubular com dano glomerular, necrose tubular aguda. Todas as lesões foram atribuídas à atividade proteolítica e de fosfolipase A2. O veneno diminuiu significativamente o ritmo de filtração glomerular, o qual foi acompanhado por severos distúrbios morfológicos nos glomérulos renais, o clearance de creatinina, causou severa proteinúria e disfunção tubular sem alteração da pressão sanguínea. A ação nefrotóxica do veneno envolve significantes alterações morfológicas e funcionais (BOER-LIMA et al., 2002).

Collares-Buzato et al. (2002), demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* induz falência renal aguda como uma consequência de alterações morfológicas e funcionais em células glomerulares e tubulares. A falência renal aguda resulta de um efeito citotóxico direto no epitélio tubular renal ou de uma isquemia renal devido a distúrbios hemodinâmicos sistêmicos.

Barbosa et al. (2002), estudando o veneno da serpente *Bothrops moojeni* em rim isolado de rato concluíram que o veneno causa intensas alterações na fisiologia renal com a diminuição na pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), e no transporte tubular de sódio, potássio e cloro (% TNa+, %TK+, %TCl-). Aumento no fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), afirmando que o veneno era diurético, natriurético, caliurético e reduz a pressão de perfusão em rim isolado de rato e que potenciadores de bradicinina poderiam estar envolvidos.

A patogênese das lesões renais nos acidente botrópicos não está bem definida. Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar tais lesões, entre eles destacam-se a ação nefrotóxica direta atribuída à ação proteolítica, coagulação intravascular disseminada e liberação de substâncias vasoativas (RAAB; KAISER, 1966; AMARAL et al., 1986; MONTEIRO, 1990). A insuficiência renal pode se instalar por ação direta ou secundária a complicações em que o choque está presente (LOPEZ et al., 1972).

Em virtude da grande complexidade dos componentes existentes nos venenos botrópicos e da variedade de espécies com efeitos diferentes, muitos esclarecimentos ainda são necessários para a compreensão de toda a sua patogênese.

1.5 Tratamento e profilaxia

a. Providências imediatas (a nível local):

01. Lavar bem a ferida com água e sabão;
02. Tratar o paciente com calma e segurança, procurando tranquilizá-lo;
03. Orientá-lo para movimentar-se o menos possível, alertando-o para deixar o membro afetado em repouso absoluto;
04. Oferecer bastante líquido ao acidentado;
05. Encaminhá-lo imediatamente para a unidade de referência mais próxima, que aplique o soro antiofídico;
06. Consultar, em caso de dúvida, o Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX - Fortaleza: Fone: (085) 3255.5050);
07. Ficar alerta para possíveis complicações respiratórias, tomando medidas pertinentes nestes casos, até o acidentado chegar ao hospital de apoio;
08. Capturar a serpente, de preferência viva, é fundamental para diagnóstico de certeza. Quando matar, não esmagar a cabeça, o que dificulta a visualização da fosseta loreal e dos olhos (coral);
09. Na certeza de tratar-se de animal não peçonhento, liberar o acidentado para casa, com orientação preventiva;
10. Preencher e emitir para o setor competente a ficha de notificação epidemiológica;
11. Fazer a prevenção do tétano acidental de acordo com esquema de rotina, verificando sempre a situação vacinal anterior do acidentado, com toxóide tetânico.

b. Medidas ultrapassadas e que não devem ser efetuadas:

01. Uso de torniquete (garrote). Apesar de bastante difundida esta prática deve ser abolida, principalmente nos acidentes com serpentes que apresentam efeito proteolítico. O mesmo provoca graves lesões na área acometida pela picada se o veneno permanecer retido em uma área específica, como ocorre com o uso do torniquete;
02. Oferecer cachaça (pinga), querosene ou outras beberagens (garrafadas, etc.);
03. Queimar, chupar, cortar para sangria, perfurar o local da picada;
04. Colocar estrume no local da picada;
05. Chamar rezador ou benzedeiro para cuspir na boca da vítima.

c. Tratamento específico (hospitalar):

01. Classificar o caso conforme o quadro 02;

02. Administrar o soro específico conforme as fichas específicas, estando alerta para a observação sobre o uso prévio do antihistamínico;

03. No acidente botrópico (jararaca), caso o tempo de coagulação permaneça acima de 10 minutos após 12 horas da aplicação do soro específico, aplicar mais soro antibotrópico em quantidade suficiente para neutralizar 100mg de veneno.

04. A insuficiência respiratória aguda, causada por coral, pode ser revertida em alguns casos, com o uso de:

- cinco injeções intravenosas, de 0,5mg de neostigmine (prostigmine - 1mL = 0,5mg com intervalos de trinta minutos entre cada administração);

- em seguida, administrar a mesma quantidade de neostigmine (0,5mg) em intervalos progressivamente maiores, conforme resposta clínica até que ocorra a recuperação completa, o que só acontecerá em torno de 24 horas;

- cada administração de neostigmine deve ser precedida de uma injeção intravenosa de 0,6mg de sulfato de atropina (atropina = 1 mL = 0,25mg), para se obter o aumento da frequência do pulso, na ordem de 120 batimentos por minuto.

d. Medidas gerais de suporte hospitalar:

01. Manter o acidentado em repouso no leito e, em caso de edema no local da picada, elevar a parte afetada;

02. Puncionar a veia calibrosa para hidratar bem o acidentado, mantendo um bom fluxo urinário (2mL/kg/hora na criança e 30 a 40mL/hora no adulto). Em caso de oligúria ou anúria indica-se o uso de diurético de alça, tipo furosemida, por via endovenosa (1mg/kg dose na criança e 40mg/dose no adulto). Pode-se usar inicialmente o manitol (5mL/kg na criança e 100mL no adulto) - da solução a 20%, no sentido de promover a diurese osmótica e evitar assim a precipitação intra-tubular de mioglobina, etc.

03. Manter a disposição, para uso imediato em caso de urgência, equipamentos e medicamentos necessários: adrenalina 1:1000, hidrocortizona (Flebocortid ou outros), oxigênio, furosemida, manitol, material de entubação endotraqueal e ventilador artificial;

04. O acidentado deve ser avaliado de seis em seis horas com rigoroso controle das funções vitais. Em caso de oligúria ou anúria, não controladas por medidas específicas, fazer diálise precocemente;

05. Em caso de abscesso, edema compressivo com comprometimento circulatório solicitar avaliação cirúrgica criteriosa;

06. Em caso de infecção local indica-se antibioticoterapia;

07. No momento da alta o acidentado deve ser orientado para retornar aos serviços de saúde, caso surjam entre 5 e 24 dias, sintomas tipo "doenças do soro": Febre, urticária, artralgia e linfoadenopatia;

08. Exames laboratoriais solicitados de rotina: sumário de urina, uréia, creatinina, tempo de coagulação, tempo de protrombina, hematócrito e hemoglobina. No acidente crotálico pede-se também aldolase e CPK (creatina fosfoquinase).

e. Diagnóstico laboratorial

A determinação do Tempo de Coagulação (TC) constitui-se em medida auxiliar extremamente útil para confirmação de suspeita diagnóstica, pois muitos acidentes apresentam a incoagulabilidade sangüínea como única alteração detectável que possibilita o diagnóstico do envenenamento.

f. Diagnóstico clínico

Os principais sinais e sintomas dos acidentes ofídicos constituem uma maneira eficaz de facilitar o raciocínio diagnóstico dos profissionais, baseando-se fundamentalmente no achado das alterações decorrentes das ações do veneno.

g. Tratamento Soroterápico

No Brasil os soros antiofídicos são produzidos pelo Instituto Butantan (São Paulo) e Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro).

Os soros antiofídicos são obtidos a partir da imunização de cavalos, inoculados com os respectivos venenos dos diferentes grupos de animais peçonhentos de importância médico-sanitária. São apresentados na forma líquida, em ampolas de concentrações definidas para cada um dos tipos. O prazo de validade dos soros é de 3 anos, se convenientemente armazenados em geladeira, a temperatura de 2 a 8 °C, devendo-se evitar seu congelamento.

A quantidade de soro a ser administrada depende diretamente da gravidade do acidente, avaliado através dos sinais clínicos. Deve ser aplicado o mais precocemente possível e de preferência por via intravenosa para que possa haver neutralização da peçonha antes da ocorrência de quaisquer danos.

h. Reações Adversas

Precedendo a infusão do antiveneno, recomenda-se a utilização de anti-histamínico do tipo Prometazina, por via intramuscular (IM). Esse procedimento visa diminuir os riscos de reações alérgicas do tipo imediato, das quais a mais temida é o choque anafilático.

i. Critério de alta:

01. Caso suspeito:

Todos os casos suspeitos de acidente ofídico, que não tenham confirmação diagnóstica de terem sido causados por animal peçonhento, devem ser observados, antes da alta, por 06 horas. Em acidentes por coral a alta só pode ser dada após 24 horas de observação, sob forte vigilância dos movimentos respiratórios e sem que haja o aparecimento de sintomas de envenenamento;

02. Casos confirmados:

Todos os casos de acidentes ofídicos por animal peçonhento, com diagnóstico confirmado e após serem tratados, só poderão ter alta após permanecerem assintomáticos por 24 horas.

j. Medidas Preventivas

As medidas de controle individuais para os trabalhadores são regulamentadas por lei que obrigam o uso de botas de cano alto, perneiras e luvas. Dentre as medidas de prevenção coletiva, deve ser ressaltado que o peridomicílio e as áreas de estocagem de grãos devam ser mantidas limpas, pois havendo facilidade para a proliferação de roedores, atraem serpentes que os utilizam como alimento. Deve ser ainda divulgado, junto às populações de risco, que animais como gansos, emas, seriemas, dentre outros, são ofiófagos e devem ser protegidos (OFIDISMO, 2002; GUIMARÃES et al., 2002).

Gênero	Bothrops (Jararaca)			Crotalus (Cascavel)		Micrurus (Coral)	Lachesis (Surucuru)
	GRAVIDADES						
Sinais e Sintomas	Leve	Moder	Grave	Moder	Grave	Grave	Gravidade avaliada pelos sinais locais e intensidade das manifestações vagas (bradicardia, hipotensão arterial, diarreia). Semelhante a jararaca, mas somente moderado e grave.
Dor e edema local	+	++	+++	-/+	-/+	-/+	
Hemorragia	-	+/-	+/+	-	-/+	-	
Choque hipovolêmico	-	+/-	+/+	-	-/+	-	
Oligúria e/ou anúria	-	+/-	+/+	-	-/+	-	
Insuficiência renal	-	-	+/+	-	+/+	-	
Visão turva	-	-	-	+/+	++	++	
Urina vermelha	-	-	-	-/+	++	-	
Mialgia	-	-	-	-/+	++	-	
Ptose Palpebral	-	-	-	+/+	++	++	
Diplopia	-	-	-	-/+	++	++	
Paralisia ocular	-	-	-	-/+	++	++	
Paralisia dos membros	-	-	-	-/+	-/+	-/+	
Paralisia da musculatura respiratória	-	-	-	-	-/+	-/+	
Tempo de coagulação (*)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-	
Veneno a ser neutralizado	100mg	200mg	300mg	150mg	300mg	150mg	150 a 300mg
Tipo de soro	Antibotrópico			Anticrotálico		Anti elapídico	Antilaquéico

QUADRO 02 - Classificação e gravidade do acidente

(*) O tempo de coagulação, embora possa ser utilizado como diagnóstico do acidente botrópico, não mais se usa para caracterização do índice de gravidade do caso.

Fonte: CEATOX/IJF- Ce, 2002

1.6 Resistência aos venenos ofídicos

Alguns animais são resistentes a certos venenos de serpentes. Existem diversos relatos sobre a resistência de serpentes venenosas e não venenosas aos efeitos tóxicos de venenos ofídicos. (FONTANA, 1781; PHILPOT; SMITH, 1950; OVADIA et al., 1975; PEREZ et al., 1978; CERDAS; LOMONTE, 1982; MIRANDA et al., 1982). A resistência aos venenos ofídicos não é uma propriedade exclusiva das serpentes; esta está também presente em alguns mamíferos. (VELLARD, 1945; OVADIA; KOCHVA, 1977; PEREZ et al., 1978; MOUSSATCHÉ; LEONARDI, 1982). Em muitos casos a resistência destes animais aos venenos de serpentes pode ser explicada pela presença de fatores de neutralização em seu soro sanguíneo. (OVADIA et al., 1975; OMORI-SATOH, 1977; OVADIA, 1978; PERALES et al., 1986; MOUSSATCHÉ; PERALES, 1989; FORTES-DIAS et al., 1990).

Diversas proteínas neutralizantes têm sido caracterizadas e isoladas do soro de diferentes animais. Exemplos são as proteínas antineurotóxicas do soro de *Vipera palaestinae* (OVADIA et al., 1977) e proteínas antihemorrágicas isoladas do soro de *Trimeresurus flavoviridis* (OMORI-SATOH, 1977), *Vipera palaestinae* (OVADIA et al., 1977), *Crotalus atrox* (WEISSENBERG et al., 1991), *Bothrops jararaca* (TANIZAKI et al., 1991), *Dinadon semicarinatus* (TOMIHARA et al., 1988), *Didelphis marsupialis* (MOUSSATCHÉ et al., 1979; PERALES et al., 1989), *Didelphis virginiana* (MENCHACA; PEREZ, 1981), *Didelphis albiventris* (LAUDUCCI et al., 1990), *Philander opossum* (DOMONT et al., 1989), *Neotoma micropus* (GARCIA; PEREZ, 1984), *Erinaceus europaeus* (DE WIT; WESTRÖM, 1987), *Herpestes edwardsii* (TOMIHARA et al., 1987) e *Sigmodon hispidus* (PICHYANGKUL; PEREZ, 1981).

As proteínas antineurotóxicas e antihemorrágicas possuem algumas características comuns, elas são glicoproteínas ácidas com pontos isoelétricos variando entre 4,0 e 5,4; suas massas moleculares variam de 52 a 90 kDa, exceto o fator antihemorrágico de *Erinaceus europaeus* (539-780 kDa). Não possuem atividade proteolítica e não são imunoglobulinas. (DOMONT et al., 1991).

1.7 *Didelphis marsupialis*

1.7.1 Descrição

O *Didelphis* pertencente ao filo Chordata, ordem Marsupialia, família Didelphidae. Conhecido popularmente na América do Norte como opossum, no Brasil seu nome varia de acordo com a região em que é encontrado. Na Amazônia é conhecido como mucura; na Bahia como suruê ou sarigüê; no Mato Grosso como micurê; na região Nordeste, principalmente no Ceará, como cassaco ou timbuo e no resto do Brasil recebe o nome de gambá. É encontrado do Canadá ao norte da Argentina, Brasil, Paraguai, Guianas e Venezuela. Habita principalmente florestas, campos e centros urbanos.

Apresenta corpo maciço, pescoço grosso, focinho alongado e pontudo, membros curtos e cauda preênsil, bastante grossa, redonda e afilada, só peluda na base, tendo pequenas escamas revestindo a parte restante. A cor da pelagem varia muito, indo do branco (animais velhos) ao negro (animais jovens) e passando por todas as tonalidades de cinzento e bruno (escuro) intermediárias. Possui o porte de um gato podendo atingir 50 cm de comprimento sem contar a cauda, quase do mesmo tamanho (figura 05).

Tem hábitos noturnos e, apesar de ser um animal de movimentos lentos, sobe em árvores com facilidade, usando a cauda preênsil para agarrar-se aos galhos. Alimenta-se principalmente de frutos silvestres, ovos e filhotes de pássaros. Não raramente visita galinheiros, causando imenso estrago. Quando perseguido, finge-se de morto ou expele um líquido fétido produzido por glândulas axilares. Na fase do cio, a fêmea também exala esse cheiro forte, facilmente reconhecível.

A fêmea possui um marsúpio bem desenvolvido, ao contrário de outras da mesma família, que só tem duas dobras ventrais abertas. A reprodução é cerca de 12 a 13 dias com 3 crias e 10 a 15 filhotes por ninhada. Quando os filhotes entram na bolsa têm apenas 1 cm e pesam 2 g e ficam nela por 70 dias, onde se desenvolvem e adquirem condições de enfrentar a vida. Vivem cerca de 2 a 4 anos (GAMBÁ, 2003).



FIGURA 05 – *Didelphis marsupialis*

1.7.2 Composição e ações do soro de *Didelphis marsupialis*

Alguns animais apresentam imunidade natural contra os efeitos deletérios produzidos pelos diversos venenos de serpentes. Esta resistência pode ser explicada pela presença de inibidores de proteínas solúveis em seus soros os quais neutralizam os efeitos tóxicos dos venenos de serpentes. (PERALES; DUMONT, 2002).

De acordo com sua habilidade em inibir diferentes efeitos fisiopatológicos de venenos ofídicos, estas proteínas podem ser classificadas em três grupos principais: antineurotoxinas, antimiotoxinas e antihemorraginas. A maioria dos fatores antihemorrágicos foram isolados e caracterizados como glicoproteínas ácidas, com uma elevada estabilidade em PH e temperatura, não possuem atividade proteolítica e não são anticorpos. (DOMONT et al., 1991; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998).

A resistência do marsupialis da América do Sul contra venenos crotálicos, especialmente do gênero *Bothrops*, de maior importância médica no Brasil, tem sido extensamente estudada nos últimos anos. (PERALES; DUMONT, 2002). Este tipo de envenenamento pode produzir efeitos locais como hemorragia, edema, mionecrose e hiperalgesia (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989) os quais podem induzir efeitos sistêmicos que podem levar à morte do animal picado (MARKLAND, 1998). A hemorragia local é principalmente produzida pela presença de metaloproteinases zinco dependentes presentes no veneno de serpentes (SVMPs) as quais são os principais componente da maioria dos venenos ofídicos. (BJARNASON; FOX, 1994). Estas enzimas são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular e por alterações no sistema hemostático. (MARKLAND, 1998). Elas causam ruptura da membrana basal de capilares e alterações da integridade dos vasos capilares (BJARNASON; FOX, 1994).

Moussatché et al. (1979,1981), Moussatché e Leonardi (1982), Domont et al. (1991), investigaram a resistência do *Didelphis marsupialis* aos venenos de diversas serpentes da família *Crotalidae*, como a *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus adamanteus*. A resistência do gambá aos venenos de serpentes parece ser uma propriedade imune natural desde que o fator antibotrópico (ABF) foi encontrado não apenas no soro de animais selvagens, mas também em recém-nascidos em laboratórios. Portanto, não é preciso um contato prévio com as serpentes para adquirir este tipo de imunidade natural. (PERALES et al., 1986).

Jurgilas et al. (1999), verificaram a presença de um fator no leite do *Didelphis marsupialis* o qual representava proteção adicional para *Didelphis* recém-nascidos contra

venenos botrópicos. Uma fração ativa foi isolada do leite e mostrou atividades físicoquímicas, estruturais, antigênicas e biológicas similares ao fator antibotrópico, indicando que ambos são provavelmente a mesma proteína.

O fator antibotrópico (ABF) é composto por duas subunidades de glicoproteínas ácidas de 42,6 e 48,5 kDa, associadas por ligações não covalentes. (PERALES et al., 1994). Estas parecem interagir com as toxinas hemorrágicas dos venenos, levando à formação de complexos circulantes inativos. (NEVES-FERREIRA et al., 1997). Segundo Perales et al., (1994), a seqüência N-terminal do aminoácido da subunidade 48,5 kDa do ABF mostrou elevada homologia quando comparada ao oprin (um fator antihemorrágico, purificado do soro do *Didelphis virginiana* por Catanese et al. (1992), que atua através da formação de complexos) O Oprin é homólogo a $\alpha 1\beta$ -glicoproteína humana, uma proteína relatada para o supergene da família de imunoglobulina (CATANESE; KRESS, 1992).

Duas antihemorráginas nomeadas por DM40 e DM43 foram recentemente isoladas do ABF-Dm. (NEVES-FERREIRA et al., 2000). Elas inibem as metaloproteinases zinco dependentes presentes no veneno de serpentes (SVMPs) através da formação de complexos não covalentes (com interação estequiométrica de 1:1), não são modificadas por enzimas, não formam complexos entre si e são estruturalmente relacionadas à família de supergene de imunoglobulina. DM43 também demonstrou propriedades antiletais, antiedematogênicas e antihiperálgicas. Estes resultados sugerem que a habilidade em inibir um amplo espectro de efeitos tóxicos é uma consequência da inativação primária da atividade enzimática das metaloproteinases por DM43.

Neves-Ferreira et al. (2002), propuseram que DM43 faz parte do sistema imune, especificamente do sistema imune inato. Existe uma homologia consistente entre as seqüências de aminoácidos de DM43 e as células que pertencem à imunidade natural como as “células natural killer” (NK). Funcionalmente a proteção proporcionada contra toxinas estranhas indica que este inibidor de metaloproteinases exerce funções do sistema imune.

Uma proteína antimiotóxica com estrutura de imunoglobulina-like denominada DM64 foi isolada recentemente do soro de *Didelphis marsupialis*. (ROCHA et al., 2002). DM64 apresenta homologia ao inibidor DM43 isolado da mesma espécie de gambá e ao oprin (um fator antihemorrágico purificado do soro do *Didelphis virginiana*). A proteína neutraliza a miotoxicidade in vivo e a citotoxicidade in vitro das miotoxinas I (mt-I/Asp49) e II (mt-II/Lys49) do veneno de *Bothrops asper* através da formação de complexos não covalentes com ambas miotoxinas, porém não inibe a atividade de PLA2 da mt-I. DM64 não neutraliza o efeito anticoagulante da mt-I nem a letalidade intracerebroventricular, efeitos que dependem

da atividade enzimática, e o qual demonstra a dissociação entre as atividades catalíticas e tóxicas da PLA2 miotóxica Asp49 Além disso, apesar da similaridade com inibidores de metaloproteinases, DM64 apresenta nenhuma atividade antihemorrágica contra os venenos brutos de *Bothrops jararaca* ou *Bothrops asper*.

