

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

IVANY MARIA DO SOCORRO CARVALHO DA SILVA

**EFEITOS DA PEÇONHA DA
CASCAVEL (*Crotalus durissus
terrificus*) EM RIM ISOLADO DE
RATO**

ORIENTADORA DA TESE:
HELENA SERRA AZUL MONTEIRO
Prof^a ADJUNTA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ

**FORTALEZA - CEARÁ
1995**

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. 518301	
24 / 10 / 86	

C301485
1986

1986

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

IVANY MARIA DO SOCORRO CARVALHO DA
SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/01/95

HELENA SERRA AZUL MONTEIRO
ORIENTADORA

MARIA ELISABETE AMARAL DE MORAES

CARLOS ALBERTO FLORES

AOS MEUS PAIS
Pelos ensinamentos que guiam minha vida

AO MEU MARIDO
Pela grande dedicação a família

A MINHA FILHA
Por fazer os sacrifícios valerem a pena

**“AMIGO É COISA PRÁ SE
GUARDAR DEBAIXO DE
SETE CHAVES DENTRO DO
CORAÇÃO”**

AGRADECIMENTOS

A autora deste trabalho agradece a Profa. Helena Serra Azul Monteiro, que mostrou-se bastante dedicada, fornecendo, através da metodologia científica, os meios necessários a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Manassés Claudino Fonteles, por ter cedido o Laboratório de Farmacologia Renal e Metabólica para a elaboração da parte experimental do trabalho de tese e ter oferecido sugestões valiosas que aumentaram o valor acadêmico do mesmo.

Em especial ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, que em muito acreditou na capacidade intelectual e científica da autora.

À Profa. Maria Elisabete Amaral de Moraes, por ter se mostrado sempre solícita em ajudar.

Aos estudantes de Medicina Débora Santos, Filadelfo Rodrigues e Gilmasa Daniele Rios, pela colaboração dispensada na fase experimental.

À estudante de medicina Andréa Alcântara, pela colaboração na parte experimental e na formatação final dos textos para impressão.

A Messias Simões, pela confecção dos gráficos deste trabalho e a qualidade dos slides apresentados.

A Adriano Veras, pela colaboração na parte experimental e ajuda na parte referente a estatística.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, principalmente a Sílvia Helena Freire França, pela eficiência dedicada ao trabalho experimental.

A Maurício Cardoso da Costa, pela grande ajuda na organização da revisão bibliográfica e atuação como meu crítico perspicaz de estilo e linguagem.

Aos meus pais, irmãos, sogra e amigos pela ajuda oferecida nas horas difíceis de conciliação entre deveres de mãe e elaboração do

trabalho científico.

Ao Prof. Francisco Valdeci Ferreira, pela elaboração do estudo histopatológico das peças experimentais.

Ao Prof. Lima Verde, pela disponibilidade oferecida quanto aos seus conhecimentos referente a acidente ofídico.

Ao Prof. Carlos Maurício de Castro Costa, pela tradução realizada no resumo desta tese.

À Fabiana Maria da Silva Nascimento, pela amizade e o trabalho de revisão final da tese.

A todos os professores, colegas de mestrado e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
I. INTRODUÇÃO	17
• Epidemiologia dos acidentes ofídicos e classificação das serpentes peçonhentas do Brasil	17
Generalidades sobre o efeito dos acidentes ofídicos	22
Fisiopatologia do veneno e nefrotoxicidade do acidente crotálico	24
Estrutura e atividade do veneno da <i>Crotalus durissus terrificus</i> : Quadro clínico e laboratorial do envenenamento	27
Crotoxina: Mecanismo de ação	30
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	35
Animais Experimentais	35
Pesagem dos Animais	35
Técnica Cirúrgica	36
Solução Perfusora	38
Sistema de Perfusão de rim Isolado	38
Calibração do Sistema de Perfusão	41

Protocolo Experimental	44
Determinação da Água e Eletrólitos Tissulares	44
Cálculos dos Parâmetros Funcionais Renais	45
Procedimento Bioquímico	47
Estudo Histopatológico	48
Substâncias Utilizadas Experimentalmente	49
Análise Estatística	50
IV. RESULTADOS	51
V. DISCUSSÃO	74
VI. CONCLUSÃO	83
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
VIII. APÊNDICE	96

LISTA DE FIGURAS

1. Número de acidentes ofídicos no Brasil	19
2. Desenho esquemático de estruturas renais e peri-renais	37
3. Sistema de perfusão em rim isolado	40
4. Gráfico de calibração de fluxo	42
5. Gráfico de calibração de pressão de perfusão	43
5. Fluxo urinário em rins perfundidos com crotoxina	52
6. Fluxo urinário em rins perfundidos com o veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	53
7. Ritmo de filtração glomerular em rins controle e perfundidos com crotoxina	54
8. Ritmo de filtração glomerular em rins controle, perfundidos com o veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	56
9. Pressão de perfusão em rins controle e perfundidos com crotoxina	57
10. Pressão de perfusão em rins controle, perfundidos com o veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	58
11. Transporte de sódio tubular de rins controle e perfundidos com crotoxina	59
12. Transporte de sódio de rins controle, perfundidos com veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	60
13. Transporte de potássio tubular em rins perfundidos com crotoxina	64
14. Transporte de potássio tubular em rins controle, perfundidos com veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	65
15. Composição eletrolítica tecidual de sódio em rins controle, perfundidos	

com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	68
16. Composição eletrolítica de potássio em rins controle, perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno	69
17. Aspecto histopatológico do rim perfundido com veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	72
18. Aspecto histopatológico do rim perfundido com dexametasona previamente ao veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	73

LISTA DE TABELAS

1. Acidentes ofídicos no Brasil	18
2. Percentual do transporte de sódio em rins controles e perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	62
3. Percentual do transporte proximal de sódio em rins controles e perfundidos com crotoxina veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	63
4. Percentual do transporte do potássio de rins controles, perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	66
5. Análise histopatológica em rins controles e perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	71
6 Fluxo urinário em rins controles, perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	97
7. Ritmo de filtração glomerular em rins controles, perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	98
8. Pressão de perfusão em rins controles e perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	99
9. Transporte de sódio em rins controles e perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i> .	100
10. Transporte de potássio de rins controles, perfundidos com crotoxina, veneno da <i>C. durissus terrificus</i> e dexametasona + veneno da <i>C. durissus terrificus</i>	101

11. Composição eletrolítica tecidual de sódio e potássio em rins não perfundidos e rins perfundidos com solução de Krebs Henseleit modificado (controle), com crotoxina, veneno da *C. durissus terrificus* e dexametasona + veneno da *C. durissus terrificus*

102

RESUMO

**Efeitos da peçonha da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)
em rim isolado de rato.**

**Dissertação de Mestrado em Farmacologia
UFC- 1995.**

Acredita-se que a insuficiência renal aguda (IRA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade das vítimas envolvidas no envenenamento pela *Crotalus durissus terrificus* (cascavel). A técnica de rim isolado de rato constitui-se num modelo útil para o estudo dos efeitos diretos de drogas na função renal. Nesse trabalho, utilizando-se dessa técnica, investigamos o efeito do veneno da *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina, a principal fração do veneno.

Os experimentos foram realizados em cinco grupos de rins os quais foram perfundidos com 1) albumina 6g% (controle albumina); 2) crotoxina (1 μ g/ml); 3) crotoxina (2 μ g/ml); 4) veneno (1 μ g/ml); 5) dexametasona (10 μ g/ml) + veneno (1 μ g/ml).

Os animais da cepa Wistar foram anestesiados com pentobarbital na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Fez-se a canulação distal do ureter direito e a seguir da artéria renal. Após esse procedimento realizou-se a nefrectomia do rim direito e acoplamento deste ao sistema de perfusão. Após um período de estabilização de 20 minutos coletou-se 1,5 ml do perfusato, a esta amostra deu-se o nome de amostra zero do perfusato (Po). A partir de Po a cada 10 min foram coletadas amostras de urina e do perfusato, além da aferição do volume urinário e da pressão de perfusão. Estas amostras foram analisadas para a determinação dos conteúdos dos ions sódio e potássio e da osmolaridade. A duração do experimento foi de 90 a 120 minutos. As substâncias testadas foram colocadas no sistema de perfusão após 30 minutos da coleta de Po. No grupo dexametasona + veneno, o corticóide foi colocado no sistema no tempo de 30 min e o veneno no tempo de 60 min. Ao término do experimento os rins esquerdo (não perfundido) e direito (perfundido) tiveram seus pesos úmido e seco calculados, bem como o conteúdo de sódio e potássio tissular. Utilizando-se os dados experimentais calculou-se os seguintes parâmetros: fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, sódio filtrado, sódio excretado, potássio excretado, potássio transportado, percentual de potássio transportado, transporte proximal de sódio, percentual do transporte proximal de sódio.

Os parâmetros funcionais renais do grupo controle albumina apresentaram estabilidade dos resultados ao longo do experimento.

Nos grupos de rins perfundidos com a crotoxina 1 e 2 μ g/ml, somente nesta última dose observou-se aumento do fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, transporte de sódio, transporte de potássio e sódio tissular. Apresentou, ainda, uma redução na pressão de perfusão.

No grupo de rins que foram perfundidos com o veneno (1 μ g/ml) observamos aos 40 minutos de experimento, aumento acentuado ($p < 0,05$) do fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, transporte de sódio, transporte de potássio e da composição eletrolítica tecidual de sódio.

No estudo histopatológico dos rins observamos que os grupos controles e grupo dexametasona + veneno, apresentaram apenas raros focos de esclerose intersticial. Nos grupos perfundidos com o veneno da *Crotalus durissus terrificus* ou com a crotoxina (2 μ g/ml) foram encontrados abundante material protéico no espaço urinário dos glomérulos e hialinização das células tubulares.

A dexametasona foi eficiente em proteger os efeitos tóxicos causados pelos veneno da *Crotalus durissus terrificus* nos parâmetros funcionais analisados e nas alterações histológicas renais.

Os resultados mostraram que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* (1 μ g/ml) e a crotoxina (2 μ g/ml) causaram nefrotoxicidade direta em ratos reveladas através das alterações funcionais e histopatológicas, entretanto tais alterações não foram compatíveis com IRA, nas dosagens utilizadas e no período de tempo de experiência.

ABSTRACT

Acute renal failure seems to be the chief cause of morbidity and mortality of people poisoned by *Crotalus durissus terrificus*. The technique of isolated kidney of rat is a useful model for the study of direct effect of drugs on the renal function. In this work we have used this technique to investigate the effect of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin, as principal fraction of it.

The experiments were carried out in five groups of kidney which were perfused with: 1) albumin 6g% (control albumin); 2) crotoxin 1 μ g/ml; 3) crotoxin 2 μ g/ml; 4) venom 1 μ g/ml; 5) dexametasone 10 μ g/ml + venom 1 μ g/ml.

The wistar rats were anesthetized with pentobarbital in a dosis of 50mg/Kg of body weight. A distal canulation of the right ureter was performed and subsequently of the renal artery. After this procedure, a nephectomy of the right kidney was done. The kidney was coupled to the perfusion system. After a stabilisation period (20 min) of the preparation, the first sample of the perfusate was colleted (Po). From Po, samples of urine and perfusate were collected every 10 minutes, besides the measure of urinary volume and of the perfusion pressure. These samples were analysed to determine the contents of sodium and potassium ions and osmolality. The duration of the experimental was of 90 to 120 minutes. The substances tested were put in the perfusion system after 30 minutes from Po. In the group dexametasone + venom, the corticosteroid was put into the system in 30 minutes, and the venom in 60 minutes.

After the experiment the not perfused left kidneys and the right kidneys had their humid and dry weight calculated, as well as their content of tissular sodium and potassium. Using the experimental data we have calculated the following parameters: urinary flow, rate of glomerular filtration, filtrated sodium, excreted sodium, transported sodium, percentage of reabsorbed sodium, filtrated potassium, excreted potassium, transported potassium, percentage of transported potassium, osmotic clearance, free water clearance, distal transport of sodium, percentage of distal transport of sodium, proximal transport of sodium, percentage of proximal transport of sodium.

The functional renal parameters of albumin control group did not present significant changes as related with the internal control.

In the group of kidney perfused with crotoxin 1 and 2 μ g/ml, only the latter produced an increase in urinary flow, rate of glomerular filtration, sodium transport, tissular potassium and sodium transport. The crotoxin also showed a decrease in the perfusion pressure.

In the groups treated with venom 1 μ g/ml we have observed, at the 40 minutes of perfusion, an accentuated increase ($p < 0,05$) of the urinary flow, rate of glomerular filtration, sodium transport, potassium transport, tissular electrolytic composition of sodium.

In the histopathological study of the kidneys, we have observed that the control group and the group with dexametasone + venom, presented only rare foci of interstitial esclerosis. In the groups, treated with venom of *Crotalus durissus terrificus* or with crotoxin, we have found abundant proteic material in the urinary space of the glomeruli and hyalination of tubular cells.

The dexametasone succeeded to protect the toxic effects caused by the venom of *Crotalus durissus terrificus* in the functional analyzed parameters and in the histological renal changes.

The results showed that the venom of *Crotalus durissus terrificus* (1 μ g/ml) and the crotoxin (2 μ g/ml) caused direct nephrotoxicity in rats evidenced by functional and histopatological alterations; however there changes were not compatible with acute renal failure in the dosis used and in the time period of experiment.

I. INTRODUÇÃO

EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS E CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES

Vital Brazil, fundador e diretor do Instituto Butantan no início deste século, foi o primeiro a estudar a epidemiologia dos acidentes por serpentes venenosas no Brasil, realizando o primeiro levantamento de óbitos por acidentes ofídicos no estado de São Paulo (Brazil, 1901).

O Ministério da Saúde, em 1987, notificou 12.894 casos de acidentes por serpentes venenosas, com informação do gênero a que pertenciam e mostrou que 87,5% eram do gênero *Bothrops*, 8,5% do gênero *Crotalus*, 3,2% do gênero *Lachesis* e 0,8% do gênero *Micrurus*.

Os acidentes por animais peçonhentos representam um grande problema da Saúde Pública (Jorge e Ribeiro, 1989) nos países em desenvolvimento, dada a incidência, a gravidade e as sequelas que causam (Amaral et al., 1989). A Organização Mundial de Saúde estima que anualmente 50.000 pessoas são vítimas fatais de acidentes ofídicos, e que a maioria desses casos ocorrem na Ásia (Nancy et al., 1991).

Nos Estados Unidos, de 7.000 ocorrências desse tipo de acidente, somente 12 evoluíram para a morte (Arena e Andrew, 1986), sendo que muitos dos casos não fatais, resultaram em morbidade para o paciente, apresentando dor local, edema de tecido, necrose e falência renal aguda (Nancy et al., 1991).

Acidente ofídico continua sendo um grave problema de Saúde Pública no Brasil, sendo que nos acidentes causados pela *Crotalus durissus terrificus* a mortalidade é elevada, chegando a 72% nos casos não tratados com soro anticrotálico e 11% quando há tratamento. As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 80 a 90% dos

acidentes no Brasil (Barraviera, 1993).

No Brasil, durante os anos de 1987, 1988 e 1989 foram notificados 21.463, 19.815 e 20.947 casos de acidentes ofídicos, respectivamente. A Tabela 1 ilustra a incidência de casos destes acidentes por região geográfica e a Figura 1 mostra o número absoluto de casos, segundo a área geográfica. Em 1990 (janeiro a julho), o Ministério da Saúde recebeu 9.396 notificações de acidentes por serpentes venenosas. Entre os acidentes graves devem ser ressaltados os causados por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Barraviera, 1993).

Estudo epidemiológico realizado em São Paulo entre os anos de 1986 e 1989 notificou 8.721 acidentes ofídicos, dos quais 6.834 casos com referência ao gênero da serpente. A estatística encontrada é semelhante aquela observada no resto do país, no que diz respeito a serpente causadora do acidente. A maioria dos acidentes ocorreu entre os meses de novembro a abril, ou seja, nos meses mais quentes e chuvosos. A maior parte das vítimas foi do sexo masculino e a letalidade foi de 0,4%, sendo maior nos acidentes causados pelo gênero *Crotalus* (1,1%) que no *Bothrops* (0,4%). Porém as serpentes do gênero *Bothrops* foram responsáveis pela maioria dos óbitos (Ribeiro et al., 1993). Esta baixa letalidade em relação ao resto do país deve-se a precocidade da assistência e a difusão das normas de atendimento consideradas ideais (Resende et al., 1989).

TABELA 1
Acidentes ofídicos no Brasil nos anos 1987, 1988 e 1989.

REGIÕES	PERÍODOS ESTUDADOS		
	1987	1988	1989
Norte	24,49	25,36	23,49
Nordeste	10,80	7,44	6,01
Centro-Oeste	30,98	33,60	36,57
Sudeste	15,29	13,35	13,56
Sul	14,69	12,94	15,73
Média Nacional	15,48	13,71	13,96

Coeficiente de incidência por 100 mil habitantes (Barraviera, 1993)

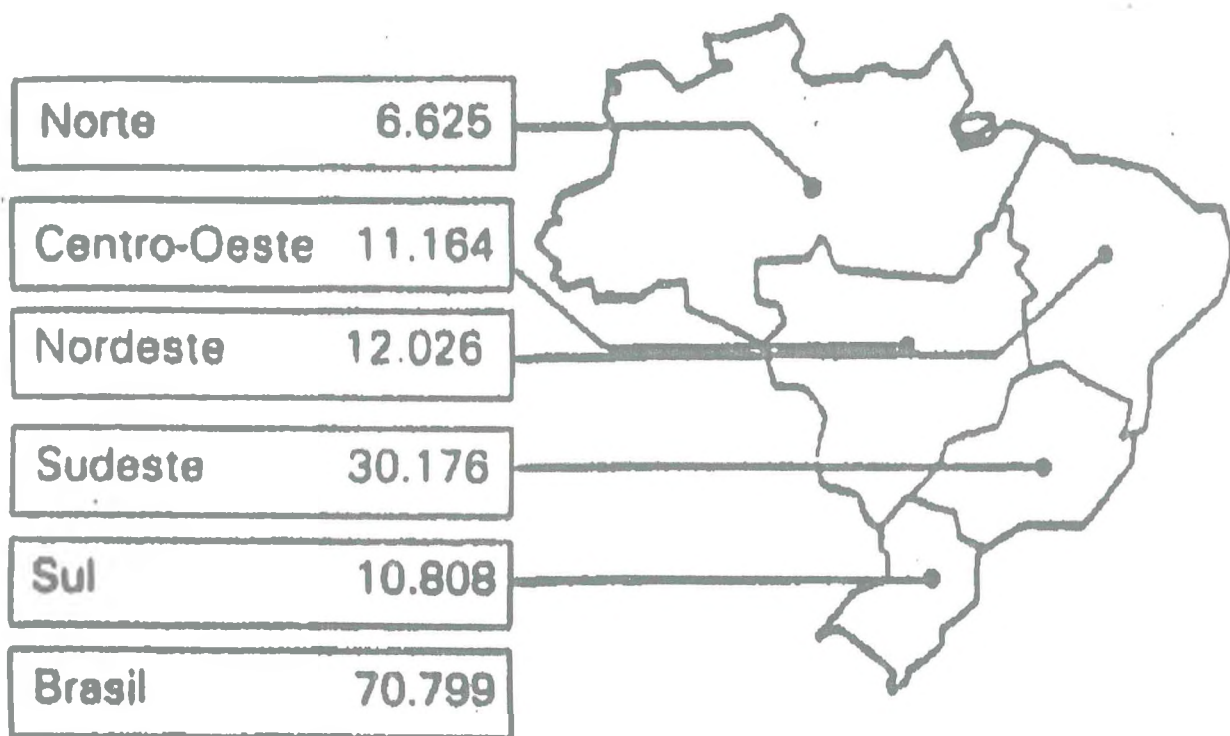


FIGURA 1: Número de acidentes ofídicos no Brasil

Distribuição do número de casos de acidentes causados por serpentes brasileiras segundo as regiões geográficas do Brasil no período de 1986 a 1989.

Fonte: Secretaria de Saúde de Unidades Federativas.

A região brasileira em que ocorreu maior coeficiente de incidência de acidentes ofídicos entre os anos de 1987 e 1989 foi a região Centro-oeste, sendo seguida pela região Norte. Este resultado é plenamente aceitável, tendo em vista que tais zonas possuem características rurais e pouco índice populacional, sendo o habitat escolhido pelas serpentes.

A região Nordeste mostrou menor índice por 100 mil habitantes de acidentes ofídicos do Brasil. Tal região possui grandes áreas rurais, e por esse motivo, esperava-se maior número de acidentes ofídicos. Uma explicação provável para tais resultados é de que não houve notificação satisfatória dos casos ocorridos.

São apenas quatro os gêneros de serpentes peçonhentas existentes no Brasil: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Basta que seja reconhecido o gênero da serpente causadora do acidente para que se possa tomar medidas terapêuticas fundamentais (Jorge e Rosenfeld, 1970).

Os soros produzidos no Brasil não são específicos para cada espécie, exceto no caso do gênero possuir uma única espécie nacional, como no caso do gênero *B. jararaca*. Sabendo-se que, embora as serpentes de um mesmo gênero possam causar patologias semelhantes em suas vítimas, determinadas espécies e subespécies do mesmo gênero possuem peçonhas com propriedades um pouco diferentes. O mesmo acontece entre serpentes da mesma espécie, mas de idade e procedência diferentes (Kamigutti, 1988).

As espécies de diferentes gêneros, bem como de espécies do mesmo gênero possuem algumas substâncias antígenicamente semelhantes (Dias da Silva et al., 1989).

No Brasil representantes de apenas duas famílias de serpentes possuem interesse em Saúde Pública:

- 1) Família: *Elapinae*
Sub-família: *Elapinae*
Gênero: *Micrurus* (12 espécies)
Leptomicrurus (2 espécies)

As serpentes corais são representantes desta família, sendo que as mais estudadas são 3 espécies do gênero *Micrurus*: *Micrurus*

corallinus, *Micrurus frontalis*, *Micrurus lemmiscatus*. Acidentes causados por esse grupo são raros, pois as corais são de hábitos noturnos, subterrâneos, esquivas e pouco agressivas, decorrendo, regra geral, de manipulação sem as devidas precauções e técnicas.

A família *Viperidae* possui dois gêneros: *Crotalus*, *Bothrops*.e *Lachesis*.

2) Família: *Viperidae*

Sub-família: *Crotalinae*

2.1.Gênero: *Crotalus*

Espécie: *Crotalus durissus*

Subespécies: *C. d. terrificus*

C. d. cascavela

C. d. collitineatus

C. d. ruruima

C. d. marajoensis

As peçonhas da *C. durissus terrificus*, *C. durissus cascavela* e *C. durissus collitineatus*, tem sido as mais estudadas pelos pesquisadores. As pesquisas realizadas com as outras duas subespécies são bastante reduzidas. As serpentes de todas estas subespécies podem ser encontradas em quase toda região brasileira, excetuando-se a Floresta Amazônica, Zona da Mata Atlântica e Regiões Litorâneas. São popularmente chamadas de cascavel, cascavel de quatro ventos, boicininga, maracabóia, maracá e outros (Ministério da Saúde, 1986).

2.2.Gênero: *Bothrops*

Espécies: *B. Jararaca*

B.jararacussu

B. alternatus

B. moojeni

B. neuwiedi

B. cotiara

Estas seis espécies citadas são as mais estudadas e ainda existe no Brasil mais onze espécies descritas e inúmeras subespécies.

