

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 11 62322	
05 / 10 / 99	

Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente
Bothrops jararacussu em ratos

ALEXANDRE HAVT

FC-00006284-2

FORTALEZA - CE
1999

ORIENTADOR:

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

H323t Havt, Alexandre

Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos / Alexandre Havt. – Fortaleza, 1999.

161f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. *Bothrops*. 2. Nefrologia – Toxicidade.

3. Hematologia – Toxicidade. I. Título

CDD 615.942

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Alexandre Havt Bindá

Dissertação aprovada em 19 - 02 - 1999

Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À MÚSICA

Por me deixar mais próximo dos deuses

AOS MEUS PAIS E IRMÃS

Por tudo que sou

AO PROF. MANASSÉS

Pela oportunidade de poder crescer cientificamente

Agradecimentos

À profa. **Helena Serra Azul Monteiro** pela orientação e companheirismo.

Aos eternos amigos **Nilberto** e **Angélica**, que me acompanharam nessa ardorosa vida científica.

Aos amigos músicos **Júnior, André, Elvis, Betinho, Prata e Erwin**, pela oportunidade de estar mais próximo da música.

A todos os outros **amigos**, não músicos, que sempre foram importantes em toda a minha vida.

À minha irmã **Nadja**, pelas sugestões de correção de toda a dissertação

Ao amigo **Romero**, pela paciência e enorme ajuda durante os experimentos.

À **Arlandia**, pelo companheirismo e cumplicidade durante todo o Mestrado.

À **Profa. Iêda Pereira**, pela ajuda nos experimentos hematológicos.

Ao **Prof. Dalgimar Beserra de Menezes**, pela imensa ajuda nos estudos histopatológicos e todas as sugestões de correção das traduções para o Inglês.

Ao amigo **Sérgio Almeida**, pelas fotos da técnica cirúrgica e todas as fotos que indiretamente fizeram parte dos trabalhos durante todo Mestrado.

Aos estudantes de iniciação científica **Janaina, Milena, Ederson, Gustavo, Russilânia, Cristina**, e **Mércia**, que tanto me ajudaram nos experimentos.

À Técnica do laboratório **Maria Silvia Helena França**, pela imensa ajuda durante os experimentos renais.

Ao Bioquímico **Domingos Barreto de Oliveira**, pela realização dos ensaios bioquímicos.

Aos **funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas** que indiretamente ajudaram na realização dos experimentos.

À bibliotecária Norma pela correção das referências bibliográficas.

Ao **CNPq e Funcap**, pelo financiamento dos trabalhos que geraram esta dissertação.

**Dedico esta dissertação a Minha Mãe,
sinônimo de respeito e amizade
e a minha sobrinha Julia, pela inocência infantil.**

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	01
1 - As serpentes e o homem	01
2 - Classificação	03
3 - Epidemiologia	14
4 - Composição dos venenos ofídicos	20
5 - Alterações clínicas e patológicas	25
6 - Tratamento e profilaxia	31
OBJETIVOS	36
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Parte 1 - Toxicidade aguda e determinação da DL50	37
1 - Descrições gerais	37
2 - Determinação da DL50	37
3 - Histologia	38
Parte 2 - Hematologia	39
1 - Descrições gerais	39
2 - Descrição específica dos exames hematológicos	39
2.1 - Eritrograma	40
2.1.1 - Contagem de eritrócitos	40
2.1.2 - Hematócrito	40
2.1.3 - Dosagem de hemoglobina	41
2.1.4 - Valores hematimétricos	42
2.2 - Leucograma	43
2.2.1 - Contagem dos leucócitos totais	43
2.2.2 - Contagem diferencial dos leucócitos	44
3 - Dosagem das proteínas plasmáticas totais	44
4 - Contagem de plaquetas	45
5 - Estatística	45

Parte 3 - Perfusão renal	46
1 - Animais experimentais	46
2 - Divisão dos grupos de animais	46
3 - Veneno	46
4 - Substâncias utilizadas	47
5 - Solução perfusora e seu preparo	47
6 - O sistema de perfusão renal	48
7 - Preparo do sistema	50
8 - Técnica cirúrgica	54
9 - Protocolo experimental	55
10 - Avaliação bioquímica	57
11 - Histologia	57
12 - Cálculo dos parâmetros renais	57
13 - Estatística	59
RESULTADOS	61
Parte 1 - Toxicidade aguda com determinação da DL50	61
Parte 2 - Avaliação hematológica	68
1 - Avaliação dos grupos controle	68
2 - Ação do veneno de <i>B. jararacussu</i> nos parâmetros sanguíneos	68
Parte 3 - Perfusão renal	86
1 - Avaliação do grupo controle	86
2 - Efeito do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	86
DISCUSSÃO	120
CONCLUSÕES	136
ANEXO	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

Lista de abreviaturas

B. jararacussu - *Bothrops jararacussu*

DL50 - Dose letal média, ou dose capaz de matar metade dos animais.

IP - Via intraperitoneal

VCM - Volume corpuscular médio

CHCM - Concentração corpuscular média

HCM - Hemoglobina corpuscular média

PPT - Proteínas plasmáticas totais

PP - Pressão de perfusão

RVR - Resistência vascular renal

FU - Fluxo urinário

RFG - Ritmo de filtração glomerular

%TNa⁺ - percentual de transporte tubular de sódio

%TK⁺ - percentual de transporte tubular de potássio

%TCI⁻ - percentual de transporte tubular de cloro

%pTNa⁻ - percentual de transporte proximal de sódio

%pTK⁺ - percentual de transporte proximal de potássio

%pTCI⁻ - percentual de transporte proximal de cloro

Cosm - clearance osmótico

ENa⁺ - sódio excretado

EK⁺ - potássio excretado

ECl⁻ - cloro excretado

Lista de Figuras

Figura 01 - Tipos de dentição encontradas nas serpentes.	05
Figura 02 - Tipos de caudas encontradas nas serpentes da subfamília <i>Crotalinae</i> .	06
Figura 03 - Serpente da espécie <i>Bothrops jararacussu</i> .	13
Figura 04 - Procedência das notificações dos acidentes ofídicos no Brasil no período de 1990 a 1993.	14
Figura 05 - Distribuição mensal dos acidentes ofídicos no Brasil no período de 1990 a 1993.	15
Figura 06 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil segundo o gênero da serpente peçonhenta no período de 1990 a 1993.	16
Figura 07 - Letalidade dos acidentes ofídicos por regiões fisiográficas no período de 1990 a 1993.	18
Figura 08 - Reticulo de leitura da Câmara de Neubauer.	41
Figura 09 - Sistema de perfusão renal esquemático.	51
Figura 10 - Retas de calibração da velocidade da bomba X fluxo.	52
Figura 11 - Retas de calibração da velocidade da bomba X pressão de perfusão.	52
Figura 12 - Retas de calibração da velocidade da bomba X fluxômetro.	53
Figura 13 - Retas de calibração do fluxômetro X pressão de perfusão.	53
Figura 14 - Retas de calibração do fluxômetro X fluxo.	54
Figura 15 - Técnica cirúrgica.	56
Figura 16 - Curva da Dose letal 50% .	63
Figura 17 - Número de eritrócitos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	72

Figura 18 - Concentração de hemoglobina sérica na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	73
Figura 19 - Valores do hematócrito na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	74
Figura 20 - Número de plaquetas na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	75
Figura 22 - Volume corpuscular médio na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	76
Figura 23 - Concentração de hemoglobina corpuscular média na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	77
Figura 24 - Hemoglobina corpuscular média na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	78
Figura 21 - Concentração de proteínas plasmáticas totais na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	80
Figura 25 - Número de leucócitos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	81
Figura 26 - Número de neutrófilos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	82
Figura 27 - Número de linfócitos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	83
Figura 28 - Número de eosinófilos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	84
Figura 29 - Número de monócitos na ausência (n=6) e presença do veneno de <i>B. jararacussu</i> (n=6).	85
Figura 30 - Pressão de perfusão na ausência, (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	93
Figura 31 - Resistência vascular renal na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	95

- Figura 32** - Fluxo urinário na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 97
- Figura 33** - Ritmo de filtração glomerular na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 99
- Figura 34** - Percentual de transporte tubular de sódio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 101
- Figura 35** - Percentual de transporte tubular de potássio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 103
- Figura 36** - Percentual de transporte tubular de cloro na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 105
- Figura 37** - Percentual de transporte proximal de sódio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 107
- Figura 38** - Percentual de transporte proximal de potássio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 109
- Figura 39** - Percentual de transporte proximal de cloro na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 111
- Figura 40** - Sódio excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 113
- Figura 41** - Potássio excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 115
- Figura 42** - Cloro excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 117

Figura 43 Clearance osmótico na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs- Henseleit contendo 6% de albumina bovina.

Lista de Quadros

Quadro 01 – Distinção das serpentes brasileiras de acordo com a dentição, presença de fosseta loreal, e particularidades da cauda, corpo e biologia.	07
Quadro 02 – Principais enzimas encontradas nos venenos de serpentes.	22

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Coeficientes de incidência dos acidentes por serpentes no Brasil por região fisiográfica entre 1990 e 1993.	15
Tabela 02 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil entre 1990 e 1993 de acordo com o gênero das serpentes.	16
Tabela 03 - Índice de letalidade dos acidentes ofídicos no Brasil entre 1990 e 1993 de acordo como gênero da serpente	17
Tabela 04 - Determinação da DL50 pelo método dos probitos	62
Tabela 05 - Alterações histopatológicas em ratos Wistar causadas pelo veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> na dose de 2,0 mg/kg (n=6).	64
Tabela 06 - Alterações histopatológicas em ratos Wistar causadas pelo veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> na dose de 4,0 mg/kg (n=6).	65
Tabela 07 - Alterações histopatológicas em ratos Wistar causadas pelo veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> na dose de 8,0 mg/kg (n=6).	66
Tabela 08 - Alterações histopatológicas em ratos Wistar causadas pelo veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> na dose de 16,0 mg/kg (n=6).	67
Tabela 09 - Valores de referência para o hemograma de ratos Wistar provenientes do Biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas - UFC (n=24).	70
Tabela 10 - Valores para o eritrograma em ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> .	71
Tabela 11 - Dosagem das proteínas plasmáticas totais e valores para o leucograma em ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> .	79
Tabela 12 - Parâmetros renais (PP, RVR, FU, RFG) após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina (n=6).	89
Tabela 13 - Parâmetros renais (%TNa ⁺ , %TK ⁺ , %TCl ⁻ , %pTNa ⁺ , %pTK ⁺ , %pTCl ⁻) após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina (n=6).	90

Tabela 14 - Parâmetros renais (ENa^+ , EK^+ , ECl^- , C_{osm}) após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina (n=6).	91
Tabela 15 - Pressão de perfusão na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	92
Tabela 16 - Resistência vascular renal na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	94
Tabela 17 - Fluxo urinário na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	96
Tabela 18 - Ritmo de filtração glomerular na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	98
Tabela 19 - Percentual de transporte tubular de sódio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	100
Tabela 20 - Percentual de transporte tubular de potássio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	102
Tabela 21 - Percentual de transporte tubular de cloro na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	104
Tabela 22 - Percentual de transporte tubular proximal de sódio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	106
Tabela 23 - Percentual de transporte tubular proximal de potássio na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de <i>B. jararacussu</i> nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina.	108

- Tabela 24** - Percentual de transporte tubular proximal de cloro na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 110
- Tabela 25** - Sódio excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 112
- Tabela 26** - Potássio excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 114
- Tabela 27** - Cloro excretado na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 116
- Tabela 28** - Clearance osmótico na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *B. jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml de solução perfusora de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. 118

Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais causadas pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos.

Alexandre Havt, Dissertação de Mestrado, UFC, 1999.

Os mais recentes dados publicados pelo Ministério da Saúde revelam um número de aproximadamente 20.000 acidentes humanos por picada de serpentes por ano. Este trabalho teve como objetivo geral, avaliar a toxicidade aguda e estudar as alterações hematológicas e renais após inoculação experimental do veneno bruto da serpente *Bothrops Jararacussu* em ratos Wistar.

Inicialmente investigamos a toxicidade aguda do veneno e determinamos sua DL50. Quatro grupos de seis animais foram inoculados intraperitonealmente nas doses de 2, 4, 8 e 16mg/kg. Pelo método dos probitos, encontramos a DL50 de $9,5 \pm 0,44$ mg/kg. Em estudo complementar, fragmentos de rim, baço, pulmão, cérebro, fígado e coração foram coletados dos animais mortos e sobreviventes para avaliação histopatológica. Os últimos foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia intraperitoneal com pentobarbital (50mg/kg). As lâminas coradas por Hematoxilina-eosina foram lidas em microscópio óptico. Todos os tecidos apresentaram congestão. Nos fígados e cérebros a congestão foi a única alteração observada. Encontramos nos rins dilatação das células tubulares, edema intersticial, cilindros protéicos e exudação granulocitária. Nos baços observamos hiperplasia de polpa branca e nos pulmões encontramos exudação granulocitária e um caso de broncopneumonia. Em um único caso o coração apresentou, além de congestão, sinais de destruição muscular.