A resistência aos venenos de serpentes não é peculiaridade exclusiva do gambá *Didelphis marsupialis*. Perales et al. (1994), descreveram a presença de frações antibotrópicas no soro do gambá *Philander marsupialis* Brazilian e *Lutreolina crassicaudata* demonstrando que a resistência aos venenos de serpentes está presente em outras espécies de gambá.

Um inibidor de metaloproteinases zinco dependentes presentes no veneno de serpentes (SVMPs) denominado PO41 foi isolado do soro do gambá *Philander* e testado com o veneno de *Bothrops jararaca*. (JURGILAS et al., 2003). PO41, assim DM40 e DM43, é uma glicoproteína ácida de 41,33 Da, pertence ao supergene da família de imunoglobulinas e atua através da formação de complexos não covalentes com SVMPs (com interação estequiométrica de 1:1). PO41 mostrou elevada homologia quando comparado a DM40 e DM43 e ao oprin (um fator antihemorrágico purificado do soro do *Didelphis virginiana*).

Trento et al. (2001), isolaram um fator antibotrópico do soro do gambá da América do Sul *Didelphis albiventris*. O ABF mostrou a presença de duas subunidades glicosiladas de 43 e 45 kDa o qual mostraram um alto grau de identidade com outros inibidores isolados de diferentes marsupiais. Assim como DM40 e DM43 isolados de *Didelphis marsupialis*, o ABF de *Didelphis albiventris* atua através da formação de complexos solúveis inativos entre este e a toxina do veneno de *Bothrops asper* inibindo os efeitos hemorrágicos, miotóxicos, edematogênicos e letais do veneno.

Diversos inibidores foram isolados de diferentes espécies de gambá como *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris*, *Philander* sp e as propriedades do fator antibotrópico constituem uma alternativa futura para o tratamento de envenenamentos ofídicos.

Este trabalho propõe estudar as alterações causadas pelo veneno de serpentes *Bothrops erythromelas* através da avaliação dos parâmetros funcionais em sistema de perfusão de rim isolado de rato verificando se o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* exerce ação protetora sobre o efeito renal causado pelo veneno através de bloqueio farmacológico, na perspectiva de elucidação da fisiopatologia e tratamento do envenenamento ofídico por *Bothrops erythromelas*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar alterações renais induzidas pelo veneno da *Bothrops erythromelas*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as possíveis alterações dos parâmetros funcionais renais.
- Avaliar as alterações histopatológicas renais.
- Verificar se o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* exerce ação protetora sobre o efeito renal causado pelo veneno de *Bothrops erythromelas*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Ratos Wistar, adultos, pesando entre 260 e 300g, machos, oriundos do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em jejum alimentar de 24 horas antes dos experimentos e com fornecimento de água “ad libitum”.

3.2 Veneno

O veneno da *Bothrops erythromelas* foi doado pela Profa. Dra. Mirian C. Guarniere (Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil).

3.3 Fator antibotrópico

Obtenção do fator antibotrópico

A obtenção e fracionamento do fator antibotrópico (ABF) foram realizados pelo Dr. Marcos Hikari Toyama (Depto. de Bioquímica, Inst. Biologia, UNICAMP/UNESP, São Paulo, SP, Brasil).

Espécies de *Didelphis marsupialis* foram capturados na região de Campinas (sudeste do estado de São Paulo, Brasil) e sangrados por punção cardíaca. O sangue foi coagulado a temperatura ambiente e o soro foi separado por centrifugação à -70°C , sendo fracionado através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- Sephadex A50 equilibrada com acetato de sódio 0,01M, pH 3,7, seguindo o método descrito por Farah et al. (1996).

Duas frações, DM1 e DM2, foram obtidas usando um gradiente step-wise. A fração ativa DM2-II foi posteriormente purificada por cromatografia de troca iônica (HPLC) usando uma coluna Protein Pack SP 5PW (0,39 X 30cm; Waters) com gradiente linear de cloreto de sódio 0 - 0,1M em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 4,1 a uma taxa de fluxo de 1.0 mL / min por 60 minutos.

O perfil de eluição foi monitorado por absorvância a 280 nm e a concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino como o padrão. O grau de pureza do fator antibotrópico purificado foi determinado por Tricina PAGE-SDS.

3.4 Incubação do veneno com o fator antibotrópico

A incubação do veneno de *Bothrops erythromelas* com o fator antibotrópico (ABF) de *Didelphis marsupialis* foi realizada na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

O procedimento foi realizado no início de cada experimento e a infusão do veneno de *Bothrops erythromelas* com o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* ocorreu sempre aos 30 minutos.

Dois grupos constituíram o processo de incubação:

Grupo 01: Pesou-se 10 μg do veneno e 10 μg do ABF. Ambos foram misturados à temperatura ambiente deixando a mistura reagir por 30 minutos para a formação de um complexo entre o veneno e o ABF.

Grupo 02: Pesou-se 10 μg do veneno e 30 μg do ABF. Ambos foram misturados à temperatura ambiente deixando a mistura reagir por 30 minutos para a formação de um complexo entre o veneno e o ABF.

3.5 Grupos Experimentais

Para avaliar o efeito renal induzido pelo veneno, cinco grupos constituíram o trabalho experimental, os quais foram divididos em:

Grupo controle: Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6g% de albumina bovina (n=6).

Grupo tratado (veneno): Neste grupo, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionado o veneno da *Bothrops erythromelas* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aos 30 min de perfusão (n=6).

Grupo tratado (fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis*): Neste grupo, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionado o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aos 30 min de perfusão (n=6).

Grupo ABF de *Didelphis marsupialis* + veneno (n° 01): Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionado o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10 µg/mL) incubado com o veneno (10 µg/mL) aos 30 min de perfusão (n=6).

Grupo ABF de *Didelphis marsupialis* + veneno (n° 02): Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionado o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30 µg/mL) incubado com o veneno (10 µg/mL) aos 30 min de perfusão (n=6).

3.6 Substâncias utilizadas

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as seguintes substâncias:

- NaHCO₃ (Synth)
- NaH₂PO₄ · H₂O (Synth)
- NaCl (Synth)
- MgSO₄ · 7H₂O (Reagen)
- CaCl₂ · 2H₂O (Reagen)
- Manitol (Reagen)
- Uréia (Reagen)
- KCl (Merck)
- Glicose (Squibb)
- Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)
- Heparina (Roche)
- Fração V de albumina bovina (Sigma)
- Inulina (Sigma)
- Pentobarbital sódico (Cristália)

3.7 Solução perfusora e seu preparo

A solução empregada nas experiências foi a de Krebs-Henseleit modificada, associada com albumina bovina 6g%. Essa adição à solução foi desenvolvida para manter as funções renais sem alterações durante o experimento.

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes, continha NaCl (138g), KCl (7,0g), NaH₂PO₄ · H₂O (3,2g), MgSO₄ · 7H₂O (5,8g), e Uréia (10g). No tempo de 48 horas antes do experimento, separamos 100 mL desta solução e acrescentamos NaHCO₃ (4,2g), CaCl₂ · 2H₂O (0,74g), glicose (2,0g), e penicilina G Potássica Cristalina (0,050g). Em seguida, o volume foi completado para 2000mL com água bidestilada. Retiramos 300 mL desta última solução, na qual adicionamos albumina bovina (6g%). Procedemos, em seguida, à diálise desta solução com albumina, auxiliada por um homogeneizador. Esta diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvato, citrato e lactato. (HANSON; BALLARD, 1968; COHEN et al., 1977; SCHUREK et al., 1970; ROSS, 1978). Os 1700mL restantes foram usados como solução para a diálise, a qual trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, acrescentamos 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

3.8 Sistema de perfusão renal

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou vários pesquisadores a desenvolver a técnica de perfusão de rim isolado de rato. As primeiras perfusões renais datam de 1849, realizadas por Lobell. Em seguida, temos relatos de trabalhos de Bidder (1862), Ludwig (1868) e Schroder (1882) (ARAÚJO FILHO, 1995). A necessidade de maiores informações sobre a fisiologia renal trouxe grandes avanços para a técnica de perfusão renal, principalmente nestas duas últimas décadas. Algumas descobertas propiciaram uma melhora considerável na perfusão do rim isolado, como a adição da fração V de albumina bovina pura à solução perfusora (BOWMAN, 1970; BOWMAN; MAACK, 1974; LITTLE; COHEN, 1974; DE MELLO; MAACK, 1976; ROSS, 1978; SCHUREK, 1978); a utilização da solução de Krebs-Henseleit (SCHUREK, 1980); a adição de substâncias à solução perfusora como glicose, aminoácido, lactato, oxalacetato e piruvato (BAHLMAN et al., 1967; NISHIITSUJI-UWO et al., 1967; TRIMBLE; BOWMAN, 1973; DE MELO;

MAACK, 1976) e a adaptação de um filtro millipore para o rim de rato (ROSS et al., 1973; COHEN et al., 1977; FONTELES, 1980; FONTELES; LEIBACH, 1982).

Existem atualmente dois sistemas de perfusão de rim isolado. O sistema aberto, no qual o perfusato não recircula através rim possuindo como principal vantagem a manutenção constante de parâmetros funcionais, porém apresenta um alto gasto de albumina, dificultando o orçamento dos projetos. No outro tipo conhecido, o sistema fechado, o perfusato recircula no rim e apresenta inúmeras vantagens sobre o primeiro, como a utilização de albumina e outras substâncias na solução perfusora em pequenas quantidades. Além disso, as substâncias dialisadas se mantêm constantes na solução e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dialisador. (MONTEIRO, 1990).

O sistema fechado, utilizado em nossos experimentos, foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978), com modificações feitas por Fonteles (1980), através da adaptação de um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton (1974), e descrito por Moreira Lima (1983). O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES et al., 1983; MONTEIRO, 1990) com dois subsistemas, um “in situ” e outro com circuito fechado, para perfusão “in vitro” mantidos ambos a uma temperatura de 38°C (Figura 06).

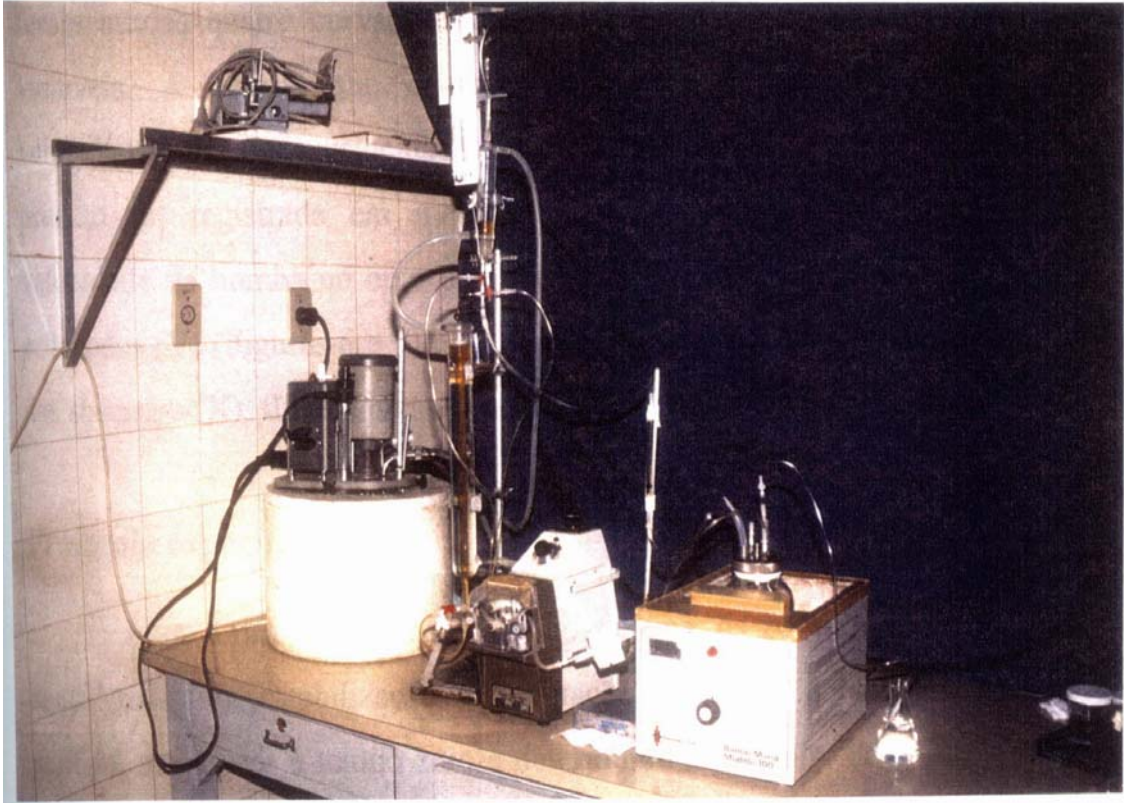


FIGURA 06 - Sistema de perfusão de rim isolado

3.8.1 Componentes do sistema de perfusão

- Condensador - serve de reservatório de aquecimento da solução perfusora mantendo aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
- Coletor de urina - frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocado em intervalos de 10 minutos;
- Seringa graduada - para retirada de amostra de perfusato feita em intervalos de 10 minutos;
- Bomba de perfusão (Watson) - para manutenção do fluxo de perfusão renal. Bombeia a solução de perfusão no sistema, apresenta cinco velocidades;
- Filtro (USA-Millipore-5 μ m) - promove uma melhor perfusão através da filtração constante da solução perfusora;
- Oxigenador (pulmão artificial) - onde acontece as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂) sendo constituído de tubos silásticos;
- Banho Maria (Fanem-modelo 100) - aquece e mantém o pulmão conservando a temperatura constante entre 36 e 37°C;
- Fluxômetro - permite a leitura do fluxo de perfusão durante o experimento;
- Catabolhas - câmara que retém bolhas, evitando o embolismo gasoso do órgão;
- Manômetro de mercúrio - permite fazer a leitura direta da pressão de perfusão;
- Bomba aquecedora com termostato - para manutenção de todo o sistema de perfusão a 37°C.

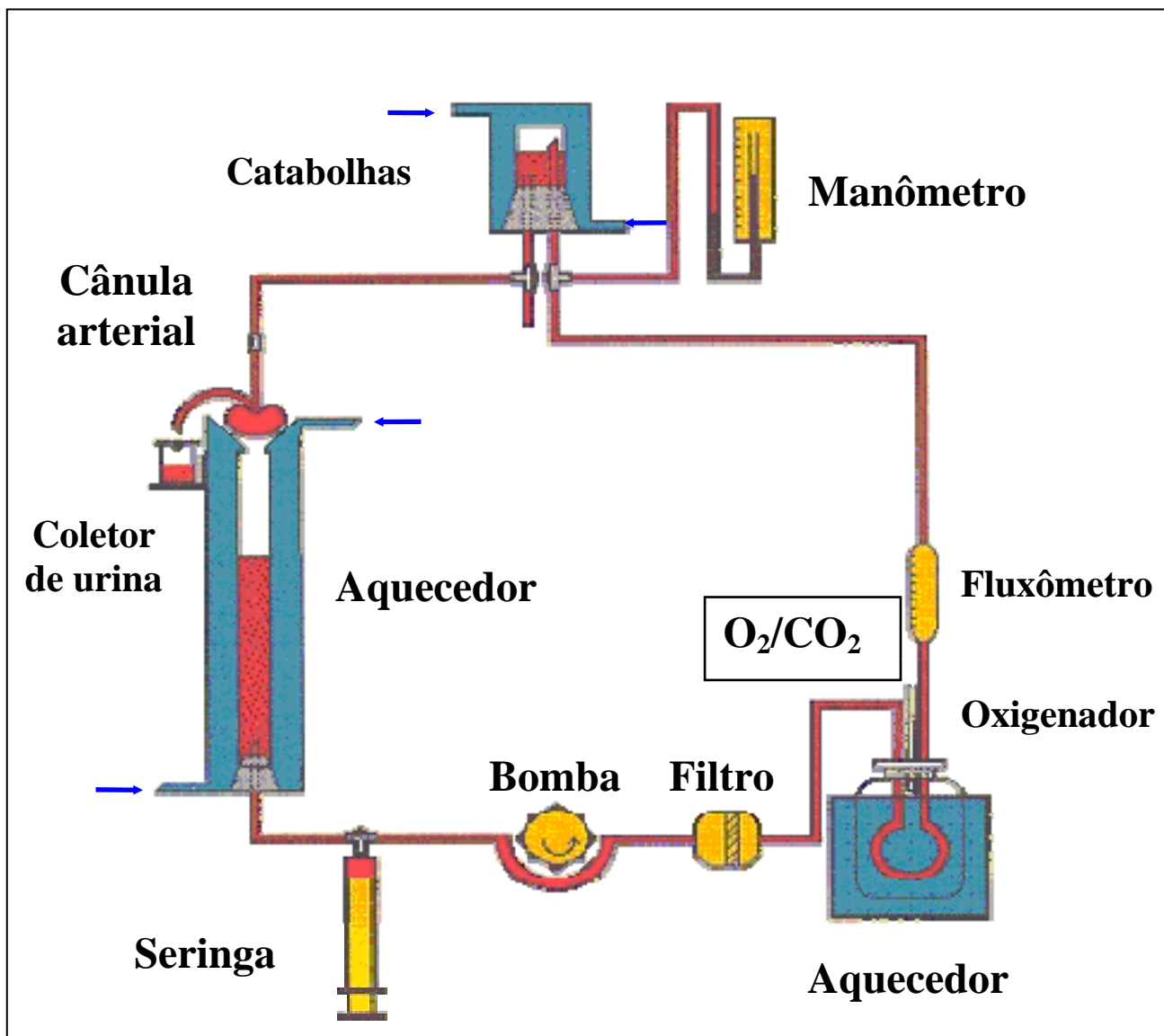


FIGURA 07 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado

3.9 Preparo do Sistema

Antes de cada experimento o sistema foi lavado com detergente e água destilada aquecida, montado e então calibrado.

A calibração foi sempre feita com o sistema em funcionamento na presença de solução salina a 0,9%, aquecida entre as temperaturas de 36 - 37°C. A cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5), coletamos a salina por 1 minuto em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula), e anotamos a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão, através do manômetro de mercúrio ligado ao sistema. Para melhor adaptação do sistema às unidades da bomba, foram estabelecidos 3 minutos de intervalo entre cada coleta.

A calibração foi feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Para tanto, os resultados de calibração obtidos nos grupos tratados foram compilados em curvas, onde plotamos a velocidade da bomba nos eixos das abscissas (X) contra a pressão de perfusão, o valor obtido no fluxômetro e volume de salina coletado (fluxo) no eixo das ordenadas (Y) (Figura 08, 09, 10).

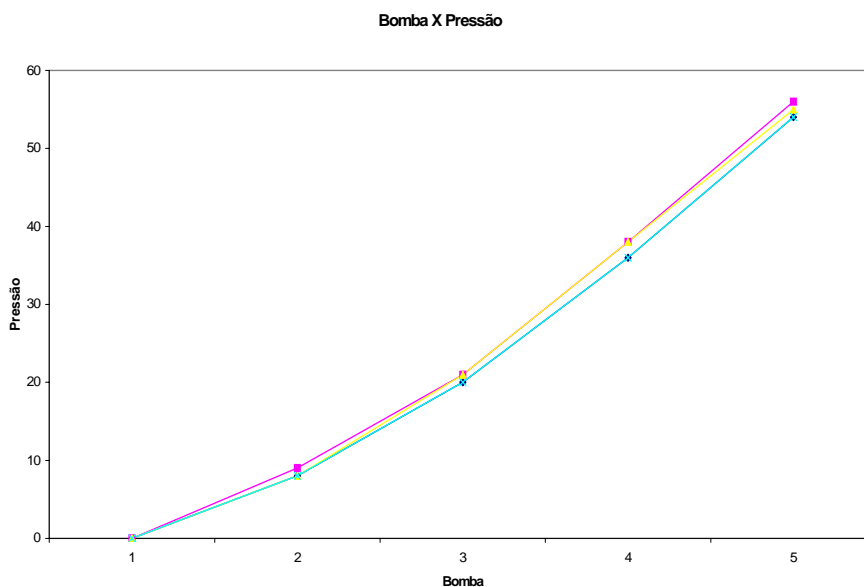


FIGURA 08 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Pressão de perfusão.

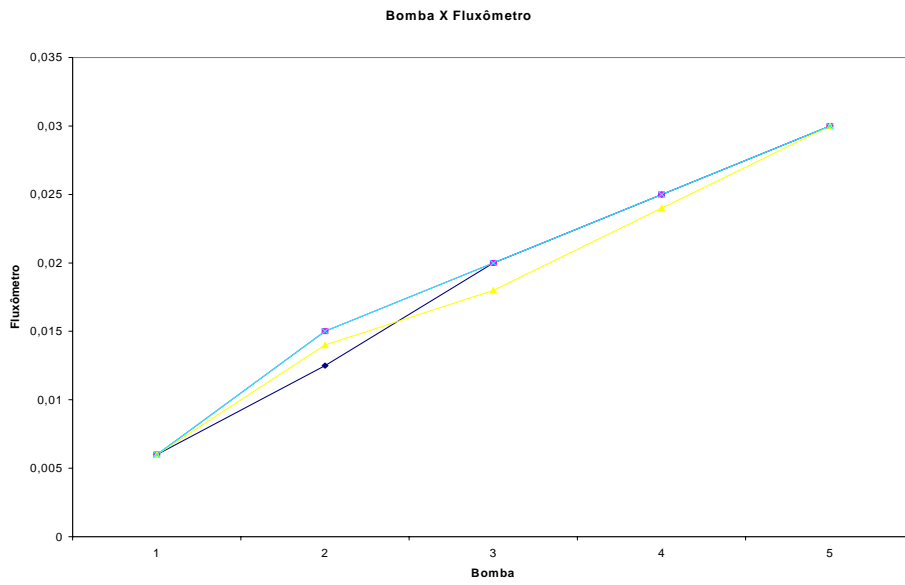


FIGURA 09 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxômetro.