2.3.Gênero: *Lachesis*

Espécies: *Lachesis muta*

Subespécies: *L. m. muta*

L.m.rhombeata

Este grupo é o menos estudado. É raro o acidente causado pela subespécie existente no Brasil. Encontra-se distribuída nas grandes florestas tropicais do Brasil: Amazônia e Atlântica. Recebe nomes populares de surucutinga, surucucu, pico-de-jaca (Gualtieri, 1987).

GENERALIDADES SOBRE O EFEITO DOS ACIDENTES OFÍDICOS

As ações fisiopatológicas causadas pelos venenos dos cinco gêneros de serpentes peçonhentas do Brasil, *Micrurus*, *Leptomicrurus*, *Crotalus*, *Bothrops* e *Lachesis* são: ação proteolítica, coagulante, neurotóxica, miotóxica, hemorrágica e nefrotóxica (Jorge e Ribeiro, 1990).

Nos acidentes provocados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis*, as lesões locais como rubor, edema, bolhas e necrose eram atribuídas a ação proteolítica destes venenos (Ministério da Saúde, 1986). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que os efeitos locais decorrem da atividade de múltiplos componentes com ações diversas, tais como a liberação de mediadores químicos (Cupo et al., 1988).

Os venenos de serpentes da família *Crotalidae*, objeto de estudo no presente trabalho, possuem atividade proteolítica sobre a caseína, mas existe marcada diferença quantitativa entre os mesmos. Há variações quantitativas no efeito proteolítico não somente entre as diferentes espécies, como também foi observado diferenças na mesma espécie com habitat em distintas zonas geográficas (Lomonte e Gutiérrez, 1983):

Muitos venenos da subfamília *Crotalidae* são caracterizados pela ação tecidual local, não causam neurotoxicidade tal como paralisia muscular, porém os venenos das serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* não mostram esses efeitos em suas vítimas. O envenenamento causado por essa espécie é muito semelhante aqueles causados pela família *Elapidae*. Todas as subespécies *Crotalus durissus* analisadas não apresentaram ação proteolítica sobre a caseína (Sanchez et al.,

1992).

Os venenos dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* possuem ação coagulante do tipo trombina, ou seja, os venenos transformam diretamente o fibrinogênio em fibrina. O veneno botrópico também possui a capacidade de ativar o fator X e a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. Após esta ativação, o resultado final será o consumo de fibrinogênio com incoagulabilidade sanguínea, consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando ao quadro de coagulação intravascular disseminada (Kamiguti et al., 1988).

A ação neurotóxica é encontrada nos venenos das serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*, sendo que esta ação limita-se praticamente ao bloqueio da junção mioneural. Na realidade, a terminologia mais adequada seria ação mioneural, e não neurotóxica (Jorge e Ribeiro, 1989).

A neurotoxina elapídica possui peso molecular menor que a da crotalídica. Esta característica causa maior demora no aparecimento da sintomatologia de bloqueio da junção mioneural nesse tipo de acidente. Admite-se, também, uma atividade neurotóxica do veneno laquétrico capaz de ocasionar síndrome de excitação vagal com os seguintes efeitos: diarreia, hipotensão arterial e choque (Jorge e Ribeiro, 1989).

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* podem causar hemorragia local ou sistêmica nos pulmões, cérebro e rins. A hemorragia, nesse caso, é provocada pela ação de hemorraginas (fatores hemorrágicos), que agem sobre os vasos capilares e causam inicialmente destruição da membrana basal, levando posteriormente a sua ruptura (Jorge e Ribeiro, 1989, Ribeiro et al., 1990).

A ação miotóxica sistêmica para músculos esqueléticos é encontrada nos venenos das serpentes do gênero *Crotalus*, que provocam lise e/ou necrose das fibras, liberando enzimas musculares e mioglobina na circulação (Magalhães et al., 1986).

Nos venenos crotálicos e botrópicos são encontradas ações nefrotóxicas. Admite-se ação nefrotóxica direta sobre os túbulos renais, embora outros mecanismos possam contribuir para a patogênese dessas lesões (Sanchez et al., 1992).

FISIOPATOLOGIA E NEFROTOXICIDADE DO ACIDENTE CROTÁLICO

O veneno crotálico possui ação importante sobre os músculos esqueléticos (Azevedo-Marques et al., 1985), sistema nervoso (Wajchenberg et al., 1954), rins (Amaral et al., 1986) e sangue (Costa et al., 1989). Exerce o efeito neurotóxico no sistema nervoso central e periférico (Chang e Lee, 1977). Possui ação predominantemente inibidora da liberação da acetilcolina ao nível da placa motora, causando bloqueio na condução do estímulo nervoso (Vital Brazil, 1980). É descrito também uma ação pós-sináptica, porém muito menos potente (Bon et al., 1979). Causa paralisia flácida de músculos esqueléticos, principalmente os faciais e oculomotores (Jorge, 1989). A principal fração tóxica do veneno da *Crotalus durissus terrificus* é a crotoxina, causadora de paralisia em todas as espécies animais estudadas, sendo esta paralisia semelhante ao efeito causado pelos curares (Barraviera, 1990).

As investigações experimentais mostram que os venenos dos animais peçonhentos causam efeitos nefrotóxicos (Minton, 1971), e que os vários componentes dos venenos das serpentes agem direta ou indiretamente sobre as células renais (Raab e Kaiser, 1966).

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação bastante encontrada nas vítimas de envenenamento ofídico (Chugh et al., 1975, Da Silva et al., 1979). As lesões anatômicas renais causadoras desta complicação são a glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda (Date e Shastry, 1982) e a necrose cortical renal (Date e Shastry, 1982).

Nancy et al. (1991) relatam que as lesões renais mais frequentes provocadas por acidentes ofídicos são a necrose difusa, em 18%, e a necrose cortical, em 9% dos casos, sendo que Chugh (1989) inclui a necrose tubular aguda em 73% dos estudos.

As mesmas lesões também foram observadas em nosso meio nos envenenamentos produzidos por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Amaral et al., 1980). Porém Amaral et al. (1986) em estudo clínico e laboratorial de trinta e dois pacientes vítimas de acidente crotálico não encontraram necrose cortical renal causado pelo gênero *Crotalus*.

A IRA é observada após acidentes ofídicos causados pelo grupo *Viperidae* (Amorim e Melo, 1954, Reid, 1961) e em muitos trabalhos a falência renal é atribuída a necrose tubular e cortical (Amorim e Melo, 1954, Reid, 1961, Amorim et al., 1969, Amorim, 1971), infarto renal, arterites necrosantes e síndrome nefrótica (Raab e Kaiser, 1966). Sant e Puradare (1972) descreveram que a glomerulonefrite proliferativa é causada por ação tóxica direta deste veneno. Porém, muitos outros autores não mencionam alterações glomerulares (Mittal et al., 1986).

A realização da biópsia renal nos pacientes com IRA secundária ao acidente ofídico poderia contribuir para elucidar a patogênese e os tipos histológicos das lesões observadas. Entretanto tal procedimento traz complicações graves ao paciente e não altera a conduta terapêutica.

Mittal et al., (1986) estudaram durante quatorze anos acidentes ofídicos causados pelo gênero *Viperidae*, *Bothrops* e *Crotalus*, realizando autópsia e biópsia nas vítimas. Os resultados mostraram necrose tubular em 15% dos casos. Concluíram que a patogênese da necrose tubular pode ser causada por ação tóxica direta do veneno, através da ação da fosfolipase. A lesão renal em 50% desses casos resultou da coagulação intravascular, porém não foi esclarecido se tal efeito foi conseqüente à ação tóxica direta do veneno no endotélio ou devido ao aumento do fator pró-coagulante. Nos glomérulos foram encontradas outras mudanças significativas, como a dilatação endotelial e ruptura da membrana basal em dezessete casos (Mittal et al., 1986).

A nefrotoxicidade resultante do envenenamento crotálico foi atribuída a ação nefrotóxica direta, à hipotensão arterial e ao choque (Hadler e Vital Brazil, 1966). Recentemente, através de exames laboratoriais específicos das vítimas de acidente crotálico foi descartada a atividade hemolítica desta peçonha, através da dosagem de hemoglobina, haptoglobina sanguínea e hemoglobina na urina (Azevedo-Marques, 1985). A liberação de mioglobina, secundária à rbdomiólise, pode ser outro mecanismo envolvido na patogênese das lesões renais causadas por acidentes crotálicos (Azevedo-Marques et al., 1985).

A ação miotóxica sistêmica causa rbdomiólise generalizada com acometimento preferencial da fibra do tipo I, rica em mioglobina (Jorge e Ribeiro, 1987). Produz aumento precoce e intenso da atividade sérica das enzimas musculares, mioglobinemia e mioglobinúria (Azevedo-Marques et al., 1985).

A rabdomiólise é uma síndrome clínico-laboratorial de múltiplas etiologias, resultante da lesão muscular esquelética com liberação do conteúdo celular para o plasma (Gabow et al., 1982). A rabdomiólise, associada a insuficiência renal aguda é uma complicação observada nos acidentes causados por serpentes marinhas e elapídicas (Hood e Johnson, 1974), e só recentemente foi relatada no envenenamento produzido pela *Crotalus durissus terrificus* (Azevedo-Marques et al., 1985). O diagnóstico clínico pode ser suspeitado quando o paciente apresenta mialgia e edema muscular (Magalhães et al., 1986). Entretanto, cerca de 50% dos casos são assintomáticos, podendo o diagnóstico passar despercebido (Reid, 1961).

Estudos experimentais se fazem necessários para definir os mecanismos envolvidos na patogênese da IRA, ocasionada pelas peçonhas botrópica e crotálica.

Os pacientes vítimas de acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops e Crotalus* apresentam em comum sintomas de IRA, tais como: uremia, hiperpotassemia, acidose metabólica, anemia, hiperhidratação e edema agudo do pulmão (Amaral et al., 1986). Reid (1968) sugeriu que as peçonhas das serpentes dos gêneros *Viper e Pit vip* possuem atividades através de seus efeitos diretos nos rins.

A administração do veneno de serpente causa alteração glomerular (nefrite), alteração tubular (nefrose) e infarto renal. As alterações glomerulares consistem em inflamação e as tubulares ocorrem por ação direta do veneno (nefrose do néfron intermediário) através de hipóxia vascular (Raab e Kaiser, 1966).

Hadler e Vital Brazil (1966) mostraram, através de injeção endovenosa em coelhos, que a crotoxina produz lesões glomerulares e tubulares. O exame histopatológico em microscopia eletrônica mostrou que entre o primeiro e o nono dia após a injeção de crotoxina ocorreram alterações em algumas destas zonas renais. Nos primeiros quatro dias os túbulos estavam menos afetados que os glomérulos e, a partir do quinto dia predominavam as lesões tubulares. Tais lesões foram atribuídas ao choque e ao efeito nefrotóxico direto do veneno.

O veneno crotálico produz, inicialmente, efeito neurotóxico e, posteriormente, uma síndrome nefrotóxica intermediária, com lesões tubulares no transcurso da enfermidade, podendo sobrevir anúria, que requer hemodiálise. Como consequência da complicação renal pode

sobrevir a morte de alguns pacientes entre o oitavo e décimo quinto dia do acidente ofídico (Rosenfeld, 1971).

Nos acidentes causados por *Crotalus durissus terrificus*, 74% das vítimas não tratadas morrem. Porém, com a terapia antiveneno a mortalidade é de 12%. A alta mortalidade é atribuída ao efeito neurotóxico do veneno aliado à complicação renal (Hawgood, 1982).

Outros fatores tais como: desidratação, hipotensão arterial, acidose metabólica e choque podem estar associados à rabdomiólise e contribuem para a instalação da lesão renal (Barraviera, 1990).

As alterações observadas nos fatores da coagulação estão relacionadas com enzimas tipo trombina, sendo esta uma das frações do veneno que tem a capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina. Este efeito causa o consumo dos fatores da coagulação e por fim incoagulabilidade sanguínea (Kamiguti et al., 1988). Contrastando com os efeitos da cascavel norte americana, a *Crotalus durissus terrificus* não apresenta ação proteolítica ou atividade hemorrágica (Sanchez et al., 1992).

ESTRUTURA E ATIVIDADE DO VENENO DA *C. durissus terrificus*: QUADRO CLÍNICO E LABORATORIAL DO ENVENENAMENTO

A composição do veneno crotálico é complexa, sendo constituído de enzimas, toxinas e peptídeos. O fracionamento do veneno em coluna de Sephadex revelou as seguintes frações enzimáticas: 5-nucleotidase, fosfodiesterase, enzimas tipo trombina, L-amino oxidase, atividade calicreína tipo tissular e hidrolase do NAD. As toxinas separadas foram as seguintes: cromatina, crotapotina, crotoxina, giroxina e convulxina (Bercovici et al., 1987).

Em geral não há reação no local da mordida da serpente *Crotalus*, embora um pequeno edema possa estar presente, pois nesse tipo de acidente não há relação entre os sintomas locais e a gravidade do

envenenamento (Barraviera, 1990).

O veneno crotálico causou hemólise “*in vitro*”, porém este fenômeno não foi observado “*in vivo*” (Barraviera, 1990).

Algumas manifestações observadas em pacientes vítimas deste acidente, tais como as alterações da sensibilidade no local da picada e a alteração da gustação e da olfação, ainda não tem fisiopatologia definida (Jorge et al., 1986).

A manifestação sistêmica mais comum, se deve à neurotoxicidade, através da ptose palpebral, diminuição da expressão facial devido à paralisia de músculo da mímica, enrugamento da testa na tentativa de abrir os olhos e, muitas vezes, permanecer com a boca entreaberta: fácies neurotóxico de Rosenfeld. São frequentes a diminuição da mobilidade visual e diplopia (Rosenfeld, 1965).

A contagem das plaquetas pode estar normal ou diminuída e os fatores da coagulação estão diminuídos. Em consequência, o tempo de protrombina (sistema extrínseco) e o tempo de tromboplastina parcialmente ativado (sistema intrínseco) encontram-se aumentados. Qualquer que seja o mecanismo de ativação da cascata da coagulação, o efeito resultante será principalmente o consumo de fibrinogênio (Barraviera, 1990).

A miotoxicidade do veneno é observada pela intensa mialgia generalizada, podendo ser acompanhada de edema muscular discreto, embora em alguns casos possa ser assintomático (Cupo et al., 1988). Nesses casos, o diagnóstico é despertado pela constatação de níveis plasmáticos elevados de creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (DHL) e transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) (Barraviera, 1990).

A ausência de mioglobina na urina não exclui o diagnóstico de rabdomiólise, pois a mioglobinúria é dependente da concentração plasmática de mioglobina, do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. A biópsia muscular também pode contribuir de forma importante para a confirmação da rabdomiólise (Barraviera, 1993).

As alterações renais evidenciadas pela urina escura e/ou vermelha ocorrem, em geral, após 24 horas do acidente (Barraviera, 1990). Nos casos que evoluem para IRA foram constatadas hipocalcemia,

hiperuricemia, e hiposfatemia, grave oligúria, seguida de anúria após o acidente, com elevação progressiva dos níveis séricos de uréia e creatinina (Magalhães et al., 1986). A hiponatremia acompanha os estados de desidratação e o potássio sérico pode estar normal ou aumentado. O potássio sérico pode estar diminuído quando o acidente é grave (Barraviera, 1990).

A produção do veneno ocorre em glândulas exócrinas do tipo seroso, cuja secreção é coletada no conduto secundário que conduz à boca. Sabe-se que a glândula nunca esvazia-se completamente, mesmo depois de uma série de esvaziamentos espontâneos ou de extrações do veneno (Fraenkel-Conrat, 1982).

A crotamina, toxina polipeptídica básica, peso molecular 4.900 Daltons (Laure, 1975), atua nas fibras musculares alterando sua permeabilidade ao sódio (Pellegrini Filho e Vital Brasil, 1978). É pouco tóxica, não desempenhando importância na fisiopatologia do veneno crotálico no homem (Vital Brasil, 1980).

A convulxina, toxina de elevado peso molecular, produz convulsões, perturbações respiratórias e circulatórias, e seu papel no envenenamento não se encontra esclarecido. É possível que participe na gênese de movimentos convulsivos, por vezes observados no envenenamento crotálico (Vital Brasil, 1980, Prado-Franceschi et al., 1981).

A giroxina é pouco conhecida, sabendo-se somente que produz uma síndrome convulsiva peculiar em camundongos (Barrio, 1961).

Todos os tipos de venenos da subespécie *Crotalus durissus* apresentaram uma dose letal 50 (DL₅₀) significativamente maior pela via intra-peritoneal (1,5 - 2,6 µg/20g de peso) que pela via endovenosa (2,0 - 2,4 µg/20g de peso). Sendo a atividade letal muito mais significativa pela via intratecal (28,8 - 42,3 x 10⁻³ µg/20g de peso) (Sanchez et al., 1992).

CROTOXINA: MECANISMO DE AÇÃO

A crotoxina é uma neurotoxina com atividade fosfolipásica A_2 e correspondente ao mais importante componente tóxico do veneno da Cascavel sul americana (*Crotalus durissus terrificus*), exercendo sua ação fisiopatológica através do bloqueio da transmissão neuromuscular (Vital Brazil, 1971).

Esta toxina foi isolada pela primeira vez em 1939 e seu peso molecular foi estimado em 30.000 Daltons (Slota e Fraenkel-Conrat, 1939). As estruturas tridimensionais da fosfolipase A_2 de pâncreas bovino e do veneno da *Crotalus atrox* foram bem elucidadas e mostraram semelhanças somente em alguns detalhes estruturais, mas possuem o mesmo aspecto geral (Renetseder et al., 1985).

A crotoxina consiste basicamente de duas proteínas, uma altamente básica fosfolipase A_2 (fosfatidase 2-acilhidrolase) e outra menos básica chamada crotapotina (Haberman e Breithaupt, 1978). A crotapotina é responsável pelo transporte da fosfolipase ao nível da membrana pós-sináptica e possui baixa potência letal (Rubsamen et al., 1978, Breithaupt, 1976).

Estas duas subunidades formam um complexo molar de proporção 1:1. A reassociação das duas subunidades isoladas restaura a neurotoxicidade da crotoxina original (Rubsamen et al., 1978). A ligação química entre a fosfolipase A_2 e a crotapotina não é do tipo covalente, é portanto uma ligação fraca e reversível (Barraviera, 1993).

Recentemente, Aird et al. (1986) e Laure (1988) analisaram a sequência dos aminoácidos do componente básico, e os resultados revelaram similaridade entre ele e o veneno total, bem como a fosfolipase pancreática A_2 .

O soro antiofídico da *Crotalus durissus terrificus* é capaz de inativar a fosfolipase A_2 básica, que é o componente crucial para a ação tóxica do complexo crotoxina, sendo provável que o veneno seja inativado pelo soro através da formação de complexo inativo entre os dois (Mittal et al., 1986).

A crotoxina purificada do veneno coletado de um grande número de serpentes venenosas mostrou uma mistura de várias proteínas, tendo o mesmo peso molecular e também atividade farmacológica e enzimática. Elas diferiam largamente nas propriedades cromatográficas e na mobilidade eletroforética (Rubsamen et al., 1971, Wu, 1983).

A crotoxina causa bloqueio da transmissão neuromuscular ao nível pré-sináptico, portanto os venenos de serpentes que possuem essa fração pertencem a classe de serpente venenosa beta-neurotoxina. Este efeito ocorre através de uma mudança trifásica de depressão, facilitação e bloqueio final na liberação de acetilcolina no nervo terminal (Fraenkel-Conrat, 1982, Bon et al., 1988, Faure e Bon, 1988).

Efeito semelhante ocorre com outros venenos beta-neurotoxina tal como a beta-bugarotoxina (Chang et al., 1973, Abe et al., 1977), notexina (Harris et al., 1973), taipoxina (Cull-Candy et al., 1976) e textilotoxina (Su et al., 1983).

A crotoxina em altas doses age na membrana pós-sináptica, produzindo estabilização dos receptores da acetilcolina em estado conformacional inativo. Este estado de dessensibilização também é observado após prolongada incubação com agonistas colinérgicos (Vital Brazil, 1966, Bon e Jeng, 1979).

A dose letal da crotoxina foi testada em camundongos, ratos, coelhos, cobaios e pombos. A suscetibilidade para a ação da dose letal da crotoxina e veneno nos animais em experimento segue a seguinte ordem: pombo, cobaios, camundongo, coelho, rato.

Em cães a causa da morte é devido a um componente do veneno diferente da crotoxina. Os ratos são os mais resistentes para a crotoxina e também para o veneno bruto. Albuminúria, oligúria e anúria foram sintomas frequentes encontrados, em cães, pela crotoxina e também em pacientes (Wajchembeg et al., 1954).

Vários sinais de envenenamento produzidos no homem pela mordedura da cascavel sul americana foram também observados nos animais que receberam crotoxina, tais como: ptose palpebral e de mandíbula, atonia da musculatura cervical, e paralisia geral dos músculos. De qualquer modo, a participação de outros componentes do veneno na gênese dos distúrbios renais e vômitos não são excluídos (Vital Brazil et al., 1966).

Na realização de estudo histopatológico em rins de coelhos, após o primeiro dia de inoculação por via endovenosa da crotoxina, foram encontradas alterações patológicas nos glomérulos e túbulos. Estudo histopatológico em microscopia eletrônica, 35 minutos após a injeção de crotoxina, não revelou lesões ostensivas no córtex, embora tenha diminuído o fluxo nesta região. A causa de tal efeito não se devia a trombose, pois esta se instalou posteriormente, e contribuiu para diminuir ainda mais o fluxo. A causa da vasoconstrição foi investigada através do tratamento prévio dos animais com reserpina, sendo que o efeito foi a diminuição do fluxo cortical sem significância estatística (Rovere et al., 1978).

Esta diminuição precoce da irrigação cortical causada pelo veneno é um fator que poderia contribuir para o desenvolvimento da insuficiência renal aguda (Rovere et al., 1978).

Através da inoculação de crotapotina no músculo foi possível observar que o sítio primário de ação da crotoxina é a membrana plasmática e está relacionado com hidrólise de fosfolípídeo (Barraviera, 1990).

Na ação “curare-like”, a neurotoxina liga-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina e assim previne a ação despolarizante da acetilcolina. A neurotoxina pré-sináptica inibe a liberação da acetilcolina, sendo extremamente letal (Hawgood e Smith, 1977).

A fosfolipase A_2 , encontrada no veneno da *C. durissus terrificus*, é uma proteína básica com peso molecular compreendido entre 14.500 e 16.400 Daltons e requer cálcio para exercer sua atividade em pH alcalino (Habermann e Breithaup, 1978). Coelhos imunizados com fosfolipase A_2 purificada de veneno de *Crotalus durissus terrificus* produzem anticorpos capazes de neutralizar a atividade neurotóxica presente na crotoxina purificada ou no veneno crotálico bruto (Bon e Jeng, 1979). Camundongos imunizados com fosfolipase A_2 purificada da peçonha da *Crotalus durissus terrificus* produziram anticorpos que neutralizaram a ação do veneno crotálico bruto, com títulos de anticorpos séricos específicos para a crotoxina, determinados pelo método de ELISA (Santos et al., 1988).

Experiências com equinos que receberam imunização com fosfolipase A_2 purificada da crotoxina, também mostraram uma proteção nos animais, quanto ao efeito letal causado pelo veneno da

Crotalus durissus terrificus (200mg) quando este foi inoculado quatro meses após a imunização. Portanto a fosfolipase A₂ pode ser usada como antígeno protetor do efeito letal causado pelo respectivo veneno. É importante salientar que a dose de 200mg do veneno seco de *Crotalus durissus terrificus* é um valor quatro vezes maior de quantidade de veneno que pode ser retirado por extração manual de 75% de serpentes desta espécie (Santos et al., 1988).