Realizamos avaliação hematológica a partir da coleta de sangue, conservado em heparina (500 UI/ml), por punção cardíaca após administração intraperitoneal do veneno de *Bothrops jararacussu* na dose de 9,5mg/kg em oito grupos de seis animais. Cada grupo com veneno tinha um grupo controle correspondente, que foram avaliados nos tempos de 2, 6, 12 e 24 horas. Comparando os grupos observamos aumento no número de leucócitos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos, assim como para os valores corpusculares médios VCM= volume corpuscular médio; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; e HCM= hemoglobina corpuscular média. O número de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina sérica, plaquetas, e proteínas plasmáticas totais (PPT) apresentaram decréscimo em relação ao controle.

Utilizamos o método de perfusão de rim isolado de rato para investigar as alterações funcionais renais. Após anestesia intraperitoneal com pentobarbital (50mg/kg) a artéria renal direita foi canulada a partir da artéria mesentérica superior sem a interrupção do fluxo sanguíneo (Bowman, R.H., Maack, T.E. Amer. J. Physiol, v. 226, p. 426-430, 1974). Após 20 minutos de adaptação, tanto dos rins como do sistema, iniciamos os experimentos que duravam 120 minutos. Usamos os 30 primeiros minutos como controle interno. Adicionamos o veneno ao sistema após estes 30 minutos, nas concentrações de 3, 10 e 30µg. A cada 10 minutos coletamos urina e perfusato, de forma intercalada, para realização de análise laboratorial com dosagens de sódio, potássio, cloro, inulina e medida da

osmolaridade. Fizemos comparações por ANOVA entre os três grupos tratados e o grupo controle e entre os três grupos tratados entre si. Os fragmentos de rins tratados e não tratados foram avaliados por microscopia óptica através de lâminas coradas por hematoxilina-eosina. A pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁻), percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻), foram estatisticamente diferentes do controle com 90 e 120 minutos de experimento em todas as concentrações de veneno. O percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) e percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl⁻) diminuíram com 120 minutos em todos os grupos tratados, contudo, para o grupo de 30µg esta redução iniciou aos 90 minutos. O percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁻) e o percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁻) reduziram aos 60 e 120 minutos nos grupos de 10 e 30µg. O ritmo de filtração glomerular (RFG) reduziu inicialmente aos 60 minutos nos grupos de 10 e 30µg, porém, aumentou aos 120 minutos no grupo de 30µg. Observamos também um aumento aos 120 minutos do fluxo urinário (FU), do *clearance* osmótico (Cosm), e da excreção de sódio potássio e cloro (ENa⁺, EK⁺, ECl⁻) nos grupos de 10 e 30µg. Notamos efeito dose dependente no tempo de 120 minutos para os parâmetros resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), *clearance* osmótico (Cosm), e excreção de sódio, potássio e cloro (ENa⁻, EK⁻, ECl⁻).

A avaliação histopatológica dos fragmentos de rins mostrou a presença de material protéico nos glomérulos e túbulos renais nos grupos com 10 e 30µg. O mesmo material foi visto no grupo de 3µg, porém apenas nos túbulos. Quanto maior a quantidade de veneno empregada maior a intensidade do surgimento destes materiais protéicos, demonstrando um efeito dose dependente.

Concluimos que a DL50% para o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar foi de $9,5 \pm 0,44$ mg/kg e a avaliação histopatológica sugeriu que uma congestão intravascular disseminada associada com processo inflamatório e nefrose foram os possíveis causadores das mortes de alguns animais. A avaliação hematológica mostrou quadros de eritrocitopenia, trombocitopenia e perda de proteínas plasmáticas totais, associado a um processo inflamatório às expensas de neutrofilia, linfocitose e monocitose sem contudo observarmos desvio à esquerda. O veneno de *Bothrops jararacussu* causou intensas alterações funcionais e patológicas nos rins, contudo a falta de alterações histológicas nos glomérulos do grupo de 3µg sugere a possibilidade de uma ação independente do veneno sobre os túbulos.

Acute toxicity and hematological and renal alterations caused by the ophidian venom of *Bothrops jararacussu* in rats.

The most recent data from ophidian bites in Brazil show approximately an amount of 20.000 human accidents each year. This work has the objective of evaluating the acute toxicity and the hematological and renal alterations after experimental envenomation with the crude lyophilized venom of *Bothrops jararacussu*, in Wistar rats.

Initially, we investigated the venom's acute toxicity and determined its LD50. Four groups of six animals (n=24) were inoculated intraperitoneally with doses of 2, 4, 8 and 16 mg/kg. The LD50, after probit analyses, was $9,5 \pm 0,44$ mg/kg. As a complementary study, fragments of kidney, spleen, lungs, brain, liver and heart were collected for histopathological evaluation by Hematoxylin-Eosin staining under optic microscopy, from the dead and surviving animals. The last ones were sacrificed by cervical displacement after pentobarbital anesthesia (50mg/kg). All tissues presented congestion. The congestion was the only alteration observed in the liver and brain. We found dilatation of tubule cells, interstitial edema, proteic casts, and cellular exudation in the kidneys. The spleen presented white pulp hyperplasia. The lungs presented cellular exudation and one case of bronchopneumonia. In one specific animal, the heart showed muscle destruction.

The hematological evaluation was done with blood collection, preserved in heparin (500 UI/ml), after intraperitoneally inoculation of the venom at the dose of 9,5mg/kg in eight groups of six animals (n=48). Each treated group had a control group, which were analyzed in the periods of 2, 6, 12 and 24 hours. When the treated and control groups were compared, an increase in the number of leukocytes, lymphocytes, monocytes, eosinophils, neutrophils was found, as well as in the mean corpuscular values MCV= mean corpuscular volume; MCHC= mean corpuscular hemoglobin concentration; and MCH= mean corpuscular hemoglobin. A decrease in the number of erythrocytes, in hemoglobin concentration, hematocrit, platelets and total plasma proteins (TPP) was also found.

The isolated perfused rat kidney method was used to investigate the renal alterations. After intraperitoneally pentobarbitone anesthesia (50mg/kg) the right renal artery was cannulated through the upper mesenteric artery without blood flow interruption (Bowman, R.H., Maack, T.E. Amer. J. Physiol. 226: 426-430, 1974). Following 20 minutes for complete adjustments for both kidney and system, the experiments were started and lasted 120 minutes. The first 30 minutes were used as internal control. The venom was added in the system after these 30 minutes in the concentrations of 3, 10 and 30 μ g/ml. Every ten minutes, urine and perfusate were collected for further laboratorial analysis of sodium, potassium, chloride, inulin and osmolarity. ANOVA comparisons were done for all groups. Fragments from treated and control kidneys were evaluated by Hematoxylin-Eosin staining under optic microscopy. The perfused pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), tubular sodium transport percentage (%TNa⁻), tubular chloride transport percentage (%TCl⁻) were statistically different from control at 90 and 120 minutes in all venom concentrations. The proximal tubular sodium transport percentage (%pTNa⁺) and proximal tubular chloride

transport percentage (%pTCl⁻) decreased at 120 minutes in all concentrations; however, for the 30µg group the reduction started at 90 minutes. Tubular potassium transport percentage (%TK⁻) and proximal tubular potassium transport percentage (%pTK⁻) reduced at 60 minutes in the groups of 10 and 30µg and at 120 minutes in all concentrations. The glomerular filtration rate (GFR) initially reduced at 60 minutes in the groups of 10 and 30µg, but increased at 120 minute in the group of 30µg. An increase at 120 minutes was also seen for urinary flow (UF), sodium, potassium, chloride excretion (ENa⁻, EK⁻, ECL⁻) and osmotic clearance (Cosm) in the groups of 10 and 30µg. Complete dose-dependency was observed for renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), and sodium, potassium, chloride excretion (ENa⁻, EK⁻, ECL⁻) and osmotic clearance (Cosm) at 120 minutes.

The histopathological evaluation of the fragments of kidney showed a substance in the urinary space of the glomeruli and the presence of proteic casts in the tubules in the treated groups of 10 and 30µg. The same material was also seen in the tubules but not in the glomeruli in the treated group of 3µg. More proteic casts was seen as much venom concentration were used, demonstrating a dose-dependency logic.

In conclusion, the DL50 of the crude venom from *Bothrops jararacussu* in rats was $9,5 \pm 0,44$ mg/kg. Taking into account the histopathological evaluation we suggest that an intravascular disseminated coagulation associated with an inflammatory process and nephrosis were the cause of the death of some animals. The hematological alterations seen in this study was erythrocytopenia, thrombocytopenia and loss of total plasma proteins. An inflamatory process based in neutrophilia, lymphocytosis and monocytosis without a left shift in the leukogram was also noticed. The venom from *Bothrops jararacussu* caused intense functional and pathological alterations in the kidney, however an independent tubule action can be suggested, specially because at the 3µg group we observed alterations only in the tubules.

Introdução

1 - As Serpentes e o Homem

As mais remotas evidências do interesse humano por serpentes vêm de pinturas em cavernas do Sudeste da Europa que datam de 20 a 30 mil anos atrás. Outras pinturas com representações serpentiformes em cavernas podem ser encontradas em regiões habitadas por tribos cujo estilo de vida não sofreu muitas modificações, como o daquelas do Sudeste da África e aborígenes Australianos (Mattison, 1995). Além disso, as serpentes têm um papel importante na mitologia de diversas civilizações do mundo.

Dentre tantas civilizações existentes e outras tantas aniquiladas na história mundial, nenhum outro animal foi, e é, mais cultuado ou amaldiçoado que as serpentes. Estas são vistas como deuses, demônios, monstros, ancestrais ou protetores sagrados, dependendo da civilização em questão.

Na Mesopotâmia, Apsoo, o deus primário, criou Timat, uma divindade feminina semelhante a uma serpente ou dragão. Ambos conceberam outros deuses e um deles, Marduk, organizou o mundo, e usando metade do corpo de Tiamat criou o céu.

Na Índia, acreditava-se que, após um dilúvio, um número de elementos vitais, divindades e objetos preciosos desapareceram do mar do leite e do seu creme, chamado Amrita, de onde os deuses drenavam suas forças. Para encontrar o que havia sido perdido e recriar o mundo, os deuses combateram o mar com a serpente da eternidade, Vasuki (Boquet, 1979).

As serpentes na África têm um papel preponderante nos mitos de criação.

Para os Dogons de Mali, o deus Amma criou a Terra e envolveu-a com uma grande serpente. Para os Dinka do Sudão, o primeiro homem existente está associado à serpente e ao sol, enquanto a primeira mulher, com a serpente e a água.

Para Aborígenes Australianos o mundo foi criado por uma enorme e sobrenatural serpente, um ancestral chamado Kurrichalpongo. De seus ovos teriam emergido as montanhas, árvores e animais (Fourcade, 1997).

Na tradição judaica e cristã, de acordo com o velho testamento, a serpente convenceu Adão e Eva a provarem do fruto da árvore do bem e do mal, única árvore cujos frutos a qual eles eram proibidos de tocar. A serpente então levou-os a cometer o pecado original e como castigo foram exilados do paraíso e obrigados a trabalhar, procriar e morrer

Muitos dos monstros das lendas Gregas foram serpentes ou possuíam atributos ofídicos. Cérbero, o guardião do inferno, tinha três cabeças e um rabo de serpente. A Hidra de Lerna, presente no mito de Hércules, tinha nove cabeças de serpente que renasciam quando cortadas (Brandão, 1989).

Não só as populações do velho mundo têm as serpentes associadas a deuses de sua mitologia. Índios Americanos relacionam-nas às chuvas. Por isso, nas regiões áridas, as danças da chuva envolvem a presença de ofídios vivos. Após as danças, esses índios as depositam em buracos entre rochas para que estas levem suas preces aos deuses da chuva. Nesses casos elas fazem o papel de mensageiras.

Os Astecas e Maias decoravam seus templos e monumentos com objetos feitos de pedra, com forma estilizada de serpentes. Além disso, muitas divindades foram

esculpidas com serpentes envoltas em seus corpos na forma de mantos, saias ou cintos e muitos carregam cajados com serpentes.