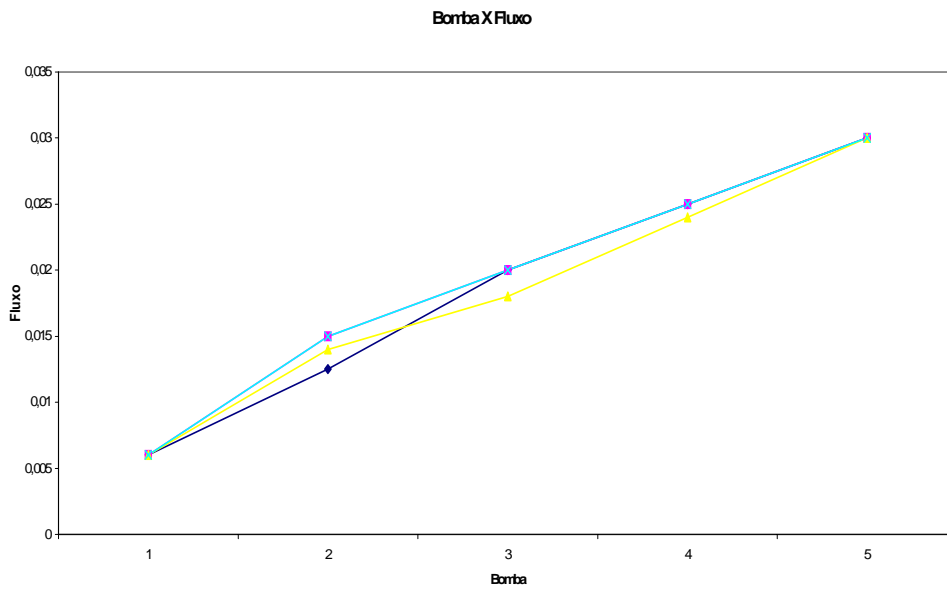


FIGURA 10 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxo.

3.10 Técnica Cirúrgica

Após a pesagem, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. Em seguida os animais foram transportados para a uma mesa cirúrgica, a veia femoral esquerda foi isolada e 3mL de manitol a 20% foram administrados com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter. Após assepsia da parede abdominal, foi feita uma incisão com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para aumentar o campo cirúrgico. Com isso a cavidade abdominal foi exposta e as vísceras abdominais afastadas para o lado esquerdo para visualização do rim direito e conseqüente limpeza do excesso de tecido gorduroso presente na área. Após este procedimento, o ureter direito foi isolado e dissecado do tecido conjuntivo e do tecido adiposo que o envolve, sendo em seguida canulado através de tubo de polietileno (PE50), a uma distância aproximadamente de 3cm do pedúnculo renal, através de uma pequena incisão. Com o intuito de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para com isso providenciarmos a descapsulação do rim. Após cumpridos estes procedimentos, canulamos a artéria renal, a partir da artéria mesentérica superior. Após sua identificação, a artéria mesentérica superior foi ocluída em seu lado direito e pinçado no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido introduzimos a cânula por 3 a 5 mm e daí fixamos cânula e artéria. Logo a seguir, os órgãos foram isolados com pinças e seccionados, promovendo a retirada do rim e ureter, devidamente liberados. Com o rim já acoplado ao sistema, esperamos um período de aproximadamente 30 minutos para sua adaptação ao sistema in vitro, sem interrupção do fluxo (Figura 11).

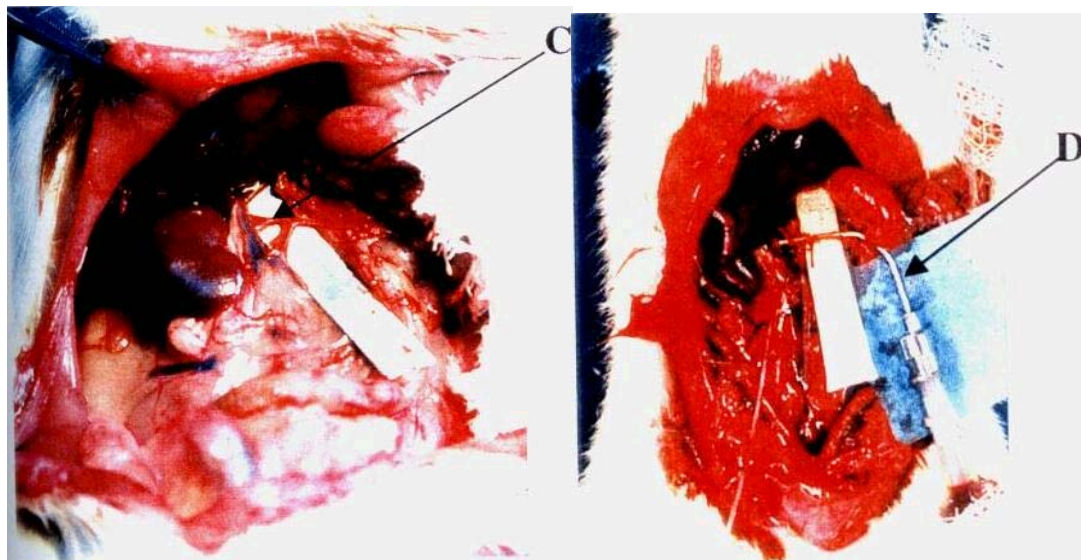
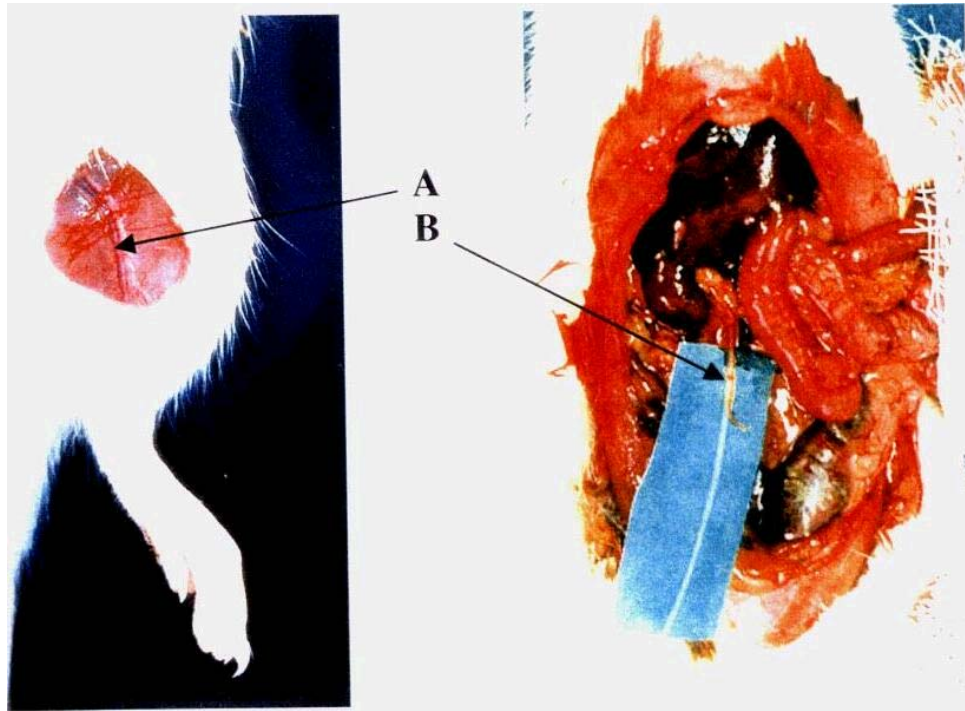


FIGURA 11 – Técnica cirúrgica. A= veia femural; B= ureter canulado; C= artéria mesentérica; D= cânula arterial.

3.11 Protocolo Experimental

Após o rim ter sido colocado no sistema, os 20 minutos iniciais foram considerados de estabilização e adaptação às novas condições. Após esse período, marcou-se o tempo zero e determinou-se 30 minutos de controle interno. O tempo total de perfusão do órgão foi sempre de 120 minutos. Durante esse período, coletamos a cada 5 minutos a medida do fluxômetro e a pressão do perfusato. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, coletamos a urina e o perfusato, de modo que na hora de coletar o último não se trocava o coletor de urina e vice e versa. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal. Sempre aos 30 minutos, administramos o veneno de *Bothrops erythromelas*, o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* e o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas*.

Com o rim direito montado no sistema, coletamos o rim esquerdo para controle, o qual foi pesado e dele retirado um fragmento para posterior exame histopatológico. Após o fim do experimento, foi realizado o mesmo procedimento com o rim direito.

3.12 Avaliação bioquímica

Os testes bioquímicos foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Urina e perfusato foram coletados em intervalos de 10 minutos, de forma intercalada, conforme o protocolo experimental acima descrito. Foram feitas dosagens de sódio e potássio pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443 IL). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta descrita por Fonteles e Leibach (1982), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras foi medida com um osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR).

3.13 Análise histológica

As lâminas usadas em nosso estudo histológico foram feitas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

Após cada experimento, retiramos um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e do não perfundido (esquerdo), os quais foram acondicionados em frascos com formol 10%. Para proceder a análise histológica, estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5 μm de espessura. Procedemos a coloração do material por hematoxilina-eosina e as lâminas foram analisadas por microscópio óptico (Nikon).

Também foi realizado o estudo histológico dos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada para servir de controle perfundido.

3.14 Cálculo dos parâmetros renais

As seguintes fórmulas são utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO et al., 1978; FONTELES, 1980).

➤ $\text{FU (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Fluxo Urinário}$

$\text{FU} = \text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo} \times 10$

➤ $\text{PP (mmHg)} = \text{Pressão de perfusão}$

* Obtida diretamente através da análise em manômetro de mercúrio.

➤ $\text{FPR (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Fluxo plasmático renal ou fluxo de perfusão}$

* Fluxo registrado a cada 10min/ intervalo de tempo x Peso do rim.

➤ $\text{RVR (mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Resistência vascular renal}$

$\text{RVR} = \text{PP (mmHg)} / \text{FPR}$

➤ $\text{RFG (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Ritmo de filtração glomerular}$

$\text{RFG} = \text{DOUin} / \text{DOPin} \times \text{FU}$

$\text{DOUin} = \text{Densidade ótica da inulina na urina}$

DOPin = Densidade ótica da inulina no perfusato

➤ $FNa^+ = (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Sódio filtrado}$

$$FNa^+ = RFG \times PNa^+$$

PNa^+ = Concentração de sódio no perfusato

➤ $ENa^+ = (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Sódio excretado}$

$$ENa^+ = FU \times UNa^+$$

UNa^+ = Concentração de sódio na urina

➤ $TNa^+ = (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Sódio transportado}$

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

➤ $\%TNa^+ = \text{Percentual de sódio transportado}$

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$$

➤ $Cosm (mL.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Clearance osmótico}$

$$Cosm = (Uosm / Posm) \times FU$$

$Uosm$ = Osmolaridade Urinária

$Posm$ = Osmolaridade do perfusato

➤ $CH_2O (mL.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Clearance de água livre}$

$$CH_2O = FU - Cosm$$

➤ $dTNa^+ (mL.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Transporte distal de sódio}$

$$dTNa^+ = CH_2O \times PNa^+$$

➤ $AdNa^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Aporte distal de sódio}$

$$AdNa^+ = dTNa^+ + ENa^+$$

➤ $pTNa^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Transporte proximal de sódio}$

$$pTNa^+ = FNa^+ - AdNa^+$$

➤ %pTNa⁺ = Percentual de transporte proximal de sódio

$$\%pTNa^+ = pTNa^+ \times 100 / FNa^+$$

➤ FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio filtrado

$$FK^+ = RFG \times PK^+$$

PK⁺ = Concentração de potássio no perfusato

➤ EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio excretado

$$EK^+ = FU \times UK^+$$

UK⁺ = Concentração de potássio na urina

➤ TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio transportado

$$TK^+ = FK^+ - EK^+$$

➤ %TK⁺ = Percentual de potássio transportado

$$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$$

➤ dTK⁺ (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Transporte distal de potássio

$$dTK^+ = CH_2O \times PK^+$$

➤ AdK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Aporte distal de potássio

$$AdK^+ = dTK^+ + EK^+$$

➤ pTK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Transporte proximal de potássio

$$pTK^+ = FK^+ \times AdK^+$$

➤ %pTK⁺ = Percentual de transporte proximal de potássio

$$\%pTK^+ = pTK^+ \times 100 / FK^+$$

Todos os cálculos feitos para a determinação dos parâmetros do sódio e potássio acima citados, foram repetidos para o cloro.

3.15 Análise estatística

Usamos computador PC – Pentium III (900Hz) e programa Sigmastat para análise estatística dos dados. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA (teste t de Bonferroni) e teste t Student pareado, com significância de * $p < 0,05$. A análise permitiu a avaliação da ocorrência de alterações funcionais renais durante o período de perfusão. Os dados desse trabalho foram expressos em média(\bar{x}) \pm E.P.M.

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 30 minutos.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo dos parâmetros funcionais renais

Grupo Controle

Foram realizados seis experimentos controle para avaliação dos parâmetros funcionais renais sob a influência apenas da solução de Krebs-Henseleit modificada a 6g%, para posterior comparação com os grupos tratados com veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL) e fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL). O grupo apresentou todos os parâmetros estáveis durante os 120 minutos de experimento (tabela 1 a 14 e gráfico 1 a 14).

Efeitos do Veneno de *Bothrops erythromelas*

A infusão do veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL) ocorreu aos 30 minutos após o início do experimento.

Com relação ao grupo controle o veneno apresentou uma diminuição significativa na pressão de perfusão (PP) aos 60 minutos permanecendo até do final experimento (tabela 1 e gráfico1).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), foi observado que o veneno causou uma diminuição deste parâmetro aos 60 minutos, assim como aconteceu na pressão de perfusão, esta diminuição foi significativa em relação ao grupo controle persistindo até o final do experimento (tabela 2 e gráfico 2).

O veneno, em relação ao grupo controle, ocasionou um aumento significativo no fluxo urinário (FU) aos 90 minutos persistindo até do final experimento (tabela 3 e gráfico3).

O efeito produzido no ritmo de filtração glomerular (RFG) foi uma diminuição significativa aos 60 minutos. Aos 90 e 120 minutos observou-se um aumento significativo do RFG quando comparado ao grupo controle (tabela 4 e gráfico 4).

Com relação ao percentual de transporte tubular de sódio (%TNa+) observou-se uma queda significativa a partir dos 60 minutos, persistindo até o final do experimento (tabela 5 e gráfico 5).

Foi observado que no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa+) houve uma queda significativa aos 60 minutos, mantendo-se até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle (tabela 6 e gráfico 6)

O efeito produzido pelo veneno no transporte tubular de potássio (%TK+) foi de uma diminuição significativa aos 90 minutos, quando comparado ao grupo controle, persistindo até o final do experimento (tabela 7 e gráfico 7).

O efeito do veneno com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de potássio (%pTK+), foi de uma diminuição significativa aos 90 minutos, persistindo até o final do experimento (tabela 8 e gráfico 8).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloro (%TCl-) obsevou-se uma queda significativa aos 60 minutos prosseguindo até os 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (tabela 9 e gráfico 9).

O efeito do veneno com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de cloro (%pTCl-) foi de uma diminuição significativa aos 60 minutos prosseguindo até os 120 minutos (tabela 10 e gráfico 10).

No parâmetro referente à excreção de sódio (ENa+) foi observado um aumento com significância estatística aos 90 minutos e 120 minutos (tabela 11 e gráfico 11).

Foi observada uma diminuição significativa aos 60 minutos na excreção de potássio (EK+) ocasionado pelo veneno em comparação ao controle. Após esta diminuição, observou-se um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (tabela 12 e gráfico 12).

Com relação à excreção de cloro (ECl-), o veneno promoveu um aumento significativo aos 90 e 120 minutos conforme (tabela 13 e gráfico 13).

Com relação ao clearance osmótico (Cosm) o veneno promoveu um aumento significativo aos 90 e 120 minutos quando comparado ao grupo controle (tabela 14 e gráfico14).

Efeitos do Fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis*

A infusão do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) ocorreu aos 30 minutos.

O fator antibotrópico não apresentou alteração significativa na pressão de perfusão (PP) quando comparado ao grupo controle (tabela 1 e gráfico 1).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), foi observado que o fator antibotrópico não alterou este parâmetro quando comparado ao grupo controle (tabela 2 e gráfico 2).

O fluxo urinário (FU) não apresentou alteração quando comparado ao grupo controle (tabela 3 e gráfico 3).

Não foi observado nenhum efeito significativo no ritmo de filtração glomerular (RFG) quando comparado ao grupo controle (tabela 4 e gráfico 4).

Com relação ao percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) observou-se um aumento significativo aos 60 minutos quando comparado ao grupo controle, retornando aos parâmetros normais aos 90 e 120 minutos (tabela 5 e gráfico 5).

Foi observado que no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) houve um aumento significativo aos 60 minutos conforme se pode observar na tabela 6 e gráfico 6, quando comparado ao grupo controle. Após este aumento observou-se uma diminuição aos 90 minutos persistindo até o final do experimento (tabela 6 e gráfico 6).

Não foi observado nenhum efeito causado pelo fator antibotrópico no transporte tubular de potássio (%TK⁺) quando comparado ao grupo controle (tabela 7 e gráfico 7).

O efeito do fator antibotrópico com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺), foi de uma diminuição significativa aos 90 e 120 minutos (tabela 8 e gráfico 8).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻) não foram observadas alterações significativas (tabela 9 e gráfico 9).

O efeito do fator antibotrópico com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de cloro (%pTCl⁻) foi de uma diminuição com significância aos 90 e 120 minutos (tabela 10 e gráfico 10).

No parâmetro referente à excreção de sódio (ENa⁺) não foram observadas alterações significativas (tabela 11 e gráfico 11).

Não foram observadas alterações significativas na excreção de potássio (EK⁺) ocasionada pelo fator antibotrópico em comparação ao controle (tabela 12 e gráfico 12).

Com relação à excreção de cloro (ECl⁻), o fator antibotrópico não alterou este parâmetro (tabela 13 e gráfico 13).

Com relação ao clearance osmótico (Cosm), o fator antibotrópico não alterou este parâmetro quando comparado ao grupo controle (tabela 14 e gráfico 14).

Efeitos do Veneno de Bothrops erythromelas + Fator antibotrópico de Didelphis marsupialis (10µg/mL)

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL) foi adicionado sempre aos 30 minutos de perfusão.

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* ocasionou uma queda significativa na pressão de perfusão (PP) aos 60 minutos persistindo até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle. No entanto, esta queda não foi tão acentuada neste parâmetro quanto a observada no veneno (tabela 1 e gráfico 1).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR) ocorreu uma diminuição significativa aos 90 minutos. Após esta diminuição ocorreu um aumento, retornando a um valor próximo ao encontrado aos 30 minutos (tabela 2 e gráfico 2).

Ocorreu um aumento no fluxo urinário (FU) com significância aos 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (tabela 3 e gráfico 3).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuiu significativamente aos 60 minutos quando comparado ao grupo controle. Após esta diminuição observou-se um aumento do RFG com significância aos 120 minutos (tabela 4 e gráfico 4).

Não foi observado nenhum efeito causado pelo fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa+) (tabela 5 e gráfico 5).

Em relação ao percentual do transporte tubular proximal de sódio (%pTNa+) não ocorreu alteração deste parâmetro quando comparado com o grupo controle (tabela 6 e gráfico 6).

Não se observou nenhum efeito causado pelo fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* no transporte tubular de potássio (%TK+) (tabela 7 e gráfico 7).

Em relação ao percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK+), não houve alteração deste parâmetro, quando comparado ao grupo controle (tabela 8 e gráfico 8).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloro (%TCl-) o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* não produziu nenhum efeito conforme se pode observar na (tabela 9 e gráfico 9).

Em relação ao grupo controle, o percentual do transporte tubular proximal de cloro (%pTCl-) não sofreu alteração (tabela 10 e gráfico 10).

Na excreção do sódio (ENa+) ocorreu uma diminuição significativa aos 60 minutos. Após esta diminuição ocorreu um aumento significativamente estatístico aos 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (tabela 11 e gráfico 11).

A excreção de potássio (EK+) apresentou uma queda significativa aos 60 minutos quando comparado ao controle. Após esta queda observou-se um aumento com significância aos 90 e 120 minutos (tabela 12 e gráfico 12).

Na excreção de cloro (ECl-), observou-se um aumento significativo aos 120 minutos quando comparado ao grupo controle (tabela 13 e gráfico 13).

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* promoveu um aumento significativo aos 120 minutos do clearance osmótico (Cosm), quando comparado ao grupo controle (tabela 14 e gráfico 14).

Efeitos do Veneno de *Bothrops erythromelas* + Fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL)

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL) foi adicionado sempre aos 30 minutos de perfusão.

Com relação ao grupo controle o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* ocasionou uma diminuição na pressão de perfusão (PP) com significância aos 90 e 120 minutos (tabela 1 e gráfico1).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), foi observado que o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* não causou alteração deste parâmetro (tabela 2 e gráfico 2).

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* apresentou uma queda significativa do fluxo urinário (FU) aos 90 minutos quando comparado ao grupo controle (tabela 3 e gráfico3).

Foi observada uma queda significativa aos 60 minutos no ritmo de filtração glomerular (RFG) persistindo até o final do experimento (tabela 4 e gráfico 4).