Os efeitos renais causados pelo veneno da *C. durissus terrificus* podem ocorrer por ação direta e/ou indireta (Raab e Kaiser, 1966). Muitas pesquisas já foram realizadas desde a afirmação desses autores, na tentativa de elucidar o mecanismo de nefrotoxicidade causado pelo referido veneno. O sistema de rim isolado permite eliminar as manifestações sistêmicas que atuam sobre a função renal, constituindo-se em um modelo experimental bastante vantajoso para avaliar a ação direta das substâncias no rim.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a nefrotoxicidade causada pelo veneno da *Crotalus durissus terrificus* e pela sua principal fração, a crotoxina, em sistema de rim isolado, ou seja, onde não há interferência de fatores sistêmicos.

Os objetivos específicos analisados foram:

a) Determinar as alterações das funções renais causadas pelo veneno da *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina.

b) Relacionar as alterações histopatológicas e funcionais nos rins perfundidos com o veneno da *Crotalus durissus terrificus*, comparando-as com aquelas obtidas nos rins perfundidos com a crotoxina e com dexametasona antes e durante a perfusão com o veneno.

III. MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os ratos utilizados foram da cepa Wistar, com variação de peso entre 250 e 350g, de 90 a 120 dias de idade e provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Antes de cada experimento os animais foram previamente submetidos a jejum por um período de 24 horas e água *ad libitum*.

No planejamento das experiências, dois animais foram sempre preparados para evitar alguma casualidade, como problemas no decorrer do procedimento cirúrgico ou anormalidades anatomofisiológicas no animal que prejudicassem o andamento da experiência.

As experiências foram realizadas com cinco grupos de rins os quais foram perfundidos com:

- 1) Albumina (6g%)
- 2) Veneno da *Crotalus durissus terrificus* (1 μ g/ml)
- 3) Crotoxina (1 μ g/ml)
- 4) Crotoxina (2 μ g/ml)
- 5) Dexametasona (10 mg) + veneno (1 μ g/ml)

O número de rins perfundidos nos diferentes grupos grupo experimentais foram de 4 a 6.

PESAGEM DOS ANIMAIS

Todos os animais utilizados na parte experimental foram pesados

através de uma balança de precisão (Modelo METTLER PB 3000).

O rim esquerdo e direito dos ratos também foram pesados antes e após o corte histopatológico e a seguir foram colocados em estufa para inceração (Modelo Gram-ATIC).

TÉCNICA CIRÚRGICA

Após os animais terem sido pesados, foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Em seguida, o animal foi colocado na mesa cirúrgica e a veia femural foi isolada sendo administrado 3ml de manitol na concentração de 66,6mg/ml.

Foi realizada antissepsia da parede abdominal para depois proceder uma incisão mediana à linha alba, que vai desde o externo até a região púbica. Perpendicularmente, na metade dessa incisão cirúrgica, procedeu-se duas outras incisões em direção aos flancos, ou seja, uma do lado esquerdo e outra do lado direito.

Para o manuseio do rim direito, as vísceras abdominais foram afastadas para o lado esquerdo e mantidas úmidas usando-se soro fisiológico na temperatura de 37°C. Este processo permite um maior campo cirúrgico e melhor visualização das estruturas anatômicas a serem utilizadas. O ureter direito foi dissecado e obstruído distalmente, seguindo-se, então, sua canulação com um tubo de polietileno (PE 50).

A artéria supra-renal direita e a glândula supra-renal direita foram identificadas, isoladas, seccionadas, e em seguida, o rim foi descapsulado. Usou-se uma lupa (7x) para identificar e dessecar a artéria mesentérica superior e a artéria renal direita, observando a existência de linearidade entre elas (Fig. 2).

O rim foi isolado com pinças hemostáticas e a artéria renal foi canulada pela artéria mesentérica. Logo após o rim foi estipado juntamente com o ureter e fixado a cânula perfusora do sistema sem interrupção do fluxo.

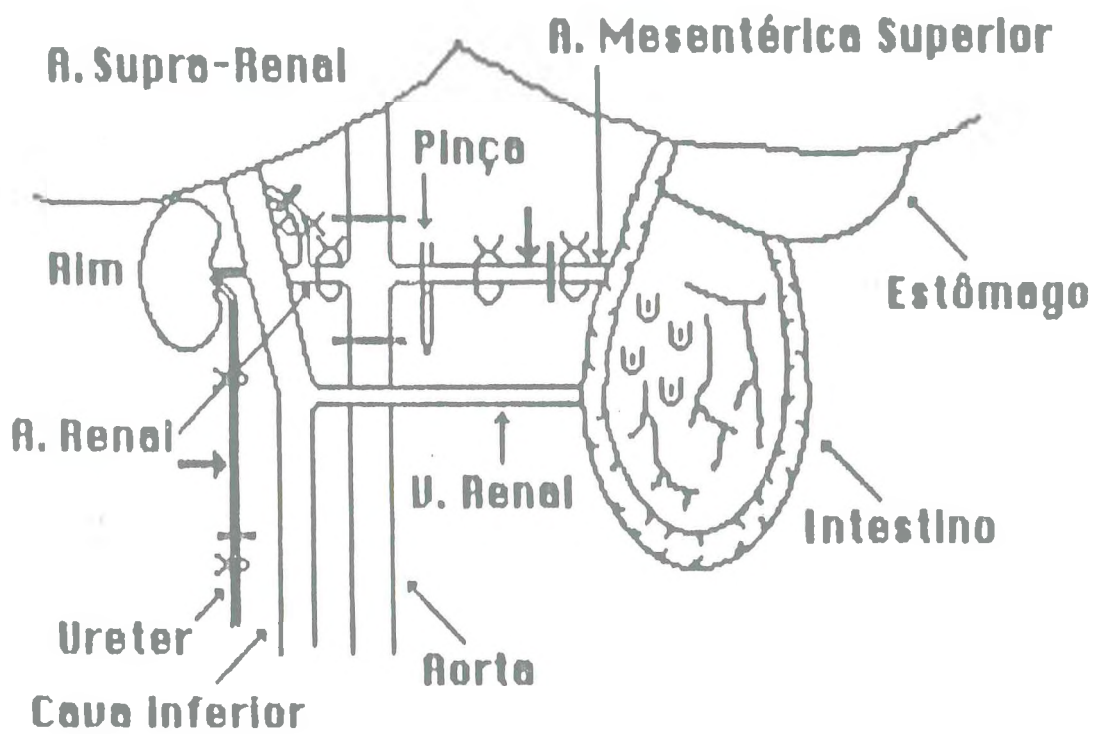


FIGURA 2: Desenho esquemático das Estruturas Renais e Peri-Renais

SOLUÇÃO PERFUSORA

A solução usada para perfundir o sistema de rim isolado passou por várias etapas de preparo, tendo sido iniciada com a solução de Krebs-Henseleit concentrada 20 vezes, de acordo com as quantidades abaixo:

NaCl	138,50g
KCl	1,85g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3,2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5,8
Uréia	10,0g

Antes de sofrer o processo de diálise por 48 horas, foram retirados 100ml da solução acima e adicionados os constituintes a seguir:

NaHCO ₃	4,2g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,74g
Glicose	2,0g

Completo-se o volume com água bidestilada até 2000ml e acrescentou-se 50mg de penicilina (Squibb). Foi retirado 300ml desta solução e adicionou-se albumina bovina a 6g% (fração V Sigma). A seguir foi dializada durante 48 horas com refrigeração a 4°C, e uso de homogeneizador. A solução restante (1700ml) serviu como solução dializadora, sendo trocada a cada 24 horas. Após a diálise foi acrescentada a inulina (0,150g). Ao final da diálise o pH foi ajustado entre 7,3 e 7,4.

SISTEMA DE PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

Após a nefrectomia direita, o rim foi acoplado ao sistema de perfusão cuja solução, previamente recirculada, aquecida e oxigenada, foi desviada para o sistema *in situ*. Foi iniciada assim a perfusão do

órgão, com o cuidado de antes eliminar bolhas que pudessem estar presentes. Este cuidado é válido para evitar embolia.

Uma torneira adaptada a cânula, no momento da perfusão “in situ”, permitia a passagem do fluxo de perfusão, através da gravidade. A seguir, a cânula do uréter foi colocada em posição adequada, para permitir a coleta das amostras de urina nos referidos intervalos de tempo.

Hoje existem dois modelos para a perfusão do rim isolado, o sistema aberto e o sistema de perfusão com recirculação e diálise: o sistema aberto em que o perfusato não recircula através do rim, e que possui como principal vantagem a manutenção constante de parâmetros funcionais renais, apresentando um elevado gasto de albumina. O sistema de perfusão com recirculação e diálise apresenta algumas vantagens, tais como: manutenção constante de parâmetros funcionais renais, utilização de albumina ou outras substâncias na solução perfusora em pequena quantidade, manutenção constante de substâncias dialisáveis no perfusato e a oxigenação adaptada no próprio dialisador.

O sistema de perfusão sofreu modificações durante o seu uso devido descobertas que propiciaram melhoras consideráveis para o seu funcionamento, tais como a introdução da albumina bovina (Fração V) pura na solução (Bowman, 1972, Schurek et al., 1978, Schurek e Alt., 1981, Ross et al., 1978, Bowman e Maack, 1974, Little e Cohen, 1974, De Mello e Maack, 1976), o uso da solução de Krebs Henseleit (Schurek, 1980), a adição de substratos na solução perfusora como glicose, aminoácido, lactato, oxalacetato, piruvato (Bahlman et al., 1967, Nishiitsuji-Uwo et al., 1967, De Melo e Maack, 1976, Trimble e Bowman, 1973).

Para melhorar as condições do sistema de perfusão foi utilizado um filtro do tipo miliporo para rim de rato (Ross et al., 1973, Cohen et al., 1977, Fonteles, 1980, Fonteles, 1982) baseado no modelo de Hamilton et al. (1974).

Em nosso trabalho utilizamos o sistema de perfusão que se baseia nas idéias pioneiras de Weiss et al. (1959) e no sistema descrito por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978) com modificações feitas por Fonteles (1980), através da introdução de um pulmão artificial do tipo silástico (Figura 3).

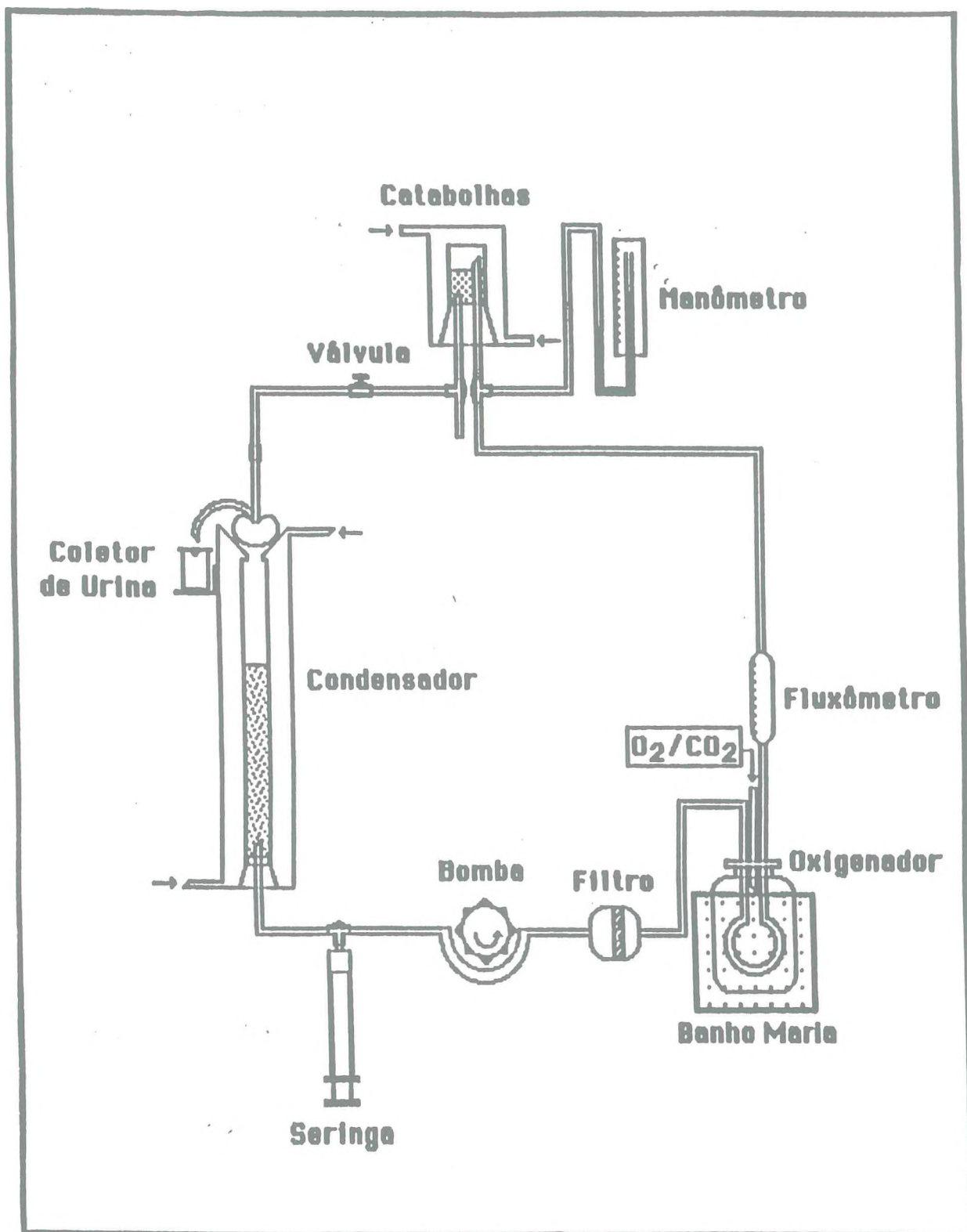


FIGURA 3: Sistema de perfusão - o desenho acima mostra o rim direito de rato com canulação no ureter e acoplado ao sistema de perfusão.

CALIBRAÇÃO DO SISTEMA DE PERFUSÃO

Inicialmente o sistema de perfusão foi montado e limpo com detergente líquido e água bidestilada aquecida. Seguindo este processo, o sistema foi calibrado através da realização de duas curvas onde se utilizou como variáveis a pressão e o fluxo. A água bidestilada foi colocada no sistema para a calibração.

O sistema é constituído por uma bomba de perfusão que possui cinco velocidades e em cada velocidade foi medido o fluxo, na ponta da cânula, em ml/min e a correspondente pressão de perfusão em mmHg. Elaborou-se no final deste procedimento duas curvas de calibração, sendo que ambas possuem a velocidade da bomba no eixo dos x e o fluxo obtido em ml/min e a pressão em mmHg no eixo dos y.

Os gráficos são representados nas figuras 4 e 5 através da calibração realizada em diversos experimentos.

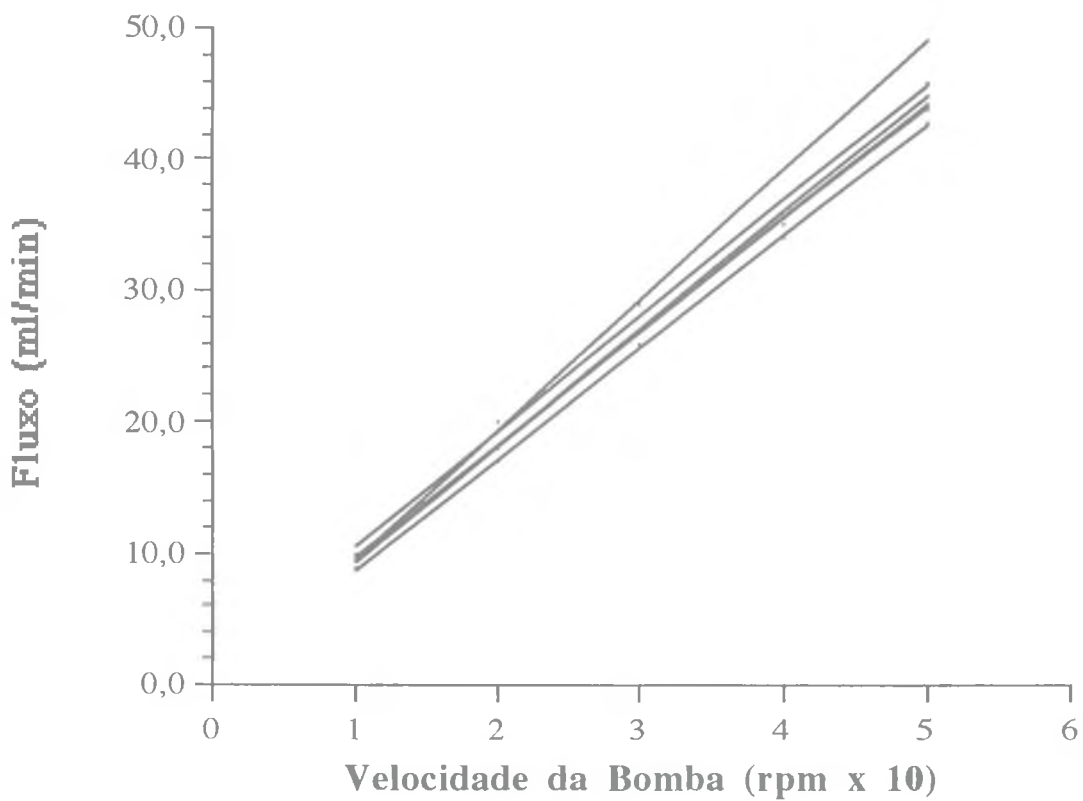


FIGURA 4: Retas de Calibração de Fluxo

A figura mostra as variações da velocidade da bomba e do volume obtidos em mesmo período de tempo nas diferentes velocidades da bomba de perfusão, antes do experimento do grupo controle (n=6).

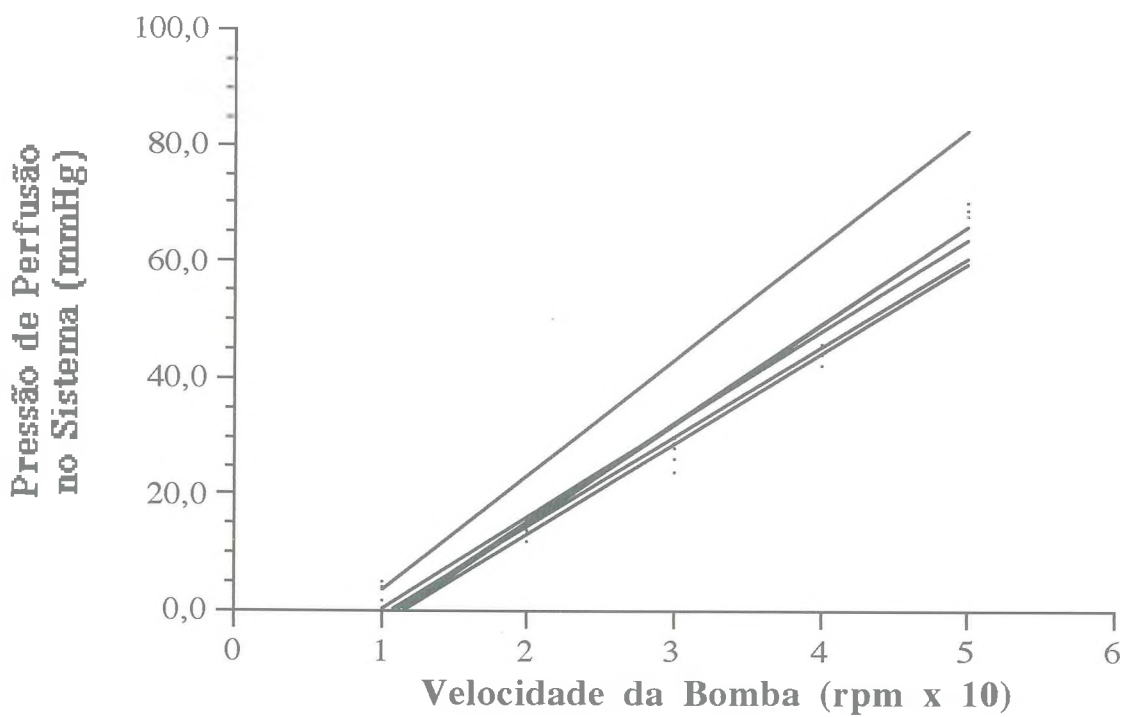


FIGURA 5: Retas de Calibração de Pressão de Perfusão

A figura mostra o registro de pressão em função da velocidade da bomba perfusora, no mesmo período de tempo em diferentes velocidades da bomba de perfusão, antes do experimento do grupo controle (n=6).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O órgão foi acoplado ao sistema de perfusão e aguardou-se em média 20 minutos para a observação das características de pressão e fluxo do próprio rim. Este intervalo de tempo foi chamado período de estabilização. O experimento foi realizado a fluxo constante e apresentou a média de 17ml/min.

Após o período de estabilização foi retirado 1,5ml do perfusato do sistema, que foi considerado como a amostra “zero” do perfusato (P_0). A partir de então, a cada 10 minutos foi colhida uma amostra de urina e do perfusato até o final do experimento. Os primeiros 30 minutos a partir de P_0 funcionaram como controle interno, para que todas as variações ocorridas fossem melhor avaliadas. Após esse período foi colocado no sistema a crotoxina, o veneno ou a dexametasona. No grupo da dexametasona + veneno, o veneno foi colocado no sistema de perfusão no tempo de 60 minutos.

As amostras colhidas de perfusato e urina foram guardadas em freezer à temperatura de -20°C e posteriormente foram determinadas as concentrações de inulina, sódio, potássio e osmolaridade. As amostras urinárias, antes de serem guardadas no freezer, tiveram seus pesos anotados para a realização de cálculos posteriores (Modelo Gram - ATIC).

DETERMINAÇÃO DA ÁGUA E ELETRÓLITOS TISSULARES

O rim direito, após cada experimento, foi pesado e colocado numa estufa a 90°C por 48 horas para sofrer desidratação. O rim esquerdo não foi perfundido, mas sofreu o mesmo processo de pesagem e desidratação do rim direito. A água renal foi calculada pela diferença entre o peso úmido, antes de colocar na estufa, e o peso seco dos rins,

ou seja, após a retirada da estufa.

Posteriormente foram incinerados a 550°C durante 12 horas e em seguida foi adicionado 0,2ml de ácido nítrico concentrado em 2,0ml de água bidestilada sobre as cinzas e aquecidas a 100°C durante 2 a 3 minutos.

Após este processo o volume foi completado com 10ml de água bidestilada em tubo graduado e determinada a concentração tecidual de sódio e potássio em fotômetro de chama (Modelo 443). O método utilizado foi de Gregg et al., (1978). Ao final do procedimento utilizamos a seguinte fórmula:

$$K_t (\mu\text{Eq/g peso do rim}) = D_k \times 10\text{ml} / \text{peso seco do rim}$$

Onde: K_t - potássio tissular ou sódio tissular

D_k ($\mu\text{Eq/ml}$) = concentração de potássio ou sódio na amostra diluída.