Muitas das crenças e preconceitos antigos em relação às serpentes ainda vivem até hoje. E isso vem associado à necessidade que o homem tem de fazer uso da natureza para contornar problemas principalmente de saúde. Daí encontramos inúmeros remédios tradicionais feitos com partes anatômicas das serpentes que mesmo sem comprovação científica são usados pelo mundo. A camada de pele liberada a cada muda é usada popularmente para curar reumatismo, inflamação de garganta, dor de cabeça e dor nas costas. A pele é usada para ajudar no parto, assim como a vesícula. A musculatura tem sido usada para tratamento da pele e face, e a gordura é usada para a calvície. Na China a carne oriunda das serpentes marinhas se pensa ser efetiva contra malária e epilepsia (Mattinson, 1995).

2 - Classificação

Os ofídios pertencem à classe *Reptilia*, subclasse *Lepidosauria*, ordem *Squamata* e subordem Serpentes (Troiano, 1991). Existem na Terra cerca de 3000 espécies de serpentes das quais 410 são classificadas como venenosas (Barraviera e Pereira, 1994).

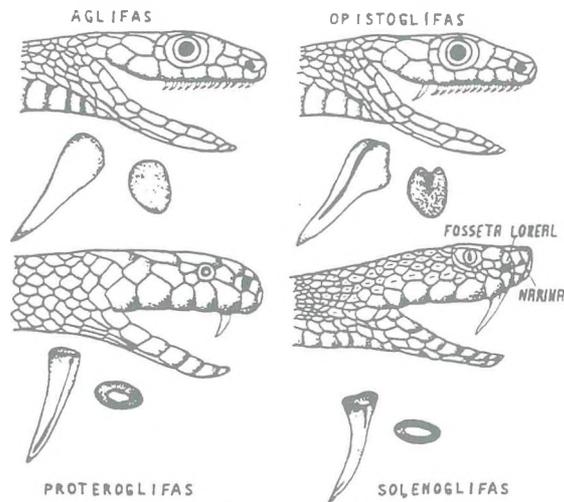
Muitas são as características que distinguem as serpentes peçonhentas das não peçonhentas. Desde 1986, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a notificação do acidente ofídico. Desde então a distinção entre serpentes venenosas e não venenosas ganhou maior importância no Brasil. Podemos identificar as serpentes de acordo com as

suas características de dentição, presença ou não de fosseta loreal e particularidades da cauda, corpo, olhos e de sua biologia.

Entre as serpentes podemos classificar quatro tipos de dentição. Os ofídios de dentição áglifa têm dentes aproximadamente do mesmo tamanho e não possuem canais ou sulcos. Temos como exemplo as serpentes da família *Boidae*. As espécies que apresentam dentição opistóglifa possuem dentes anteriores de tamanhos aproximadamente iguais e dentes posteriores de tamanhos diferenciados. Os dentes do maxilar superior posterior são maiores que os demais e são providos de sulcos por onde o veneno escorre e penetra no ferimento. Em virtude de sua localização torna-se difícil a inoculação do veneno em um animal que não pode ser deglutido. Como exemplo teríamos algumas serpentes da família *Colubridae* (Jorge e Ribeiro, 1990). Tanto a classificação áglifa como a opistóglifa são características de serpentes não peçonhentas, porém existem algumas exceções. Já foi relatado um caso de acidente com serpente de dentição opistóglifa, *Philodryas olfersii*, (Silva e Buononato, 1983/84).

Os ofídios com dentição proteróglifa têm presas anteriores, sendo estas pequenas, fixas e sulcadas. A família *Elapidae* é um exemplo deste tipo de dentição. As serpentes classificadas com dentição tipo solenóglifa apresentam um ou mais pares de presas anteriores, grandes, canaliculadas e inseridas no osso maxilar que é móvel, permitindo a movimentação dessa presa para frente no ato do bote. O gênero *Bothrops* é exemplo deste tipo de dentição. Tanto a dentição opistóglifa como a solenóglifa são características de serpentes peçonhentas (Puerto, 1992), ver figura 01.

Figura 01 – Tipos de dentição encontradas nas serpentes.

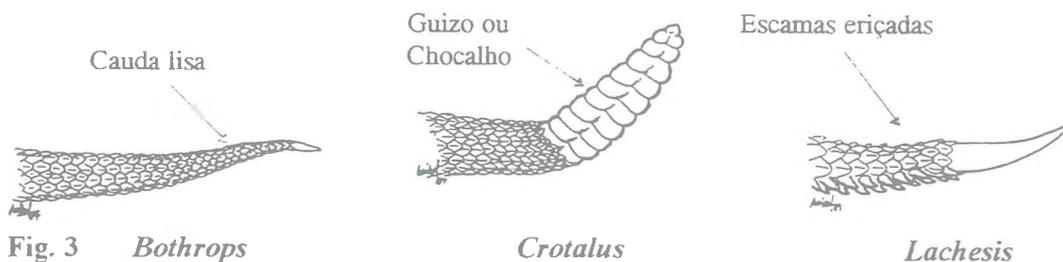


Fonte: Schvartsman, 1992

Todas as serpentes peçonhentas no Brasil apresentam fossa loreal, com exceção para o gênero *Micrurus*. A fossa loreal é caracterizada por um orifício entre a narina e o olho, uma de cada lado e tem função termossensitiva (figura 01).

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

Figura 02 - Tipos de caudas encontradas nas serpentes da subfamília Crotalinae



Fonte: Brasil, 1998

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

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

Muitas exceções são encontradas no tocante às características do corpo, cabeça e olhos, quando tentamos distinguir as serpentes venenosas das não venenosas. Somente a classificação da dentição assegura uma melhor identificação. Um resumo destas características pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 - Distinção das serpentes brasileiras de acordo com a dentição, presença da fosseta loreal e particularidades da cauda, corpo e biologia.

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

Fonte: Barraviera, 1991

No Brasil, as serpentes peçonhentas estão distribuídas em duas famílias. A família *Elapidae*, representada pelo gênero *Micrurus*, com 29 espécies; e a família *Viperidae*, representada no Brasil pela subfamília *Crotalinae*, com os gêneros *Bothrops*, com 32 espécies catalogadas, o gênero *Crotalus*, com seis subespécies de uma só espécie, e o gênero *Lachesis*, com uma espécie dividida em duas subespécies. No total teríamos 69 serpentes peçonhentas (Barraviera e Pereira, 1994).

A família *Elapidae* está bem distribuída em todo o mundo, em ambientes tanto aquáticos como terrestres; estando mais bem representadas no hemisfério sul. Esta família habita por toda a Oceania e sul da Ásia; grande parte da África, com exceção dos territórios desérticos e de Madagascar; além do Sudeste da América do Norte, e toda a América Central e do Sul (Mattison, 1995).

Na América do Sul, estão representadas pela subfamília *Elapinae*, onde encontramos os gêneros *Leptomicrurus*, *Micruroides* e *Micrurus*. Neste último estão todas as representantes brasileiras desta família (Roze, 1982).

As cobras corais, como são popularmente conhecidas as serpentes do gênero *Micrurus*, têm um padrão colorido de anéis que formam tríades com a sequência vermelho-preto-amarelo-preto-amarelo-preto-vermelho. Em algumas espécies a cor amarela é substituída pela cor branca (Mehrtens, 1987).

Apresentam cabeça ovalada, não diferenciada do corpo, que é cilíndrico e delgado. Os olhos são pequenos com pupilas redondas. As escamas são lisas e grandes. Têm hábitos fossoriais vespertinos e noturnos. Vivem em troncos, ocos de árvores e preferem zonas úmidas e sombreadas. Alimentam-se de lacertílios e amphisbenídeos, ou outras serpentes. São pouco agressivas, porém, quando ameaçadas, assumem postura de

ataque onde a cauda é erguida e movimentada em semicírculos, simulando uma cabeça. Desta forma, quando se tenta capturá-la pela cauda, a cabeça vira rapidamente, ocorrendo o bote (Romano-Hoge, 1990).

Gualtiéri (1987) destaca como principais espécies: *Micrurus frontalis*, *Micrurus corallinus*, *Micrurus surinamensis*, *Micrurus lemniscatus* e *Micrurus ibiboboca*.

A família *Viperidae* está dividida em três subfamílias. A mais antiga das três, *Azemiopinae*, pode ser encontrada na Ásia; as “verdadeiras” viperídeas da subfamília *Viperinae*, encontram-se distribuídas pela Europa, Ásia e África; e finalmente, a subfamília *Crotalinae*, presentes principalmente nas Américas, podendo ainda ser encontrada na Ásia e Europa. Esta última subfamília tem como característica diferencial dentre as outras serpentes da mesma família a presença da fosseta loreal. As representantes brasileiras da subfamília *Crotalinae* estão distribuídas em três gêneros: *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, (Rage, 1997).

No Brasil, o gênero *Lachesis* está representado por uma espécie subdividida em duas subespécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctivaga*, (Barraviera, 1994), conhecida como Surucucu, Surucucu pico de jaca ou Surucutinga. Neste gênero encontramos as maiores serpentes venenosas da América Latina, podendo atingir até quatro metros e inocular quatro mililitros de veneno líquido, que perfazem um grama de veneno seco (Barraviera, 1991). Habitam florestas densas e são encontradas na região Amazônica e Mata Atlântica do Nordeste ao Rio de Janeiro (Puerto, 1992). Tem um padrão de cor marrom amarelado, com grandes manchas triangulares pretas, as quais apresentam uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçada (Grantsau, 1991).



O gênero *Crotalus* é o mais conhecido dentre os viperídeos. São 26 espécies que habitam do Norte do Canadá até o Sul da Argentina. São todas terrestres, mas nenhuma tem hábito arborícola. Ocorrem geralmente em terrenos secos e pedregosos, porém algumas podem ser vistas em terrenos mais úmidos, inclusive em matas tropicais (Mattison, 1995).

No Brasil são popularmente conhecidas como Cascavel, Cascavel-de-quatro-ventas, Boicininga ou Maracabóia. São distribuídas ao longo de todo o território brasileiro, à exceção da Mata Atlântica e região Amazônica (Puerto, 1992). De fato, compõem a única espécie que representa este gênero no país a *Crotalus durissus*, dividida em seis subespécies, *Crotalus durissus terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima*, *C. d. marajoensis*, e *C. d. trigonicus* (Barraviera, 1993).

Mesmo entre as próprias subespécies a coloração é bastante variável. Podemos encontrar as cores oliva-cinza, oliva, marrom-cinza até marrom, com manchas romboédricas pela linha dorsal, manchas com margens brancas e centro mais claro; lado ventral branco-amarelado até cinza-amarelado (Grantsau, 1991).

Bothrops é o terceiro e último gênero da família *Crotalidae* encontrado no Brasil. Ocorrem na América Central e América do Sul, ocupando todo o território brasileiro. Apresentam grande diversidade de cores, desenhos, tamanhos e hábitos, sendo o mais numeroso gênero, com 32 espécies. Em virtude do número de espécies há grande dificuldade na sua identificação por nome popular em todo o território nacional. Alguns nomes mais conhecidos são Jararaca, jararacuçu, jararaca-pintada, urutu e cotiara (Puerto, 1992). Habitam preferencialmente ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferia de grandes cidades. Têm



hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas do país (França e Fan, 1992).

Belluomini, (1984) fez algumas descrições das principais espécies do gênero *Bothrops* existentes no Brasil:

➔ *Bothrops jararaca* - conhecida popularmente por Jararaca, é responsável pelo maior número de acidentes ofídicos, por ser a mais abundante, por viver no campo e nos lugares comuns ao homem. Aparece em todo o território nacional.

➔ *Bothrops alternatus* - conhecida como Urutu-Cruzeiro. É encontrada em regiões mais elevadas e secas. É ágil, violenta, dando o bote meio de lado, do tipo chicote, extremamente voraz. Aparece a partir do Estado de Minas Gerais para o Sul do país.

➔ *Bothrops neuwieddi* - conhecida como Jararaca-pintada e Jararaca-de-rabo-branco. São 12 as subespécies encontradas no Brasil. Habita principalmente as regiões secas, sendo considerada espécie das mais perigosas.

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

➔ *Bothrops moojeni* - é chamada de Caiçaca. Habita as regiões mais quentes e secas, tendo por distribuição geográfica os Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Maranhão. Extremamente perigosa, rápida, valente, dá uma sucessão de botes, projetando praticamente todo o corpo, o que dificulta sua captura com laço ou gancho. Tem pele de cor característica, marrom-aveludada, com desenhos bem nítidos.