Com relação ao percentual de transporte tubular de sódio (%TNa+) o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* não apresentou alteração do parâmetro quando comparado ao grupo controle (tabela 5 e gráfico 5).

Quando comparado ao grupo controle foi observado que no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa+) não houve alteração (tabela 6 e gráfico 6).

Não foi observado nenhum efeito produzido pelo fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* no transporte tubular de potássio (%TK+) (tabela 7 e gráfico 7).

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* não causou alteração no transporte tubular proximal de potássio (%pTK+) em relação ao grupo controle (tabela 8 e gráfico 8).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloro (%TCl-) não foi observada alteração deste parâmetro quando comparado com o grupo controle (tabela 9 e gráfico 9).

O fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* não causou alteração no transporte tubular proximal de cloro (%pTCl-) (tabela 10 e gráfico 10).

No parâmetro referente à excreção de sódio (ENa+) o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* ocasionou uma diminuição com significância estatística aos 90 e 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (tabela 11 e gráfico 11).

Foi observada uma diminuição na excreção de potássio (EK+) ocasionado pelo fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* em comparação ao controle com significância aos 90 minutos (tabela 12 e gráfico 12).

Com relação à excreção de cloro (ECl-), o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* promoveu uma diminuição significativa aos 90 e 120 minutos conforme (tabela 13 e gráfico 13).

Com relação ao clearance osmótico (Cosm) o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* + veneno de *Bothrops erythromelas* ocasionou uma queda significativa deste parâmetro aos 90 minutos, quando comparado ao grupo controle (tabela 14 e gráfico 14).

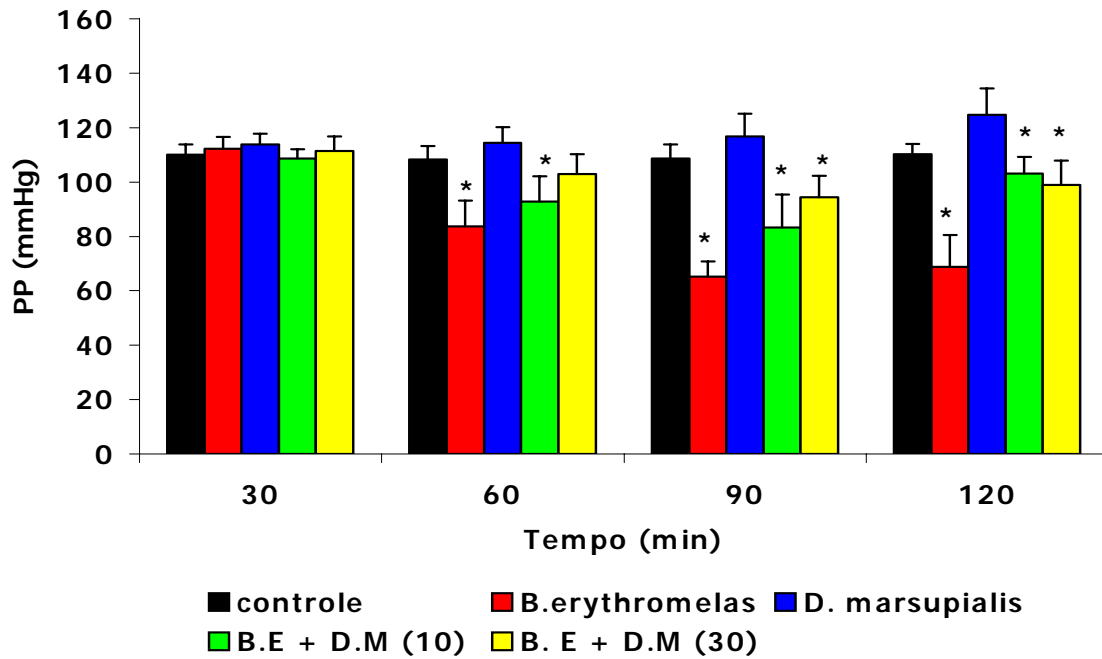


GRÁFICO 1: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 1.

TABELA 1: Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis (mmHg)	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	110,11 ± 3,7	108,27 ± 4,9	108,70 ± 5,1	110,28 ± 3,7
B.E.	112,30 ± 4,2	83,70 ± 9,5*	65,20 ± 5,6*	68,80 ± 11,6*
D.M.	113,80 ± 4,0	114,30 ± 5,8	116,80 ± 8,4	124,80 ± 9,6
B.E.+ D.M (10)	108,60 ± 3,5	92,70 ± 9,4*	83,20 ± 12,1*	103,0 ± 6,3*
B.E.+ D.M (30)	111,40 ± 5,3	102,90 ± 7,4	94,30 ± 8,1*	98,90 ± 9,0*

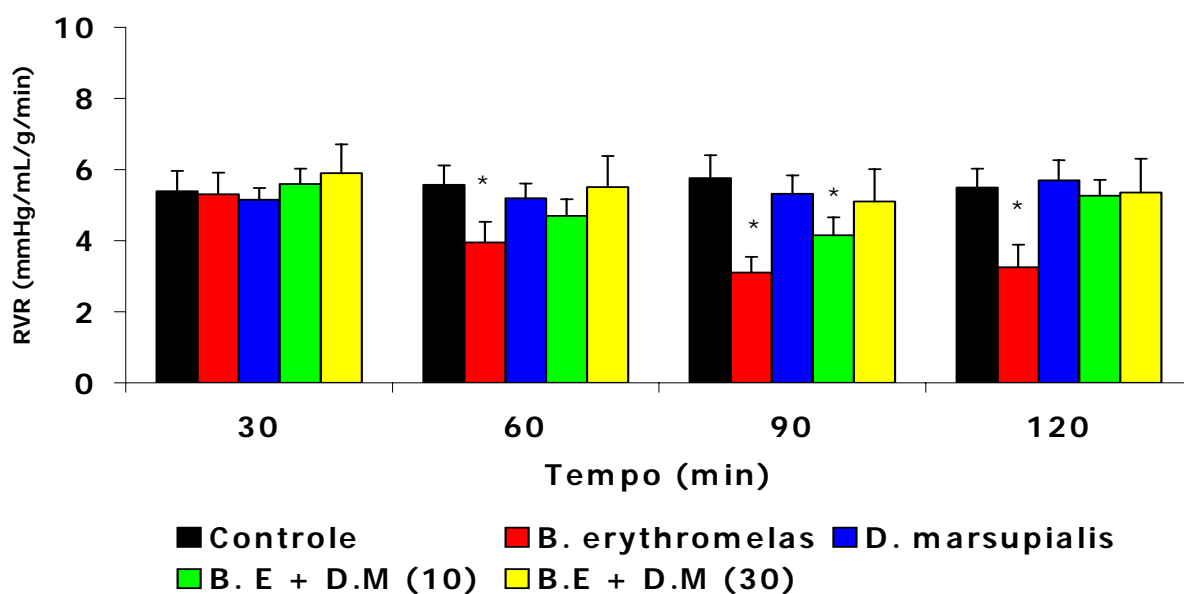


GRÁFICO 2: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 2.

TABELA 2: Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis (mm.Hg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	5,39 ± 0,57	5,57 ± 0,54	5,76 ± 0,65	5,49 ± 0,54
B.E	5,30 ± 0,61	3,95 ± 0,58*	3,10 ± 0,45*	3,25 ± 0,63*
D.M.	5,15 ± 0,33	5,19 ± 0,42	5,32 ± 0,51	5,69 ± 0,57
B.E.+ D.M (10)	5,59 ± 0,43	4,69 ± 0,48	4,15 ± 0,51*	5,27 ± 0,44
B.E.+ D.M (30)	5,90 ± 0,81	5,51 ± 0,87	5,10 ± 0,91	5,35 ± 0,95

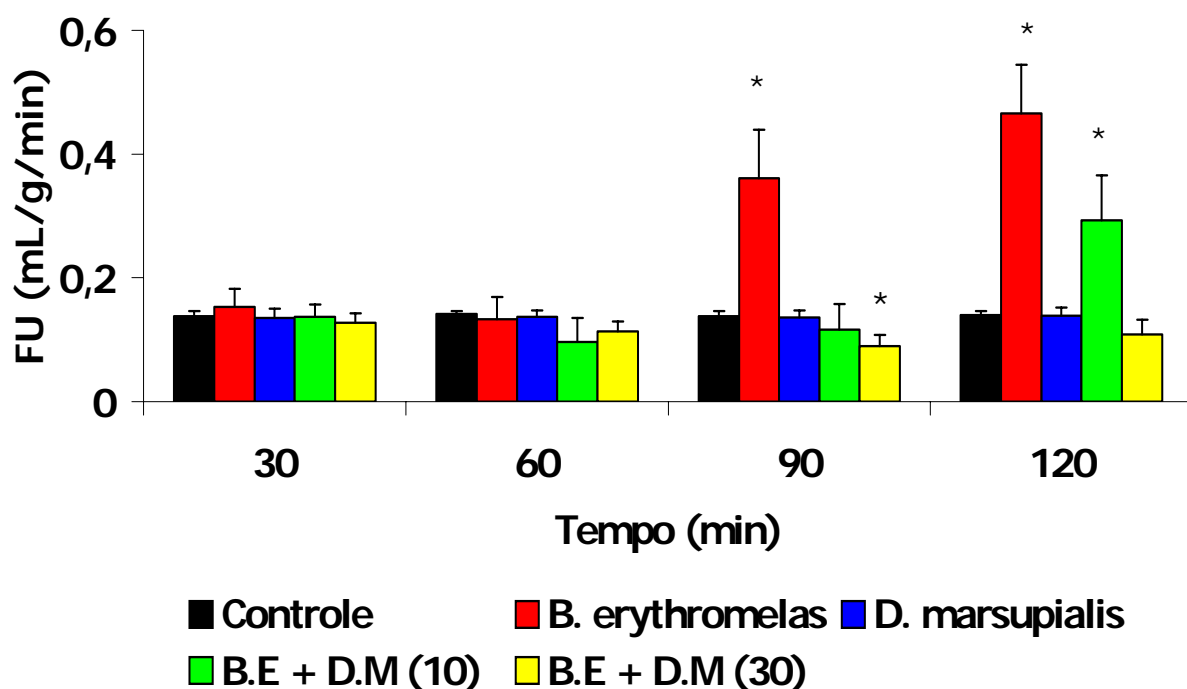


GRÁFICO 3: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 3.

TABELA 3: Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	30	60	90	120
Controle	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
B.E	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,36 ± 0,08*	0,47 ± 0,08*
D.M.	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
B.E.+ D.M (10)	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,29 ± 0,07*
B.E.+ D.M (30)	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02*	0,11 ± 0,02

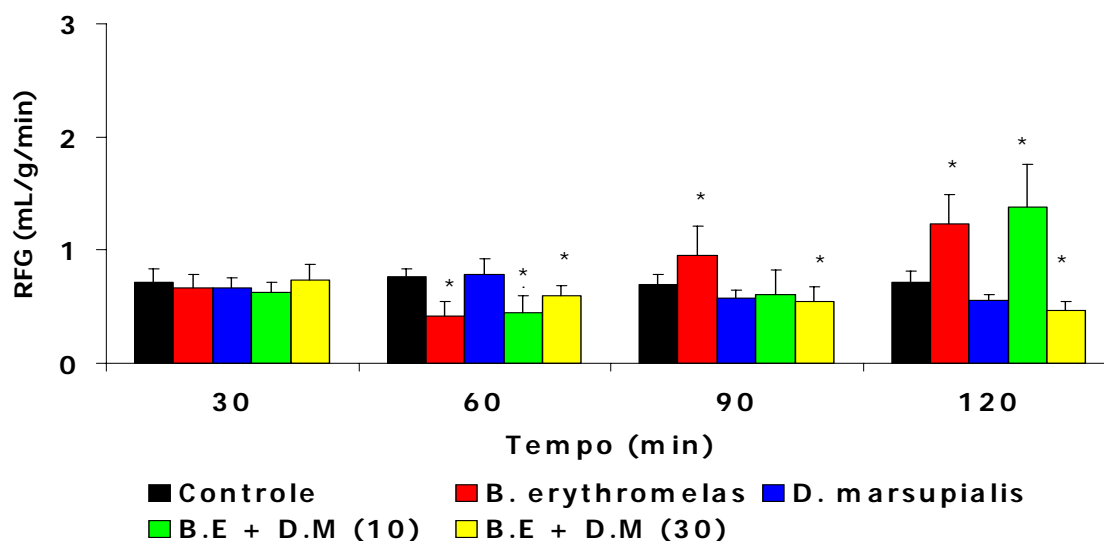


GRÁFICO 4: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 4.

TABELA 4: Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	30	60	90	120
Controle	0,72 ± 0,12	0,76 ± 0,07	0,70 ± 0,09	0,72 ± 0,10
B.E	0,66 ± 0,12	0,42 ± 0,12*	0,95 ± 0,26*	1,24 ± 0,26*
D.M.	0,67 ± 0,09	0,79 ± 0,13	0,57 ± 0,07	0,56 ± 0,05
B.E.+ D.M (10)	0,62 ± 0,09	0,44 ± 0,15*	0,61 ± 0,22	1,38 ± 0,38*
B.E.+ D.M (30)	0,74 ± 0,14	0,59 ± 0,09*	0,54 ± 0,13*	0,47 ± 0,08*

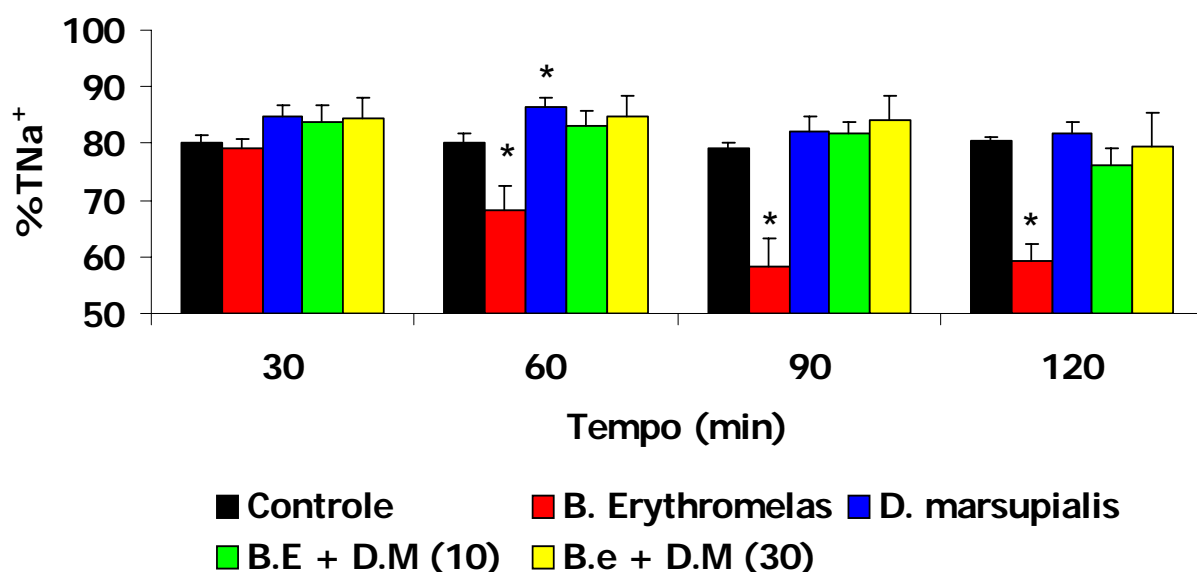


GRÁFICO 5: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 5.

TABELA 5: Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	80,17 ± 1,40	80,04 ± 1,61	79,18 ± 0,88	80,58 ± 0,45
B.E	79,08 ± 1,67	68,36 ± 4,12*	58,35 ± 4,86*	59,24 ± 3,15*
D.M.	84,67 ± 2,20	86,48 ± 1,65*	82,05 ± 2,73	81,65 ± 2,16
B.E.+ D.M (10)	83,73 ± 3,03	83,25 ± 2,66	81,83 ± 1,94	76,12 ± 3,03
B.E.+ D.M (30)	84,30 ± 3,63	84,70 ± 3,70	84,04 ± 4,41	79,56 ± 5,75

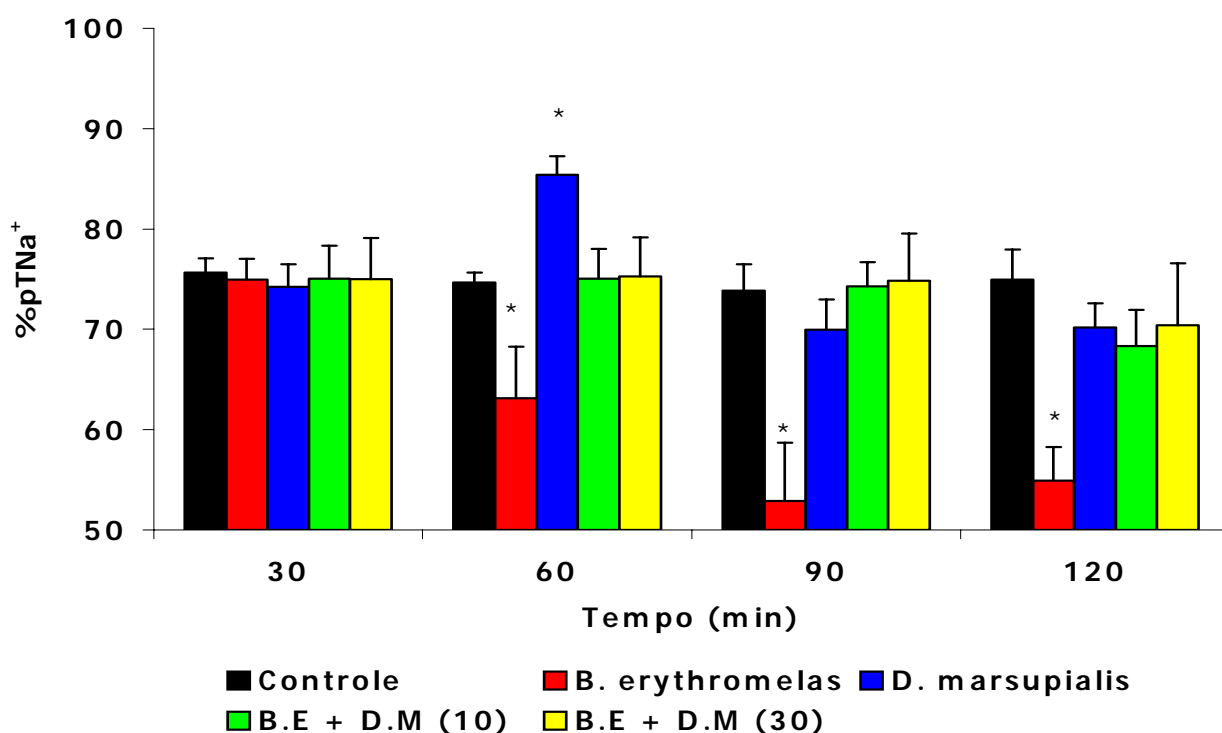


GRÁFICO 6: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 6.

TABELA 6: Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	75,65 ± 1,42	74,69 ± 0,99	73,84 ± 2,64	74,94 ± 3,02
B.E	74,97 ± 2,07	63,13 ± 5,14*	52,89 ± 5,79*	54,91 ± 3,36*
D.M.	74,25 ± 2,20	85,39 ± 1,87*	69,94 ± 3,03	70,16 ± 2,45
B.E.+ D.M (10)	75,04 ± 3,28	75,07 ± 2,94	74,30 ± 2,40	68,34 ± 3,60
B.E.+ D.M (30)	75,01 ± 4,12	75,27 ± 3,91	74,82 ± 4,73	70,40 ± 6,18

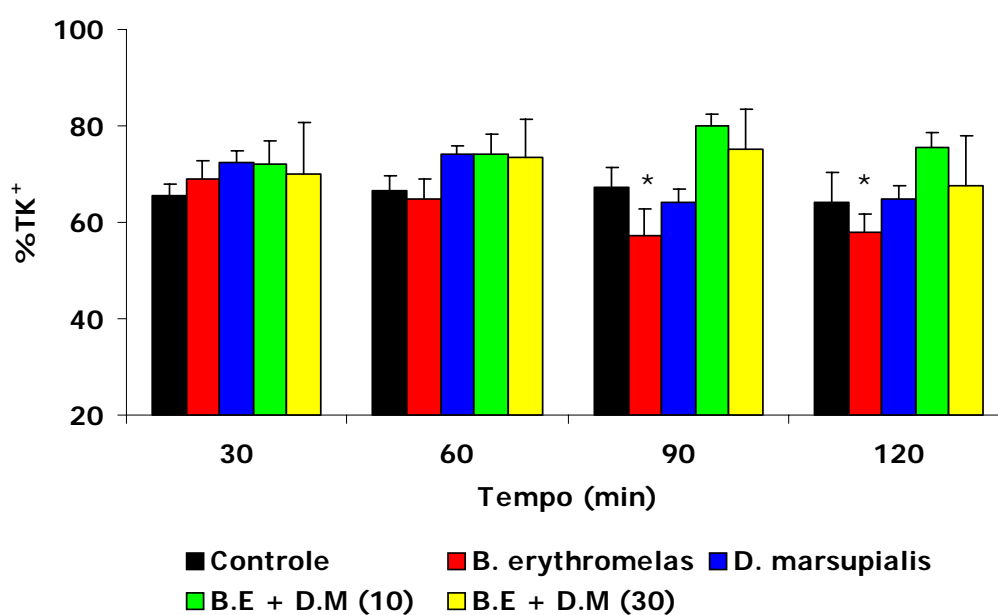


GRÁFICO 7: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 7.