CÁLCULO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS RENAIS

Foram utilizados para determinação dos parâmetros funcionais renais as fórmulas a seguir:

1. FU ($\text{ml.g}^{-1}\text{min}^{-1}$) = Fluxo urinário
 $FU = \text{Peso do volume urinário} / \text{peso do rim esquerdo} \times 10$
* Admitiu-se que a urina possui a mesma densidade de água ($d=1$).
2. RFG ($\text{ml.g}^{-1}\text{min}^{-1}$) = Ritmo de filtração glomerular
 $RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in}) \times FU$
 $\text{DOU in} = \text{Densidade ótica da inulina na urina}$
 $\text{DOP in} = \text{Densidade ótica da inulina no perfusato}$
3. RNa^+ = Concentração de sódio no perfusato

4. UNa^+ = Concentração de sódio na urina
5. $FNa^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Sódio filtrado
 $FNa^+ = RFG \times PNa^+$
6. $ENa^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Sódio excretado
 $ENa^+ = FU \times UNa^+$
7. $TNa^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Sódio transportado
 $TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$
8. $\%TNa^+$ = Percentual de sódio reabsorvido
 $\%TNa^+ = TNa^+ \times 100/FNa^+$
9. $FK^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Potássio filtrado
 $FK^+ = RFG \times PK^+$
 UK^+ = Concentração de potássio na urina
10. $EK^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Potássio excretado
 $EK^+ = FU \times UK^+$
 UK^+ = Concentração de potássio na urina
11. $TK^+(\mu Eq.g.^{-1}min^{-1})$ = Potássio transportado
 $TK^+ = FK^+ - EK^+$
12. $\%TK^+$ = Percentual de potássio transportado
 $\%TK^+ = TK^+ \times 100/FK^+$
13. $C_{osm} (ml.g.^{-1}min^{-1})$ = Clearance osmótico
 $C_{osm} = (U_{osm} / P_{osm}) \cdot FU$
 U_{osm} = Osmolaridade urinária
 P_{osm} = Osmolaridade do perfusato
14. $CH_2O (ml.g.^{-1}min^{-1})$ = Clearance de água livre
 $CH_2O = FU - C_{osm}$
15. $dTNa^+ (ml.g.^{-1}min^{-1})$ = Transporte distal de sódio
 $dTNa^+ = C_{H_2O} \times PNa^+$

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

$$\text{Ad} = \text{dTNa}^+ + \text{ENa}^+$$
17. %dTNa⁺ = Percentual de transporte distal de sódio

$$\% \text{dTNa}^+ = \text{dTNa}^+ \times 100/\text{Ed}$$
18. pTNa⁺ ($\mu\text{Eq.g.}^{-1}\text{min}^{-1}$) = Transporte proximal de sódio

$$\text{pTNa}^+ = \text{FNa}^+ - \text{Ed}$$
19. %pTNa⁺ = Percentual de transporte proximal de sódio

$$\% \text{pTNa}^+ = \text{pTNa}^+ \times 100/\text{FNa}^+$$
20. PP = Pressão de perfusão (mmHg) = Análise direta em manômetro

Todas estas fórmulas foram registradas em programa de computador Modelo Macintosh (LCII) para cálculos e estatística, no programa Statview.

PROCEDIMENTO BIOQUÍMICO

A análise bioquímica foi realizada através da medida de osmolaridade, dosagem dos eletrólitos e inulina da solução perfusora e urina.

Para a dosagem dos eletrólitos a metodologia utilizada foi fotometria de chama (Flame photometer - Modelo 443) e para a medida da osmolaridade foi utilizado o osmômetro (Advance Instruments, INC).

O método usado para a determinação da inulina foi hidrólise direta, conforme Walson et al. (1955) e Fonteles et al., (1983), com modificações que levaram a redução das quantidades de amostras e reagentes. As etapas para o procedimento experimental, foram as seguintes:

- a) Nos tubos de ensaio foram previamente colocados 1,0 ml de NaOH 1N;

- b) Adicionou-se 30 μ l de urina, perfusato ou água bidestilada (para padrão zero);
- c) Misturou-se o conteúdo em aparelho vótex-mixer (agitador);
- d) Colocou-se em seguida para aquecer à temperatura de 100°C durante 20 minutos e refriados em geladeira a 4°C durante 30 minutos;
- e) Acrescentou-se ainda 3,0ml de Difenilamina e repetiu-se a etapa descrita no item d;
- f) A leitura das densidades óticas das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (UNICAMPP) a 620 nanômetro.

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Ao final do experimento o rim perfundido (direito) e o rim controle (esquerdo) foram clivados, fixados em formol a 10% e, posteriormente, submetidos a processo de desidratação e diafanização para a confecção de cortes, os quais mediram 5mm de espessura. Em cada grupo experimental duas peças de rins direito e esquerdo foram separados para análise histopatológica. O estudo das lâminas foi realizado através de microscópio óptico (Embraeme)

Foram realizadas colorações em HE, PAS, MASSON e METANAMINA em 4 cortes de cada rim. Para o estudo das lâminas foi utilizado microscópio óptico. Os resultados obtidos, foram submetidos a análise semi-quantitativa, usando as seguintes denominações: 0 (ausente), + (leve ou ocasional), ++ (moderado), +++ (intenso).

SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA PRESENTE PESQUISA

- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- NaHCO₃ (Merck)
- MgSO₄ (Merck)
- CaCl₂ (Merck)
- Uréia (Carlos Erba)
- Penicilina G potássica cristalina (Squibb)
- Inulina (Sigma)
- Manitol (Darrow)
- Heparina (Roche)
- Albumina bovina Fração V (Sigma)
- Pentobarbital (Abbott)
- Veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Instituto Butantan)
- Crotoxina (Instituto Butantan)
- Dexametasona (Prodome)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada em computador tipo Macintosh LC II, Quadra 605. Usou-se o programa Statview.

Os resultados foram submetidos a análise estatística e expressos com média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). A significância estatística dentro do mesmo grupo foi calculada de acordo com o teste “t de Student”, para os dados pareados, obedecendo aos níveis de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,01$ (Hoel, 1981, Vieira, 1981). Os 30 minutos iniciais de cada experimento serviram como controle interno e os resultados obtidos após esse período foram comparados estatisticamente a ele.

Os resultados obtidos dos cálculos dos parâmetros funcionais renais foram representados em tabelas e gráficos. Cada parâmetro funcional renal está organizado separadamente e relacionado com o grupo controle, bem como com as substâncias testadas, ou seja, crotoxina, veneno da *Crotalus durissus terrificus* e dexametasona-veneno.

As tabelas e gráficos dos parâmetros funcionais renais foram analisados segundo a variável do tempo, que foi dividido em intervalos de 10 minutos. A dose das substâncias testadas foram divididas por 100ml, que é a quantidade da solução perfusora contida no sistema.

IV. RESULTADOS

O grupo controle albumina apresentou estabilidade de resultados do início até o final do experimento, nos parâmetros analisados. Os rins que receberam crotoxina na dose de $1\mu\text{g/ml}$ tiveram os valores do fluxo urinário com características de estabilidade (Figura 6).

Quando a dose da crotoxina foi aumentada para $2\mu\text{g/ml}$, ocorreu progressivo aumento no fluxo urinário a partir dos 30 minutos de experimento, mas somente em 50 minutos ocorreu significância estatística ($p < 0,05$). O gráfico representativo (Figura 6) mostra esse fato claramente, com aumento do fluxo urinário continuamente, sendo o pico máximo aos 70 minutos. Após esse período ocorreu uma diminuição do efeito nos 20 minutos finais. Apesar da queda dos valores, o resultado continua sendo significativamente aumentado em relação ao controle interno (30 minutos iniciais) e ao controle externo.

O fluxo urinário do grupo que recebeu o veneno da *C. durissus terrificus* ($1\mu\text{g/ml}$) permaneceu estável durante os 50 minutos iniciais do experimento, sendo que a partir dos 60 minutos ocorreu aumento gradativo até os 90 minutos (Figura 7). Este resultado é significativo estatisticamente ($p < 0,05$).

O grupo experimental que recebeu dexametasona, os valores do fluxo urinário, logo após sua introdução foram constantes. Seguido esse período, foi introduzido o veneno da *C. durissus terrificus* ($1\mu\text{g/ml}$) e os valores do fluxo urinário encontrados permaneceram muito próximo aos resultados do controle interno (ver apêndice - Tabela 6). Os valores apresentados por esse grupo foram semelhantes ao encontrado no grupo controle albumina (Figura 7).

A crotoxina nas duas doses utilizadas apresentou também diferentes resultados no ritmo de filtração glomerular (Figura 8). Na dose de $1\mu\text{g/ml}$ os valores não apresentaram mudanças significativas estatisticamente ao longo do experimento, comportando-se de maneira semelhante ao controle interno. Com a dose maior de crotoxina, $2\mu\text{g/ml}$ este parâmetro aumentou significativamente a partir de 30 minutos de experimento ($p < 0,05$).

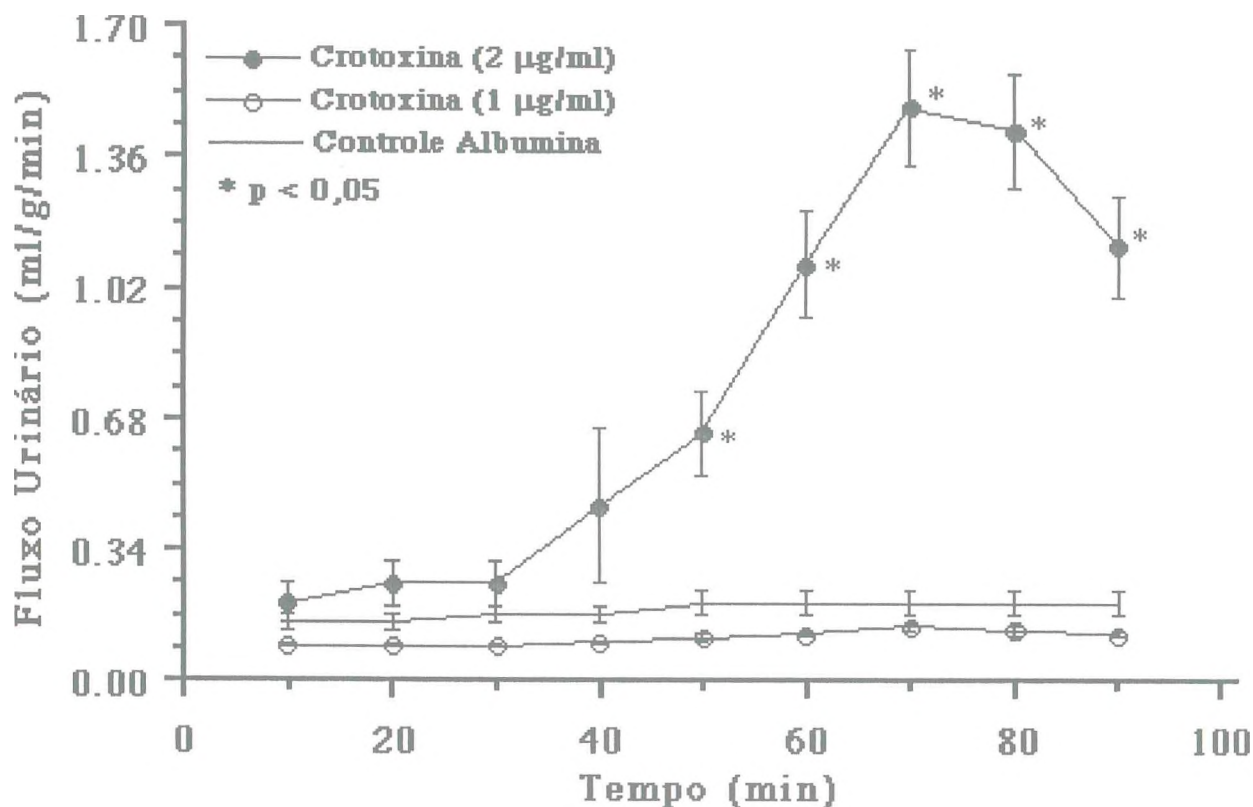


FIGURA 6: Fluxo urinário em rins perfundidos com crotoxina - o gráfico representa o fluxo urinário em rins dos grupos controle albumina e perfundidos com crotoxina nas doses de 1µg/ml e 2µg/ml. Os 30 min iniciais de experimento serviram como controle interno e seus resultados foram comparados aos efeitos ocorridos após esse período. A crotoxina foi introduzida no sistema aos 30 min.. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

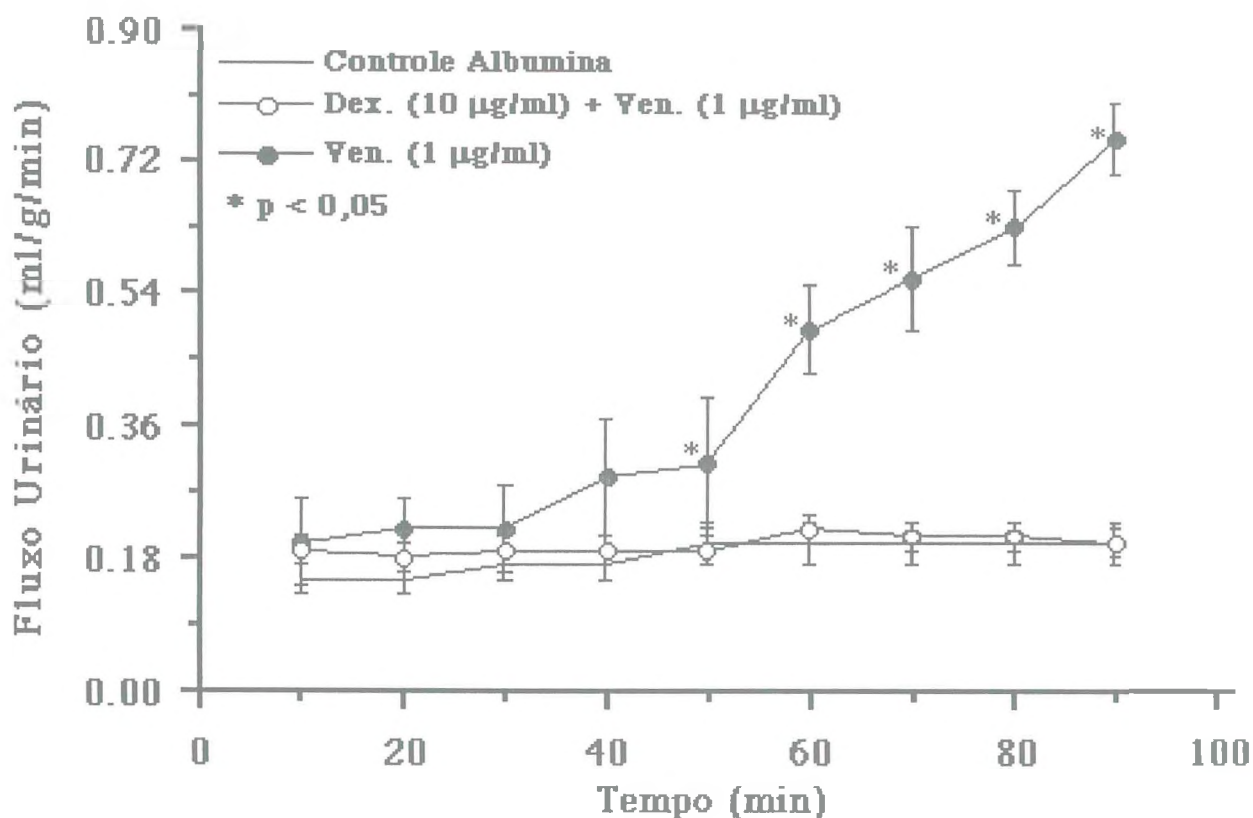


FIGURA 7: Fluxo urinário em rins perfundidos com veneno da *C.durissus terrificus* e dexametasona + veneno - o gráfico representa o fluxo urinário de rins dos grupos controle albumina e perfundidos com veneno (1µg/ml) e dexametasona (10µg/ml) introduzida previamente ao veneno (1µg/ml). A dexametasona foi colocada no sistema no tempo 10 e o veneno após os 30 minutos iniciais. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

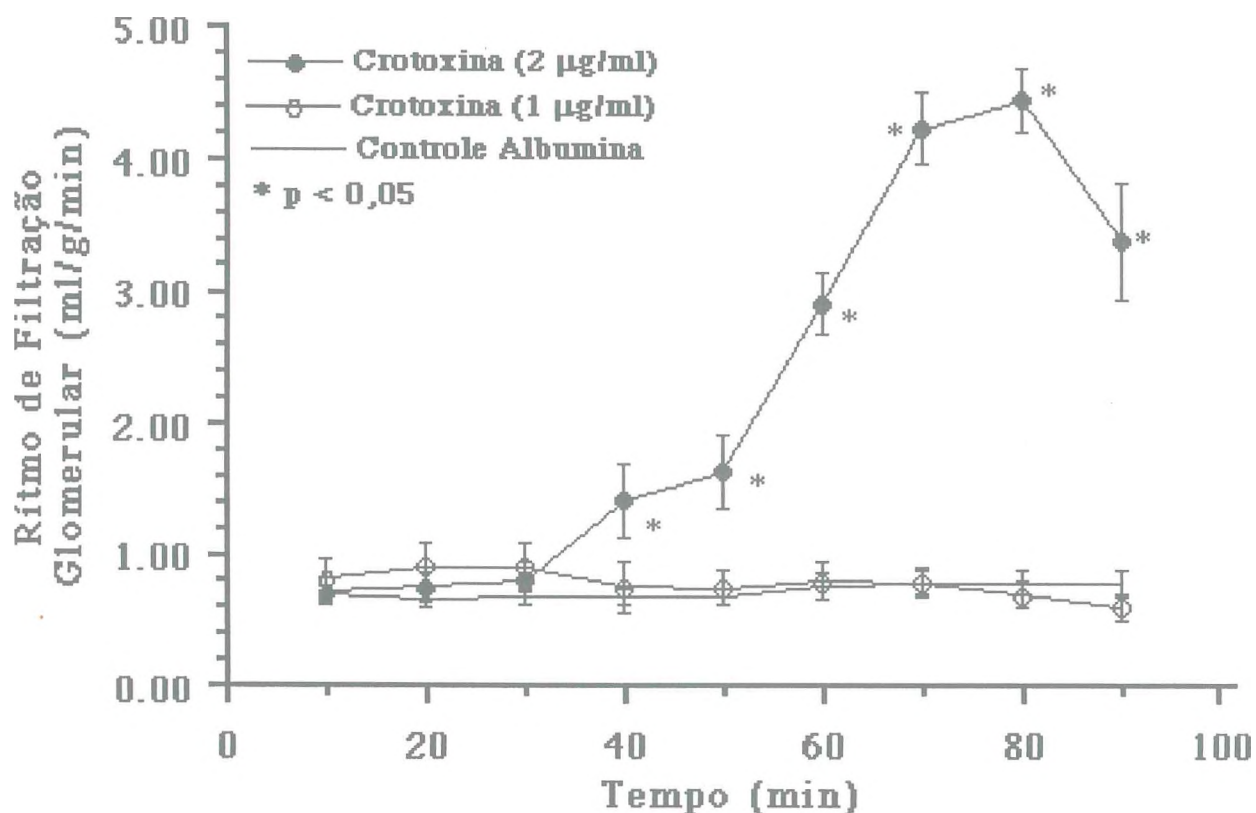


FIGURA 8: Ritmo de filtração glomerular em rins perfundidos com crotoxina - o gráfico representa o ritmo de filtração glomerular em rins dos grupos controle albumina e perfundidos com crotoxina nas doses de 1µg/ml e 2µg/ml. Os 30 min iniciais de experimento serviram como controle interno e seus resultados foram comparados aos efeitos ocorridos após esse período. A crotoxina foi introduzida no sistema aos 30 min.. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

O gráfico representativo do ritmo de filtração glomerular da crotoxina (Figura 8) mostra aumento gradativo desse efeito, até o tempo de 80 minutos e diminuição aos 90 minutos, contudo esta diminuição não foi significativa estatisticamente.

Os efeitos do veneno da *C. durissus terrificus* ($1\mu\text{g/ml}$) permaneceram estáveis durante os 50 minutos iniciais do experimento e o veneno causou modificações significativas ($p < 0,05$) no ritmo de filtração glomerular a partir dos 60 minutos de experimento (Figura 9).

A dexametasona manteve constante o ritmo de filtração glomerular. Após a introdução de $1\mu\text{g/ml}$ do veneno da *C. durissus terrificus* no tempo 30 minutos, também não ocorreu alteração desse parâmetro funcional (Figura 9). Os valores encontrados do início do experimento até o final foram bastante homogêneos.

A crotoxina na dose de $2\mu\text{g/ml}$ causou diminuição da pressão de perfusão aos 50 minutos de experimento, continuando a diminuir até os 90 minutos, com significância estatística ($p < 0,05$) (Figura 10). Porém com a dose menor de crotoxina ($1\mu\text{g/ml}$) não ocorreu modificações significativas desse parâmetro.

O grupo perfundido somente com o veneno da *C. durissus terrificus* não apresentou modificação significativa estatisticamente na pressão de perfusão durante toda a fase experimental, apesar de uma diminuição progressiva a partir dos 50 minutos.

O grupo referente a dexametasona ($10\mu\text{g/ml}$) + veneno ($1\mu\text{g/ml}$), apresentou estabilidade após a introdução da dexametasona na pressão de perfusão, enquanto que, quando o veneno foi adicionado ocorreu diminuição desta a partir dos 50 minutos de experimentação (Figura 11).

A crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) causou progressivo aumento do transporte de sódio nos 40 minutos de experimentos, com súbito aumento em 70 minutos (Figura 12). Porém a crotoxina $1\mu\text{g/ml}$ não causou modificação desse parâmetro.

O transporte de sódio do grupo rins que receberam veneno sofreu aumento de seus valores significativos estatisticamente após os 70 minutos de experimento e permaneceram aumentando cada vez mais até os 90 minutos (Figura 13). Quando $10\mu\text{g/ml}$ de dexametasona foi

colocada no sistema de perfusão previamente ao veneno esse efeito foi bloqueado (Figura 13).