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

- ➔ *Bothrops pirajai* - de tamanho avantajado para o gênero, podendo competir em tamanho com *Bothrops jararacussu*. É encontrada no Sul da Bahia e em Minas Gerais.
- ➔ *Bothrops erythromelas* - conhecida por Jararaca-da-seca, aparece da Bahia até o Ceará.
- ➔ *Bothrops atrox* - chamada de Jararaca ou surucucu, conforme a área da Região Norte em que aparece, tendo ampla distribuição geográfica e predomínio progressivo. Habita tanto as florestas como áreas desmatadas, adaptando-se facilmente. É a maior responsável pelos acidentes ofídicos no norte do Brasil, podendo atingir comprimento superior a 1,5 metro.
- ➔ *Bothrops bilineatus* - Tem cor verde clara e é arborícola. Conhecida por Jararaca-verde, é muito confundida com a cobra-papagaio (*Corallus*), que também é arborícola, porém não venenosa. Encontrada na Zona da Mata e na Amazônia.
- ➔ *Bothrops jararacussu* - conhecida popularmente por jararacuçu que significa “jararaca-grande”. Encontrada nas regiões baixas e alagadiços, margens de rios e lagoas, pode alcançar tamanho avantajado. É capaz de secretar até 4 mililitros de veneno, o que corresponde aproximadamente a 1 grama de veneno seco. Constitui enorme perigo para pescadores, caçadores e para os gados bovino e equino. É uma espécie frequente no litoral, do Espírito Santo até Santa Catarina. Grantsau (1991) descreveu dois padrões de cores para esta espécie, uma preta com amarela (fêmea) e outra marrom com manchas triangulares de marrom mais escuro (macho), ver figura 03.

Figura 03 – *Bothrops jararacussu*

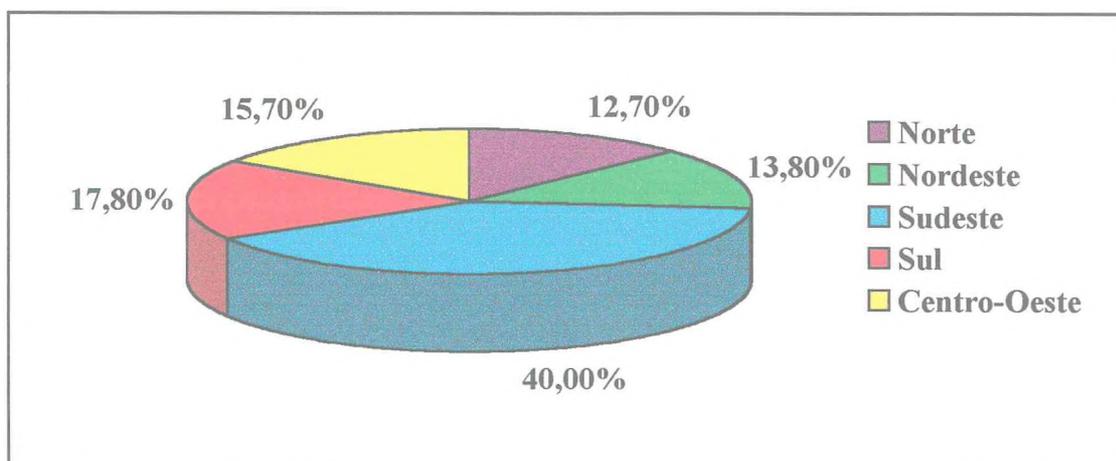


Foto: Alexandre Havt

3 - Epidemiologia

Os dados mais recentes publicados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 1998) notificam um número de 81.611 acidentes, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, representando uma média de 20.000 casos por ano no Brasil. As regiões com maior número de notificações foram o Sudeste e o Sul, seguidas pela região Centro-Oeste, Nordeste e Norte (Figura 4).

Figura 4 - Procedência das notificações segundo as regiões fisiográficas. Brasil, 1990-1993.



Fonte: Brasil, 1998

O coeficiente de incidência foi de 13,5 acidentes por 100.000 habitantes e a região que apresentou maior índice de acidentes por habitante nos quatro anos de estudo foi a região Centro-Oeste, tabela 1.

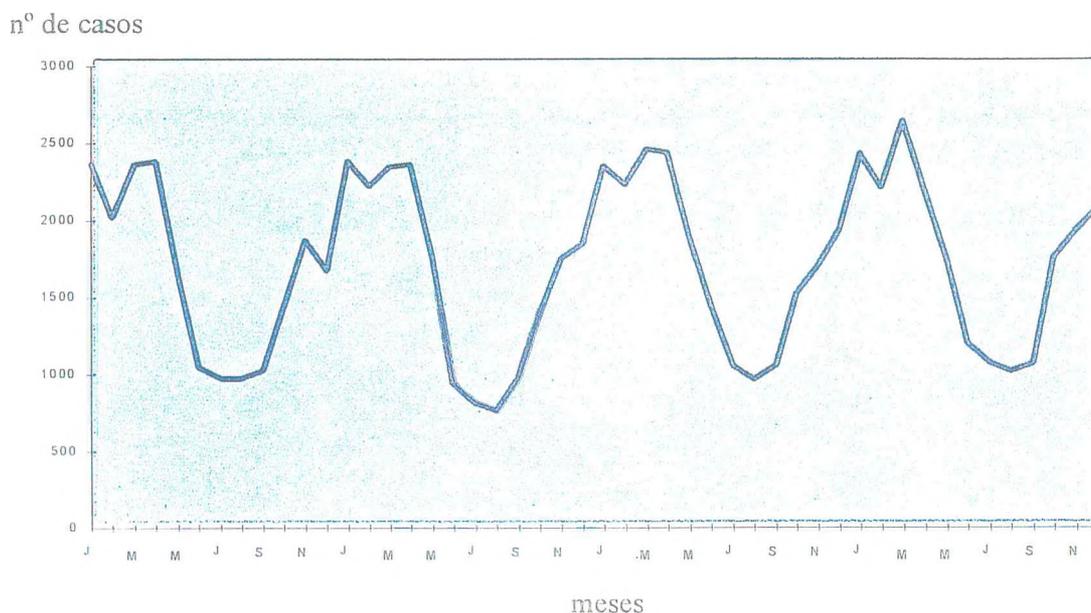
Tabela 1 – Coeficientes de incidência Anual (por 1000.000 habitantes) dos Acidentes Ofídicos por Região Fisiográfica – 1990 a 1993

Região	Coeficiente 90	Coeficiente 91	Coeficiente 92	Coeficiente 93
Brasil	13,78	13,30	14,08	13,94
Norte	24,44	23,23	23,77	25,89
Nordeste	6,77	6,71	6,23	7,65
Centro-Oeste	34,75	28,36	37,98	32,13
Sudeste	13,15	13,34	12,92	12,34
Sul	15,35	15,11	17,52	16,83

Fonte: Brasil, 1998.

Os acidentes ocorrem, com maior frequência, no período de setembro a março, para as regiões Sudeste Sul e Centro-Oeste, e até maio para o Nordeste, seguindo uma relação direta com os fatores climáticos e o aumento do trabalho no campo. Porém para a região Norte esta sazonalidade não é marcante, pois os acidentes ocorrem durante todo o ano (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição mensal dos acidentes ofídicos.
Brasil 1990-1993.



Fonte: Brasil, 1998

Analisando as ocorrências registradas, incluindo aqueles com serpentes não peçonhentas e aquelas sem a confirmação do gênero, as espécies de *Bothrops* obtiveram maior índice de acidentes, perfazendo um total de 59.619 acidentes (73,1%), ver tabela 2.

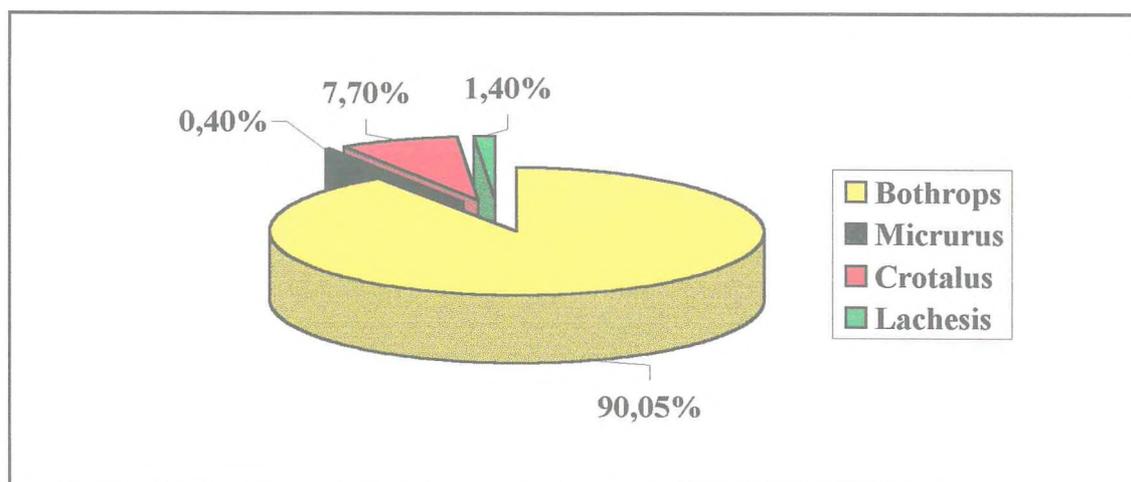
Tabela 2 - Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente envolvida.
Brasil 1990-1993.

Distribuição	nº de acidentes	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

Fonte: Brasil, 1998

No entanto, quando analisados apenas os acidentes com serpentes peçonhentas, o gênero *Bothrops* obteve a percentagem de 90,5 % (Figura 6).

Figura 6 - Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta. Brasil, 1990-1993



fonte: Brasil, 1998.

Porém, o número de acidentes poderia ter sido drasticamente reduzido se fossem tomadas medidas preventivas, como a utilização de sapatos, botas e luvas de couro. Do total de notificações, 70,8% das picadas ocorreram nos pés e pernas, e em 13,4% nas mãos e antebraços.

De acordo com a idade e sexo dos acometidos, encontramos um percentual de 52,3% das notificações em indivíduos com 15 a 49 anos, correspondendo à faixa etária que se concentra a força de trabalho. Destes, 70% foram homens, e 20% foram mulheres. Nos 10% dos casos restantes o sexo não foi informado.

Excluindo os 2.361 casos com serpentes não peçonhentas, obtivemos um número de 359 óbitos, perfazendo uma letalidade no país de 0,45%. O maior número de óbitos ocorreu com as serpentes do gênero *Bothrops*, 185 mortes ao todo. Porém o maior índice de letalidade foi observado nos acidentes com o gênero *Crotalus*. Isto demonstra a maior toxicidade do veneno crotálico em relação ao veneno botrópico, (tabela 3).

Tabela 3 - Letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente.

Brasil, 1990-1993.

Gênero	Nº de Casos	Nº de Óbitos	Letalidade (%)
Bothrops	59.619	185	0,31
Crotalus	5.072	95	1,87
Lachesis	939	9	0,95
Micrurus	281	1	0,36
Não informado	13.339	69	0,52
TOTAL	79.250	359	0,45

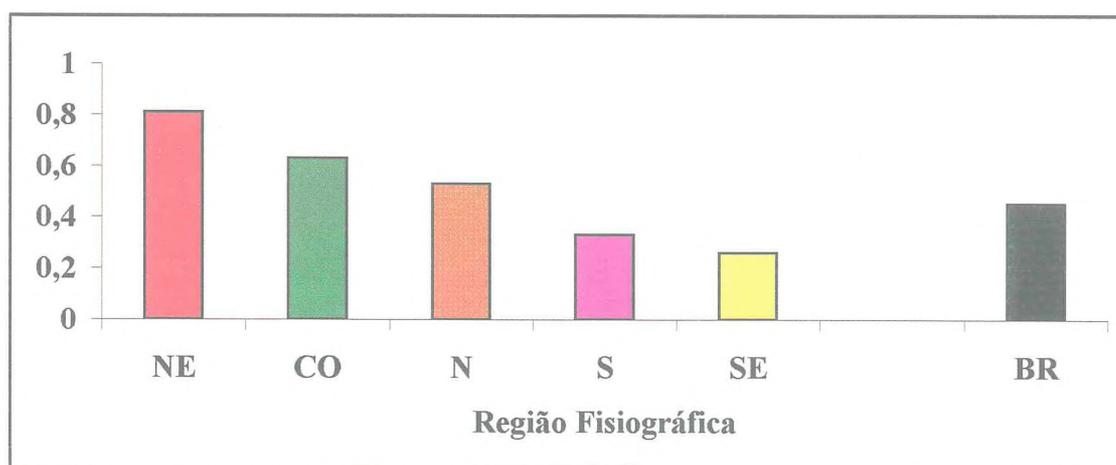
Fonte: Brasil, 1998

Contudo, a letalidade não foi uniforme no tocante às regiões fisiográficas. A região Nordeste obteve maior índice de letalidade (0,81%) seguido da região Centro-Oeste, Norte, Sul e Sudeste. Levando em consideração uma uniformidade no padrão de

vida e do serviço de saúde pública na região Nordeste, podemos analisar esse maior índice de letalidade nesta mesma região através dos números observados para o Ceará. De acordo com dados da Secretaria de saúde do Estado do Ceará, a letalidade com acidentes ofídicos no período de 1987 a 1990 foi de 1,4%. Porém, Feitosa (1996) afirmou que o índice de letalidade para o Ceará no período de 1992 a 1995 foi de 0,7%. O mesmo trabalho afirmou que essa redução da letalidade deveu-se a uma melhoria tanto no atendimento quanto no acesso dos acidentados às unidades de saúde. Apesar desta melhora, quando comparamos os dados de letalidade do Nordeste para com o resto do país notamos que muito ainda precisa ser melhorado para evitar os óbitos decorrentes de acidentes ofídicos (Figura 7).