TABELA 7: Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	65,36 ± 2,47	66,38 ± 3,31	67,20 ± 4,04	64,28 ± 5,93
B.E	68,89 ± 3,79	64,80 ± 4,02	57,32 ± 5,28*	58,07 ± 3,78*
D.M.	72,30 ± 2,64	74,08 ± 1,93	64,25 ± 2,58	64,78 ± 2,80
B.E.+ D.M (10)	72,15 ± 4,88	74,13 ± 4,07	80,06 ± 2,25	75,56 ± 3,22
B.E.+ D.M (30)	69,99 ± 10,55	73,48 ± 7,98	75,11 ± 8,27	67,52 ± 10,31

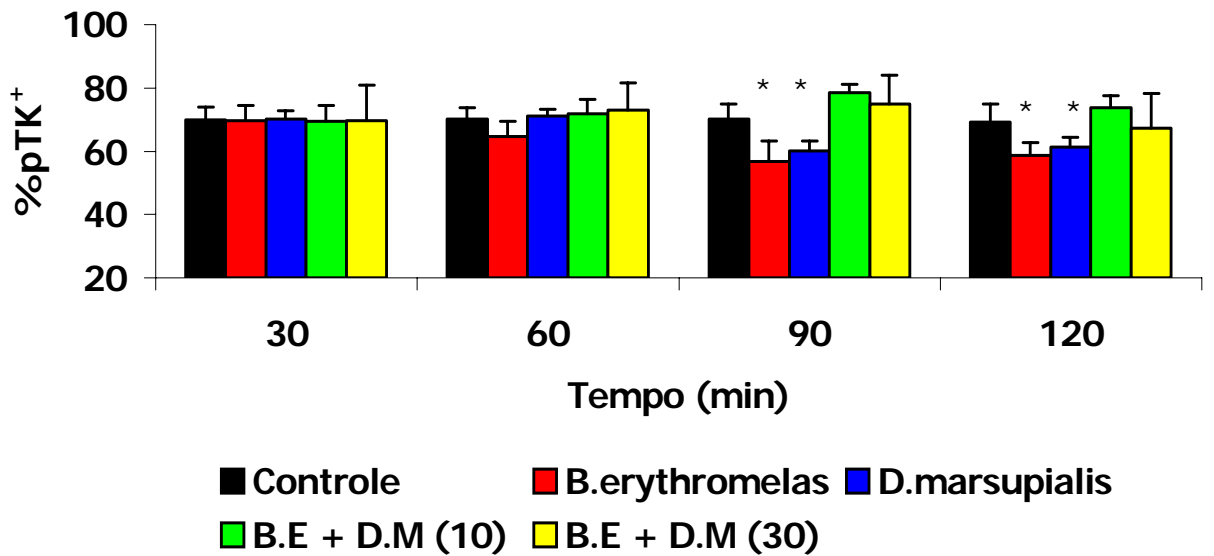


GRÁFICO 8: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 8.

TABELA 8: Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05.*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	69,92 ± 4,09	70,13 ± 3,69	70,18 ± 4,86	69,17 ± 5,64
B.E	69,78 ± 4,56	64,57 ± 4,88	56,86 ± 6,29*	58,74 ± 4,0*
D.M.	70,15 ± 2,51	70,99 ± 2,18	60,14 ± 3,0*	61,29 ± 3,10*
B.E.+ D.M (10)	69,45 ± 5,11	71,94 ± 4,32	78,54 ± 2,60	73,79 ± 3,78
B.E.+ D.M (30)	69,70 ± 11,09	73,05 ± 8,45	74,89 ± 9,07	67,36 ± 11,0

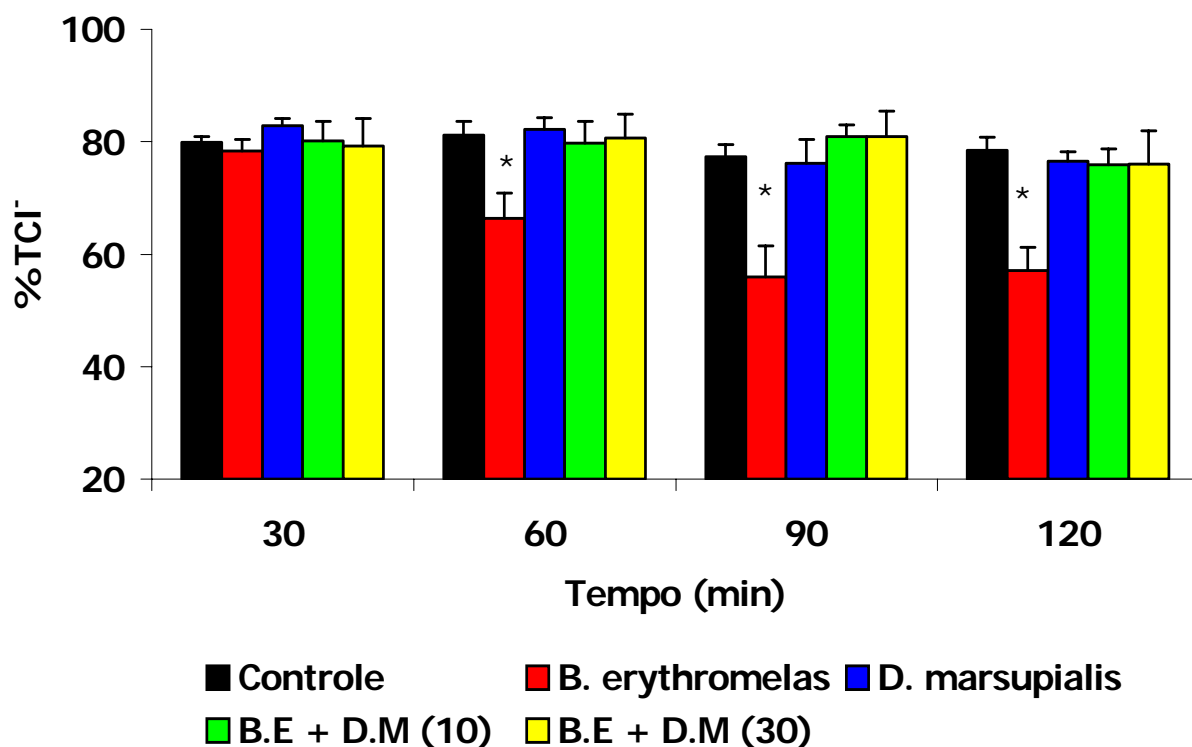


GRÁFICO 9: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 9.

TABELA 9: Efeitos no percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	79,90 ± 1,03	81,25 ± 2,44	77,32 ± 2,22	78,53 ± 2,33
B.E	78,40 ± 1,98	66,37 ± 4,48*	55,97 ± 5,52*	57,10 ± 4,13*
D.M.	82,89 ± 1,22	82,27 ± 2,07	76,16 ± 4,29	76,57 ± 1,72
B.E.+ D.M (10)	80,10 ± 3,53	79,73 ± 3,94	80,90 ± 2,14	75,89 ± 2,91
B.E.+ D.M (30)	79,24 ± 4,88	80,70 ± 4,28	80,87 ± 4,52	75,99 ± 5,97

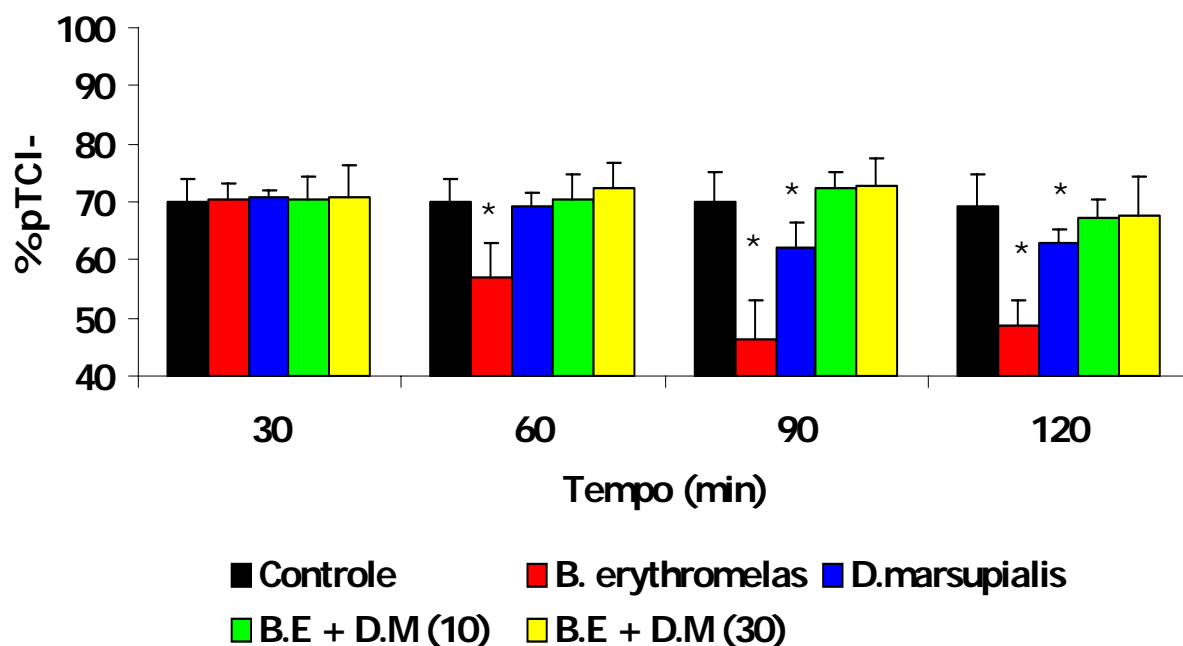


GRÁFICO 10: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 10.

TABELA 10: Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de cloro (%pTCl) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	69,92 ± 4,09	70,13 ± 3,69	70,18 ± 4,86	69,17 ± 5,64
B.E	70,29 ± 2,85	57,14 ± 5,69*	46,51 ± 6,59*	48,77 ± 4,22*
D.M.	70,74 ± 1,31	69,19 ± 2,24	62,05 ± 4,51*	63,08 ± 2,11*
B.E.+ D.M (10)	70,40 ± 3,79	70,55 ± 4,23	72,38 ± 2,59	67,12 ± 3,47
B.E.+ D.M (30)	70,95 ± 5,39	72,27 ± 4,56	72,64 ± 4,98	67,82 ± 6,49

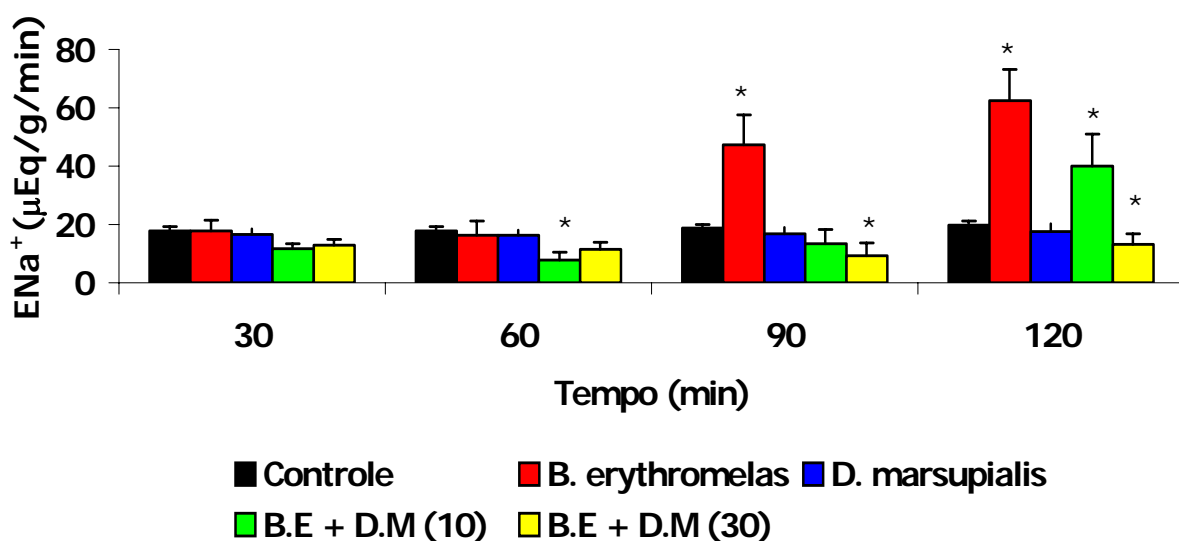


GRÁFICO 11: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 11.

TABELA 11: Efeitos na excreção de sódio (ENa^+) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10 $\mu\text{g/mL}$), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10 $\mu\text{g/mL}$), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10 $\mu\text{g/mL}$), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30 $\mu\text{g/mL}$).

Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis ($\mu\text{Eq/g/min}$)	30	60	90	120
Controle	17,81 \pm 1,43	17,74 \pm 1,51	18,76 \pm 1,31	19,74 \pm 1,48
B.E	17,85 \pm 3,62	16,37 \pm 4,76	47,3 \pm 10,36*	62,40 \pm 10,86*
D.M.	16,60 \pm 1,86	16,34 \pm 1,60	16,73 \pm 2,26	17,62 \pm 2,73
B.E.+ D.M (10)	11,74 \pm 1,75	7,83 \pm 2,66*	13,41 \pm 4,95	40,02 \pm 10,87*
B.E.+ D.M (30)	12,90 \pm 2,08	11,56 \pm 2,41	9,29 \pm 2,42*	13,08 \pm 3,70*

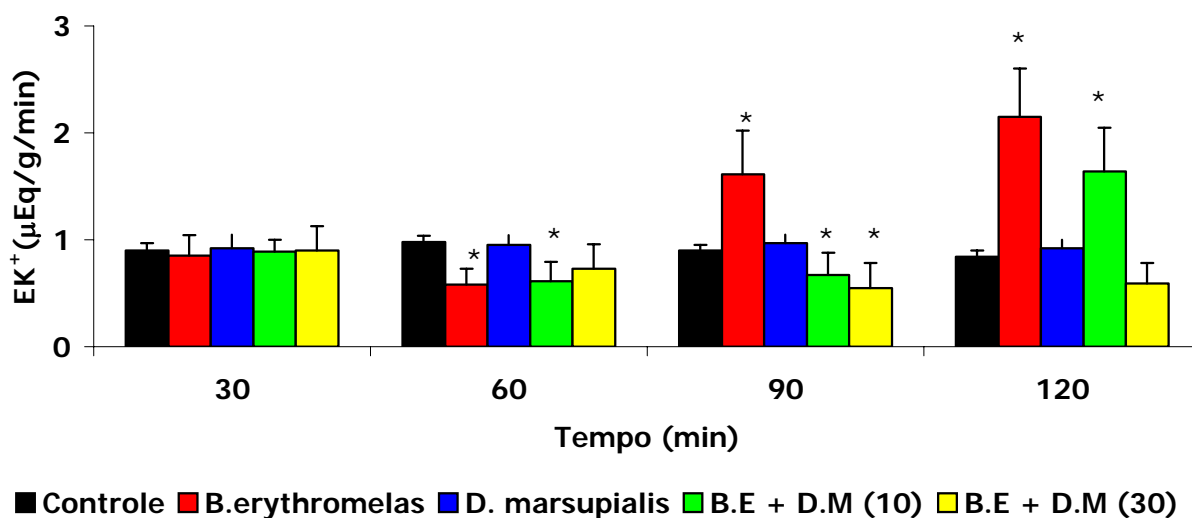


GRÁFICO 12: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 12.

TABELA 12: Efeitos na excreção de potássio (EK^+) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (**B.E**=10μg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (**D.M**=10μg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10μg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30μg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis (μEq/g/min)	30	60	90	120
Controle	0,90 ± 0,07	0,98 ± 0,06	0,90 ± 0,05	0,84 ± 0,06
B.E	0,85 ± 0,19	0,58 ± 0,15*	1,61 ± 0,41*	2,15 ± 0,45*
D.M.	0,92 ± 0,13	0,95 ± 0,09	0,97 ± 0,08	0,92 ± 0,08
B.E.+ D.M (10)	0,89 ± 0,11	0,61 ± 0,18*	0,67 ± 0,21*	1,64 ± 0,41*
B.E.+ D.M (30)	0,90 ± 0,23	0,73 ± 0,23	0,55 ± 0,23*	0,59 ± 0,19

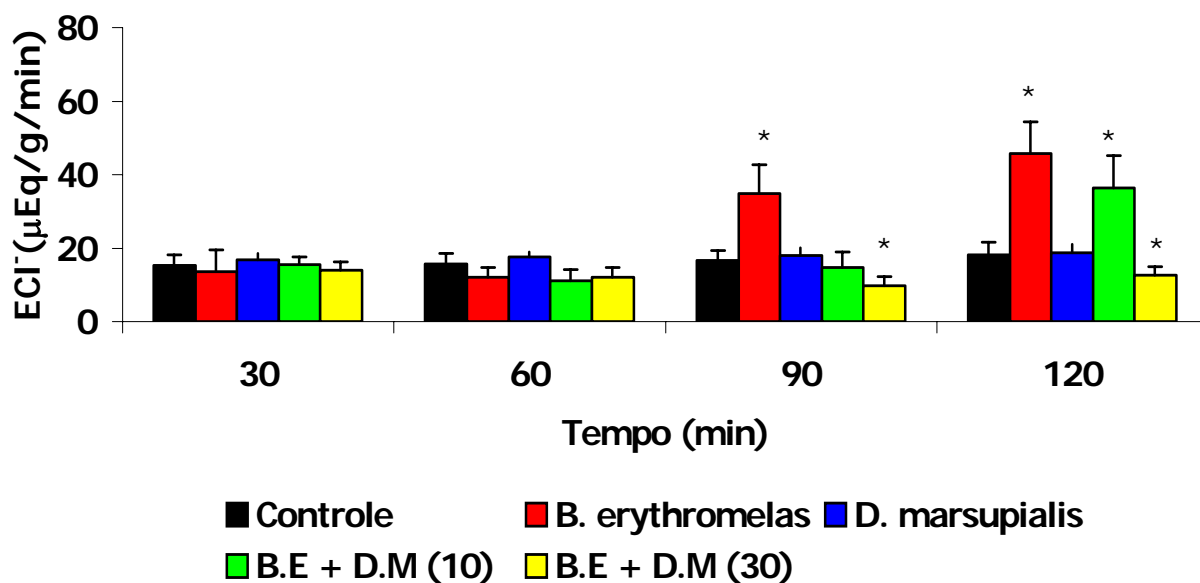


GRÁFICO 13: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 13.

TABELA 13: Efeitos na excreção de cloro (ECI) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis (µEq/g/min)	30	60	90	120
Controle	15,38 ± 2,87	15,62 ± 2,87	16,71 ± 2,70	18,17 ± 3,42
B.E	13,63 ± 2,85	12,04 ± 2,78	34,77 ± 7,96*	45,77 ± 8,53*
D.M.	16,85 ± 1,81	17,70 ± 1,29	18,04 ± 2,12	18,78 ± 2,30
B.E.+ D.M (10)	15,57 ± 2,09	11,19 ± 2,96	14,71 ± 4,16	36,31 ± 8,92*
B.E.+ D.M (30)	14,02 ± 2,26	12,15 ± 2,51	9,67 ± 2,59*	12,61 ± 3,33*

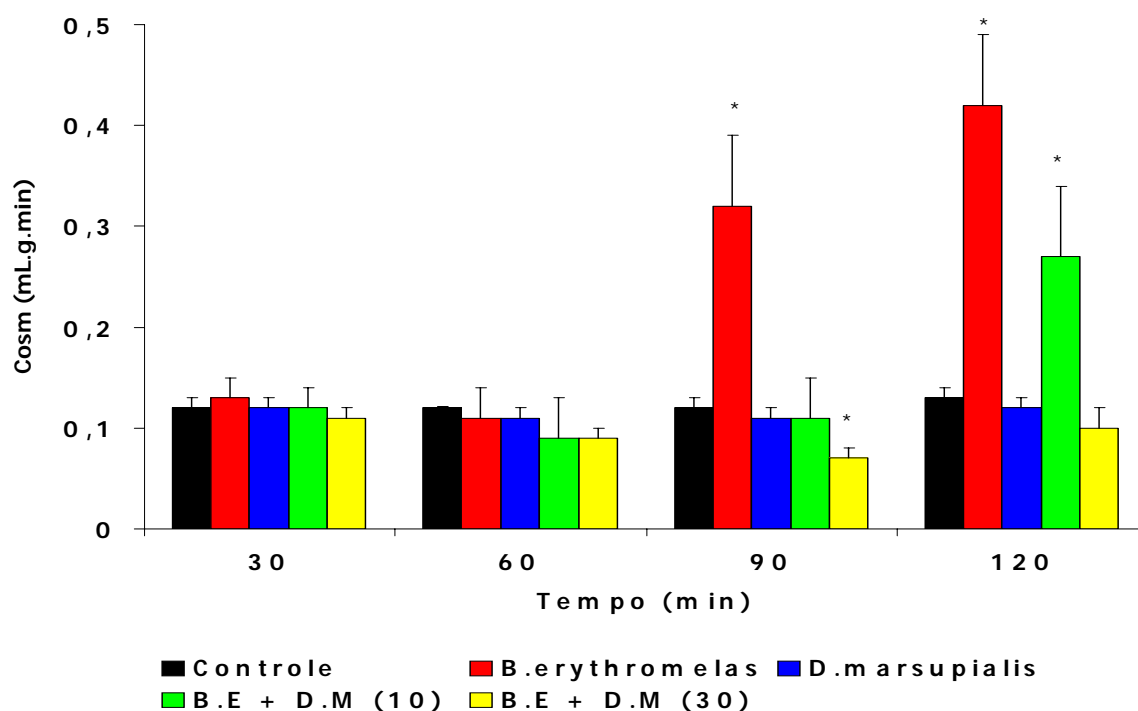


GRÁFICO 14: Representação esquemática dos dados apresentados na tabela 14.