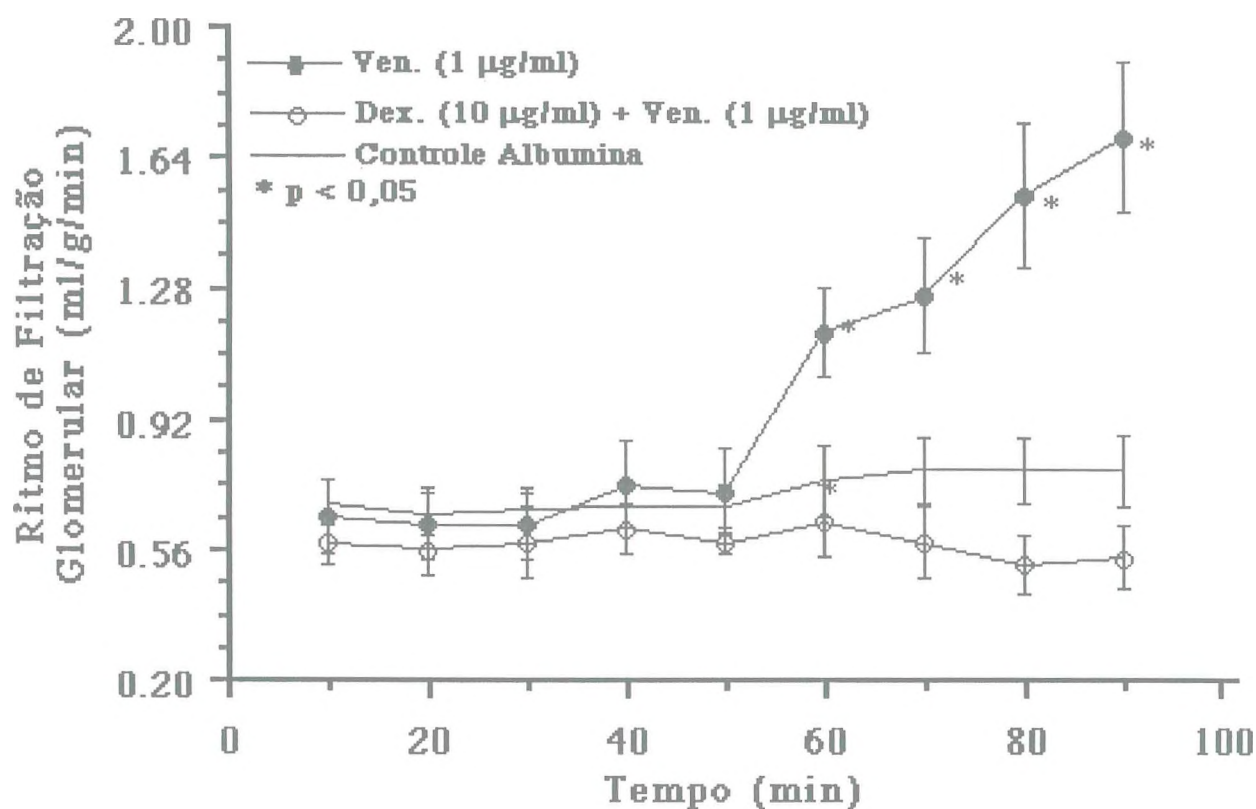


FIGURA 9: Ritmo de filtração glomerular em rins perfundidos com o veneno da *C. durissus terrificus* e dexametasona + veneno - o gráfico representa o ritmo de filtração glomerular de rins dos grupos controle albumina e tratados com veneno na dose de 1µg/ml e dexametasona(10µg/ml) introduzida previamente ao veneno 1µg/ml. O veneno foi introduzida no sistema após os 30 minutos iniciais, a dexametasona foi colocada no sistema no tempo 10. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

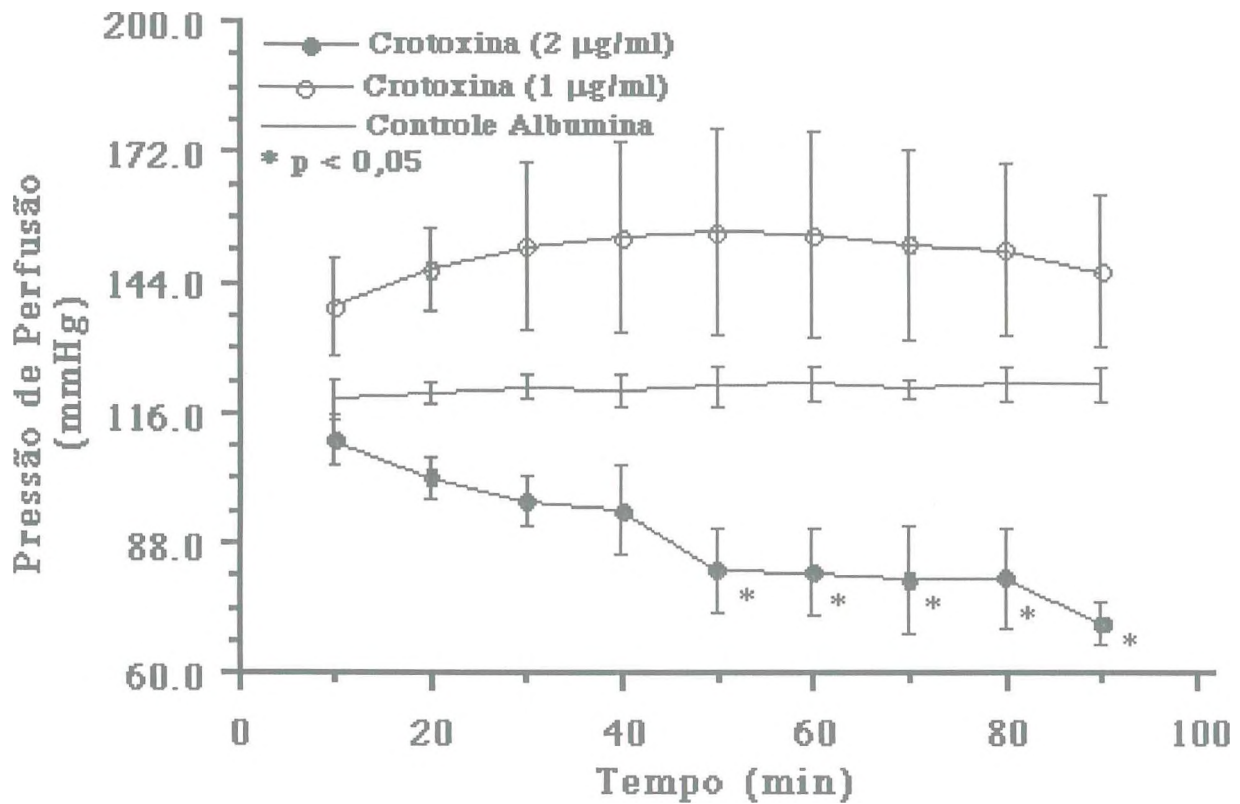


FIGURA 10: Pressão de perfusão em rins perfundidos com crotoxina - o gráfico representa o pressão de perfusão em rins dos grupos controle albumina e perfundidos com crotoxina nas doses de 1 µg/ml e 2 µg/ml. Os 30 min iniciais de experimento serviram como controle interno e seus resultados foram comparados aos efeitos ocorridos após esse período. A crotoxina foi introduzida no sistema aos 30 min.. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

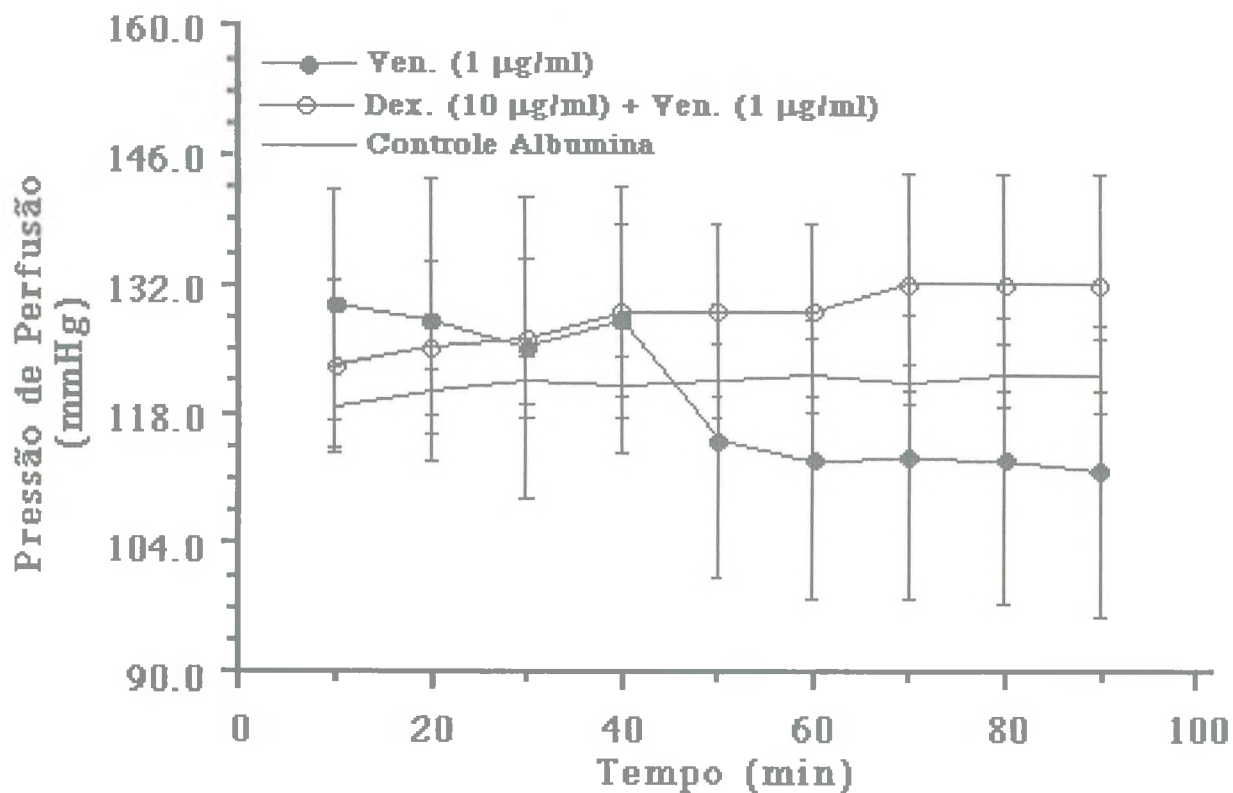


FIGURA 11: Pressão de perfusão em rins perfundidos com o veneno da *C. durissus terrificus* e dexametasona + veneno - o gráfico representa a pressão de perfusão de rins dos grupos controle albumina e tratados com veneno na dose de $1\mu\text{g/ml}$ e dexametasona ($10\mu\text{g/ml}$) introduzida previamente ao veneno $1\mu\text{g/ml}$. O veneno foi introduzida no sistema após os 30 minutos iniciais, a dexametasona foi colocada no sistema no tempo 10. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

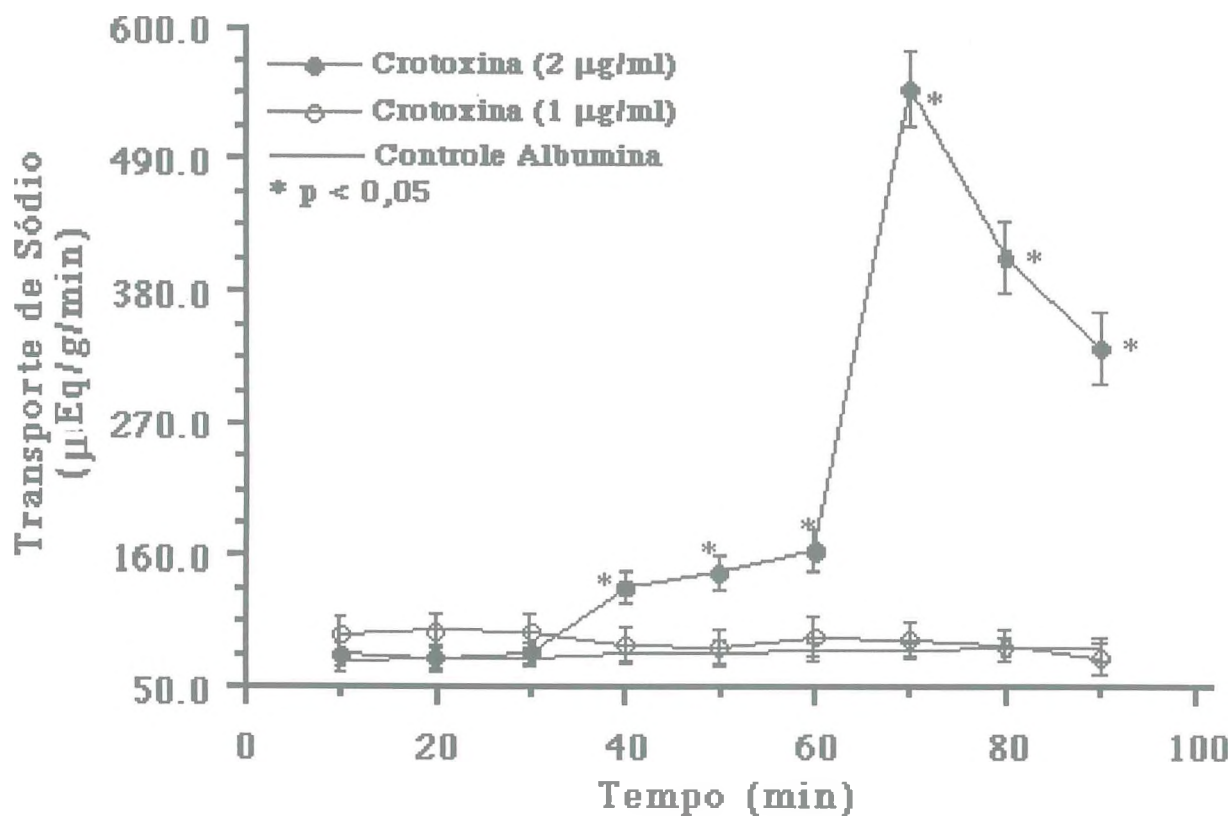


FIGURA 12: Transporte de sódio tubular em rins perfundidos com crotoxina - o gráfico representa o transporte de sódio tubular em rins dos grupos controle albumina e perfundidos com crotoxina nas doses de $1\mu\text{g/ml}$ e $2\mu\text{g/ml}$. Os 30 min iniciais de experimento serviram como controle interno e seus resultados foram comparados aos efeitos ocorridos após esse período. A crotoxina foi introduzida no sistema aos 30 min.. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

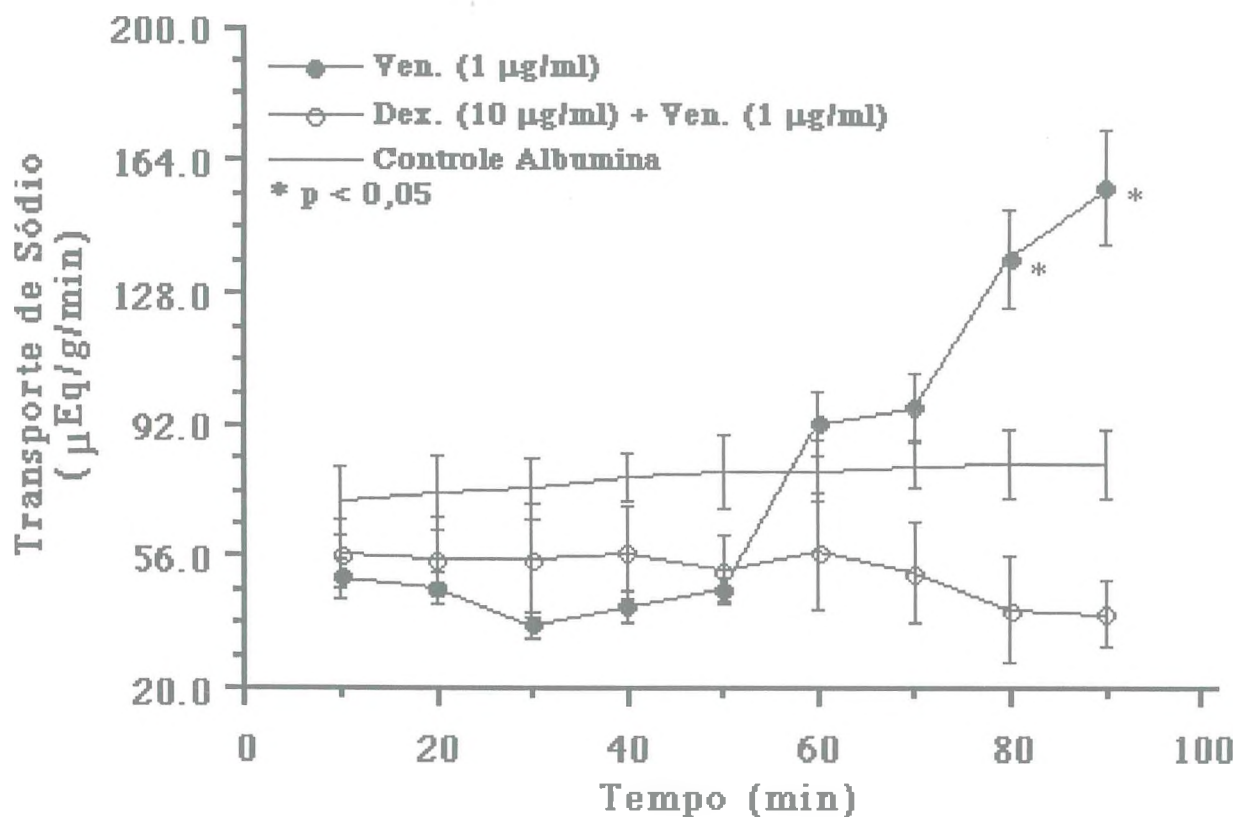


FIGURA 13 : Transporte de sódio tubular em rins perfundidos com o veneno da *C. durissus terrificus* e dexametasona + veneno - o gráfico representa o transporte de sódio tubular de rins dos grupos controle albumina e tratados com veneno na dose de 1µg/ml e dexametasona(10µg/ml) introduzida previamente ao veneno 1µg/ml. O veneno foi introduzida no sistema após os 30 minutos iniciais, a dexametasona foi colocada no sistema no tempo 10. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

Os grupos controle albumina e crotoxina nas duas doses não apresentaram modificações do percentual do transporte de sódio, enquanto que os grupos de rins que foram perfundidos com o veneno e com a dexametasona + veneno mostraram redução desse parâmetro a partir dos tempos 40 e 110 minutos respectivamente (Tabela 2).

O percentual do transporte de sódio apresentou modificações com significância durante a experimentação com o veneno da *C. durissus terrificus*, através da diminuição dos seus valores a partir dos 40 minutos. Este efeito não ocorreu no grupo dexametasona + veneno, pois o grupo manteve estabilidade durante todo o experimento (Tabela 2).

O percentual do transporte proximal de sódio não apresentou mudanças em nenhum dos grupos experimentais (Tabela 3).

Na análise do transporte de potássio o grupo controle albumina apresentou homogeneidade de resultados durante toda a fase experimental (Figura 14). O mesmo aconteceu com rins perfundidos com crotoxina 1 μ g/ml. Porém com a crotoxina na dose de 2 μ g/ml aconteceu um aumento súbito nos 40 minutos de experimentação, sendo que somente com 50 minutos esse resultado foi significativo estatisticamente (Figura 14). Este gráfico apresentou nos 70 minutos de experimento pico máximo de resultado, sendo que a partir desse tempo ocorreu progressiva queda, ou seja em 80 e 90 minutos. Esta diminuição no transporte de potássio no final do experimento ocorreu em relação os 70 e 80 minutos, e não com relação ao controle interno. Estes valores encontram-se aumentados e estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

O veneno da *C. durissus terrificus* causou no transporte de potássio aumento contínuo a partir de 60 minutos com pico máximo de 90 minutos (Figura 15). Quando 10 μ g/ml de dexametasona foi colocada no sistema de perfusão previamente ao veneno esse efeito não aconteceu (Figura 15).

O percentual do transporte de potássio não apresentou modificações durante a experimentação com a crotoxina (Tabela 4). O veneno da *C. durissus terrificus*, provocou a redução de seus valores no tempo de 70 e 90 minutos. No grupo dexametasona + veneno ocorreu estabilidade nos valores do percentual do transporte de potássio (Tabela 4). O percentual do transporte de potássio comportou-se de forma bastante estável no grupo controle (Tabela 4).

TABELA 2: Percentual do Transporte de Sódio em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 µg/ml)	Crotoxina (2 µg/ml)	Veneno (1 µg/ml)	Dexametasona (10 µg/ml) + Veneno (1 µg/ml)
10	78,08 ± 1,57	87,10 ± 6,66	73,24 ± 2,19	70,41 ± 1,01	69,62 ± 6,01
20	75,28 ± 2,28	88,28 ± 6,01	74,25 ± 2,14	70,00 ± 0,80	74,75 ± 4,21
30	77,05 ± 2,14	88,09 ± 5,73	71,21 ± 3,26	67,35 ± 0,96	74,81 ± 5,56
40	76,45 ± 2,39	85,79 ± 5,20	67,15 ± 3,99	63,90 ± 0,95*	69,42 ± 9,27
50	77,35 ± 2,60	85,08 ± 5,01	65,21 ± 4,62	63,06 ± 0,93*	70,21 ± 10,09
60	77,88 ± 2,69	87,74 ± 3,80	70,97 ± 3,16	62,64 ± 1,09*	68,37 ± 10,57
70	78,38 ± 2,02	86,78 ± 3,89	75,71 ± 4,63	61,66 ± 1,11*	70,27 ± 10,09
80	78,45 ± 2,02	86,39 ± 3,44	68,68 ± 8,84	63,84 ± 1,17*	68,37 ± 10,57
90	78,45 ± 1,94	85,98 ± 5,78	68,98 ± 5,78	61,18 ± 1,31	64,36 ± 11,77
100	66,67 ± 5,47	---	---	---	63,09 ± 12,15
110	64,54 ± 3,24	---	---	---	57,95 ± 7,55*
120	63,19 ± 3,56	---	---	---	58,95 ± 7,93*

Os dados representam a média ± E.P.M.* p<0,05.

TABELA 3: Percentual do Transporte Proximal de Sódio em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 µg/ml)	Crotoxina (2 µg/ml)	Veneno (1 µg/ml)	Dexametasona (10 µg/ml) + Veneno (1 µg/ml)
10	77,80 ± 1,16	74,22 ± 10,45	63,20 ± 8,07	64,20 ± 5,51	66,81 ± 6,78
20	74,95 ± 1,39	75,18 ± 9,53	62,14 ± 8,97	64,84 ± 5,21	71,56 ± 4,91
30	76,50 ± 1,12	76,69 ± 8,43	60,81 ± 7,64	61,77 ± 5,60	71,42 ± 6,12
40	75,73 ± 1,24	71,16 ± 8,97	58,46 ± 5,50	57,45 ± 6,22	64,50 ± 10,30
50	76,48 ± 1,43	75,15 ± 9,71	61,46 ± 5,69	56,59 ± 6,52	64,81 ± 11,26
60	77,08 ± 2,34	72,33 ± 9,45	63,15 ± 6,76	55,75 ± 6,54	63,50 ± 10,08
70	77,28 ± 1,27	75,69 ± 9,14	63,68 ± 6,76	55,78 ± 7,33	65,10 ± 9,93
80	77,30 ± 1,66	72,24 ± 10,77	62,76 ± 5,83	57,69 ± 6,02	64,02 ± 10,51
90	78,03 ± 1,45	70,42 ± 11,65	60,82 ± 5,87	53,94 ± 7,07	58,35 ± 13,12
100		---	---	---	60,78 ± 11,86
110		---	---	---	54,49 ± 8,97
120		---	---	---	52,14 ± 9,47

Os dados representam a média ± E.P.M.