Dentre os 359 óbitos, o tempo decorrido entre a picada e atendimento foi informado em 314. Destes, em 124 casos (39,49%), o atendimento foi realizado nas seis primeiras horas, e em 190 (60,51%), o atendimento foi realizado depois das seis primeiras horas.

Figura 7 - Letalidade dos acidentes ofídicos por região fisiográfica.
Brasil, 1990-1993.



Fonte: Brasil, 1998

São poucos os trabalhos sobre ofidismo no Ceará. Vale ressaltar os de Guimarães et al. (1989), onde encontramos um levantamento epidemiológico dos dados da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará referentes aos acidentes dos anos de 1986 a 1988. Mais recentemente, nos trabalhos de Feitosa (1996), encontramos resultados da compilação dos acidentes notificados entre os anos de 1992 a 1995, os quais descrevemos resumidamente a seguir.

Foram notificados 688 casos com uma maior ocorrência entre os meses de abril a setembro. Suas maiores vítimas foram residentes da zona rural (91%). No mesmo período 72,3% dos casos foram acometidos em pessoas do sexo masculino e 24,42% nos do sexo feminino. A faixa etária mais afetada, com 72,3% dos casos, foi de 10-49 anos.

As regiões do corpo mais atingidas com a picada foram os membros inferiores, com um percentual de 81,91%, seguido dos membros superiores com 14,72% dos casos. Mais uma vez, vale ressaltar que o uso dos materiais de prevenção poderia ter evitado grande parte desses acidentes.

Considerando os casos onde foram notificados o gênero da serpente, o gênero *Bothrops* causou 88,27% dos acidentes, seguido pelos gêneros *Crotalus* (10,66%), *Micrurus* (0,86%) e *Lachesis* (0,21%). Nas pessoas acidentadas em que o tempo entre a picada e o tratamento foi notificado, 77,31% procurou atendimento nas seis primeiras horas, e 17,14% foram atendidos entre seis e doze horas.

O coeficiente de incidência total para o período de 1992 a 1995 foi de 3,0 para cada 100.000 habitantes. O índice de letalidade foi de 0,89%.

4 - Composição dos venenos ofídicos

Podemos encontrar nos venenos de serpentes peçonhentas uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as espécies (Varanda e Giannini, 1994). Entre 90 e 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados. A natureza proteínica desses venenos foi estabelecida em 1843 por Lucien Bonaparte (Bon, 1997).

Na parte não protéica, os componentes podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os constituintes inorgânicos conhecidos são cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (Friederich e Tu, 1971). Porém, nem todos são encontrados em todos os venenos e a quantidade também varia para cada espécie. O papel biológico de cada um desses metais não está claro. Alguns estudos sugerem que o cálcio, magnésio e manganês, por exemplo, são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto que outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (Bjarnason e Fox, 1994).

Entre os componentes orgânicos não protéicos encontramos aminoácidos livres e pequenos peptídeos; carboidratos; lipídios, principalmente fosfolipídios; e aminas biogênicas (Varanda e Giannini, 1994).

Entre as inúmeras atividades exercidas pelos componentes protéicos, destacamos a ação enzimática e a presença de toxinas protéicas específicas. O Quadro 2

na página seguinte sintetiza a grande variedade de enzimas já descritas, sendo a maioria delas hidrolases.

Algumas são encontradas em todas as espécies, como a fosfolipase A₂. A atividade fosfolipásica é amplamente encontrada nos venenos botrópicos. As serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox* apresentam alta atividade fosfolipásica (Vidal e Stoppani, 1971; Vidal et al., 1972). Contudo, já foram isoladas fosfolipasas A₂ dos venenos de *Bothrops neuwiedi* (Vidal e Soppani, 1971), *Bothrops asper* (Gutierrez et al., 1984), *Bothrops alternatus* (Nisenbom et al., 1986) e *bothrops moojeni* (Reichl et al, 1989).

A fosfolipase A₂ hidrolisa as ligações 2-acilas das fosfatidilcolinas e das fosfatidiletanolaminas com liberação de ácido graxo e formação de lisofosfolípidos como lisolecitinas, compostos tenso-ativos que alteram a permeabilidade das membranas celulares, promovendo hemólise indireta. Porém, para que essa ocorra, é necessário a presença de substratos como lipoproteínas séricas (Vital Brazil, 1982). Além da ação hemolítica, enzimas com atividade de fosfolipase A₂ também apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas e miotóxica, dando origem a necrose e miglobinúria (Fohlman e Eaker, 1977).

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

Quadro 2 - principais enzimas presentes nos venenos de serpentes.

Tipo	Nome	Origem
1. Oxidoredutases	Lactato desidrogenase L-aminoácido oxidase Catalase	Elapidae Todas as espécies Todas as espécies
2. Transferases	Alanina amino transferase	
3. Hidrolases	Fosfolipase A ₂ – Lisofosfolipase Acetilcolinesterase Fosfatase alcalina Fosfatase ácida 5-Nucleotidase Fosfodiesterase Desoxiribonuclease Ribonuclease 1 Trifosfatase de adenosina Amilase Hialuronidase – NAD-Nucleotidase Cininogenase Ativador do fator X Heparinase α -fibrinogenase β -fibrinogenase α - β -fibrinogenase Enzima fibrinolítica Ativador de protrombina Colagenase Elastase	Todas as espécies Elapidae, Viperidae Elapidae Bothrops atrox Deinagkistrodon acutus Todas as espécies Todas as espécies Todas as espécies Todas as espécies Todas as espécies Todas as espécies Viperidae Viperidae, Crotalinae Crotalinae Viperidae, Crotalinae Viperidae, Crotalinae Bitis gabonica Crotalinae Crotalinae Viperidae Viperidae
4. Liases	Glicosaminamonioliases	

Fonte: Bon, 1997

Apesar de existir uma associação de efeitos entre enzimas proteolíticas e fatores hemorrágicos (hemorraginas), por serem ambas em grande parte metaloproteases, diversos compostos proteolíticos já foram identificados por não apresentarem efeito hemorrágico (Takahashi e Ohsaka, 1970).

As enzimas *trombina-like* ou tipo trombina estão presentes em um número variado de espécies das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*. Apresentam ação coagulativa por atuarem no fibrinogênio, transformando-o em fibrina. Diferentemente, essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A ou B, enquanto a trombina sérica libera ambos. Isso caracteriza a formação de um complexo de fibrina facilmente degradado por plasmina, gerando, assim, um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (Russel, 1983).

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

Em 1970, Ferreira e seus colaboradores fracionaram do veneno de *Bothrops jararaca* nove peptídeos biologicamente ativos. Este trabalho promoveu então uma das maiores descobertas brasileiras deste século, a presença de fatores potenciadores de bradicinina no veneno de *Bothrops jararaca*. Estes fatores inibem as enzimas proteolíticas que inativam a bradicinina e catalisam a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Este mecanismo foi usado para a produção de um dos fármacos mais empregados atualmente no tratamento de hipertensão, o Captopril.

A parte protéica não enzimática dos venenos ofídicos contém toxinas específicas, que afetam intensamente processos vitais como a função de nervos e músculos, a ação cardíaca, o sangue e a permeabilidade das membranas (Karlson, 1979).

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

As pós-sinápticas mimetizam a ação do curare, ligam-se aos receptores colinérgicos sem contudo provocar despolarização, inibindo a transmissão neuromuscular. Ocorrem nas serpentes da família *Elapidae* (Vital Brazil, 1980). As toxinas pré-sinápticas agem possivelmente inibindo o influxo de cálcio, evitando assim a liberação de acetilcolina. Têm letalidade maior que as toxinas pós-sinápticas, são estruturalmente relacionadas a fosfolipase A_2 e podem agir como toxinas mionecróticas. Foram encontradas também em serpentes da subfamília *Crotalinae* como por exemplo a crotoxina, isolada da serpente Sul Americana *Crotalus durissus terrificus* (Hawgood e Santana de Sá, 1979).

As cardiotoxinas, assim como o fator lítico direto e as cobraminas são todas denominações usadas para toxinas de membrana que causam a despolarização persistente das membranas celulares, excitáveis ou não, acarretando distúrbios celulares como hemólise e citotoxicidade. Só têm sido isoladas de venenos elapídicos, e são responsabilizadas, em associação com fosfolipases, pelas lesões locais como edema e necrose, nos acidentes com *Najas* (Reid, 1964; Vital Brasil, 1982).

Grandes avanços nas pesquisas com toxinas e enzimas ofídicas se desenvolveram nos últimos trinta anos com o advento das análises da estrutura bioquímica, principalmente dos venenos elapídicos em consequência de sua maior letalidade. Contudo novas descobertas, como das toxinas das cascavéis americanas e hipotensinas dos venenos botrópicos geraram grande interesse para os estudos com a

família Crotalidae. Esses trabalhos com toda certeza trarão novas ferramentas farmacológicas e novas substâncias que ajudarão no tratamento e prevenção de várias doenças.

5 - Alterações clínicas e patológicas

O envenenamento botrópico apresenta três atividades fisiopatológicas básicas, proteolítica, hemorrágica (Kamiguti e Cardoso, 1989) e coagulante (Maruyama et al., 1990). Contudo, já foram descritas atividade miotóxica isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* (Homsí-Brandeburgo et al., 1988), atividade anticoagulante da *Bothrops castenaudi* (Nahas et al., 1979), atividade sobre as plaquetas da *Bothrops atrox* (Niewiarowski et al., 1977) e atividade hemolítica in vitro (Rosenfeld et al., 1960/62).

A atividade proteolítica, na verdade, corresponde a ação de vários componentes do veneno e são basicamente as responsáveis pelas lesões no local da picada, como edema inflamatório e necrose. Enzimas proteolíticas como proteases, fosfolipases e hialuronidases promovem a liberação de substâncias farmacologicamente ativas (bradicinina, serotonina e histamina), que atuam no efeito hipotensor. Estimulam ainda a liberação dos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária - PAF (França e Fan, 1992).

Furtado et al. (1991) em estudo comparativo entre os venenos de nove espécies de serpente do gênero *Bothrops*, constatou que o veneno de *Bothrops jararacussu* apresentava baixa quantidade de proteína por miligrama de veneno e apresentava atividades amidolítica, caseinolítica e fribinolítica.

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

Analisando 26 tipos de veneno botrópico, Nahas et al, 1979, identificaram para efeito coagulativo da serpente *Bothrops jararacussu* as atividades tipo trombina-like e ativação do fator X. Porém, Furtado et al. (1991) não identificaram para a mesma espécie na fase adulta a ativação do fator X. Contudo já foram isolados dois fatores coagulantes do tipo trombina-like (Zaganelli et al., 1996; Andrião-Escarso et al., 1997).

A hemorragia no envenenamento botrópico é atribuída a componentes específicos chamados hemorraginas. São metaloproteases e já foram isolados das serpentes brasileiras *Bothrops jararaca* (Mandelbaum et al., 1976), *Bothrops neuwiedi* (Mandelbaum et al., 1984), e *Bothrops moojeni* (Assakura et al., 1985).

Ohsaka em 1979, atribuiu à atividade das hemorraginas uma ação sobre a membrana basal do endotélio vascular decorrente de um aumento da permeabilidade inicial, seguida da perda da função entre as células, resultando na ruptura da integridade vascular.

Os fatores hemorrágicos não interferem na ação coagulativa do veneno assim como a incoagulabilidade não constitui causa primária do sangramento. Isto é confirmado pelas observações de que o sangramento sistêmico pode tanto ocorrer quando do envenenamento por serpentes sem veneno coagulante como preceder o efeito

coagulativo. Além disso, a desfibrinação completa pode persistir sem a ocorrência de sangramento. Daí o estado de incoagulabilidade pode prolongar e/ou intensificar as manifestações hemorrágicas mas a ação coagulativa isolada não justifica o sangramento (Reid e Theakston, 1983).