TABELA 14: Efeitos no clearance osmótico (Cosm) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothrops erythromelas* (B.E=10µg/mL), fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (D.M=10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL), veneno de *Bothrops erythromelas* + fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL).

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

Variáveis (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
B.E	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,32 ± 0,07*	0,42 ± 0,07*
D.M.	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
B.E.+ D.M (10)	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,27 ± 0,07*
B.E.+ D.M (30)	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01*	0,10 ± 0,02

4.2 Análise Histológica

Os rins esquerdos serviram como grupo controle não apresentando qualquer alteração a nível de glomérulos, túbulos, vasos e interstício (figura 12).

No grupo em que os rins foram perfundidos com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL), os glomérulos apresentaram discreta quantidade de material protéico no espaço urinário (figura 13). Foi observada a presença de degeneração hidrópico vacuolar nos túbulos renais (figura 14). Não foi encontrada qualquer anormalidade a nível de vasos e interstício.

Os rins perfundidos com fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) não apresentaram qualquer alteração a nível de glomérulos, túbulos, vasos e interstício (figura 15).

No grupo em que os rins foram perfundidos com fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (10µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL), glomérulos, túbulos, vasos e interstício apresentaram-se normais (figura 16).

No grupo em que os rins foram perfundidos com fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* (30µg/mL) incubado com o veneno de *Bothrops erythromelas* (10µg/mL), glomérulos, túbulos, vasos e interstício apresentaram-se normais (figura 17).

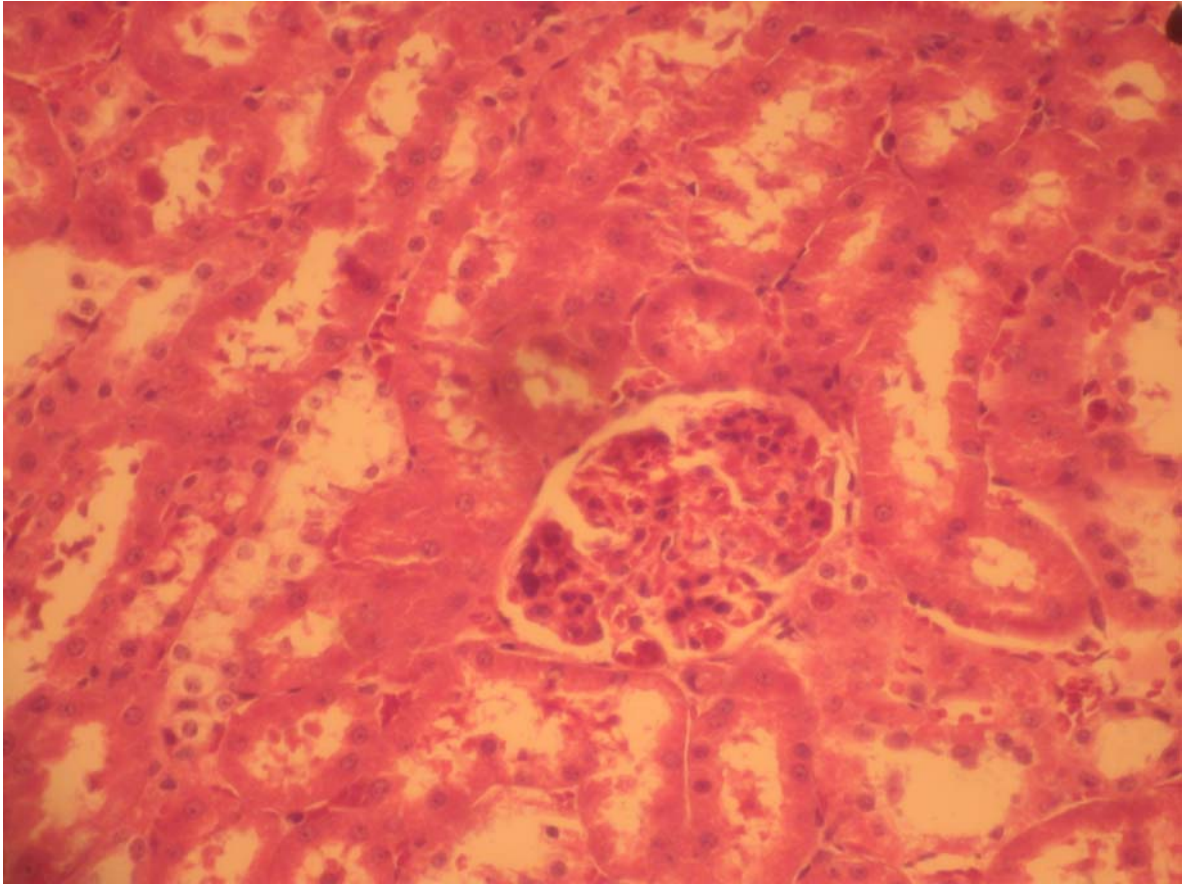


FIGURA 12- Rim controle apresentando glomérulos e túbulos normais (200X).

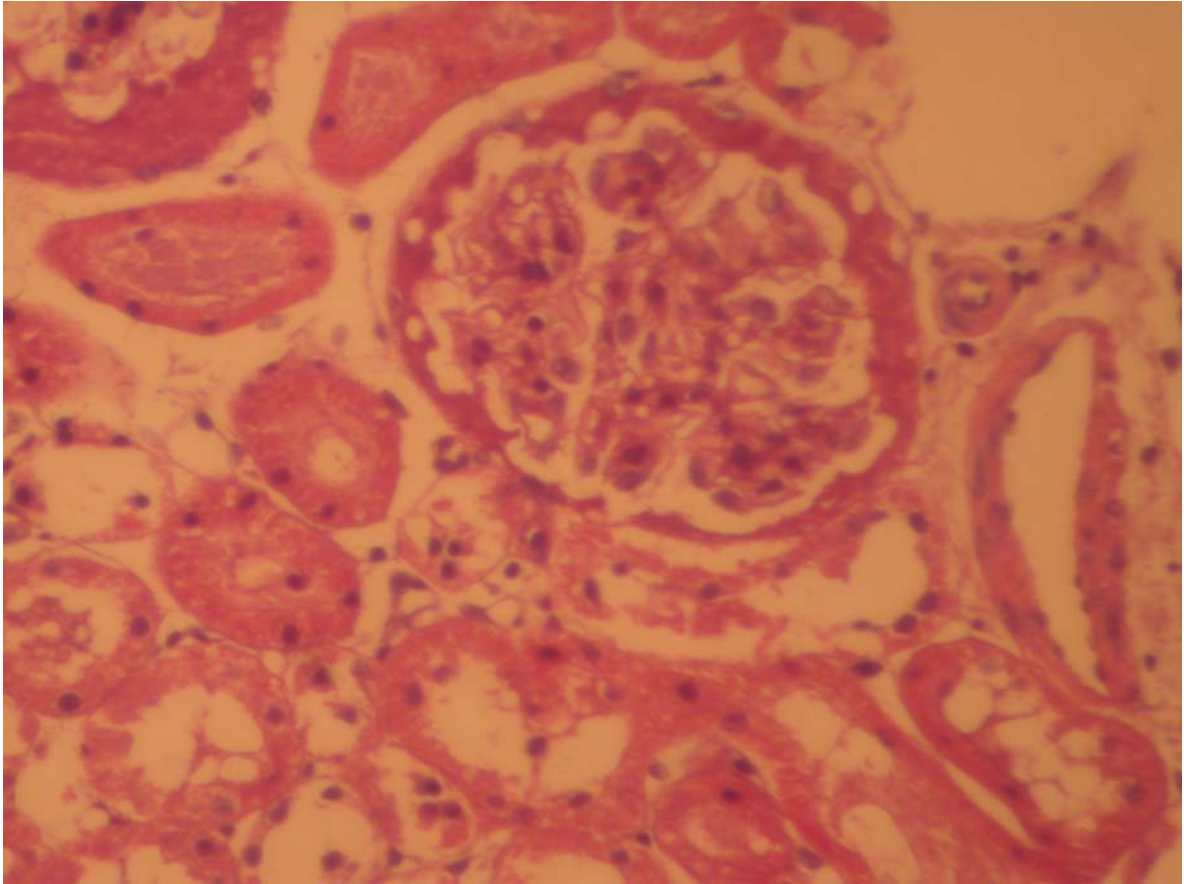


FIGURA 13- Rim tratado com 10 μ g/mL de veneno de *Bothrops erythromelas* apresentando glomérulos com material protéico no espaço urinário (200X).

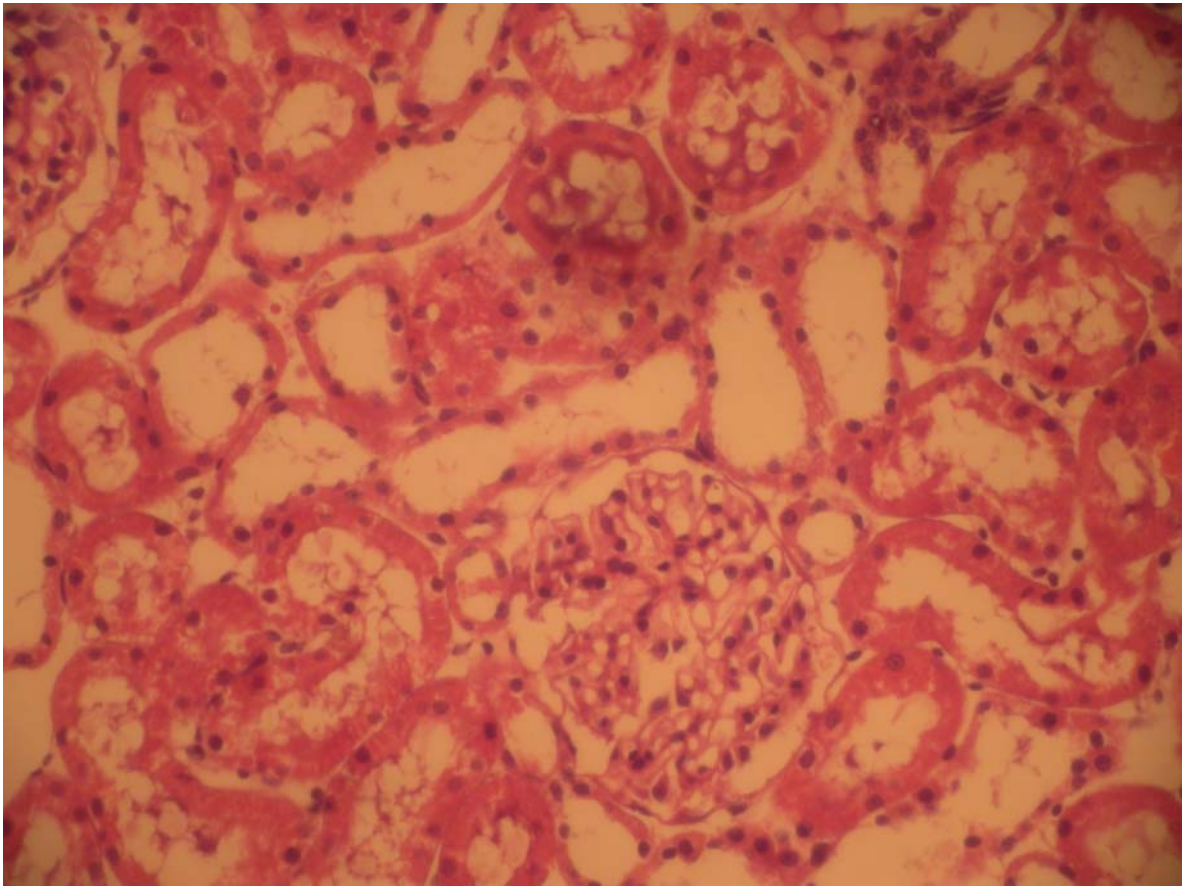


FIGURA 14- Rim tratado com 10 μ g/mL de veneno de *Bothrops erythromelas* apresentando túbulos com degeneração hidrópico vacuolar (200X).

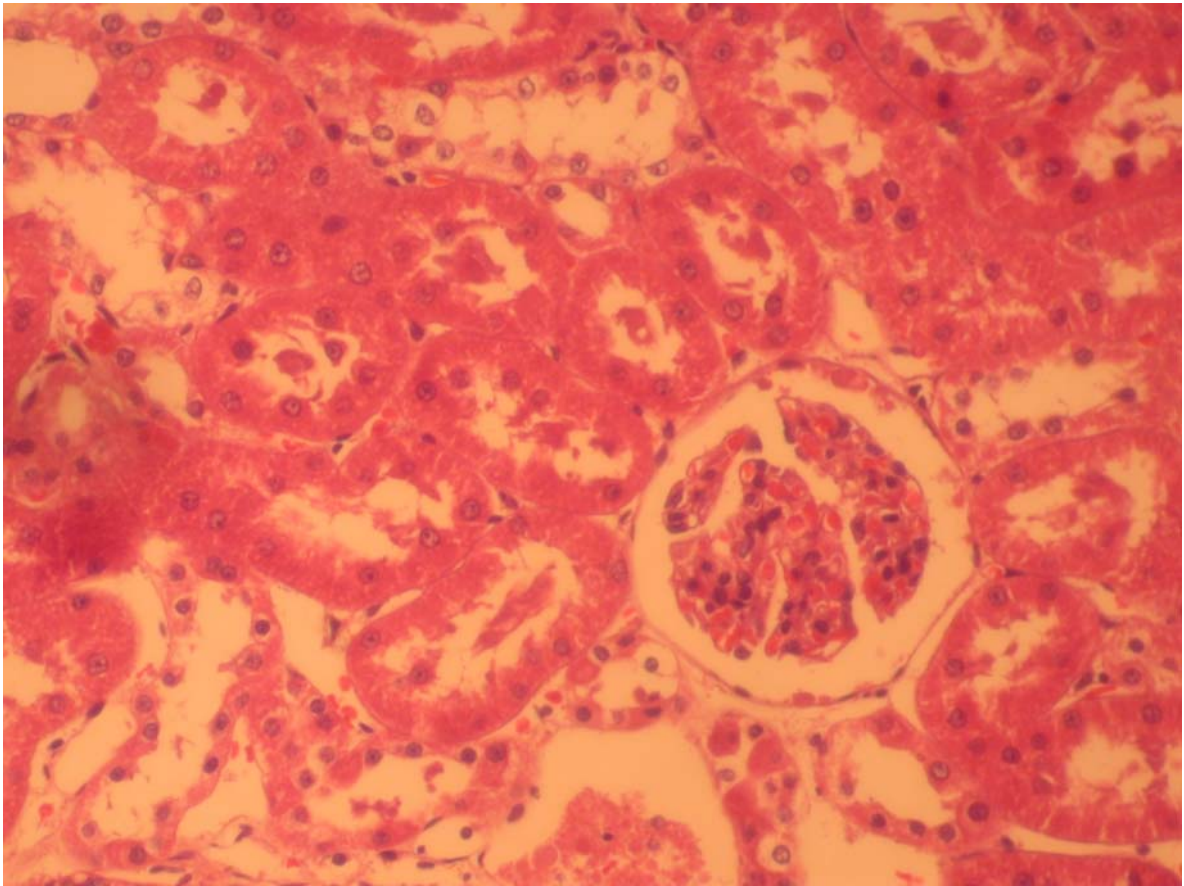


FIGURA 15- Rim tratado com 10 μ g/mL do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* apresentando glomérulos e túbulos normais (200X).

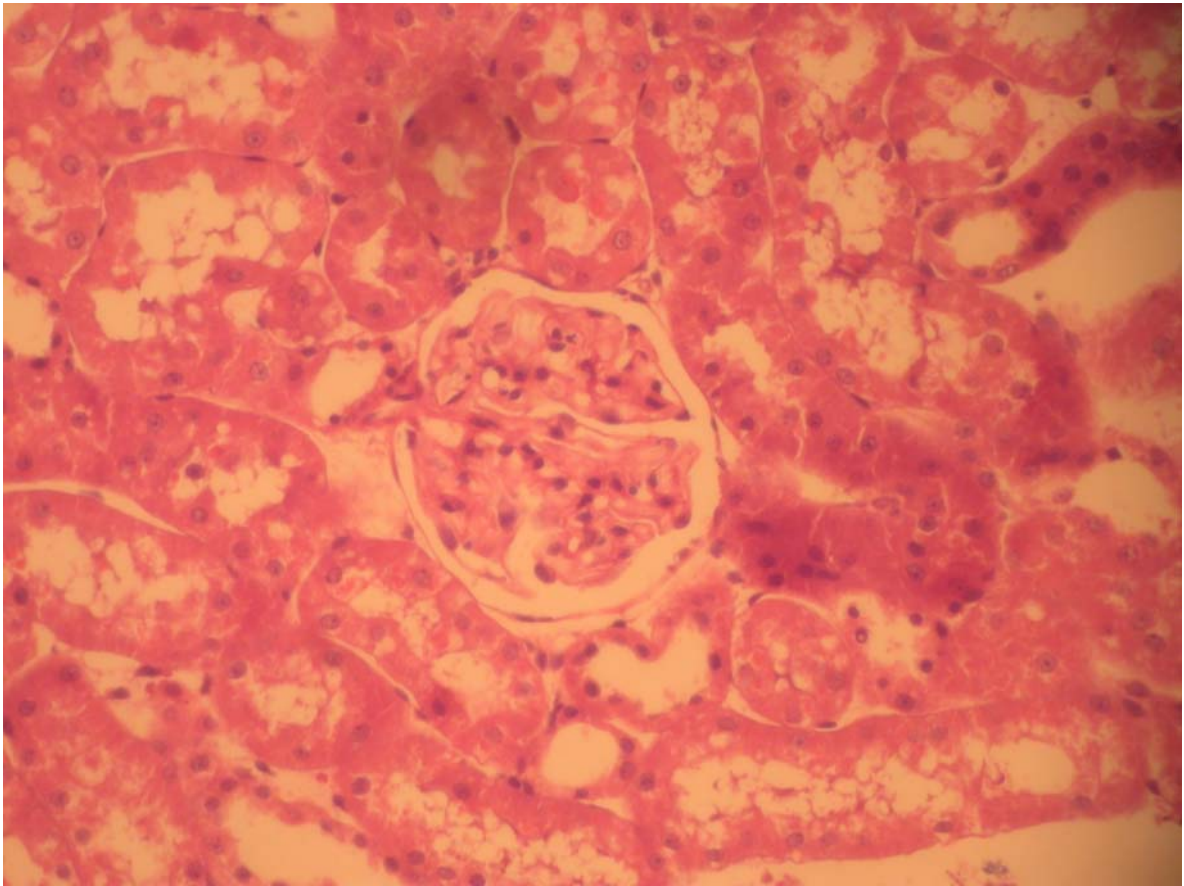


FIGURA 16- Rim tratado com 10 μ g/mL do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com 10 μ g/mL do veneno de *Bothrops erythromelas* apresentando glomérulos e túbulos normais (200X).

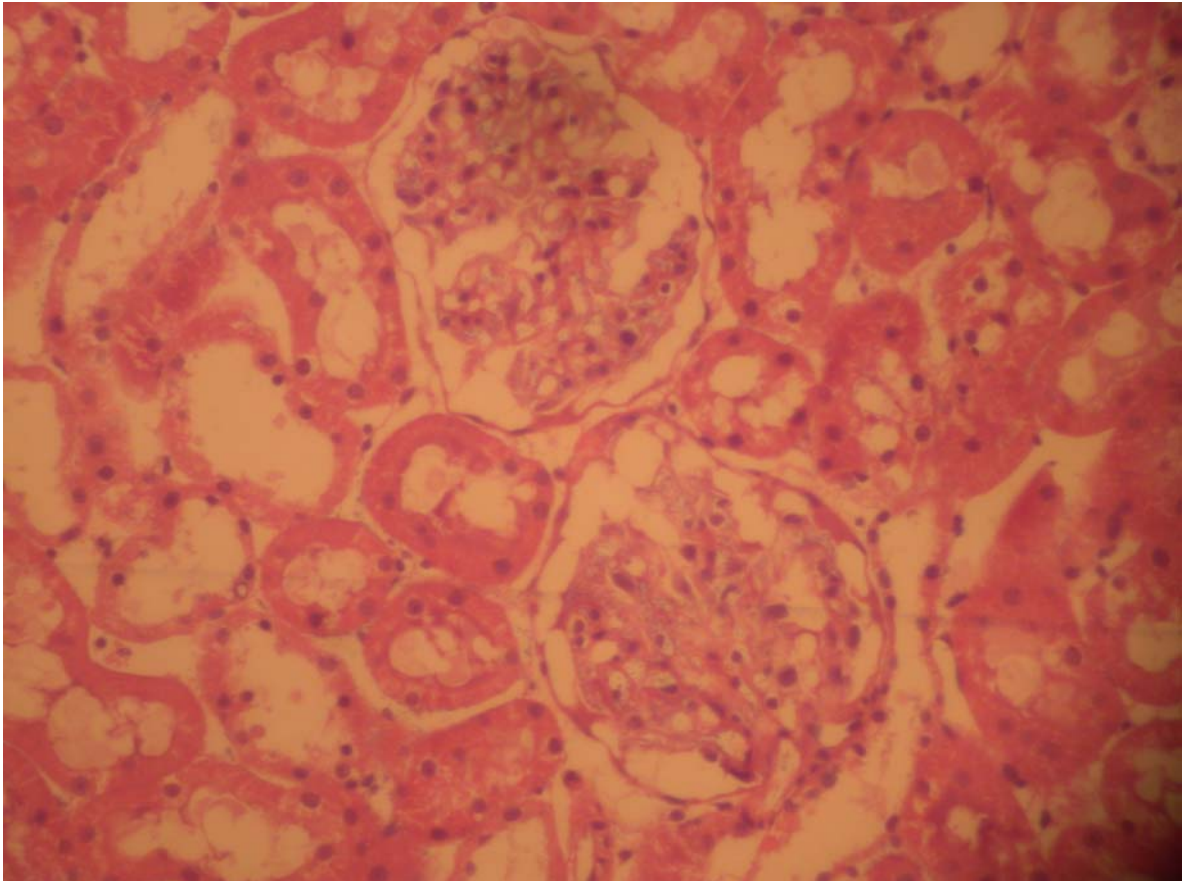


FIGURA 17 - Rim tratado com 30 μ g/mL do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* incubado com 10 μ g/mL do veneno de *Bothrops erythromelas* apresentando glomérulos e túbulos normais (200X).