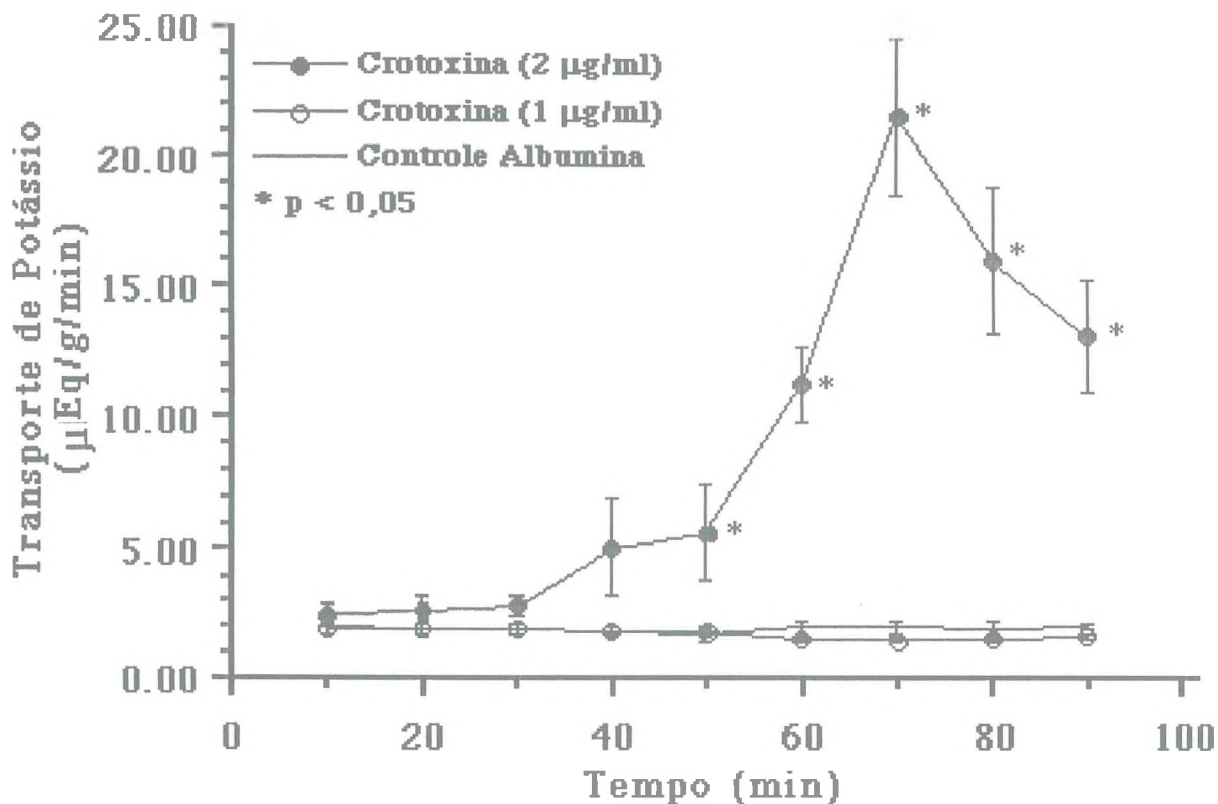


FIGURA 14: Transporte de potássio tubular em rins perfundidos com crotoxina - o gráfico representa o transporte de potássio tubular em rins dos grupos controle albumina e perfundidos com crotoxina nas doses de $1\mu\text{g/ml}$ e $2\mu\text{g/ml}$. Os 30 nin iniciais de experimento serviram como controle interno e seus resultados foram comparados aos efeitos ocorridos após esse período. A crotoxina foi introduzida no sistema aos 30 min.. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

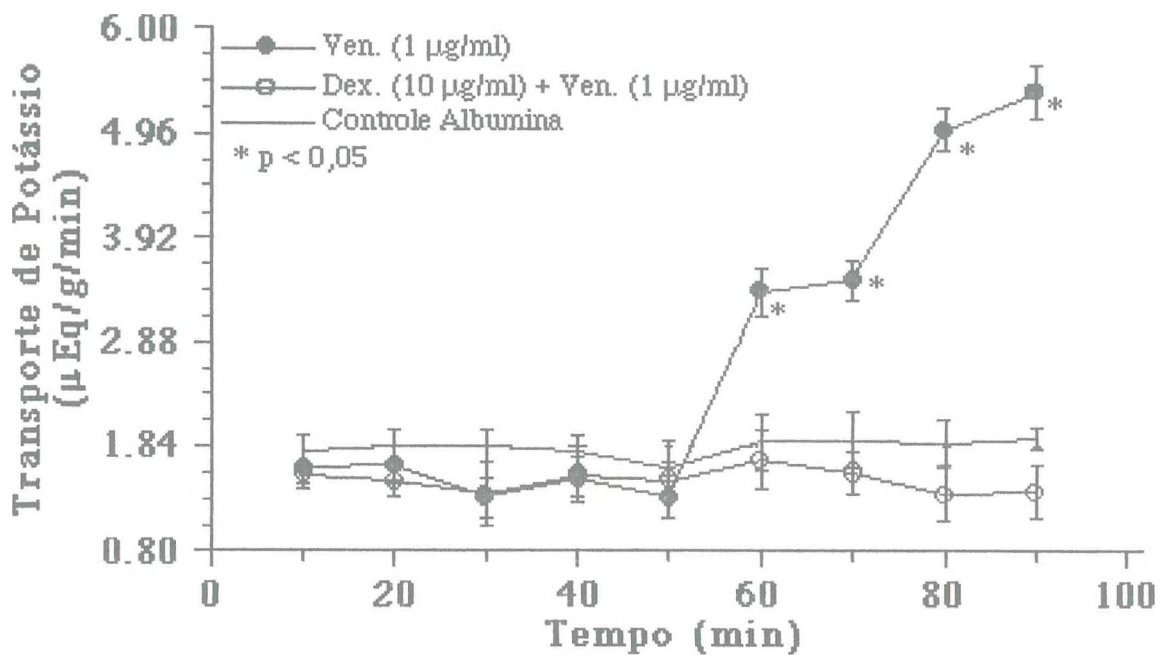


FIGURA 14: Transporte de potássio tubular em rins perfundidos com o veneno da *C. durissus terrificus* e dexametasona + veneno - o gráfico representa o transporte de potássio tubular de rins dos grupos controle albumina e perfundidos com veneno na dose de $1\mu\text{g/ml}$ e dexametasona ($10\mu\text{g/ml}$) introduzida previamente ao veneno $1\mu\text{g/ml}$. O veneno foi introduzido no sistema após os 30 minutos iniciais, a dexametazona foi colocada no sistema no tempo 10. Os dados representam a média e o erro padrão da média.

TABELA 4: Percentual do Transporte de Potássio em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 µg/ml)	Crotoxina (2 µg/ml)	Veneno (1 µg/ml)	Dexametasona (10 µg/ml) + Veneno (1 µg/ml)
10	61,56 ± 4,44	71,17 ± 12,43	59,53 ± 6,00	67,55 ± 5,82	60,63 ± 5,52
20	59,28 ± 4,16	72,80 ± 13,55	60,10 ± 3,30	67,59 ± 5,20	70,10 ± 5,20
30	62,23 ± 4,49	69,51 ± 12,16	61,62 ± 2,79	66,01 ± 5,37	74,01 ± 4,05
40	63,50 ± 2,79	45,92 ± 16,38	61,90 ± 2,79	63,10 ± 5,80	60,60 ± 4,55
50	65,68 ± 3,59	50,12 ± 12,97	62,75 ± 2,17	62,20 ± 4,37	61,14 ± 3,52
60	66,35 ± 2,83	64,83 ± 8,67	69,08 ± 1,15	63,05 ± 3,85	64,53 ± 2,22
70	65,14 ± 3,06	67,53 ± 6,48	74,35 ± 2,28	58,98 ± 2,79*	78,86 ± 2,65
80	64,18 ± 4,00	66,55 ± 3,86	67,07 ± 4,46	60,68 ± 2,00	79,52 ± 5,68
90	65,24 ± 6,00	64,86 ± 4,60	68,86 ± 2,83	54,19 ± 1,89*	77,06 ± 6,37
100	66,67 ± 5,47	---	---	---	77,89 ± 6,21
110	64,54 ± 3,24	---	---	---	67,06 ± 4,93
120	63,19 ± 3,56	---	---	---	74,56 ± 7,17

Os dados representam a média ± E.P.M.* p<0,05.

No grupo controle e crotoxina ($1\mu\text{g/ml}$) a composição eletrolítica tecidual dos íons sódio não apresentou no rim perfundido e não perfundido diferença estatística (Figura 16).

Os grupos referentes a crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$), veneno e dexametasona + veneno apresentaram aumento significativo estatisticamente ($p < 0,05$) da composição eletrolítica do íon sódio nos rins perfundidos (Figura 16).

Os grupos controle albumina e crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) não apresentaram diferença significativa entre o valor do potássio tissular do rim perfundido e não perfundido. Sendo que esse valor foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) nos grupos crotoxina ($1\mu\text{g/ml}$), veneno e dexametasona + veneno (Figura 17).

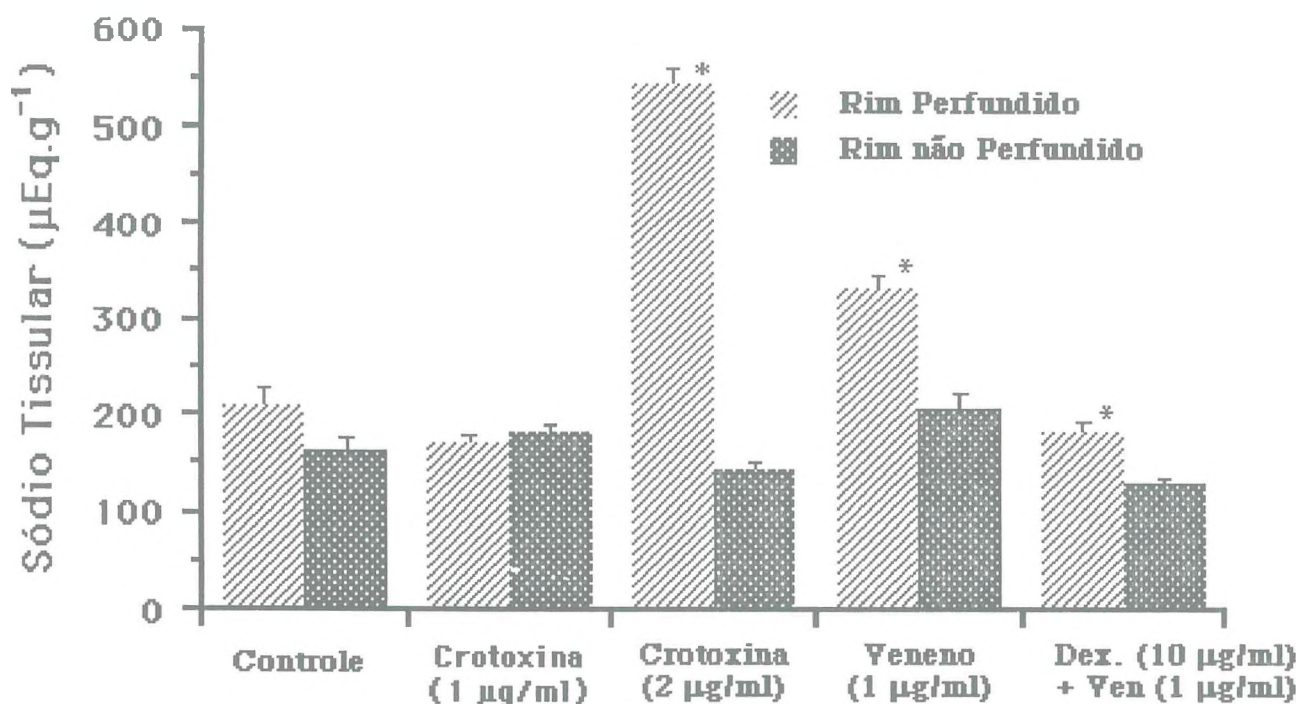


FIGURA 16: Composição eletrolítica tecidual do sódio - o gráfico acima representa o teor de sódio nos rins perfundidos e não perfundidos nos diferentes grupos. Os dados representam a média e o erro padrão da média. O teste estatístico utilizado foi teste "t de Student".

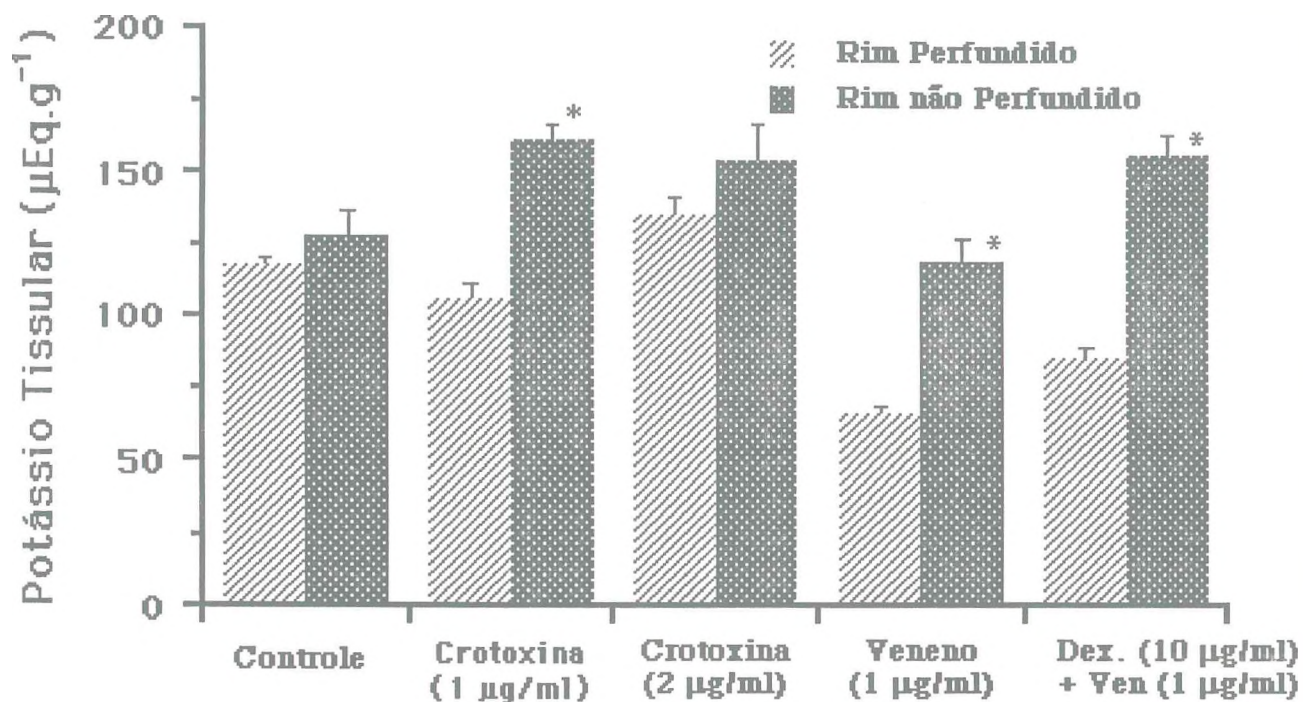


FIGURA 17 : Composição eletrolítica tecidual do potássio - o gráfico acima representa o teor de potássio nos rins perfundidos e não perfundidos nos diferentes grupos. Os dados representam a média e o erro padrão da média. O teste estatístico utilizado foi teste "t de Student".

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os resultados do estudo histopatológico dos rins dos diferentes grupos de rins perfundidos encontram-se sumarizados na Tabela 5. O grupo controle albumina apresentou ocasionalmente degeneração albumino-granulosa e focos de esclerose intersticial.

A crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) e o veneno apresentaram leves focos de esclerose intersticial e cilindros hialinos tubulares, bem como intenso depósito protéico no espaço urinário e tubular, hialinização das células tubulares e focos de perda tubular com dilatação e infiltração intersticial (Tabela 5). Os efeitos do veneno sobre o rim de rato podem ser visualizados através da fotografia obtida no microscópio óptico (Figura 18).

O grupo de rins perfundidos com a dexametasona previamente ao veneno da *C. durissus terrificus* apresentou ocasional depósito protéico no espaço urinário e tubular, cilindros hialinos e focos de perda tubular com dilatação e infiltração intersticial (Tabela 5). Portanto os efeitos obtidos neste grupo após análise histopatológica foram bastante próximos daqueles encontrados no grupo controle albumina. Uma das imagens obtidas no microscópio óptico desse grupo encontra-se na figura 19.

TABELA 5: Análise Histopatológica em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina (2 μ g/ml), Veneno da *C. durissus terrificus* (1 μ g/ml) e Dexametasona (10 μ g/ml) + Veneno da *C. durissus terrificus* (1 μ g/ml).

	Controle (n = 6)	Crotoxina (n = 4)	Veneno (n = 4)	Dexamet. + Veneno (n = 4)
Degeneração Albumina-Granulosa (Túbulos e Glomérulos)	(+)	(0)	(+)	(0)
Focos de Esclerose (Interstício)	(+)	(+)	(+)	(0)
Depósito Protéico (Espaço Urinário e Túbulos)	(0)	(+ + +)	(+ + +)	(+)
Cilindros Hialinos (Tubulares)	(0)	(+)	(+)	(+)
Hialinização (Células Tubulares)	(0)	(+ + +)	(+ + +)	(0)
Focos de Perda Tubular com dilatação infiltrado discreto (Interstício)	(0)	(+ + +)	(+ + +)	(0)

Obs: 0 (Ausente); + (Ocasional ou leve); + + (Moderado); + + + (Intenso).

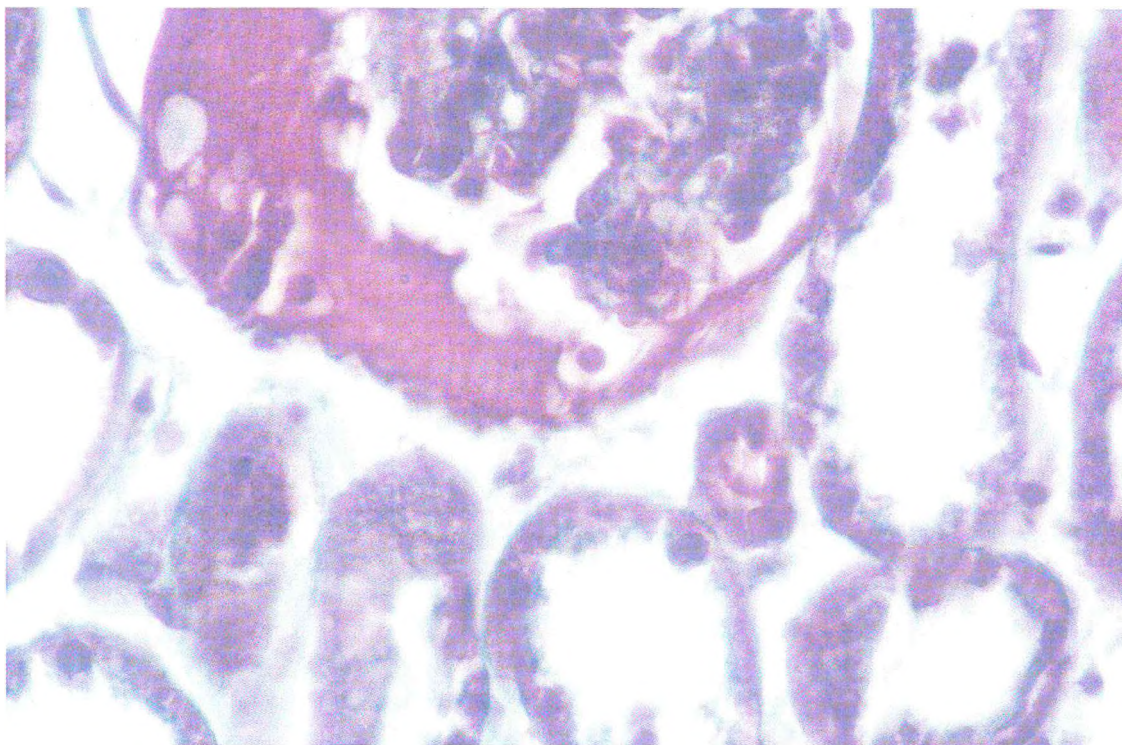


FIGURA 18: Fotografia referente ao rim direito de rato perfundido com veneno da *Crotalus durissus terrificus* (1 μ g/ml).

A figura acima detalha tanto o derrame protéico (a) no espaço urinário (Trichomico de MASSON, 400X).

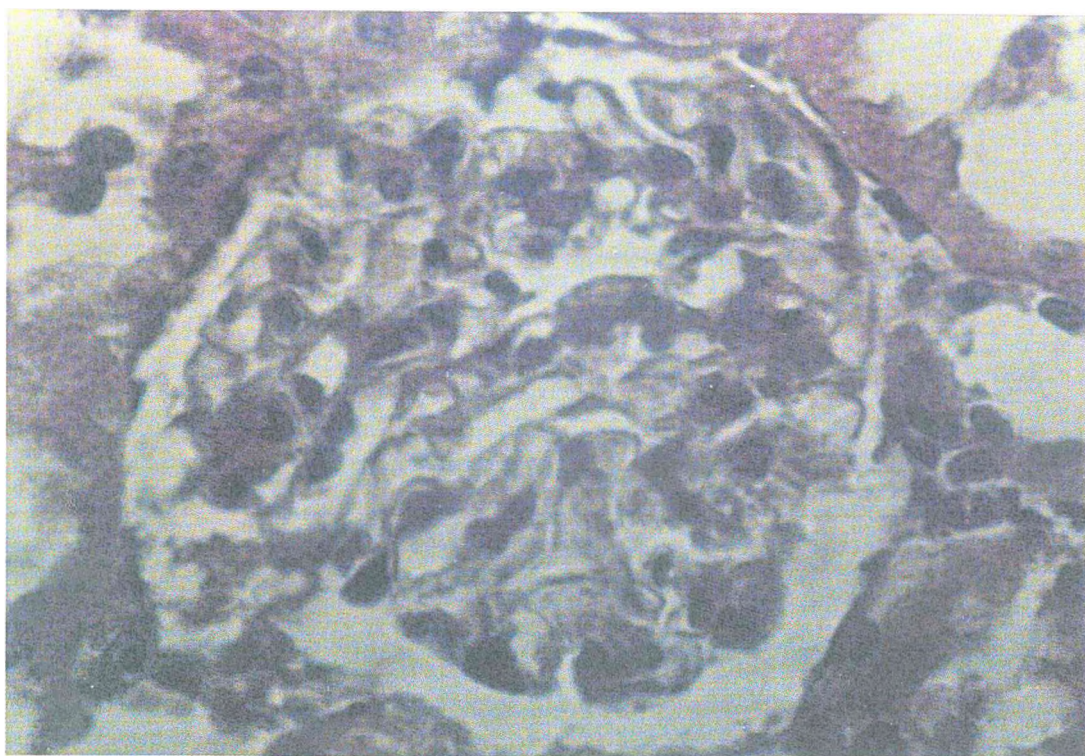


FIGURA 19: Fotografia referente ao rim perfundido de rato do grupo dexametasona + veneno da *Crotalus durissus terrificus* (1 μ g/ml).

A figura acima mostra que as estruturas renais glomerulares e tubulares encontram-se preservadas. Coloração: Hematoxilina Eosina x 1000.

V. DISCUSSÃO

A peçonha da *C. durissus terrificus* e sua principal fração, a crotoxina, causaram nefrotoxicidade através da utilização do sistema de rim de rato como modelo experimental. A nefrotoxicidade causada não foi compatível com insuficiência renal aguda (IRA), apesar das alterações funcionais e histopatológicas apresentadas. Portanto o resultado obtido foi diferente daquele encontrado por outros autores que realizaram pesquisas em animais de laboratórios *in vivo*. A crotoxina e o veneno da *C. durissus terrificus* causaram IRA em coelhos e ratos respectivamente (Rovere et al. 1978, Hadler e Vital Brazil, 1966). A crotoxina compõe 68% do peso seco deste veneno e possui além da atividade neurotóxica (Vital Brazil e Excell, 1971), atividade nefrotóxica em cães com nefrose tubular, principalmente nas porções proximais (Hadler e Vital Brazil, 1966).

As observações clínicas nas vítimas de acidentes crotálicos realizadas por vários autores também relataram IRA. Amorim e Melo (1954) descreveram as alterações renais causadas pela *C. durissus terrificus* quando realizaram autopsias de doentes que foram a óbito. Os pacientes apresentaram oligúria, seguida de anúria e os resultados da análise histopatológica revelaram IRA com nefrose do néfron intermediário. Este tipo de lesão também foi encontrado nas vítimas da *C. durissus terrificus* estudada por Rosenfeld (1971), sendo que a morte dos pacientes ocorreu entre o oitavo e décimo quinto dia do acidente ofídico.

Os efeitos apresentados nos nossos experimentos sugerem que o efeito direto do veneno não foi suficiente para causar IRA em rato. A hipótese para tais resultados é que a IRA produzida pelo veneno e a crotoxina em suas vítimas seja consequência do somatório dos efeitos nefrotóxicos diretos e sistêmicos produzidos.

Os resultados do nosso experimento revelaram que o veneno (1 μ g/ml) e a crotoxina (2 μ g/ml) causaram aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular, portanto produziram alterações funcionais renais.

O aumento da filtração glomerular causou elevação dos níveis da

inulina na urina, pois este polissacarídeo é totalmente filtrado pelo rim e não é reabsorvido ou secretado. A elevação da filtração glomerular e da inulina foram os responsáveis pelo aumento do ritmo de filtração glomerular.