Rosenfeld (1991) descreveu que após a inoculação de grandes quantidades de veneno botrópico podem sobrevir hemorragias externas, epistaxe, gastrorragias, melena, principalmente encontradas nos acidentes por *Bothrops jararacussu* por ser capaz de inocular grandes quantidades de veneno. Possivelmente, tais achados clínicos não são provocados por fatores hemorrágicos específicos, já que após fracionamento do mesmo veneno, Homsí-Brandeburgo et al. (1988), não constatou a presença de nenhuma hemorragina.

Neste último trabalho, foi isolado uma fração miotóxica sem atividade de fosfolipase A₂ denominada Bothropstoxin. Esta fração quando injetada causou necrose coagulativa após trinta minutos sem presença de hemorragia. Após 6 horas, as fibras musculares necróticas estavam anucleadas com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório. Após uma semana, a área central do músculo ainda continha fibras necróticas não fagocitadas.

Além da Bothropstoxin, outras miotoxinas já foram isoladas. Gutierrez et al. (1984), isolou uma miotoxina com atividade fosfolipásica da *Bothrops asper*. Desta mesma serpente Lomonte e Gutierrez (1989), identificaram a presença de uma miotoxina sem atividade fosfolipásica e Gutierrez et al. (1989), isolou uma miotoxina da serpente *Bothrops nummifer*. Moura-da-Silva et al. (1991), encontrou atividade miotóxica nas serpentes *bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, e *Bothrops pradoi*.

O quadro clínico causado pelo acidente botrópico se caracteriza por uma sintomatologia local, alterações no tempo de coagulação, hemorragias sistêmicas e complicações locais e/ou sistêmicas.

Trinta minutos após a picada observamos dor, edema, eritema e calor local. A dor é imediata, e o edema se forma nas primeiras 6 horas. Bolhas equimoses e necroses surgem geralmente após 12 horas do acidente. Existe uma relação direta entre a sintomatologia local e a quantidade de veneno inoculado (Barraviera, 1993).

O tempo de coagulação assim como o tempo de tromboplastina parcial ativada apresentam-se aumentados, e essas alterações são mais severas quando os acidentes são provocados por filhotes, onde os fatores coagulantes são predominantes (Furtado et al., 1991). Exames como o tempo de coagulação são válidos para a determinação do tipo de envenenamento, quando o gênero da serpente não foi identificado e para identificação da gravidade do caso.

Hemorragias são comuns tanto no local da picada como em lugares distantes da mesma, tais como gengivorragia, epistaxe, hematêmese, hemorragia digestiva alta e hematúria. Porém nos acidentes com *Bothrops jararacussu* e *Bothrops erythromelas* as hemorragias sistêmicas são raras (Barraviera, 1993).

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

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Entre elas podemos citar glomerulonefrite (Seedat et al., 1974),

glomerulite e nefrite intersticial (Sant e Pundare, 1972), arterite e necrose tubular (Sitprija e Boonpucknavig, 1979), necrose cortical (Varagunam e Penabokke, 1970) e insuficiência renal (Raab e Kaiser, 1966). De todos, o mais relatado tem sido a insuficiência renal. Ainda foram descritos a ocorrência de hematuria, mioglobinúria, hemoglobínúria e proteinúria (Sitprija e Boonpucknavig, 1979).

A insuficiência renal aguda (IRA) descrita por vários autores (Amorim et al., 1969; Amorim e Melo, 1954; Silva et al., 1979; Shastry et al., 1977; Aung-khin, 1978) é a causa principal de mortes nos acidentes ofídicos mesmo após o tratamento com soro antiofídico. O Tratamento com soro não previne o surgimento de insuficiência renal embora ele melhore o estado geral dos pacientes (Amaral et al., 1986).

A IRA ocorre secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda (Seedat et al., 1974), necrose tubular aguda (Chuch et al., 1975) e necrose cortical renal (Date e Shastry, 1981). Contudo a sua patogênese secundária aos acidentes botrópicos não está esclarecida.

Amaral et al., (1985) estudando as alterações renais provocadas em acidentes humanos com as serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* descreveram a ocorrência de necrose cortical sem contudo desvendar sua patogênese. O autor sugeriu então, que a necrose cortical deveria ser causada por coagulação intravascular, ação direta de enzimas proteolíticas no endotélio vascular ou por espasmos nos vasos provocados por substâncias vasoativas.

Estas mesmas sugestões foram usadas por Amaral et al. (1986) para explicar a patogênese da IRA, apoiando-se em evidências clínicas correlatas com a espécie *Vipera russel* realizadas por (Rosenfeld et al., 1968). Amaral identificou neste trabalho a

ocorrência da IRA atrelada à necrose cortical, porém o que provocou tal efeito não foi esclarecido.

Os venenos ofídicos causam a nível glomerular uma proliferação do endotélio e células mesangiais, com deposição de fibrina e crescimento epitelial ocasional, sem contudo provocar alterações na membrana basal. Três teorias foram propostas para explicar a patogênese da lesão glomerular. A presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente do processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica. Sitprija e Boonpucknavig (1979), avaliaram tais hipóteses e afirmaram que possivelmente todos os mecanismos propostos trabalham sinergicamente na patogênese glomerular, com predominância entre as três hipótese dependente da gravidade do acidente.

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

Monteiro (1990), tendo como método de estudo o modelo de perfusão isolado de rato analisou as alterações provocadas pelo veneno de *Bothrops jararaca* e observou queda dos parâmetros renais como pressão de perfusão, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, resistência vascular renal, transporte total e percentual de sódio e potássio bem como diminuição dos íons sódio e potássio no tecido renal após exposição

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

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

6 - Tratamento e profilaxia

O tratamento dos ataques de serpentes peçonhentas sempre foi influenciado por credices populares. Até hoje ocorrem relatos fantásticos de pessoas que foram curados com o uso de beberragens (álcool, aguardentes, querosene) ou pela aplicação tópica no local da picada de fumo, esterco e alho. Tais procedimentos são completamente desaconselhados e podem vir até a agravar os acidentes (Jorge e Ribeiro, 1990).

A sucção no local da picada tem eficácia duvidosa e só teria finalidade até 30 minutos após o acidente. Muitos problemas podem ocorrer com a sucção. O terapeuta pode vir a se contaminar por patógenos do sangue do paciente como o vírus da hepatite B assim como absorver o próprio veneno no caso de ferimentos orais. O paciente por sua vez pode ter o processo agravado por infecção secundária gerada por bactérias da flora oral do terapeuta. Diante de tais circunstâncias, quando indicado, o próprio paciente deve realizar este procedimento (Jorge e Ribeiro, 1984).

oral do terapeuta. Diante de tais circunstâncias, quando indicado, o próprio paciente deve realizar este procedimento (Jorge e Ribeiro, 1984).

Outro procedimento bastante comum é o uso de torniquete com a intenção de restringir o alcance do veneno no organismo. Ribeiro e Jorge (1988), relata que metade dos pacientes atendidos por picada de serpentes no Hospital Vital Brazil fazem uso do torniquete. Apesar de bastante difundida esta prática deve ser abolida, principalmente nos acidentes com serpentes que apresentam efeito proteolítico. O mesmo provoca graves lesões na área acometida pela picada se o veneno permanecer retido em uma área específica, como ocorre com o uso do torniquete. Para muitos casos a única solução seria a amputação. Como praticamente 90% dos acidentes no Brasil ocorrem com o gênero *Bothrops*, que apresentam este efeito, o torniquete deve ser invalidado (Puch e Theakston, 1987).

Quanto mais rápido for feito o tratamento maior são as possibilidades de cura e menor surgimento de sequelas. Esforços físicos exagerados após a picada e/ou traumas devem ser evitados especialmente nos casos de acidentes com veneno coagulante.

O tratamento específico para os acidentes com serpentes peçonhentas é feito pela administração de soro heterólogo. Estes contêm imunoglobulinas específicas purificadas obtidas do plasma de animais hiperimunizados com o próprio veneno de animais peçonhentos (Soerensen, 1990).

No Brasil os soros antiofídicos são produzidos pelo Instituto Butantan (São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro). São produzidos atualmente os soros específicos anticrotálico, antibotrópico, antilaquético,

Preconiza-se o uso dos soros específicos, pois cada gênero de serpente peçonhenta no Brasil apresenta efeitos diferenciados. Contudo Dos Santos et al. (1992), afirmam que houve maior eficácia no tratamento do envenenamento por *Bothrops jararacussu* com o emprego do antiveneno botrópico-crotálico em virtude do efeito miotóxico deste veneno, efeito comum aos venenos crotálicos.

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

Por ter característica heteróloga os antivenenos podem causar reações de hipersensibilidade imediatas como edema de glote, broncoespasmo e choque anafilático (Barraviera, 1993). Alguns autores sugerem a realização do teste de sensibilidade antes da aplicação do soro, porém há grande controvérsia do uso deste testes. Jorge e Ribeiro (1990), por exemplo, citam várias justificativas para invalidar este procedimento, principalmente porque mesmo com o resultado positivo o tratamento ainda assim é indicado.

Alguns medicamentos são indicados para limitar os sintomas do envenenamento no decorrer do processo. Dentre eles podemos citar antihistamínicos, adrenalina, nos casos de parada cardíaca, aminofilina para o broncoespasmo e antibioticoterapia por cloranfenicol ou associação de clindamicina e aminoglicosídeos, indicados para conter infecções secundárias.

Procedimentos como fasciotomia nos casos de síndrome de compartimento, transfusões de sangue e debridamento de áreas necrosadas são usados de acordo com a

necessidade. Todos os esforços são válidos para preservar o segmento acometido nos acidentes com extensa perda de tecidos (Barraviera, 1991).

O Ministério da Saúde descreve algumas medidas preventivas de suma importância para os acidentes ofídicos (Brasil, 1998):

- a) usar botas de cano alto ou perneira de couro, botinas e sapatos, o que evitaria 80% dos acidentes;
- b) usar luvas de aparas de couro quando manipular folhas secas, lixo, lenha, palha e etc., nem colocar mãos em buracos, evitando assim mais 15% dos acidentes;
- c) Cobras gostam de se abrigar em locais quentes, escuros e úmidos, exigindo-se cuidado ao mexer em pilhas de lenha, palhadas de feijão, milho ou cana ou ainda ao revirar cupinzeiros;
- d) Na presença de ratos há maior possibilidade de se encontrar cobras. Diante disso, faz-se necessário limpar paióis e terreiros, e não deixar lixo amontoado. Aconselha-se ainda que muros e frestas de portas devem ser fechadas;
- e) Evitar acúmulo de lixo e entulho de pedras, tijolos, telhas, madeiras, bem como mato alto ao redor das casas, que atraem e abrigam pequenos animais que servem de alimentos às serpentes.

Quando picado, o melhor a fazer seria lavar o local com água ou água e sabão, manter o paciente deitado, mantê-lo hidratado e procurar serviço médico. Se possível levar o animal para identificação.

Enfrentamos grandes problemas referentes ao tratamento dos acidentes ofídicos. Estes problemas são agravados pela grande extensão territorial do país e a falta de infra-estrutura dos postos de saúde. Conseqüentemente, muitos acidentados ficam a

mercê de curandeiros e tratamentos milagrosos. Um maior trabalho educativo junto às comunidades diminuiria os índices de letalidade que atualmente ainda são altos principalmente no Nordeste.

Objetivos

Objetivos gerais

- ➔ Avaliar a toxicidade aguda e as alterações hematológicas e renais causadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu*

Objetivos específicos

- ➔ Determinar a DL50 do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar;
- ➔ Avaliar as alterações histopatológicas do veneno nos rins, fígado, coração, pulmão, baço e cérebro após administração de diversas doses do veneno;
- ➔ Realizar hemograma completo, dosagem de proteínas totais e número de plaquetas em ratos após envenenamento experimental com veneno de *Bothrops jararacussu*;
- ➔ Avaliar o efeito do veneno sobre parâmetros funcionais renais em sistema de rim isolado de rato nas concentrações de 3, 10 e 30µg de veneno bruto liofilizado;
- ➔ Avaliar as alterações histopatológicas dos rins perfundidos na ausência e presença do veneno.