5 DISCUSSÃO

Monteiro e Fonteles (1999), ao estudarem o veneno de *Bothrops jararaca* em rim isolado de rato, observaram uma diminuição no fluxo urinário, na pressão de perfusão, no ritmo de filtração glomerular e do transporte tubular de sódio e potássio. Havt et al. (2001), ao analisarem os efeitos renais do veneno da *Bothrops jararacussu* em rim isolado de rato, demonstraram queda da pressão de perfusão, resistência vascular renal e diminuição dos transportes iônicos tubulares de sódio e potássio, com um aumento do ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário. Barbosa et al. (2002), avaliando os efeitos renais do veneno da *Bothrops moojeni* no mesmo modelo, comprovaram que o veneno causava queda da pressão de perfusão, resistência vascular renal e do percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloro, com um aumento do fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e excreção de sódio, potássio e cloro. Havt et al. (2004), ao estudarem os efeitos renais do veneno da *Bothrops pirajai* em rim isolado de rato, observaram redução da pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e transporte tubular de sódio, potássio e cloro.

O veneno da *Bothrops erythromelas* causou alterações nos parâmetros renais em rim isolado de rato. Observou-se uma redução da pressão de perfusão, da resistência vascular renal e dos transportes iônicos tubulares de sódio, potássio e cloro. Ocorreu um aumento do fluxo urinário, do ritmo de filtração glomerular e da excreção dos íons sódio, potássio e cloro.

O rim é um dos órgãos mais afetados nos acidentes ofídicos. A falência renal aguda (ARF) constitui a mais séria complicação renal sistêmica e a principal causa de morte seguida em incidência pela necrose tubular aguda e, ocasionalmente, glomerulonefrite (AMARAL et al., 1985; BURDMANN et al., 1993).

A etiologia da insuficiência renal aguda (IRA) causada após envenenamento botrópico tem sido muito discutida. Alguns autores atribuem um papel crucial do veneno induzindo distúrbios hemodinâmicos e isquemia renal no processo de falência renal aguda (CHAVES et al., 1989; REZENDE et al., 1989; CRUZ HÖFLING et al., 2001). Outros autores propõem que componentes presentes no veneno possuem uma ação citotóxica direta no epitélio renal (RATCLIFFE et al., 1989; WILLINGER et al., 1995).

Apesar dos inúmeros achados concernentes a insuficiência renal sua patogênese ainda se encontra incerta. Os mecanismos propostos como possíveis causadores da insuficiência renal aguda após acidente botrópico são a coagulação intravascular disseminada, a nefrotoxicidade direta atribuída à ação proteolítica do veneno, espasmos dos vasos renais

decorrentes da liberação de substâncias vasoativas (AMARAL et al., 1986), vasoconstrição renal e conseqüente isquemia renal, hemólise, depósito de fibrina nos glomérulos e injúria vascular (CHAVES et al., 1989; REZENDE et al., 1989; BURDMANN et al., 1993; CRUZ HOFLING et al., 2001;).

Vasconcelos et al. (1998), ao estudarem o veneno da *Bothrops erythromelas* demonstraram que o veneno provocava falência renal aguda através de ação indireta e atribuíram o efeito a formação de microembolia na circulação.

Nossos experimentos são destituídos de sangue, portanto a ausência de fibrinogênio exclui a atividade coagulante em nossos resultados. As alterações dos parâmetros renais provocadas pelo veneno da *Bothrops erythromelas* demonstraram ação nefrotóxica direta.

Diversos autores trabalhando com diferentes venenos botrópicos demonstraram que o processo de insuficiência renal aguda (IRA) se deve à ação nefrotóxica direta do veneno. Rezende et al. (1989) e Burdmann et al. (1993), ao estudarem o veneno da *Bothrops jararaca* observaram diminuição da pressão sangüínea, redução marcante no ritmo de filtração glomerular, fluxo renal e diurese associada com aumento da resistência vascular renal e excreção de sódio. Monteiro e Fonteles (1999), demonstraram que o veneno da *Bothrops jararaca* causava nefrotoxicidade aguda direta e alterações dos parâmetros funcionais renais, comparável às observadas na falência aguda renal (ARF). Boer-Lima et al. (2002), citam que a inoculação intravenosa do veneno da *Bothrops moojeni* em camundongos causava nefrotoxicidade e que as lesões renais eram atribuídas à atividade proteolítica e da fosfolipase A2 responsáveis por severos distúrbios morfológicos nos glomérulos renais e pela disfunção tubular. Collares-Buzato et al. (2002), demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* induz falência renal aguda resultante de um efeito citotóxico direto no epitélio tubular renal com conseqüentes alterações morfológicas e funcionais em células glomerulares e tubulares. Castro et al. (2004), ao estudarem o veneno da *Bothrops jararaca* demonstraram que o veneno causava injúria diretamente nos túbulos renais e que a toxicidade tubular era independente de cálcio extracelular e mediada em parte por peroxidação lipídica.

Guimarães et al. (1986) demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal através da ativação do receptor B2 em rim isolado de rato. Bradicinina (BK) é um potente peptídeo vasoativo gerado tanto no plasma como na parede vascular. Bradicinina pode ativar receptores do tipo B2 estimulando a liberação de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular (BAYDOUN et al., 1991). A vasodilatação induzida por bradicinina tem sido atribuída a fatores de relaxamento derivados do endotélio, como o óxido

nítrico (NO) (WELCH et al., 1991) e fator hiperpolarizante (NAKASHIMA et al., 1993). Metabólicos do ácido araquidônico derivados do citocromo P-450 aumentam a condutância ao K⁺ sendo responsável pelo efeito hipotensivo da bradicinina descritos por Gebremedhin et al. (1992) e Hu et al. (1993).

Potenciadores de bradicinina foram isolados dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* (FERREIRA et al., 1970, 1992, 1998). Isto nos leva a pensar que peptídios potenciadores de bradicinina ou a própria bradicinina possam estar presentes no veneno da *Bothrops erythromelas* e serem os responsáveis pela queda da pressão de perfusão e da resistência vascular renal presente em nossos experimentos.

Furtado et al. (1991) e Sanchez et al. (1992), ao estudarem o veneno da *Bothrops erythromelas* demonstraram a existência de atividade proteolítica no veneno. Enzimas proteolíticas são responsáveis pela liberação de substâncias vasoativas como a bradicinina, serotonina e histamina que atuam no efeito hipotensor.

Flores et al. (1993), ao estudarem o veneno da *Bothrops erythromelas* comprovou que este induzia migração neutrofílica dose-dependente quando injetado na cavidade peritoneal de ratos e que esta resposta migratória se devia à atividade da fosfolipase A2 presente no veneno o qual induzia a liberação de metabólicos do ácido araquidônico como mediadores quimiotáticos, como o leucotrieno B₄, e era dependente do número de macrófagos residentes. A atividade fosfolipásica A2 é responsável pelo edema e pela inflamação causados pelo veneno.

A atividade fosfolipásica pode produzir prostaglandinas vasodilatadoras renais, PGE₁, PGE₂, PGA₁, PGA₂, PGH₂, PGI₂, PGG₂, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese (BYDLOWSKI, 2000).

Nossos resultados sugerem que a atividade proteolítica e fosfolipásica encontradas no veneno da *Bothrops erythromelas* podem ser responsáveis pela queda da pressão de perfusão e da resistência vascular renal e pelos efeitos deletérios encontrados no epitélio renal com aumento da diurese e diminuição dos transportes dos íons sódio, potássio e cloreto.

O aumento do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário presentes nos experimentos podem ser causados pelas alterações tanto glomerulares como tubulares observadas no exame histológico.

A presença de material protéico nos glomérulos denotaria que uma maior quantidade de proteínas está sendo filtrada, diminuindo a pressão oncótica dos capilares glomerulares. A pressão oncótica dos capilares glomerulares apresenta uma correlação inversa com o ritmo de filtração glomerular (KOEPPEN; STANTON, 1997). Isto poderia explicar o

aumento do ritmo de filtração glomerular com conseqüente aumento no fluxo urinário. Outra hipótese afirmada pelos mesmos autores para explicar o aumento do ritmo de filtração glomerular seria que a bradicinina estimularia a liberação de óxido nítrico que levaria ao relaxamento vascular do endotélio renal.

Pompermayer et al. (2002), demonstraram que a bradicinina induzia vasodilatação envolvendo a liberação de óxido nítrico (NO), e metabólicos do ácido araquidônico via citocromo P-450 os quais ativavam canais de potássio cálcio-dependente causando uma diminuição dose-dependente da pressão de perfusão e da resistência vascular renal em rim isolado de rato.

A degeneração hidrópico vacuolar presente nos túbulos renais enfatiza a injúria renal causada pelo veneno já que a retenção de íons é a causa dessa degeneração. A degeneração diminui a reabsorção tubular promovendo uma maior retenção de solutos nos túbulos renais promovendo maior volume urinário com maior concentração de solutos na urina. Isto explicaria o aumento da excreção e redução do transporte dos íons sódio, potássio e cloro assim como o aumento do clearance osmótico.

A atividade proteolítica (FURTADO et al., 1991; SANCHEZ et al., 1992) e da fosfolipase A2 (FLORES et al., 1993) presentes no veneno da *Bothrops erythromelas* podem ser apontadas como as responsáveis pelos distúrbios morfológicos encontrados nos glomérulos e túbulos renais. A análise microscópica das lâminas com o tecido renal após perfusão renal mostrou a presença de material protéico, embora em quantidade discreta, nos glomérulos e túbulos e a degeneração hidrópico vacuolar presente nos túbulos levando à injúria renal sugerem que a falência renal aguda se deve ao processo de citotoxicidade direta no modelo de rim isolado de rato.

A habilidade de alguns animais de apresentar imunidade natural contra os efeitos deletérios produzidos pelos diversos venenos de serpentes tem sido extensamente descrita. Esta resistência pode ser explicada pela presença de inibidores de proteínas solúveis em seus soros os quais neutralizam os efeitos tóxicos dos venenos de serpentes. A resistência do *Didelphis marsupialis*, um gambá comumente encontrado na América do Sul, tem sido extensamente estudada (PERALES; DUMONT, 2002).

O fator antibotrópico (ABF) foi isolado do *Didelphis marsupialis* e apontado como sendo o responsável pela resistência aos venenos crotálicos, especialmente do gênero *Bothrops*. O ABF é composto por duas subunidades de glicoproteínas ácidas de 42,6 e 48,5 kDa, associadas por ligações não covalentes (PERALES et al., 1994) as quais parecem

interagir com as toxinas hemorrágicas dos venenos, levando à formação de complexos circulantes inativos (NEVES- FERREIRA et al., 1997).

O ABF foi responsável pela resistência do *Didelphis marsupialis* aos venenos de diversas serpentes da família Crotalidae, como a *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus adamanteus*. (MOUSSATCHÉ et al., 1979, 1981; MOUSSATCHÉ; LEONARDI, 1982; DOMONT et al., 1991). A resistência do gambá aos venenos de serpentes parece ser uma propriedade imune natural não sendo preciso um contato prévio com as serpentes para adquirir este tipo de imunidade natural (PERALES et al., 1986).

A capacidade do fator antibotrópico isolado do soro do gambá *Didelphis marsupialis* (ABF-Dm) em inibir os efeitos letais, hemorrágico, mionecrótico, hiperalgésico e edematogênico de venenos botrópicos tem sido extensamente descritos (MOUSSATCHÉ; PERALES, 1989; PERALES et al., 1992; NEVES- FERREIRA et al., 2000; ROCHA et al., 2000). O ABF-Dm pode inibir a atividade proteolítica desses venenos em diversos substratos como fibrinogênio, fibrina, colágeno IV, laminina e fibronectina (NEVES-FERREIRA et al., 1997).

O fator antibotrópico incubado com o veneno causou bloqueio dose-dependente de todos os efeitos causados pelo veneno da *Bothrops erythromelas*, exceto o parâmetro pressão de perfusão.

A análise microscópica das lâminas com o tecido renal perfundido com o fator antibotrópico incubado com o veneno mostraram glomérulos e túbulos renais normais comprovando que o fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* é realmente eficaz no bloqueio do veneno da *Bothrops erythromelas* no modelo estudado.

6 CONCLUSÕES

➤ O veneno da *Bothrops erythromelas* causou efeito nefrotóxico no modelo de rim isolado de rato. Evidenciamos este efeito nefrotóxico com a redução na pressão de perfusão, na resistência vascular e no transporte tubular de sódio, potássio e cloro. Ocorreu aumento no fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, excreção de sódio, potássio e cloro e clearance osmótico.

➤ O fator antibotrópico causou bloqueio dose-dependente de todos os efeitos causados pelo veneno da *Bothrops erythromelas*, exceto o parâmetro pressão de perfusão. Essa inibição pode ser atribuída à formação de um complexo inativo solúvel entre o fator antibotrópico e o veneno.

➤ A análise histopatológica do tecido renal após perfusão com o veneno de *Bothrops erythromelas* mostrou a presença de material protéico nos glomérulos e túbulos e a presença de degeneração hidrópica vacuolar nos túbulos comprovando que a nefrotoxicidade causada pelo veneno ocorre de forma direta. A análise microscópica dos rins perfundidos com o veneno da *Bothrops erythromelas* juntamente com o fator antibotrópico mostrou glomérulos e túbulos renais normais comprovando que o fator antibotrópico bloqueou os efeitos causados pelo veneno da *Bothrops erythromelas*.

➤ Estudos posteriores poderão avaliar a perspectiva da utilização do fator antibotrópico de *Didelphis marsupialis* no tratamento de envenenamentos ofídicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIMAIS peçonhentos: serpentes Bothrops. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/Animaispeconhentos/serpbothrops.html>>. Acesso em: 24 set. 2003.

AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following Bothrops jararaca and Bothrops jararacussu snake bite. *Toxicon*, v.23, n.6, p.877-885, 1985.

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

AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. *Amer. J. Path.*, v.30, p.479-499, 1954.

AMORIM, M. F.; MELLO, R. F.; SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan*, v.34, p.137-157, 1969.

ARAÚJO FILHO, R. M. Efeitos comparativos do Glutation (GSH) em dois modelos de solução preservadora no rim perfundido do coelho. 1995. 141 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. *Toxicon*, v.16, p.71-75, 1978.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; AMARAL, C. F. S.; HERING, S. E Rattlesnake bites clinical features and complementary tests. *Mem. Inst. Butantan.*, v.52, supl., p.27-29, 1990.

BAHLMAN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v.212, p.77-82, 1967.

BARBOSA, P. S. F.; HAVT, A.; FACÓ, P. E. G.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S. A. M.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal toxicity of Bothrops moojeni snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, v. 40, p.1427-1435, 2002.

BARRAVIERA, B. Curso sobre acidentes por animais peçonhentos: acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.*, v. 64, n. 4, p.14-20, 1990.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. *Arq. Bras. Med.*, v. 65, n. 4, p.345-355, 1991.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. *JBM*, v. 65, n. 4, p.209-250, 1993.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes dos gênero "Bothrops". In: BARRAVIERA, B. (Coord.). *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.19, p.261.

BARRAVIERA, B.; LAMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MEIRA, D. Acute phase reactions including cytokins in patients bitten by *Bothrops* spp. and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom Anim. Toxins*, v. 1, p. 11-22, 1995.

BAYDOUN, A. R.; WOODWARD, B. Effects of bradykinin in the rat isolated perfused heart: role of kinin receptors and endothelium-derived relaxing factors. *Br. J. Pharmacol.*, n. 103, p.1829-1833, 1991.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, v. 12, n. 12, p.82-95, 1984.

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

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, p. 735-746, 2002.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; da CRUZ-HOFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by Bothrops moojeni snake venom in rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n. 5, p.698-706, 1999.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; da CRUZ-HOFLING, M. A. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 67, n. 2, p. 217-222, 2002.

BON, C. Snake venom & pharmacopeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.). *Snakes a natural history*. New York: Sterling Publishing Co., 1997. p.194-209.

BON, C. Venom Phospholipase A2. In: KINI, R. M. (Ed.). *Enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: Wiley, 1997. p. 269-285.

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.

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

BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B.; BARRETO, O. C.; MARCONDES, M.. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48, n. 1, p. 82-88, 1993.

BYDLOWSKI, S. P. Bioquímica e fisiologia dos Eicosanóides. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). *Patofisiologia geral, mecanismos das doenças*. São Paulo: Robe Editorial, 2000. p.528-529.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. *The venomous reptiles of latin america*. Ithaca: Cornell Univ.,1989.

CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. Bothrops venom induces direct renal injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon*, v. 43, p. 833-839, 2004.

CATANNESE, J. J.; KRESS, L. F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1 β -glycoprotein. *Biochemistry*, v. 31, p. 410-418, 1992.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA/CE). Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos ocorridos nos últimos cinco anos no estado do Ceará. Fortaleza, 2003.

CERDAS, L.; LOMONTE, B. Estudio de la capacidad ofiófaga y la resistencia de la zopilota (*Clelia clelia* Colubridae) de Costa Rica a los venenos de serpientes. *Toxicon*, n. 20, p. 936-939, 1982.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, n. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, n. 40, p. 1047-1051, 2002.

CHAVES, F.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mouse. *Toxicon*, n. 27, p. 1085-1093, 1989.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Org.*, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CHUGH, K. S.; AIKAT, B. K.; SHARMA, B. K.; DASH, S. C.; THOMAS MATHEW, M.; DAS, K. C. Acute renal failure following snake bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 24, n. 4, p. 692-697, 1975.

CLARKSON, A. R.; MACDONALD, M. K.; FUSTER, V.; CASH, J. D.; ROBSON, J. S. Glomerular coagulation in acute ischaemic renal failure. *Quart. J. Med.*, v. 39, p. 585-599, 1970.

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 SUER, L., da 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.

CRUZ-HÖFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by Bothrops insularis (jararaca ilhã) venom and a phospholipase-A2 containing fraction. *Histol. Histopathol.*, v. 16, p. 185-195, 2001.

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

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

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 82, p. 924-929, 1988.

DATE, A.; SHASTRY, J. C. M. Renal ultrastructure in cortical necrosis following Russell's viper envenomation. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 84, p. 3-9, 1981.

DE MELLO, G.; MAACK, T. Nephron function of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 231, n. 6, p. 699-707, 1976.

DE WITT, C. A.; WESTRÖM, B. R. Venom resistance in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. *Toxicon*, v. 25, p. 315-323, 1987.

DÍAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A. J.; GUTIÉRREZ, J. M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A2: Role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391, n. 1, p. 56-64, July 2001.

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H. Partial purification and physico-chemical characterization of a proteic complex from *Philander opossum* with protective action against *Bothrops jararaca* venom. In: BRAZILIAN-SINO SYMPOSIUM ON CHEMISTRY AND PHARMACOLOGY OF NATURAL PRODUCTS, 1989, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro: [s.n.], 1989. p.10-14

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*, v. 29, p. 1183-1194, 1991.

DOUGLAS, C. R. Patofisiologia do processo inflamatório. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). Patofisiologia geral, mecanismo das doenças. São Paulo: Robe editorial, 2000.

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

DRAY, A. The Pharmacology of pain. Berlin: Springer, 1997. (Handbook of Experimental Pharmacology, v.130).

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

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.*, v. 17, p. 285-289, 1998.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (Peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). *Toxicon*, v. 30, n. 1, p. 33-40, 1992.

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

FLETCHER, J. E.; ARAUJO, H. S. S.; OWNBY, C. L. Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: KINI, R. M. (Ed.). *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. p. 455-497.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCHESCHI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon*, v. 31, n. 12, p. 1551-1559, 1993.

FOHLMAN, J.; EAKER, D. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A from the venom of the common sea snake *Enhydrina schistosa* causing myoglobinuria in mice. *Toxicon*, v. 15, p. 387-397, 1977.

FONTANA, F. *Traité sur le venim de la vipère*. In: _____. *Animaux venimeux et venins*. Paris: Mason & Cie Editeurs, 1781. p.744-759.

FONTELES, M. V. C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim solado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. 1980. 121 f. Tese (Pós-Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, v. 90, p. 159-161, 1982.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J.; WERTHEIM, S. J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.*, v. 244, p. 235-246, 1983.

FORTES-DIAS, C. L.; DINIZ, C. R.; KOCHVA, E. Neutralization by homologous plasma of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and crotoxin. *Cienc. Cult.*, v. 42, p. 501-506, 1990.

FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. cap.13, p.149-160.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. *Biochem. Pharmac.*, v. 20, p. 1549-1556, 1971.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.

GAMBÁ. Disponível em: <<http://www.dhnet.org.br/w3/ecovila/ecovila/fef/fauna/timbu.html>>. Acesso em: 15 out.2003.

GARCIA, V. E.; PEREZ, J. C. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in woodrat (*Neotoma micropus*) serum. *Toxicon*, v. 22, p. 129-138, 1984.

GEBREMEDHIN, D.; MA, H. Y.; FALCK, J. R.; ROMAN, R. J.; VANROL-LINS, M.; HARDER, D. R. Mechanisms of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids in cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, n. 263, p.19-25, 1992.