A análise histopatológica dos rins que foram perfundidos com o veneno e a crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) esclarecem tais resultados, pois dentre outras observações foram encontrados depósitos protéicos no espaço urinário e nos túbulos, indicando aumento da permeabilidade tecidual e/ou perda da seletividade. Pressupõe-se que ocorreu dano sub-estrutural ou submicroscópico, tendo em vista que a microscopia óptica mostrou o efeito, derrame protéico maciço nos espaços urinários. Apesar desse efeito, as alterações morfológicas (estruturais) foram mínimas. Ocorreram outras alterações histopatológicas tais como: degeneração albumino-granulosa (tubular e glomerular), cilindros hialinos (tubular), hialinização (célula tubular) e focos de perda tubular com dilatação discreta e infiltração no interstício. A causa comum destas alterações histopatológicas renais são hipóxia e lesão tóxica. Portanto o veneno e a crotoxina causaram ação tóxica direta no rim isolado através de mecanismos geradores de hipóxia e lesão tecidual. Porém, tais alterações histopatológicas não foram compatíveis com IRA.

Monteiro (1990) testou o efeito direto da peçonha da *Bothrops jararaca*, serpente da família *Viperidae*, em sistema de rim isolado de rato e constatou alterações compatíveis com IRA, tais como necrose cortical e tubular.

Apesar da *C. durissus terrificus* pertencer a mesma família da *B. jararaca*, os gêneros são diferentes e suas peçonhas possuem características fisiopatológicas distintas. A IRA causada por ação direta da peçonha da *B. jararaca* foi atribuída, entre outros mecanismos, à ação proteolítica do veneno. A peçonha da *C. durissus terrificus* não possui ação proteolítica (Sanchez et al., 1992).

Os efeitos renais causados pela crotoxina ($1\mu\text{g/ml}$) sobre o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular não apresentaram significância estatística. Ao passo que o veneno na mesma dosagem causou alterações funcionais e histopatológicas compatíveis com aquelas encontradas com a crotoxina na dosagem de $2\mu\text{g/ml}$, sendo que os efeitos apresentados pela crotoxina foram maiores. Nossos resultados entretanto sugerem a existência de uma substância no veneno da *C. durissus terrificus*, além da crotoxina responsável pela nefrotoxicidade

direta.

Vital Brazil e Excell (1966), afirmam que o veneno bruto é menos tóxico que a crotoxina para camundongos e ratos, com base nas doses letais 50 (DL₅₀) para camundongos (crotoxina 82 μ g/Kg; veneno total 168 μ g/Kg) e ratos (crotoxina 756 μ g/Kg; veneno total 1950 μ g/Kg) (Vital Brazil e Excell, 1966). A causa da morte nesses animais foi a neurotoxicidade.

Faure e Bon (1988), quando injetaram pequenas doses de crotoxina em camundongos e ratos, observaram que os sinais de intoxicação apresentados foram muito próximos ou indistinguíveis dos sinais causados pelo veneno. O autor concluiu que a crotoxina é o componente do veneno que produz os efeitos do envenenamento e causa morte nos animais.

A IRA é uma perda súbita e quase completa da função renal causada por uma falha da circulação renal ou por lesão glomerular ou tubular. Caracteriza-se por oligúria (volume urinário menor que 400-600 ml/24 horas), seguida de anúria. Entretanto pode existir diminuição da função renal com aumento da retenção de uréia e creatinina, até mesmo quando o paciente excreta mais de um litro por dia de urina, é chamada de insuficiência renal de alto débito (Amaral et al., 1986).

Amaral et al. (1986), em estudos realizados em vítimas da serpente *C. durissus terrificus*, observou que estes desenvolveram IRA de alto débito. No diagnóstico foi constatada elevação progressiva dos níveis séricos de uréia e a creatinina.

A função renal das vítimas do acidente crotálico é avaliada através das dosagens séricas de uréia e creatinina. No sistema de rim isolado utilizamos as dosagens de inulina, osmolaridade, sódio e potássio na urina e perfusato.

Diante dos resultados podemos dizer que o aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular do veneno (1 μ g/ml) e crotoxina (2 μ g/ml) foram alterações renais precoces, tendo em vista que o tempo de perfusão foi no máximo 120 minutos. Não foi possível aumentar o tempo de perfusão do rim devido limitações do próprio sistema. Cohen et al. (1977) relatou que a função distal do rim altera-se após 2 horas de perfusão. Como discutimos anteriormente, a IRA causada pelo veneno e a crotoxina poderia ser a consequência do

somatório dos efeitos nefrotóxicos diretos e sistêmicos produzidos.

Cupo et al. (1988), pesquisou a insuficiência renal aguda em crianças entre 5 e 11 anos de idade, vítimas de *C. durissus terrificus*, e verificou que o atendimento hospitalar precoce, através da utilização de soro anticrotálico, evitava que os pacientes desenvolvessem IRA. Pacientes que receberam atendimento hospitalar adequado somente após 6 horas da mordida da serpente desenvolveram IRA. Portanto, o desenvolvimento da IRA no acidente crotálico deve ser tempo dependente.

A análise histológica das peças de rins, em nosso experimento, possuem características inflamatórias. A inflamação é a resposta do organismo, ou mais especificamente dos tecidos vascularizados, a injúria, trauma ou infecção do tecido. Dentre as respostas vasculares ao estímulo lesivo estão a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de líquidos para o espaço intersticial, aumento da viscosidade, com redução gradativa do fluxo sanguíneo (Rocha e Silva, 1978, Sedgwick e Willoughby, 1985,).

Pirotzky (1984) evidenciou a capacidade do rim isolado de rato em produzir substância de reação lenta (SRS), histamina, serotonina e PAF após a utilização de ionóforo A23187 (2,5µg/ml). O ionóforo causou secreção de metabólitos do ácido aracdônico, com atividade espasmogênica sobre a vasculatura renal.

Utilizamos a dexametasona nos nossos testes com o objetivo de inibir os efeitos tóxicos causados pelo veneno, pois trata-se de um medicamento com atividade antiinflamatória, inidora da fosfolipase A₂, além de ser uma droga de fácil acesso. Devemos ressaltar que a dexametasona não é utilizada no tratamento da IRA, sendo contraindicado nos pacientes que apresentam retenção nitrogenada ou hipertensão (Haynes, 1991).

A dexametasona usada previamente ao veneno manteve o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular constantes, protegendo o rim das alterações funcionais e teciduais renais causadas pelo veneno.

Os glicocorticóides estimulam a produção da lipocortina, que constitui uma família de proteínas com atividade antifosfolipase A₂, com capacidade de suprimir a liberação de mediadores lípidicos da célula, portanto inibidora da produção de PAF, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano e outros metabólitos do ácido aracdônico. Suprime, ainda, a

ação de linfocinas, monocinas e histamina. Monocinas, tais como, interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), linfocinas, tais como, interferon (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2). São inibidoras também de aminas vasoativas, tais como histamina e bradicinina (Scheimer, 1989).

Os esteróides podem suprimir todas as respostas de permeabilidade vascular testadas com vários mediadores inflamatórios envolvendo bradicinina, serotonina, histamina e leucotrienos C, D e E, assim como as respostas induzidas em combinação com alguns destes mediadores com ácido aracdônico ou prostaglandinas E₂. A resposta a permeabilidade vascular causada pelo fator ativador de plaquetas (PAF), poderá também ser potencialmente inibido (Scheimer, 1989).

Os mecanismos envolvidos com o aumento da permeabilidade se devem a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais, induzindo a contração das mesmas, com o surgimento de solução de continuidade entre elas. Isto permite a passagem para o interstício de substâncias de alto peso molecular, tais como, as proteínas. O aumento da permeabilidade constitui provavelmente o mecanismo mais importante pelo escape transvascular das proteínas (Dichi e Burini, 1991). Entre os mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade estão: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, C5a (quinto componente do sistema complemento ativado) (Williams, 1984, Hua, 1986).

A maioria dos efeitos dos esteróides envolve interação com receptores intracelulares citoplasmático ou nucleares. O complexo esteróide-receptor liga-se ao DNA e controla a formação de RNA mensageiro específico, que direciona a síntese de proteínas específicas. Em algumas células ocorre repressão da expressão de certos genes e, portanto, inibição de produção de certas proteínas (Haynes Jr., 1991).

Os derivados do ácido aracdônico estão envolvidos em vários processos biológicos e patológicos, sendo a inflamação somente um deles. O ácido aracdônico é um ácido polinsaturado que origina diretamente de fontes alimentares ou da conversão endógena a partir do ácido linoléico. Para que o ácido aracdônico seja utilizado para a formação de eicosanóides, ele é inicialmente liberado dos fosfolipídeos, por ação da fosfolipase A₂. A seguir ocorre a biossíntese dos seus precursores, por meio das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, dando origem a gênese de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente. Em adição, após a liberação do ácido aracdônico, fosfolipídeos restantes

podem sofrer acetilação, por ação de uma acetil-transferase, e formar o PAF aceter (Lewis, 1985).

Somente a crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) causou diminuição da pressão de perfusão nos nossos experimentos, provavelmente devido dilatação da arteríola aferente. A dilatação dessa arteríola causa aumento de pressão glomerular com correspondente aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular (Haynes, 1991). O veneno não causou alteração estatisticamente significativa desse parâmetro funcional.

A explicação sugerida para esse efeito é que o dano subestrutural no tecido renal causado pela crotoxina ($2\mu\text{g/ml}$) foi mais intenso que aquele desenvolvido pelo veneno ($1\mu\text{g/ml}$), levando a hipóxia, maior número de glomérulos e túbulos e conseqüente dilatação da arteríola aferente e redução da pressão de perfusão renal. Poderemos levar em consideração também que a quantidade da crotoxina utilizada foi maior que o veneno.

Entre os mediadores, envolvidos com a vasodilatação podem está entre outros a bradicinina, a histamina, as prostaglandinas da série E (PGE) e as prostaciclina (PGI_2) (Williams, 1984).

Numerosos estudos confirmaram que a biossíntese dos prostanóides e dos fatores que a regulam na microcirculação, são semelhantes ao que ocorre nos grandes vasos. Vale ressaltar uma importante diferença quanto ao produto de cicloxigenase formado nas células endoteliais microvascular, a PGE_2 e não PGI_2 , é o principal produto da cicloxigenase em muitas células endoteliais microvasculares (Hyslop e De Nucci, 1993).

O veneno e a crotoxina também causaram aumento do transporte de sódio e potássio. Esses parâmetros estão relacionados com a taxa de filtração glomerular, que apresentou elevação causada pelo aumento da permeabilidade e perda da seletividade da membrana da cápsula de Bowman, que foram comprovados através da análise histopatológica.

Os percentuais do transporte de sódio e potássio sofreram redução no grupo de rins que recebeu o veneno, isto significa diminuição da reabsorção de sódio e potássio. Essa redução pode ser somente aparente e tenha ocorrido devido o aumento acentuado do ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário. Outro mecanismo provável é a possibilidade do veneno atuar nos túbulos alterando as trocas iônicas.

O sódio tissular mostrou aumento acentuado no grupo de rins perfundido com crotoxina (2 $\mu\text{g/ml}$) e com o veneno, indicando retenção deste íon. Estes resultados estão em acordo com aqueles do histopatológico, onde a partir dos resultados obtidos hipotetizamos dano subestrutural ou submicroscópico do tecido renal. O grupo de rins perfundidos com dexametasona previamente ao veneno causou aumento do sódio tissular. Este resultado pode ser explicado, pois a dexametasona é causadora de retenção de sódio.

O potássio tissular mostrou aumento no grupo de rins perfundidos com crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$), veneno e no grupo dexametasona + veneno, portanto nestes grupos ocorreram a retenção do íon potássio. A retenção do potássio pode ser explicada usando os resultados da análise histopatológica onde indicam perda da seletividade da membrana tubular, que pode ser consequência do dano subestrutural no tecido causada pelas substancias tóxicas. Entretanto no caso da crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$) esse mecanismo de ação tóxica não serve para explicar o aumento do potássio tissular, tendo em vista que a crotoxina nesta dosagem não causou alteração histológica renal.

A dexametasona é uma droga causadora do aumento da secreção do potássio, porém esse efeito não foi suficiente para reverter a retenção do íon causado pelo veneno (Haynes, 1991)

Já foi bastante comprovada a ação dos glicocorticóides em induzir retenção de água, produção de edema e alteração da distribuição da água em seus diversos compartimentos. Reduzem a dilatação dos vasos sanguíneos causando menor exudação de líquidos (Haynes, 1991).

A dexametasona inibiu todos os efeitos nefrotóxicos causados pelo veneno que foram discutidos anteriormente com exceção do sódio e potássio tissular, bem como no percentual do transporte de sódio.

Além de suprimir as respostas do aumento da permeabilidade vascular os glicocorticóides produzem a nível celular, uma proteína chamada de lipocortina, que possuem como característica principal inibir a fosfolipase A_2 . É importante citar que nem todos os efeitos antiinflamatório causados pelos corticóides devem-se a inibição da produção de lipocortina. A inibição dessa proteína consiste em um dos mecanismos relacionados com a atividade antiinflamatória dos corticosteróides.

O estudo histopatológico das peças de rins que foram perfundidos em sistema isolado com a dexametasona antes do veneno da *C. durissus terrificus* não mostrou aumento de proteínas no espaço urinário, bem como não apresentou alteração dos parâmetros renais analisados. A dexametasona causou proteção dos efeitos do veneno da *C. durissus terrificus*. A dexametasona causou bloqueio dos efeitos renais causados pelo veneno da *C. durissus terrificus*, sugerindo que tal droga também é capaz de inibir os efeitos renais da crotoxina, maior componente tóxico da fração do veneno da *C. durissus terrificus*.

A presença de componentes no soro ofídico capazes de inativar as frações tóxicas do veneno, esta apoiada no teste de que o soro da *C. durissus terrificus* é capaz de inativar a fosfolipase A₂ básica, que é o componente crucial para a ação tóxica do complexo crotoxina, sendo provável que a inativação do veneno pelo soro se dá através da formação de complexo inativo entre os dois (Bon et al., 1989).

Portanto a dexametasona poderá ter inibido o efeito nefrotóxico do veneno através da inibição de síntese de mediadores químicos envolvidos na permeabilidade vascular através da inibição da fosfolipase A₂ do veneno. Contudo não podemos afirmar que esse foi o único mecanismo de proteção da dexametasona aos efeitos nefrotóxicos causados pelo veneno.

Os dados acima sugerem que os efeitos renais causados pelo veneno da *C. durissus terrificus* e pela crotoxina, ocorreram através do estímulo das células endoteliais dos microtúbulos renais, causando efeito direto e/ou indireto. O efeito indireto seria através dos múltiplos mediadores químicos liberados pelas células endoteliais renais. A atividade fosfolipásica pode estar relacionada com a produção das seguintes substâncias: PAF, produtos da lipoxigenase e cicloxigenase. Dentre esses produtos encontra-se as prostaglandinas E₂. As prostaglandinas E₂ são reconhecidas substâncias que atuam em microtúbulos renais causadores de aumento da permeabilidade vascular, sendo bastante evidente a capacidade do veneno e da crotoxina em causarem aumento de material protéico no espaço urinário e tubular, portanto a presença deste material deve resultar no aumento da permeabilidade.

A dexametasona entretanto é uma droga que não é seletiva. Portanto além deste corticosteróide reduzir a vasodilatação endotelial,

poderá agir ainda através de outros mecanismos e resultar na proteção dos efeitos causados pelo veneno.

Muitos testes são necessários para que possamos descobrir todos os mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade causada pelo veneno e a crotoxina. O uso de bloqueadores seletivos poderão fazer parte de experimentações futuras.

CONCLUSÃO

- 1) O veneno da *C. durissus terrificus* e a crotoxina causaram a nefrotoxicidade que foram evidentes pelas alterações funcionais e através de análise histopatológica.
- 2) Os rins apresentaram maior sensibilidade a ação do veneno da *C. durissus terrificus* que pela crotoxina.
- 3) A dexametasona causou proteção dos efeitos renais quando foi usada previamente ao veneno da *C. durissus terrificus*.
- 4) O veneno e a crotoxina não causaram alterações histopatológicas renais compatíveis com Insuficiência Renal Aguda (IRA), nas dosagens utilizadas e no período de tempo de experiência.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, T., ALEMA, S., MILEDI, R. Isolation and characterization of the presynaptically acting neurotoxins from the venom of Bungarus snake. Eur. J. Biochem., v.80, p.1-12, 1977.
- AIRD, S.D., KAISER, I.I., LEWIS, R.V., KRUGGEL, W.G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. Arch. Biochem. Biophys., v. 249, p.296-300, 1986.
- AMARAL, C.F.S., DA SILVA, O.A., GODOY, P., MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. Ann.Hyg., v.29, p.1453-1455, 1980.
- AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., PEDROSA, T.M.G., SILVA, O.A., PEDROSO, E.R.P. Afibrinogenemia following snakebite (*Crotalus durissus terrificus*). Amer. J. Trop. Med. Hyg., v.29, p.1453-1455, 1980.
- AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., DA 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 acidentes ofídicos Botrópico e Crotálico. Análise de 63 casos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 28, p.220-227, 1986.
- AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., PEDROSA, T.M.G., SILVA, O.A. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 30, p. 288-292, 1988.
- AMORIM, M.F., MELO, R.F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. Histopatophological study. Am. J. Pathol., v.30, p. 479-499, 1954.
- AMORIM, M.F., MELO, R.F., SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. Mem. Inst. Butantan, v.34, p.137-157, 1969.
- AMORIM, M.F. Intermediate nephron nephrosis in human and experimental crotalic poisoning, In: Bucherl, W. and Buckey,

E:E:(eds): Venomous animal and their venomous vertebrados, New York: Academic Press, 1971, v.2, p.319-343.

ARENA, J, DREW, R. Poisoning Springfield, III, CHARLES, C. Thomas, 5 ed., 1986, p. 735-747.

AZEVEDO-MARQUES, M.M., CUPO, P., COIMBRA, T.M., HERING, S.E., ROSSI, M.A., LAURG, C.J. Myonecrosis, myoglobinúria and acute renal failure induced by South-American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brasil. Toxicon, v.23, p.631-636, 1985.

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

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

BARRAVIERA, B. Estudos clínicos dos acidentes ofídicos. J.B.M., v. 65, n 4., p.209-250, out., 1993.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. Acta Physiol. Latino am., v. 11, p. 224, 1961.

BERCOVICI, D., CHUDZINISKI, A.M., DIAS, N.O., ESTEVES, M.I., HIRAICHI, E., DISHI, N.Y., PICARELLI, Z.P., ROCHA, M.C., UEDA, C., YAMANOUYE, N., RAW, I. A systematic fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom. Mem. Inst. Butantan, v.49, p.69-78, 1987.

BON, C., CHOUMET, V., FAURE, G.,JIANG, M.S., LAMBEZAT, M.P., RADVANYI, F., SALIOU, B. Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A₂ Neurotoxin from snake venom. In: DOLLY, O.J.(ed) Neurotoxins in Neurochemistry. Chichester: Ellis Horwood 1988, p. 52-63.

BON, C.,BOUCHIER, C., CHOUMET, U., FAURE, G., JIANG, M., LAMBEZAT, M., RADUANYI, F., SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. vol.39,p 439-448, 1989.

- BON, C., JENG, T.W. Crotoxin; a possible mechanism of action. Adv. Cytopharmac., v.3, p.231, 1979.
- BOWMAN, R.H., MAACH, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and eletrolyte tranport in perfused rat Kidney. Am. J. Physiol., v.226, n. 2, p.426-430, 1974.
- BOWMAN, R.H. Glucose transport by the isolated perfused rat kidney. Am. J. Physiol. v.222., n. 6, p.1499-504, 1972.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Reunião técnica sobre ofídismo, 3. Distribuição geográfica das serpentes do Brasil. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1986.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasilia: Centro de Documentação do Ministério da Saúde. 1987.
- BRASIL, V. Contribuição do estudo do veneno ophidico. I. Espécies venosas brasileiras; mortalidade por mordedura de cobras. Rev. Med. S. Paulo., v.4, p.255-60, 1901.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristic of the *Crotalus* phospholipase A₂ and crotoxin complex. Toxicon, v.14, p. 221-223, 1976.
- CHANG, C.C., LEE, D.J. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venoms, is a pre-synaptic toxin acting like beta-bugarotoxin. Naunnyn-Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. v.296, p. 159-168, 1977.
- CHANG, C.C., CHENT, T.F., LEE, C.Y. Studies of the presynaptic effects of B-bugarotoxin on neuromuscular transmission. J. Pharmacol. Exp. Ther., v.184, p. 339-345, 1973.
- CHUGH, K.S. Snake-bite-induced acute renal failure in India. Kidney Int., vol. 35, p. 891-907, 1989.
- CHUGH, K.S., AIKAT, B.K., SHARMA, B.K., DASH, S.C., MATCHEW, M.T., DAS, K.S. Acute renal failure following snake bite. Amer. J. Trop. Med. Hyg., v.24, p. 692-697, 1975.

- COHEN, J.J. et al. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. J. Physiol., v.226, p.103-21, 1977.
- COSTA, P. I. et al. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. Acta Physiol. Pharma,col. Latinoam., v.39, p.359-373, 1989.
- CULL-CANDY, S.G., FOHLMAN, J., GUSTAVSSON, D., LULLMANN-RAUCH, R., THESLEFT, S. The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of the murine neuromuscular junction. Neuroscience, v.1, p. 175-180, 1976.
- CUPO, P., AZEVEDO-MARQUES, M.M., HENRING, S.E. Clinical and laboratorial features of South American rattlesnake (*C.durissus terrificus*) envenomation in children. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.82 ,p.924-929, 1988.
- DA SILVA, O.A., LOPEZ, M., GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. Amer. J. Trop. Med. Hyg., v. 28, p. 401-407, 1979.
- DATE, A., SHASTRY, J.C.M. Renal ultrastructure in acute tubular necrosis following Russell's viper envenomation. J. Pathol., v.137, p.225-241, 1982.
- De MELLO, G., MAACK, T. Nephron function of the isolated perfused rat kidney. Am. J.Physiol., v.231, p.1699-707, 1976.
- DENSON, K.W.E., ROSSEAU, W.E. Separation of the coagulant components of Bothrops jararaca venom. Toxicon, v.8, p.15-19, 1970.
- DIAS DA SILVA, W., GUIDOLIN, R., RAW, I., HIGASHI, H.G., GARICATI, C.P., MORAES, J.F., LIMA, M.L.R., YAMAGUCHI, I.K., MISHIKAWA, A.K., STEPHANO, M.A., MARCELINO, J.R., PINTO, J.R. Reatividade de antivenenos monovalentes contra venenos de dez serpentes do gênero *Bothrops*. Rev. Soc. Bras. Toxicol., v.2, 1989, trab. 2.42.
- DICHI, J., BURINI, R.C., Metabolismo e regulação dos níveis plasmático de albumina. Cad. Nutr. SBAN, v.3 p. 99- 127, 1991.