Material e Métodos

Parte 1 - Toxicidade aguda e determinação da DL50

1 - Descrições gerais

Os animais experimentais, ratos Wistar de peso entre 140 e 200g sem distinção de sexo, foram reunidos em quatro grupos com seis indivíduos. Todos estavam em jejum de 24 horas com fornecimento de água “ad libitum”. Após diluição em salina 0.9%, o veneno liofilizado de *Bothrops jararacussu*, fornecido pela Fundação Ezequiel Dias de Belo Horizonte - MG, foi aplicado por via intraperitoneal (IP) nas doses de 2, 4, 8, e 16 mg/kg, distribuídas nos grupos I, II, III, IV, respectivamente.

2 - Determinação da DL50

Os animais foram mantidos em observação durante uma hora para averiguação clínica de processos agudos provocados pela aplicação do veneno, e, após 24 horas, fizemos a segunda leitura, para contagem dos animais falecidos. A DL50 foi determinada utilizando o teste dos probitos (Miller e Tainter, 1944), onde a partir do número de animais mortos calculamos a percentagem de mortes para cada grupo, e os resultados foram convertidos em probitos de acordo com tabela descrita por Carline (1973). Os valores obtidos nesta tabela foram plotados em gráfico traçado em papel mono-log, onde a abscissa continha o logaritmo das doses de veneno empregadas, e a ordenada os valores dos probitos encontrados. A DL50 foi então determinada através dos dados obtidos neste gráfico.

3 - Histologia

Tanto para os animais mortos como para os sobreviventes, sendo os últimos submetidos ao sacrifício por deslocamento cervical após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg), fizemos a coleta de fragmentos de rim, pulmão, fígado, coração, cérebro e baço, os quais foram clivados e conservados em formol 10% para posterior estudo histopatológico dos efeitos do veneno nos órgãos em questão. Após desidratação em álcool e diafanização em xilol, os fragmentos fixados em formol foram submetidos aos procedimentos da técnica da inclusão em parafina, que tem por princípio a substituição da água presente no tecido por parafina.

O bloco de parafina pronto, foi cortado pelo microtomo na espessura de 5µm. Os cortes foram fixados nas lâminas, substituindo a parafina por água, seguindo procedimento inverso ao da inclusão, ou seja, xilol, álcool e água. Finalmente, as lâminas foram coradas por Hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico binocular (Cormack, 1991).

Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

Parte 2 - Hematologia

1- Descrições gerais

Utilizamos fêmeas de ratos Wistar, pesando em torno de 150 a 200g, com dieta e hidratação “ad libitum”. Dividimos os animais em oito grupos de seis, sendo quatro grupos controle (salina 0,9%), e quatro grupos tratados com veneno de *Bothrops jararacussu* liofilizado e diluído em 1ml de salina 0,9%. Todos os grupos foram avaliados nos períodos de 2, 6, 12 e 24 horas após a administração intraperitoneal do veneno na dose de 9,5 mg/kg. Toda a avaliação hematológica foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, e as análises bioquímicas na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) coletamos o sangue por punção intracardiaca.

2 - Descrição específica dos exames hematológicos

O hemograma é o exame laboratorial do sangue que fornece dados quantitativos e qualitativos sobre eritrócitos, leucócitos, plaquetas e hemoglobina. É composto por duas partes, o eritrograma, conjunto de exames que avalia a série vermelha, e leucograma, que analisa os dados referentes a série branca. A contagem de plaquetas é geralmente incluída nos resultados do hemograma, normalmente, porém, faz parte dos exames referentes ao coagulograma. Somamos ao exame do hemograma o teste bioquímico para medir a quantidade de proteínas totais presente no sangue coletado. Para a realização do hemograma usamos sangue total com anticoagulante (heparina 5000 UI/ml).

2.1 - Eritrograma

2.1.1 - Contagem de eritrócitos

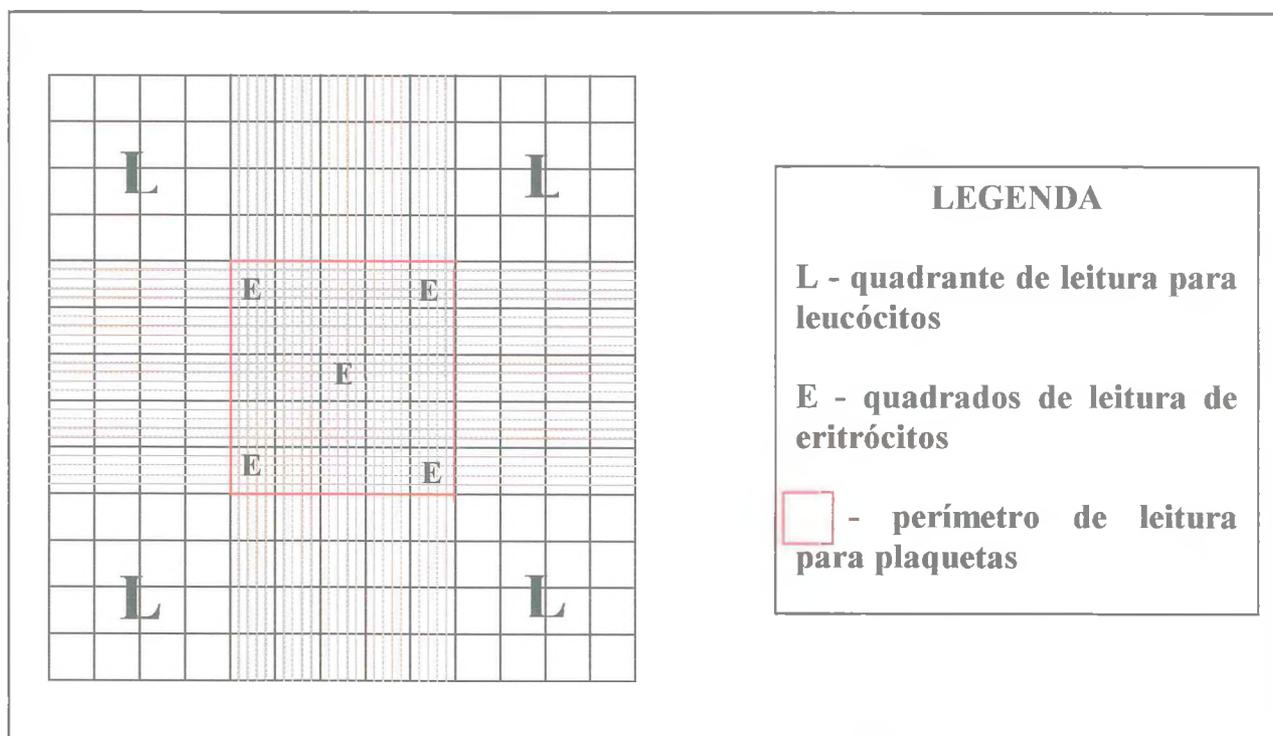
Para a contagem de eritrócitos utilizamos, além do sangue devidamente heparinizado, uma câmara de Neubauer, necessária para a contagem das hemácias, a pipeta diluidora de eritrócitos, ou pipeta de Thoma, e a solução de Gower, composta por 62,5g de sulfato de sódio anidro, 166,5 ml de ácido acético glacial completados para o volume de 1000ml com água destilada, usada para a diluição da amostra. O sangue e, em seguida, a solução diluidora foram aspirados em suas devidas marcas da pipeta de Thoma, como determina o método descrito em Garcia-Navarro (1994). O sangue foi homogeneizado dentro da pipeta e, após desprezo das primeiras gotas, a câmara de Neubauer foi preenchida pela abertura lateral. Após cinco minutos, necessários para a sedimentação dos eritrócitos no fundo da câmara, realizamos a contagem dos mesmos através de microscópio óptico na objetiva de 40x, utilizando a área predeterminada (Figura 8). O resultado obtido da soma do número de eritrócitos presentes nas cinco câmaras foi então multiplicado por 10.000.

2.1.2 – Hematócrito

O hematócrito mede o volume globular ou a relação entre os glóbulos vermelhos e o plasma, ou ainda a percentagem de sangue ocupada por eritrócitos. O método usado neste trabalho para a determinação do hematócrito foi o microhematócrito. O sangue foi devidamente homogeneizado e, por capilaridade, preenchemos $\frac{3}{4}$ do tubo capilar. Uma das extremidades foi vedada com massa de modelar, e em seguida os tubos foram acoplados à centrífuga para microhematócrito (Adams Autocrit Centrifuge – AD

6046), seguindo a técnica descrita pelo fabricante. Após cinco minutos fizemos a leitura da percentagem de eritrócitos em relação ao plasma em tabela da própria centrífuga (Almeida, 1982).

Figura 8 – Retículo de Neubauer



2.1.3 - Dosagem de hemoglobina

O procedimento usado para dosagem de hemoglobina foi o colorimétrico através do método da oxihemoglobina. Adicionamos à quantidade de 20µl de sangue com anticoagulante 5ml de hidróxido de amônio 0,4%. Homogeneizamos a mistura com a finalidade de lisar a membrana da hemácia. A hemoglobina liberada em contato com meio alcalino combinou-se com o oxigênio do ar formando complexo de cor róseo-avermelhado. Após 5 minutos medimos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 545nm. A densidade ótica obtida foi multiplicada pelo fator oriundo da concentração

da hemoglobina da solução de origem. A hemoglobina foi expressa em gramas de hemoglobina por decilitro de sangue (Carvalho, 1986).

2.1.4 - Valores hematimétricos

Os índices hematimétricos usados rotineiramente são o volume corpuscular médio = VCM, a hemoglobina corpuscular média = HCM, e a concentração de hemoglobina corpuscular média = CHCM.

O volume corpuscular médio corresponde ao volume médio dos eritrócitos expresso em (fl). É calculado pela fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito} \times 100}{\text{Número de eritrócitos} / \mu\text{l (dois primeiros algarismos)}}$$

Os valores do VCM podem diminuir em situações de anemia ferropriva, e o processo inverso ocorre quando o organismo tenta regenerar-se da anemia ferropriva aparecendo juntamente com uma grande quantidade de reticulócitos.

A hemoglobina corpuscular média corresponde ao volume médio da hemoglobina por célula expresso em picogramas (pg). Sua fórmula é:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Número de eritrócitos} / \mu\text{l (dois primeiros algarismos)}}$$

A concentração de hemoglobina corpuscular média é o índice que mede a concentração de hemoglobina em gramas por 100ml de hemácia. É calculado pela fórmula:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

O CHCM normalmente acompanha o VCM nas situações onde este último diminui, porém seu aumento não acontece pois a hemácia tem uma capacidade máxima onde a hemoglobina fica saturada (Kerbauy e Mieza, 1990).

2.2 - Leucograma

2.2.1 - Contagem dos leucócitos totais

Os mesmos materiais usados para a contagem de eritrócitos também são usados na contagem de leucócitos, com algumas diferenças. A câmara de Neubauer é novamente utilizada, porém a área de leitura para leucócitos é diferente. Usamos os quatro grupos de quadrados com 16 subdivisões posicionados mais externamente (Figura 8). A pipeta de Thoma usada para aspirar o sangue e a solução diluidora são específicas para

leucócitos. A solução diluidora usada foi de Türk, composta por 1ml de ácido acético glacial, 1ml de violeta de genciana, e estas quantidades completadas para 100ml com água destilada. Os procedimentos que se seguiram, aspiração, homogeneização e preenchimento da câmara, são semelhantes à técnica descrita para a contagem de eritrócitos. A leitura é feita por microscópio óptico com objetiva de 10x. A soma das quantidades de leucócitos nos quatro quadrantes externos é por fim multiplicado por 50, obtendo assim a quantidade de leucócitos por microlitro de sangue (Almeida, 1982).

2.2.2 - Contagem diferencial dos leucócitos

Tem por finalidade estabelecer o percentual de cada tipo de leucócito. Com os valores percentuais e a quantidade total de leucócitos por microlitro de sangue podemos determinar a quantidade dos diferentes tipos de leucócitos nesta mesma unidade.

A análise foi realizada a partir de esfregaços de sangue em lâminas coradas. Neste trabalho, usamos o método panóptico de Pappenheim, ou coloração por May-Grünwald-Giemsa, descrito em Lima et al. (1977). Foi usado microscópio óptico com objetiva de imersão a óleo (100x), onde contamos 100 células devidamente diferenciadas, que fizeram parte do valor percentual dos diversos tipos de leucócitos.

3 - Dosagem das proteínas plasmáticas totais

O sangue total, sem anticoagulante, foi centrifugado numa velocidade de 5000 rpm por 10 minutos. Devidamente separado, o soro foi colhido e submetido ao teste para dosagem das proteínas totais pelo método do Biureto, onde 50 µl da amostra foram adicionados a 2,5ml da solução de Biureto. Esta mistura foi lida em espectrofotômetro, após 15 minutos, num comprimento de onda de 545nm, comparado a um tubo branco que continha água e biureto. O resultado foi multiplicado pelo fator que foi encontrado

quando dividimos o número quatro pela média das leituras obtidas no mesmo comprimento de onda de um padrão presente no *kit* (Fabricante). O resultado foi expresso em gramas de proteína por decilitro de sangue.