GOULART, C.E.S. Ofidismo. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/artig146.htm>>. Acesso em: 20 ago.2002.

GOVERS-RIEMSLAG, J. W.; KNAPEN, M. J.; TANS, G.; ZWAAL, R. F.; ROSING, J..Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 916, p. 388-401, 1987.

GUIMARÃES, J. A.; VIEIRA, M. A. R.; CAMARGO, M. J. F.; MAACK, T. Renal vasoconstrictive effect of kinins mediated by B1-kinin receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, n. 130, p. 177-185, 1986.

GUIMARÃES, J. A.; AMARAL, D. A.; MANUEL NETO, D.F.; LIMA-VERDE, J. S.; ROUQUAYROL, M. Z.; VIANA, G. A.; ALBUQUERQUE, M. S. B. *Intoxicações agudas: guia prático para tratamento*. Fortaleza: CEATOX, 2002.

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation and partial characterization of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*, v. 22, p. 115-123, 1984.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, S.; GENE, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon*, v. 27, p. 735-745, 1989.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan*, v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms, In: KINI, R. M. (Ed.). *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: Wiley, 1997. p. 321-352.

HADLER, W. A.; VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin IV. Nephrotoxicity. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, p. 1001-1008, 1966.

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

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

HAVT, A. Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos. 1999. 161f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA2 and PAF blockers. *Toxicon*, v. 39, p. 1841-1846, 2001.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. A novel C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, v. 37, n. 1, p. 130-141, 2004.

HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*, v. 4, p. 293-306, 1979.

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. Identification, purification and properties of α prothrombin activator. *Biochemistry*, n. 26, p. 772-780, 1987.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. *Toxicon*, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

HU, S.; KIM, H. S. Activation of K⁺ channels in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharmacol.*, n. 230, p. 215-221, 1993.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. (Ed.). Snake venoms. New York: Springer Verlag, 1979. p.61-158.

JOBIN, F.; ESNOUF, M. P. Coagulant activity of tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) venom. *Nature (London)*, v. 211, p. 873-875, 1966.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Brasil.*, v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.

JURGILAS, P. B.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ, H.; PERALES, J. Detection of an antithrombotic fraction in opossum (*Didelphis marsupialis*) milk that neutralizes *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 37, p. 167-172, 1999.

JURGILAS, P. B.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; DOMONT, G. B.; PERALES, J. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from *Philander opossum* serum. *Toxicon*, v. 42, p. 621-628, 2003.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L.; MARUYAMA, M.; SANO-MARTINS, I. S.; MORENA, P.; CHUDZINSKI, A. M.; TOMY, S. C.; ANTÔNIO, L. S.; SANTOS, M. L.; KELEN, E. M. A. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* snake In: ENCONTRO BRASILEIRO DA HEMOSTASIA E TROMBOSE, 5.; JORNADA BRASILEIRA DE HEMOFILIA, 7., 1988, Florianópolis. *Anais...Florianópolis: [s.n.]*, 1988. p.14.

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C.Y. (Ed.). Snake venoms. New York: Springer Verlag, 1979. cap 5, p. 159-212.

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure- Function relationship of phospholipase II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipase. *Toxicon*, v. 24, n. 9, p. 295-905, 1986.

- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.
- KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins snake venom. *Thromb.Haemostasis*, v. 31, p. 218-224, 2001.
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Glomerular filtration and renal blood flow. In: _____. *Renal physiology*. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1997.cap.3, p.31-51.
- KORNALIK, F.; BLOMBACK, B. Prothrombin activation induced by Ecarin – a Prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thromb. Res. Suppl*, v. 6, p. 57-63, 1975.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; KOUYOUMDJIAN, N. C. V. Acidentes ofídicos “estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto”. *A Revista do Clínico Geral*, p.55-93, set. 1986.
- LANDUCCI, E. C. T.; FARAH, M. F. L.; GIGLIO, J. R.; DOMONT, G. B.; MARANGONI, S. Protecting property of *Didelphis albiventris* serum against *Bothrops jararaca* snake venom. *Mem. Inst. Butantan*, v. 52, Suppl., p. 76, 1990.
- LIMA, A. Ilha de São Paulo tem nova espécie de cobra. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 4 mar. 2001. *Ciência Zoológica*, p.19.
- LITTLE, J. R.; COHEN, J. J. Effect of albumin concentration of functional isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 226, n. 3, p. 512-517, 1974.
- LOMONTE, B. ÂNGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J. M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon*, v.37, n. 1, p.145-158, Jan. 1999.
- LOPEZ, M.; FOSCARINI, L. G.; ALVARES, J. M.; DINIZ FILHO, I.; MARRA, U. D.; PROCÓPIO, N. P. M. M. Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. *Rev. Ass. Med. Minas Gerais*, v. 23, p.107-112, 1972.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. S. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and hemostatic system. *Toxicon*, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARSHALL, R. L.; HERMANN, R. P. Coagulant and anticoagulant actions of Australian snake venoms. *Tromb. Haesmostasis*, v. 50, p. 707-711, 1983.

MARTINEZ-MALDONATO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W.N.; EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: alterations in water and eletrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 80, n. 3, p. 445-461, 1978.

MARTINS, A. M.C.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*, v. 40, p. 1165-1171, 2002.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; TOMY, S. C.; ANTONIO, L. C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 86, n. 5, p. 549-556, 1992.

MASCI, P. P.; WHITAKER, A. N.; JERSEY, J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textiles textiles*. *Biochem. Int.*, v. 17, p. 825-835, 1988.

MENCHACA, J. M.; PEREZ, J. C. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (*Didelphis virginiana*) serum. *Toxicon*, v. 19, p. 623-632, 1981.

MIRANDA, M. E.; COUTURIER, G. A.; CANZIANI, A.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Resistencia de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops neuwiedii* a la neurotoxicidad de cantidades masivas de veneno crotálico. *Acta. Physiol. Latinoamericana*, v. 32, p. 103-115, 1982.

MONTEIRO, H. S. A. Efeitos nefrotóxicos do veneno *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato: estudo de antagonistas de PAF e da indometacina. 1990. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1990.

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. *Pharmacol. & Toxicol.*, v. 85, p. 198-200, 1999.

MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

MOREIRA LIMA, A. A. Estudos dos efeitos das toxinas do *V. cholerae* e *E. coli* no rim isolado de rato. 1983. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1983.

MOUSSATCHÉ, H.; YATES, A.; LEONARDI, F.; BORCHE, L. Mechanisms of resistance of the opossum to some snake venoms. *Toxicon*, v. 17, p. 130, 1979.

MOUSSATCHÉ, H.; LEONARDI, F.; MANDELBAUM, F. Inhibición por una proteína aislada del suero de *Didelphis marsupialis* a la acción hemorrágica producida por una fracción del veneno de *Bothrops jararaca*. *Acta. Cient. Venezolana*, v. 32, Suppl.1, 1981.

MOUSSATCHÉ, H.; LEONARDI, F. Estudios de protección con sueros de mamíferos y reptiles a los venenos de serpientes *Croalidae*. *Acta. Cient. Venezolana*, v. 33, p. 151, 1982.

MOUSSATCHÉ, H.; PERALES, J. Factors underlying the natural resistance of animals against snake venoms. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 391-394, 1989.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X- activador components of Bothrops snake venom. *Thrombos. Haemostas.*, v. 41, p. 314-328, 1979.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 135, p. 145-153, 1987.

NAKASHIMA, M.; MOMBOULI, J. V.; TAYLOR, A. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J. Clin. Invest.*, n. 92, p. 2867-2871, 1993.

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; CARDINALE, N.; ROCHA, S. L. G.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1474, n. 3, p. 309-320, 2000.

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; FOX, J. W.; SHANNON, J. D.; MAKINO, D. L.; GARRAT, R. C.; DOMONT, G. B. Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 13129-13137, 2002.

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; OVADIA, M.; MOUSSATCHÉ, H.; DOMONT, G. B. Inhibitory properties of the antithroptic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon*, v. 35, n. 6, p. 849-863, 1997.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. *Thromb. Res.*, v.10, p. 863-875, 1977.

NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. I.; VIDAL, J. C. Contribution of phospholipase A2 to lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. *Toxicon*, v. 24, p. 807-815, 1986.

NISHITSUTJI-UWO, G. M.; ROSS, B. D.; KREBS, H. A. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.*, v. 103, p. 852-862, 1967.

OFIDISMO. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/saudeambiental/Animais/index.html>>. Acesso em: 21 ago.2002.

OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. Snake venoms. Berlin: Springer, 1979. cap.14, p.480-546.

OMORI-SATOH, T. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 495, p. 93-98, 1977.

OVADIA, M. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Vipera palaestinae*. *Toxicon*, v. 16, p. 661-672, 1978.

OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. *Toxicon*, v. 15, p. 541-547, 1977.

OVADIA, M.; KOCHVA, E.; MOAV, B. The neutralization mechanism of *Vipera palaestinae* neurotoxin by a purified factor from homologous serum. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 491, p. 370-386, 1977.

OVADIA, M.; MOAV, B.; KOCHVA, E. Factors in the blood serum of *Vipera palaestinae* neutralizing fractions of its own venom. *Toxicon*, n. 13, p. 113, 1975.

OWEN, W.G.; JAKSON, .M. Ativation of prothrombin with *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake) venom. *Tromb.Res.*, v. 3, p. 705-714, 1973.

OWNBY, C. L.; BJARNASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Amer. J. Pathol.*, v. 93, p. 201-218, 1978.

PERALES, J.; AMORIM, C.; ROCHA, S. L.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agents Actions*, v. 37, n. 4, p. 250-259, 1992.

PERALES, J.; DOMONT, G. B. Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A2 and myotoxins members of the innate immune system?. In: MÉNEZ, A. (Ed.). Perspectives in molecular toxinology . Chichester: John Wiley & Sons, 2002. p.435-456.

PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; DOMONT, G. B. Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. *Toxicon*, v. 32, n.10, p.1237-1249, 1994.

PERALES, J.; MUÑOZ, R.; GRATEROL, S.; OVIEDO, O.; MOUSSATCHÉ, H. New findings on the purification and characterization of an anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (opossum) serum. *Bra. J. Med. biol. res.*, v. 22, p. 25-28, 1989.

PERALES, J.; MUÑOZ, R.; MOUSSATCHÉ, H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting property against the *Bothrops jararaca* snake venom. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 58, p. 155-162, 1986.

PEREZ, J. C.; HAWS, W. C.; GARCIA, V. E.; JENNINGS, B.M. Resistance of warm-blooded animals to snake venoms. *Toxicon*, v. 16, p. 375-383, 1978.

PEREZ, J. C.; HAWS, W. C.; HATCH, H. Resistance of woodrats (*Neotoma micropus*) to *Crotalus atrox* venom. *Toxicon*, v. 16, p.198-200, 1978.

PHILPOT, V. B.; SMITH, R. G. Neutralization of pit viper venom by KING snake serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 75, p. 521-523, 1950.

PICHYANGKUL, S.; PEREZ, J. C. Purification and characterization of a naturally occurring anti-hemorrhagic factor in the serum of the hispid cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Toxicon*, v. 19, p. 205-215, 1981.

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

PIROTZKY, E.; BIDALT, J.; BURTIN, C.; GLUBERY, M. C.; BENVENISTE, J. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, vasoactive amines from isolated rat kidney. *Kidney Int.*, v. 25, p. 404-410, 1984.

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

POMPERMAYER, K.; ASSREUY, J.; VIEIRA, M. A. R. Involvement of nitric oxide and potassium channels in the bradykinin-induced vasodilatation in the rat kidney perfused *ex situ*. *Regulatory Peptides*, v. 105, p. 155-162, 2002.

PUORTO, G. Acidentes por Cobras In: SCHVARTSMAN, S. (Coord.) Plantas venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: Sarvier, 1992. cap.13, p.143-149.

RAAB, W.; KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venoms. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, n. 3, p.1017-1020, 1966.

RATCLIFFE, P. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LEDINGHAM, J. G. G.; WARREL, D. A. Direct nephrotoxicity of Russell's viper venom demonstrated in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 40, p. 312-319, 1989.

RAW, J.; ROCHA, M. C.; STEVE, M. J.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 19, p. 333-338, 1986.

REICHL, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R. Isolation and properties of a phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *Mem. Inst. Butantan*, v. 51, p. 225-237, 1989.

REID, H. A. Cobra-bites. *Brit. Med. J.*, v. 2, p. 540-561, 1964.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; BAMBIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by Bothrops jararaca venom. *Braz. J. Biol. Res.*, v. 22, p. 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpente venenosa: danos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 21 supl, p.121-122, 1988.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSON, L. B. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas: estudos de casos atendidos em 1988. *Rev. Saúde Pública*. v. 29, n. 5, p. 380-388, 1995.

ROCHA, S. L. G.; FRUTUOSO, V. S.; DOMONT, G. B.; MARTINS, M. A.; MOUSSATCHÉ, H.; PERALES, J. Inhibition of the hyperalgesic activity of Bothrops jararaca venom by an antithrotoppic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon*, v. 38, n. 6, p. 875-880, 2000.

ROCHA, S. L. G.; LOMONTE, B.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; TRUGILHO, M. R. O., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; DOMONT, G. B.; GUTIÉRREZ, J. M. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur. J. Biochem.*, v. 269, p. 6052-6062, 2002.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano In: SOERENSEN, B. Animais peçonhentos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. cap.1, p.1.

ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETIAN, J. C. H.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J. C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of Bothrops venom. *Toxicon*, v. 38, n. 6, p. 865-873, 2000.

ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. classification in different types and activities. *Mem. Inst. Butantan.*, v. 30, p. 117-132, 1960/62.

ROSING, J.; TANS, G. Inventory of exogenous prothrombin activators (for the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis). *Thromb. Haemostasis*, v. 65, p. 627-630, 1991.

ROSING, J.; TANS, G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators *Toxicon*, v. 30, p. 1515-1527, 1992.

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

ROSS, B. D.; EPSTEIN, F. H.; LEAF, A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 225, n. 5, p. 1165-1171, 1973.

RUIZ DE TORRENT, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK, S.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. *APPTLA*, v. 49, p. 177-183, 1999.

RUSSELL, F. E. Snake venom poisoning. New York: Schdium International Great, 1983.

RUSSELL, F. E.; DART, R. C. Toxic effects of animal toxins. In: AMDUR, M. O., DOULL, J., KLAASSEN, C. D. (Ed.). *Toxicology: the basic science of poisons*. 4th ed. New York: Mcgraw Hill, 1991. p.753-803.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SANT, S. M.; PUNDARE, N. M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to renal lesions. *J. Postgrad. Med.*, v. 18, p. 181-188, 1972.

SCHUREK, H. J; LOHFERT, H.; HIERHOLZER, K. Na⁺ reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na⁺-load). *Pflugers Arch. Ges. Physiol.*, v. 319, p.1285, 1970.

SCHUREK, H. J. Albumin filtration and effective pressure in nephrons in the isolated perfused rat kidney In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NEFROLOGY, 7., 1978, Montreal. Proceedings... Montreal, 1978.

SCHUREK, H. J. Application of the isolated perfused rat kidney. *Contr. Nephrol.*, v. 19, p.176-190, 1980.

SEEDAT, Y. K.; REDDY, J.; EDINGTON, D. A. Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. *Nephron*, v. 13, p. 455-463, 1974.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinase from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP2. *Toxicon*, v. 31, n. 4, p. 483-492, 1993.

SHASTRY, J. C. M.; DATE, A.; CARMAN, R. H.; JOHNY, K. V. Renal failure following snake bite: a clinico pathological study of nineteen patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 26, n. 5, p. 1032-1038, 1977.

SILVA, O. A.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 28, n. 2, p. 401-407, 1979.

SILVA, M. B.; SCHATNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A.; POZNER, R. G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.*, v. 369, p. 129-139, 2003.

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. In: LEE, C.Y. (Ed.). *Snake venoms*. New York: Springer-Verlag, 1979. cap.28, p.997-1018.

SITPRIJA, V.; SRIBHIBHADH, R.; BENYAJATI, C. Hemodialysis in poisoning by sea-snake. *Brit. Med. J.*, v. 3, p. 218-219, 1971.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOHAMA, M. H.; LOMBARD, F. R.; ARNI, A. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, myonecrotic activity and cristalization. *Toxicon*, v. 36, n. 3, p. 503-514, 1998.

SOE-SOE, THAN-THAN; KHIN-EI, HAN. The nephrotoxic action of Russell's viper (*Vipera Russellii*) venom. *Toxicon*, v. 28, n. 5, p.461-467, 1990.

SOERENSEN, B. Animais peçonhentos. São Paulo: Atheneu, 1990.

TANIZAKI, M. M.; KAWAZAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM, F. R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, v. 29, p. 673-681, 1991.

TANIZAKI, M. M.; OLIVEIRA, E. P.; MANDELBAUM, F. R. Purification and specificity of a protein inhibitor isolated from the plasma of *Bothrops jararaca*. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 32, n. 1, p. 146, 1989.

TANUS, M. J.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Braz.*, v. 36, n. 2, p. 66-76, 1990.

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

THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments. *Toxicon*, v. 36, p. 1471-1482, 1998.

TOMIHARA, Y.; YONAHARA, K.; NOZAKI, M.; YAMAKAWA, M.; KAMURA, T.; TOYAMA, S. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon*, v. 25, p. 685-689, 1987.

TOMIHARA, Y.; YONAHA, K.; NOZAKI, M.; YAMAKAWA, M.; KAWAMURA, Y.; KAMURA, T.; TOYAMA, S. Purification of an anti-haemorrhagic factor from the serum of the non-venomous snake *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon*, v. 26, p. 420-423, 1988.

TRENTO, E. P.; GARCIA, O. S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S. C.; BATALINI, C.; ARANTES, E. C.; GIGILIO, J. R.; SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteinases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. *Biochem. Pharmacol.*, v. 62, p. 1521-1529, 2001.

TRIMBLE, M. E.; BOWMAN, R. H. Renal Na⁺ and K⁺ transport: effects of glucose, pelmitate and alfa-bromopalmitate. *Am. J. Physiol.*, v. 225, n. 5, p. 771-784, 1973.

VALENÇA, R. C.; SILVA, L. B.; ARAUJO, L. M.; PAZ, S. T.; VASCONCELOS, C. L. M.; MONTEIRO, W. O.; PONTES, M. M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERI, M. C. *Bothrops erythromelas* venom action: morphological observations of the experimental study in dogs. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 4., 1996, Recife. Resumos... Recife, 1996. v. 163.

VARAGUNAM, T.; PANABOKKE, R. G. Bilateral cortical necrosis of the kidney following snake bite. *Postgrad. Med. J.*, v. 46, p. 449-451, 1970.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro:EPUC, 1994. cap.14, p.205.

VASCONCELOS, C. M. L. Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: Caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição. Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1996.

VASCONCELOS, C. M. L.; VALENÇA, R. C.; ARAUJO, E. A.; MODESTO, J. C.; PONTES, M. M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERE, M. C. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, n. 3, p. 439-443, 1998.

VELLARD, J. Resistencia de los 'Didelphis' (Zarigueya) a los venenos ofidicos (Nota previa). Rev. Bras. Biol., v. 5, p. 463-467, 1945.

VIDAL, J. C.; STOPPANI, A. O. M. Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms. Archs. Biochem. Biophys., v. 145, p. 543-552, 1971.

VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. M. A general procedure for the isolation and purification of phospholipases A2 isoenzymes from Bothrops venom. Acta. Physical. Latinoam., v. 23, p. 91-104, 1972.

VITAL BRAZIL, O.; FARINA, R.; YOSHIDA, L.; OLIVEIRA, V. A. Pahrmacology of cristalline crotoxin. III - cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and Crotalus durissus terrificus venom. Mem. Inst. Butantan, v. 33, p.993-1000, 1966.

VITAL BRAZIL, O. Venenos ofidicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Brasil, v. 26, p. 212-218, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas In: CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap.71, p.1044-1074.

WALKER, F. J.; OWEN, W. G; ESMON, C. T. Characterization of the prothrombin activator from the venom of Oxyuranus scutellatus scutellatus (Taipan venom). Biochemistry, v. 19, p.1020-1023, 1980.

WEISSENBERG, S.; OVADIA, M.; FLEMINGER, G.; KOCHVA, E. Antihemorrhagic factors from the blood serum of the western diamondback rattlesnake Crotalus atrox. Toxicon, v. 29, p. 807-818, 1991.

WELCH, W. J.; WILCOX, C. S.; AISAKA, K.; GROSS, S. S.; GRIFFITH, O. W.; FONTOURA, B. M. A. Nitric oxide synthesis from L-arginine modulates renal vascular resistance in isolated perfused and intact rat kidneys. J. Cardiovasc. Pharmacol., v. 17, p. 165-168, 1991.

WEN, F. H.; MARINHO, L. A. C.; SILVA, E. P.; MEDEIROS, G. E. Estudo retrospectivo dos acidentes botrópicos em região de alta prevalência de *Bothrops erythromelas*. Revista Brasileira de Medicina Tropical, v. 22, p. 69, 1989.

WHATLY, R. E. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. J. Biol. Chem., v. 264, p. 6325-6333, 1989.

WILLINGER, C. C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W. In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. Kidney Int., v. 47, p. 518-528, 1995.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. J. Biol. Chem, v. 271, p. 5200-5207, 1996.

YAMADA, D.; MORITA, T. Purification and characterization of a Ca^{2+} dependent prothrombin activator, multactivase from the venom of *Echis multisquamatus*. J. Biochem, v. 122, p. 991-997, 1997.

ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* na agregação plaquetária. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA, 1., 1990, São Paulo. Resumos... São Paulo, 1990. v. 17.