- FALK, K., RAYYES, A.N., DAVID, D.S., HOCHGELERENT, E.L., SAKAI, S. Myoglobinúria with reversible acute renal failure. N.Y. State. J. Med., v.73, p.537, 1973.
- FAURE, G., BON, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durussus terrificus* : purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. Biochemistry,(N.Y.), v.27, p. 730-738, 1988.
- FERREIRA, S.H. et al., Interleukin-1 b(beta) as a potent hyperlgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. Nature, v. 334, p. 698-700, 1988
- FLECK, A. Clinical and nutritional aspect of change in acute-phase proteins during inflammation. Proc. Nutr. Soc., v.48, p. 347-354, 1989.
- FONTELES, M.C., MOREIRA LIMA, A.A. Functional comparison of kidney perfused with fatty acid-free and rich albumin. Braz. J. Med. Biol. Res. v.15, n 4-5, p.296, 1982.
- FONTELES, M.C. Efeito do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências da Saúde, 1980.
- FONTELES, M.C., COHEN, J.J., BLACK, A.J., WERTHEIM: Support of kidney function by long-chain fatty derived from renal tissue. Am. J. Physiol., v.244, p.235-246, 1983.
- FRAENKEL-CONRAT, H. Snake venom neurotoxins related to phospholipase A₂. J. Toxicol. v.1, p. 205-221, 1982.
- GAWBOW, P. A., KAEHNY, W.D., KELLEHER, S.P. The spectrum of rhabdomyolysis. Medicine, v.61, p. 141-152, 1982.
- GUALTIÉRI, V.B.F. Toxicologia dos venenos do ofídios brasileiros. Rev. Homeopatia v.174, p. 33-9, jul-set. 1987.
- HABERMANN, E., BREITHAUPT, H. The crotoxin complex : an example of biochemical and pharmacological complementation.

Toxicon, v.16, p. 19-30,1978.

HADLER, W.A., VITAL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV: Nephrotoxicity. Mem. Inst. Butantan, v.33, p.1017-1020,1966.

HAMILTON, R.L., BERRY, M.N., WILLIAMS, M.C., SEVERINGHANS. A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. J. Lipid. Res., v.15, p.182-186, 1974.

HARRIS, J.B., KARLSSON, E., THESLEFF, S. Effects of an isolated toxin from the Australian tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) venom at the mammalian neuromuscular junction. Br. J. Pharmacol., v.47, p.141-146, 1973.

HAWGOOD, J.B. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venom. In: Tu, A. T. Rattlesnake Venom: their Action and Treatment, New York: Marcel Dekker, 1982. p. 121-162.

HAWGOOD, B.J., SMITH, J.W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase a-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. Br. J. Pharmacol., v.61, p.597, 1977.

HAYNES Jr., R.C. Hormônio Adrenocorticotrófico; esteróides cortico-supra-renais e seus análogos sintéticos; inibidores de síntese e as ações dos hormônios córtico-supra-renais. In: GOODMAN, L.S., GILMAAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8 (eds). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991., 1232, p. 951-972.

HIGGS, G. A., VANE, J. R. Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase. Br. Med. Bull., v. 39, p. 265-268, 1983.

HOEL, P. G. Estatística Elementar. 2ª ed. Atlas, São Paulo, 1981.

HOOD, V.L., JONHSON, J.R. Acute renal failure with myoglobinuria following tiger snake bite. N. Z. Med. J., v.4, p.415, 1974.

HUA, X. Y. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. Acta Physiol. Scand., v. 551, p. 1-44, 1986.

HYLOP, S., De NUCCI, G., Prostaglandin Biosynthesis in the

Microcirculation: Regulation by endothelial and non-endothelial factors. Prostaglandins Leuk. Fatty Acids, v. 49, p.723-760. 1993.

JAMES Jr., C.W. Permeability of basement membranes to macromolecules (43782B). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. v.207, p.13-19, 1994.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Distância entre os ferimentos causados pelas presas e tamanho da serpente. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.20, p.55-56, 1987.

JORGE, M.T. , RIBEIRO, L.A. Incoagulabilidade sanguínea no acidente crotálico. Rev. Soc. Bras.Med. Trop., v.21, p. 121, 1988.

JORGE, M.T., TOLEDO FILHO, J.R., RICOI, J.A., RIBEIRO, L.A. Alterações neurológicas em pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*. Rev. Soc. Bras. Med.Trop. v.19, p.28, 1986.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Acidentes por animais peçonhentos. In: AMATO NETO, V., BALDY, J.L.S.Doenças transmissíveis. 3. ed.São Paulo: Sarvier, 1989, p.133-141.

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

KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L., MARUYAMA, M., SANOMARTINS, I.S., MORENA, P., CHUDZINSKI, A.M., TOMY, S.C., ANTÔNIO, L.C., SANTOS, M.L., KELEN, E.M.A. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patientis bitten by bothrops jararaca snake. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE HEMOSTASIA E TROMBOSE, 5 e JORNADA BRASILEIRA DE HEMOFILIA, 7., 1988 Florianópolis,. p.14, 1988.

KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. Toxicon, v.27, nº 9, p.955-963, 1989.

LAURE, J.C. Die primarstruktur des crotamins, Hoppe-Seyler'ss, Z. Physiol. Chem. v.356, p. 213, 1975.

LAURE, J.C. Veneno da *Crotalus durissus terrificus* : crotamina, crotoxina, crotapotina, fosfolipase: obtenção, estrutura e função. In:

SIMPÓSIO ANUAL DA ACIES SOBRE TOXINAS PROTEICAS,
12, 1988. Anais., v.1, p.1-8.

LEE, C. Y., HO, C.L. Pharmacology of presynaptic neurotoxins from snake venom. In: EAKER, D., WADSTROM, T. (eds) Natural Toxin. Oxford: Pergamon Press, 1980. p.539-547.

LEWIS, R.A. A presumptive role for leukotrienes in obstructive airways diseases. Chest.,v.88, p. 98S-102S, 1985.

LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Rev. Biol. Trop., v.3, nº 1, p.37-40, 1983.

MAGALHÃES, R.A., RIBEIRO, M.M.F., RESENDE, N.A., AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo v.28, p.228-233, 1986.

MINTON, S.A. Snake Venoms and Envenomation. New York: Marcel Dekkar. 1971.

MITTAL, B.V., KINARE, S.G., ACHRVA, V.N. Renal lesion following viper bites- a study of 14 years. Indian J. Med. Res. v.83, p. 642-651, June 1986.

NANCY, G., AHLSTROM, M.D., LUGINBUHL, M.D.W., TISHER, M.D.C. Acute anuric renal failure after pigmy rattlesnake bite. South Medical J. v. 84, nº 6, june 1991.

NINIO, E., MENCIA-HUERTA, J.M., BENVENISTE, J. Biosynthesis of platelet-activating factor: Evidence for an acety-transferase activity in murine macrophages. Biochem. Biophys. Acta., v. 710, p. 23-31, 1982.

NISHITSUTJI-UWO, J.M. et al. Metabolit activities of the isolated perfused rat kidney. Biochem. J., v.103, p. 852-862, 1967.

PELLEGRINI FILHO, A., VITAL BRAZIL, O. The action of crotamine on skeletal muscle: an eletrophysiological study. In: ROSENBERG, P.(ed.): Toxins: animal, plant and microbiol. London: Pergamon Press, 1978.

- PIROTZKY, E., BIDAULT, J., BURTIN, C., GUBLER, M.C., BENVENISTE, J. Biosynthesis of platelet-activating factor. VI Precursor of Platelet - Activating Factor and Acetyltransferase Activity in Isolated kidney Cells. Lab Invest. v. 51, n° 5. p. 567-572, 1984.
- PRADO-FRANCESCHI, J., TAVARES, D.Q., HERTEL, R., ARAÚJO, A.L. Efeito da convulsina, a toxina from rattlesnake venom, on platelets, and leucocytes of anesthetized rabbits. Toxicon., v.19, p.661, 1981.
- RAAB, W., KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venoms. E. Mem. Inst. Butantan. v.33, n° 3, p.1017-1020, 1966.
- REID, H.A. Myoglobinuria and sea-snake bite poisoning. Br. Med. J., v.1, p. 1284-1293, 1961.
- REID, H.A. Snakebite in the tropics. Br. Med. J., v.3, p. 359-362, 1968.
- RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENTH, J., SINGLER, P. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and crotoalus atrox venom. J. Biol. Chem., v.260, p. 11627-11634, 1985.
- RESENDE, N.A. et al. Functional and histopathological renal change induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. Braz. J. Med. Biol. Res., v.22, p.407-16, 1989.
- RESENDE, C.C., ARAUJO, F.A.A., SALLENAVE, R.N.U.R. Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. Brasília: Ministério da Saúde, 1989.
- REUSSELL. F.E., CARLSON, R.W., WAINCHEL, J. Snake venom poisoning in the United States, experiences with 550 cases. JAMA. v.233, p..341-344, 1975.
- RIBEIRO, L.A., PIRES DE CAMPOS, M., ALBUQUERQUE, M.J., TAKAOKA, M.Y. In: SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS 3, 1990. ANNALS . v. 86.
- RIBEIRO, L.A., PIRES DE CAMPOS, M., ALBUQUERQUE, M.J., TAKAOKA, M.Y. Acidentes ofídicos no Estado de São Paulo. Rev.

Ass. Med. Brasil. v.39, nº 1, p.4-7, 1993.

ROCHA e SILVA, N. O. Brief history of inflammation. In: VAM, J. R., FERREIRA, S. H. (eds) Handbook of experimental pharmacology. Local: Springer-Verlag, 1978. v. 50/I, p. 6-25

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South American. In: Bucherl, W. Buckley, E.E. e Devlofeu, V.(eds) Venomous Animal and their Venoms. New York: Academic Press, 1971 p. 345-384.

ROSENFELD, G. Moléstias por venenos animais. Terapia, v. 17, p.3-15, 1965.

ROSS, B.D., EPSTEIN, F.H., LEAF, A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. Am. J. Physiol., v.225, nº.5, p.1165-71,1973.

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

ROVERE, A.A., RAYNALD, C.A., BERMAN, J.M., ROMAN, A.S., GARCIA, C.A. Efecto precoz del veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre la circulaion renal. Acta. Physiol. Latinoam. V.28, p. 133-139, 1978.

RUBSAMEN, K., BREITHAUPT, H., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. Naunyn-Schiedebergs Arch. Pharmac. v.270, p. 274-288, 1978.

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 snake. Toxicon, v.30, n.1, p.95-103, 1992.

SANT, S.M., PURADARE, N.M. Autopsy study of cases of snake bite with special references to the renal lesions. J. Postgrad. Med. v.18,p.181, 1972.

SANTOS, M.C., DINIZ, C.R., PACHECO, M.A.W., DIAS DA SILVA, W. Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the letal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, v. 26,

p. 207-213. 1988.

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

SANTOS, M.C., YAMAGUCHI, J.K., CARICATTI, C.P., HIGASHI, H.G., DIAS-DA-SILVA, W. Immunization of equines with phospholipase A₂ protects against the letal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. Brazilian J Med Biol Res, v.22, n.4, p. 509-512. 1989.

SCHUREK, H.J., ALT, J. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. Am.J.Physiol., v.240, n° 9, p.569-76,1981.

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

SHEIMER, R. P. The effects of glucocorticoides on mast cells and basophilis. In: ANTI-inflammatory Steroid Action Basic and Clinical. London: Academic Press, 1989, p. 226-248.

SEDGWICK, A. D., WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory responses and its prevention. In: BONTA, I.L., BRAY, M.A., PARNHAM, M.J.(eds) Handbook of Inflammation. Amsterdam: Elsevier, 1985 v. 5, p. 27-47.

SLOTTA, K., FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan, v.12, p.505-513, 1938-39.

SU, M.J. et al. The pre-synaptic blocking effect and phospholipase A₂ activity of textilotoxin, the most toxic neurotoxin isolated from the venom of the Australian brow snake, *Pseudonaja textilis*. Toxicon, v.21, p. 143-151, 1983.

TU, A.T. Venoms: Chemistry and molecular biology. New York: John Wiley Sons, 1977.

TRIMBLE, M.E., BOWMAN, R.H. Renal Na and K transport: effects of glucose, palmitate and alfa-bromopalmitate. Am. J. Physiol., 1973 v.225, n.5, p.1057-62.

VARAGUNAM, T., PANABOKKE, R.G. Bilateral cortical necrosis of

the kidneys following snake bite. Postgrad. Med. J. v.46, p.449. 1970.

VIEIRA, S. Introdução a Bioestatística. Campus, Rio de Janeiro, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Veneno ofídico neurotóxico. Rev. Ass. Med. Brasil. v.26, p. 212-218, 1980

VITAL BRAZIL, O. et al. Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. Mem. Inst. Butantan.v.33, n.3, p. 973-980, 1966.

VITAL BRAZIL, O., EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*(south American rattlesnake) on the for neuromuscular junction. J. Physiol.(Lond.) v. 212, p.34, 1971.

WAJCHENBERG, B.L. et al. Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. Rev. Ass. Med. Bras. v.1, p.179-193, 1954.

WEISS, C. et al. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. Am. J. Physiol., v.196 ,n.5, p. 1115-1118, 1959.

WILEY, J. Basic Medical Laboratory Technology. Section Staining and Monting. New York: Toronto, 1975.

WILLIAMS, T.J. Mechanisms of inflamatory odema formations. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1984, p. 210-216. 1984.

WORLD HEALT ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms.Geneva: WHO Offset Publication n° 58. geneva:World Health Organization.1981.

WU, S.H. Separation of the subunits of crotoxin by high performace liquid chromatography. J. Chromatogr., v.259, p.375-377, 1983.

APÊNDICE

TABELA 6: Fluxo Urinário ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$)	Crotoxina (2 $\mu\text{g/ml}$)	Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)	Dexametasona (10 $\mu\text{g/ml}$) + Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)
10	0,15 \pm 0,02	0,09 \pm 0,003	0,20 \pm 0,05	0,20 \pm 0,06	0,19 \pm 0,01
20	0,15 \pm 0,02	0,09 \pm 0,003	0,25 \pm 0,06	0,22 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02
30	0,17 \pm 0,02	0,09 \pm 0,003	0,25 \pm 0,06	0,22 \pm 0,06	0,19 \pm 0,02
40	0,17 \pm 0,02	0,10 \pm 0,009	0,45 \pm 0,20	0,29 \pm 0,08	0,19 \pm 0,02
50	0,20 \pm 0,03	0,11 \pm 0,006	0,64 \pm 0,21*	0,31 \pm 0,09	0,18 \pm 0,02
60	0,20 \pm 0,03	0,12 \pm 0,012	1,08 \pm 0,34*	0,49 \pm 0,06*	0,19 \pm 0,02
70	0,20 \pm 0,03	0,14 \pm 0,014	1,49 \pm 0,51*	0,56 \pm 0,07*	0,19 \pm 0,02
80	0,20 \pm 0,03	0,13 \pm 0,006	1,43 \pm 0,50*	0,63 \pm 0,05*	0,19 \pm 0,02
90	0,20 \pm 0,03	0,12 \pm 0,006	1,13 \pm 0,43*	0,75 \pm 0,05*	0,22 \pm 0,02
100	0,20 \pm 0,03	---	---	---	0,21 \pm 0,02
110	0,20 \pm 0,03	---	---	---	0,21 \pm 0,02
120	0,20 \pm 0,03	---	---	---	0,20 \pm 0,02

Os dados representam a média \pm E.P.M.* $p < 0,05$.

TABELA 7: Ritmo de Filtração Glomerular ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$)	Crotoxina (2 $\mu\text{g/ml}$)	Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)	Dexametasona (10 $\mu\text{g/ml}$) + Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)
10	0,68 \pm 0,06	0,81 \pm 0,15	0,71 \pm 0,18	0,65 \pm 0,10	0,56 \pm 0,12
20	0,66 \pm 0,06	0,90 \pm 0,17	0,75 \pm 0,11	0,63 \pm 0,10	0,61 \pm 0,09
30	0,67 \pm 0,05	0,90 \pm 0,17	0,80 \pm 0,13	0,63 \pm 0,10	0,57 \pm 0,04
40	0,68 \pm 0,06	0,75 \pm 0,19	1,40 \pm 0,28*	0,74 \pm 0,12	0,49 \pm 0,06
50	0,68 \pm 0,06	0,74 \pm 0,13	1,63 \pm 0,28*	0,72 \pm 0,12	0,47 \pm 0,07
60	0,75 \pm 0,10	0,79 \pm 0,14	2,90 \pm 0,23*	1,16 \pm 0,12*	0,49 \pm 0,10
70	0,78 \pm 0,09	0,78 \pm 0,11	4,23 \pm 0,17*	1,26 \pm 0,16*	0,52 \pm 0,07
80	0,78 \pm 0,09	0,69 \pm 0,10	4,45 \pm 0,24*	1,54 \pm 0,20*	0,49 \pm 0,03
90	0,78 \pm 0,10	0,60 \pm 0,10	3,38 \pm 0,45*	1,70 \pm 0,21*	0,54 \pm 0,10
100	0,79 \pm 0,09	---	---	---	0,49 \pm 0,10
110	0,77 \pm 0,10	---	---	---	0,44 \pm 0,08
120	0,78 \pm 0,10	---	---	---	0,45 \pm 0,09

Os dados representam a média \pm E.P.M.* $p < 0,05$.

TABELA 8: Pressão de Perfusão (mmHg) em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 µg/ml)	Crotoxina (2 µg/ml)	Veneno (1 µg/ml)	Dexametasona (10 µg/ml) + Veneno (1 µg/ml)
10	118,0 ± 4,3	138,5 ± 11,0	110,0 ± 5,4	129,7 ± 13,0	130,0 ± 5,3
20	120,2 ± 2,4	146,7 ± 9,0	102,0 ± 5,0	128,0 ± 15,3	128,0 ± 6,1
30	121,0 ± 2,6	151,5 ± 18,0	97,0 ± 5,3	125,0 ± 16,3	127,0 ± 7,0
40	120,8 ± 3,3	153,5 ± 21,0	95,6 ± 10,9*	128,0 ± 14,0	123,0 ± 9,3
50	121,5 ± 4,0	154,5 ± 22,1	82,0 ± 9,1*	115,0 ± 14,8	125,0 ± 9,3
60	122,5 ± 3,9	154,0 ± 22,2	81,6 ± 9,4*	112,9 ± 15,0	126,0 ± 9,0
70	121,0 ± 2,0	152,0 ± 21,0	80,0 ± 11,4*	113,1 ± 15,4	129,0 ± 9,4
80	122,0 ± 3,5	151,0 ± 18,4	80,4 ± 10,7*	112,9 ± 15,5	129,0 ± 9,4
90	122,0 ± 4,0	146,5 ± 16,3	70,5 ± 5,0*	111,7 ± 15,9	129,0 ± 9,4
100	125,0 ± 4,0	---	---	---	132,0 ± 6,2
110	124,0 ± 3,0	---	---	---	132,0 ± 5,0
120	125,0 ± 3,2	---	---	---	132,0 ± 7,0

Os dados representam a média ± E.P.M.* p<0,05.

TABELA 9: Transporte de Sódio ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$)	Crotoxina (2 $\mu\text{g/ml}$)	Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)	Dexametasona (10 $\mu\text{g/ml}$) + Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)
10	71,23 \pm 9,38	94,24 \pm 14,68	76,76 \pm 9,62	50,03 \pm 5,45	60,56 \pm 8,69
20	73,40 \pm 10,37	96,72 \pm 15,02	74,01 \pm 9,57	47,16 \pm 4,45	67,47 \pm 8,72
30	74,30 \pm 8,24	95,98 \pm 15,38	78,28 \pm 9,63	37,26 \pm 3,69	63,27 \pm 8,50
40	77,53 \pm 6,53	84,84 \pm 15,04	132,97 \pm 9,90*	42,17 \pm 4,25	56,42 \pm 9,51
50	78,80 \pm 10,12	82,33 \pm 15,74	145,53 \pm 14,53*	46,88 \pm 3,54	54,92 \pm 11,92
60	79,20 \pm 8,36	92,10 \pm 15,78	163,96 \pm 17,81*	92,11 \pm 8,87	54,85 \pm 15,50
70	80,63 \pm 6,26	89,60 \pm 13,99	549,62 \pm 31,76*	96,75 \pm 9,11	56,58 \pm 12,53
80	81,14 \pm 9,16	83,60 \pm 13,13	408,92 \pm 29,55*	137,37 \pm 13,25*	52,24 \pm 9,32
90	81,20 \pm 9,10	73,71 \pm 12,46	333,56 \pm 29,54*	156,68 \pm 15,64*	57,24 \pm 15,94
100	82,25 \pm 8,20	---	---	---	51,32 \pm 13,60
110	81,40 \pm 7,24	---	---	---	49,17 \pm 14,63
120	82,15 \pm 9,56	---	---	---	40,40 \pm 9,33

Os dados representam a média \pm E.P.M.* $p < 0,05$.

TABELA 10: Transporte de Potássio ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) em Rins Controles e Perfundidos com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* (n=22).

Tempo (min)	Controle	Crotoxina (1 $\mu\text{g/ml}$)	Crotoxina (2 $\mu\text{g/ml}$)	Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)	Dexametasona (10 $\mu\text{g/ml}$) + Veneno (1 $\mu\text{g/ml}$)
10	1,80 \pm 0,14	1,89 \pm 0,28	2,41 \pm 0,50	1,63 \pm 0,20	1,70 \pm 0,02
20	1,84 \pm 0,16	1,84 \pm 0,23	2,56 \pm 0,56	1,66 \pm 0,18	1,73 \pm 0,19
30	1,85 \pm 0,16	1,84 \pm 0,23	2,77 \pm 0,38	1,33 \pm 0,20	1,68 \pm 0,03
40	1,78 \pm 0,16	1,77 \pm 0,20	5,02 \pm 1,91	1,53 \pm 0,20	1,56 \pm 0,09
50	1,63 \pm 0,26	1,71 \pm 0,17	5,58 \pm 1,81*	1,34 \pm 0,20	1,49 \pm 0,14
60	1,89 \pm 0,28	1,45 \pm 0,11	11,19 \pm 1,39*	3,38 \pm 0,24*	1,37 \pm 0,32
70	1,90 \pm 0,28	1,41 \pm 0,13	21,60 \pm 3,05*	3,50 \pm 0,20*	1,56 \pm 0,27
80	1,88 \pm 0,22	1,43 \pm 0,11	15,88 \pm 2,79*	5,00 \pm 0,21*	1,51 \pm 0,18
90	1,92 \pm 0,10	1,55 \pm 0,12	13,02 \pm 2,16*	5,38 \pm 0,27*	1,70 \pm 0,18
100	1,90 \pm 0,16	---	---	---	1,58 \pm 0,29
110	1,90 \pm 0,22	---	---	---	1,37 \pm 0,27
120	1,92 \pm 0,18	---	---	---	1,39 \pm 0,26

Os dados representam a média \pm E.P.M.* $p < 0,05$.

TABELA 11: Composição Eletrolítica Tecidual de Sódio e Potássio em Rins não Perfundidos (Rim Esquerdo, RE) e Rins Perfundidos (Rim Direito, RD) com solução de Krebs Henseleit modificado com Crotoxina, Veneno da *C. durissus terrificus* e Dexametasona + Veneno da *C. durissus terrificus* .

Variáveis		Controle	Crotoxina (1 µg/ml)	Crotoxina (2 µg/ml)	Veneno (1 µg/ml)	Dexametasona (10 µg/ml) + Veneno (1 µg/ml)
Na ⁺ µEq.g ⁻¹	RE	162,22 ± 14,82	181,20 ± 7,45	143,56 ± 7,48	205,22 ± 16,50	128,56 ± 7,15
	RD	209,56 ± 19,34	170,96 ± 6,75	542,70 ± 17,72*	333,50 ± 11,66*	181,76 ± 1,92
K ⁺ µEq.g ⁻¹	RE	127,64 ± 9,01	161,34 ± 5,32	153,80 ± 12,87	117,66 ± 8,85	155,22 ± 7,42
	RD	117,14 ± 2,97	105,63 ± 4,95*	134,52 ± 6,52*	66,04 ± 2,19*	84,72 ± 3,78*

Os dados representam a média ± E.P.M.* p<0,05.