4 - Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada através do método do hemocítômetro, onde usamos uma câmara de contagem (Neubauer). Utilizamos 20µl de sangue, diluídos em 2ml da solução de citrato de sódio 3,8%. Após leve homogeneização da mistura, preenchemos a câmara de Neubauer, a qual foi posta em câmara úmida por 10 minutos, para sedimentação da amostra. A contagem foi realizada sobre o quadrado central da câmara, em observação por microscópio óptico, e o total contado foi multiplicado por 1000. O resultado foi expresso pela quantidade de plaquetas por mm^3 de sangue (Almeida, 1982).

5 - Estatística

Todos os resultados foram analisados em computador Pentium 133hz através de programa Sigmastat. Avaliamos os dados por test T de Student não pareado, onde comparamos os resultados dos grupos controles com os respectivos grupos tratados, de acordo com o tempo de ação após a aplicação do veneno.

Parte 3 - Perfusão renal

1 - Animais Experimentais

Utilizamos ratos Wistar adultos com peso variando entre 220 e 270g, sem distinção de sexo, oriundos do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em jejum alimentar de 24 horas antes das experiências com fornecimento de água “ad libitum”.

2 - Divisão dos grupos de animais

Com o intuito de avaliar os efeitos do veneno de *Bothrops jararacussu* dividimos os animais experimentais em quatro grupos. Um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit modificada, na presença de 6% de albumina bovina. Este grupo controle foi comparado aos outros três grupos nos quais utilizamos as doses de 3, 1 e 0,3 mg de veneno liofilizado. Todos os grupos continham seis animais.

3 - Veneno

O veneno utilizado em nossos experimentos foi fornecido pela Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais, pela pessoa do Dr. Carlos Ribeiro Diniz. O veneno liofilizado, nas quantidades de 3, 1 e 0,3mg, foi diluído antes de cada experimento em 1ml de solução salina (0,9%) e adicionado ao sistema, que continha 100ml de solução perfusora, sempre após 30 minutos do início dos experimentos. As concentrações finais foram 3, 10 e 30 μ g/ml, respectivamente.

4 - Substâncias utilizadas

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as seguintes substâncias:

- ➔ NaHCO_3 (Synth)
- ➔ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Synth)
- ➔ NaCl (Synth)
- ➔ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reagen)
- ➔ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reagen)
- ➔ Manitol (Reagen)
- ➔ Uréia (Reagen)
- ➔ KCl (Merck)
- ➔ Glicose (Squibb)
- ➔ Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)
- ➔ Heparina (CEME)
- ➔ Fração V de albumina bovina (Sigma)
- ➔ Inulina (Sigma)
- ➔ Pentobarbital sódico (Sigma)

5 - Solução perfusora e seu preparo

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

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada a 20%, continha $\text{NaCl} = 138\text{g}$, $\text{KCl} = 7\text{g}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 3,2\text{g}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 5,8\text{g}$, e Uréia = 10g. No tempo de 48 horas antes do experimento, separamos 100 ml desta solução e

acrescentamos $\text{NaHCO}_3 = 4,2 \text{ g}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,74 \text{ g}$, glicose = $2,0 \text{ g}$, e penicilina = $0,050 \text{ g}$. Em seguida, o volume foi completado para 2000ml com água bidestilada. Retiramos 300 ml desta última solução, na qual adicionamos albumina bovina (6%). Procedemos, em seguida, à diálise desta solução com albumina, auxiliada por um homogeneizador. Esta diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvato, citrato e lactato (Hanson e Ballard, 1968, Cohen et al., 1977, Schurek et al., 1970; Ross, 1978) Os 1700ml restantes foram usados como solução para a diálise, a qual foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, acrescentamos $0,15\text{g}$ de Inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

6 - O Sistema de perfusão renal

As primeiras perfusões renais datam de 1849, realizadas por Lobell. Em seguida, temos relatos de trabalhos de Bidder em 1862, Ludwig em 1868 e Schroder em 1882 (Araújo Filho, 1995). A necessidade de maiores informações sobre a fisiologia renal trouxe grandes avanços para a técnica de perfusão renal, principalmente nestas duas últimas décadas. Como exemplos de novas descobertas temos a adição da fração V de albumina bovina pura à solução perfusora (Bowman, 1970; Bowman e Mack, 1974; Little e Cohen, 1974; De Mello e Maack, 1976); a utilização da solução de Krebs-Henseleit (Schurek, 1980); o uso de substâncias como glicose, aminoácido, lactato, oxalacetato e piruvato (Bahlman et al., 1967; Trimble e Bowman, 1973; De Melo e Mack, 1976); e a adaptação do sistema para o uso de um filtro miliporo no sistema de perfusão renal de ratos (Ross et al., 1973; Cohen et al., 1977; Fonteles, 1980).

Conhecemos atualmente dois sistemas de perfusão de rim isolado. O sistema aberto, no qual o perfusato não recircula pelo rim. Este sistema, apesar de manter

constante os parâmetros renais, apresenta um alto gasto de albumina, dificultando o orçamento dos projetos. No outro tipo conhecido, o sistema fechado, o perfusato recircula no rim e apresenta inúmeras vantagens sobre o primeiro, como a utilização de menores quantidades de albumina. Além disso, as substâncias dialisadas se mantêm na solução, e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dialisador (Monteiro, 1990).

O sistema fechado, utilizado nos nossos experimentos, foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Mack (1974) e Ross (1978). A este sistema foram sugeridas modificações pelos trabalhos de Fonteles (1980) e Moreira Lima (1983), os quais adicionaram um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton et al. (1974).

O sistema de perfusão fechado (Figura 9) é a soma de vários equipamentos. Cada um tem uma determinada função.

- ➔ Condensador - mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
- ➔ Coletor de urina - frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocado em intervalos de 10 minutos;
- ➔ Seringa coletora de perfusato - coletor da solução de perfusão feita em intervalos de 10 minutos;
- ➔ Bomba de perfusão (Watson) - bombeia a solução de perfusão no sistema, apresenta cinco velocidades;
- ➔ Filtro de milipore ($8\mu\text{m}$) - filtra a solução perfusora;
- ➔ Banho-maria - aquece o oxigenador ou pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre 36 e 37°C ;
- ➔ Fluxômetro - mede o fluxo da solução;
- ➔ Manômetro de mercúrio - mede a pressão do perfusato;
- ➔ Catabolhas - retira as bolhas formadas evitando embolia.

- ➔ Oxigenador ou pulmão artificial - promove as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂)
- ➔ Bomba aquecedora com termostato - mantém o sistema de perfusão na temperatura de 37° C

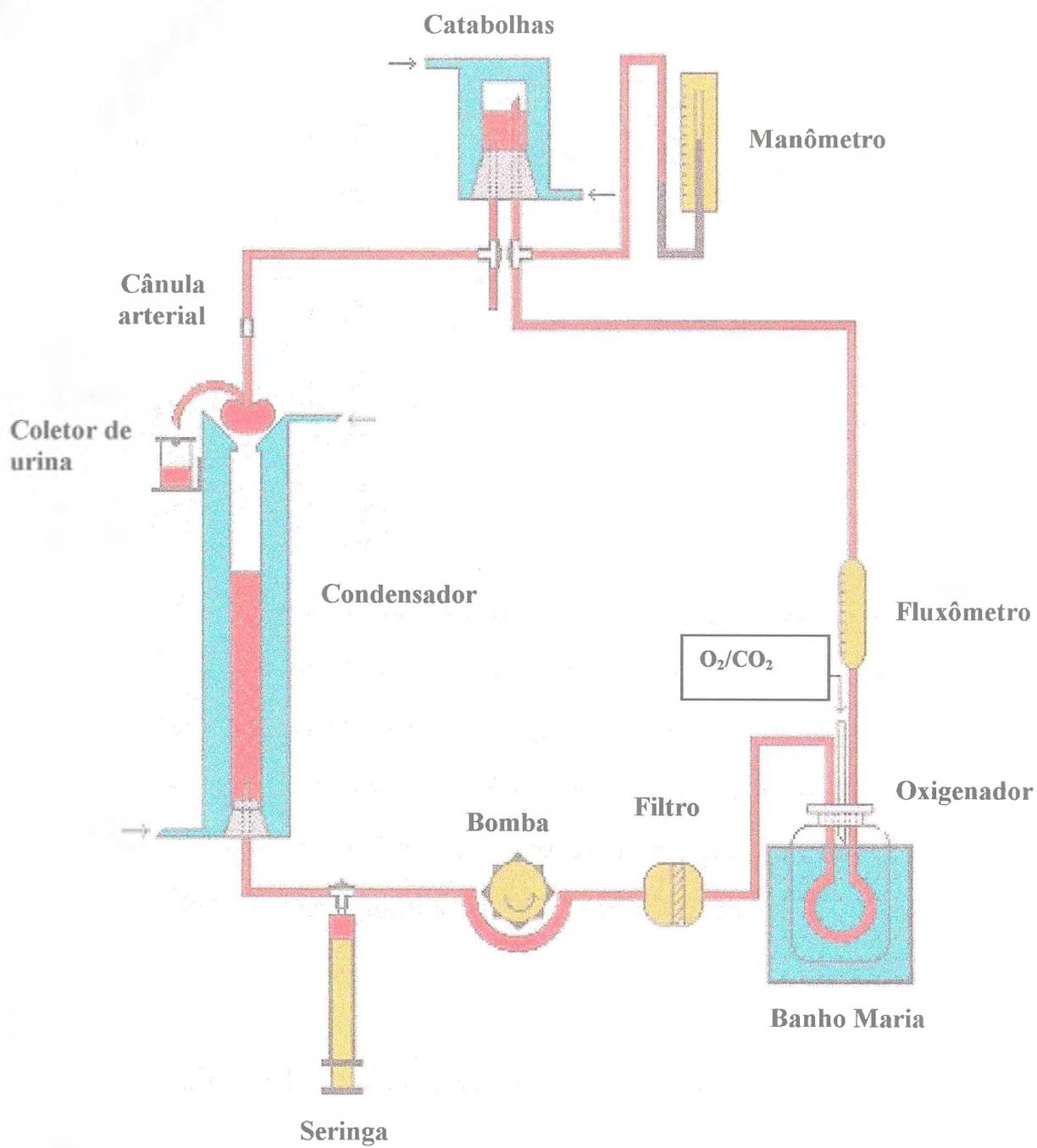
7 - Preparo do Sistema

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

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

A calibração foi feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Para tanto, os resultados de calibração obtidos nos três grupos tratados foram compilados em curvas, onde plotamos a velocidade da bomba no eixo das abscissas contra a pressão de perfusão, volume de salina coletado (fluxo) e o valor obtido no fluxômetro no eixo das ordenadas (Figura 11, 12, 13). Duas outras curvas foram plotadas com os valores de fluxômetro no eixo das abscissas e a pressão de perfusão e o fluxo no eixo das ordenadas (Figura 14 e 15).

Figura 09 - Esquema do sistema de perfusão de rim isolado



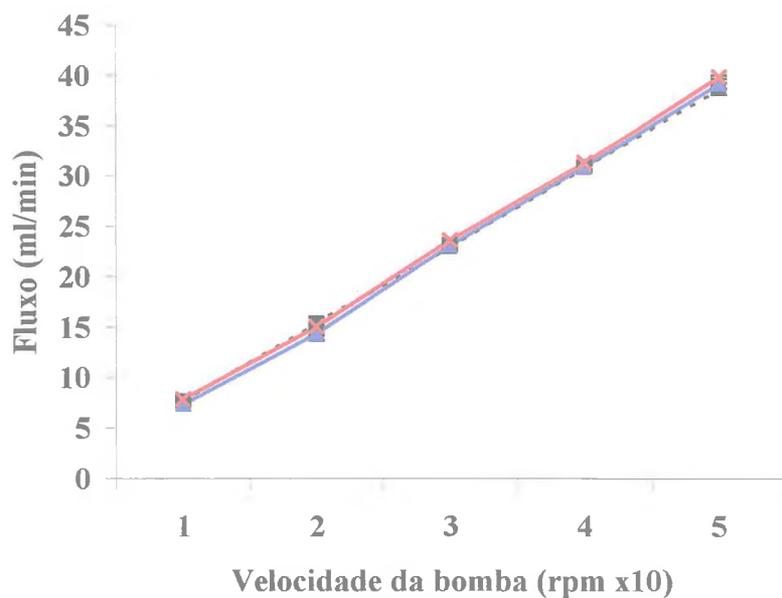


Figura 10 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X fluxo

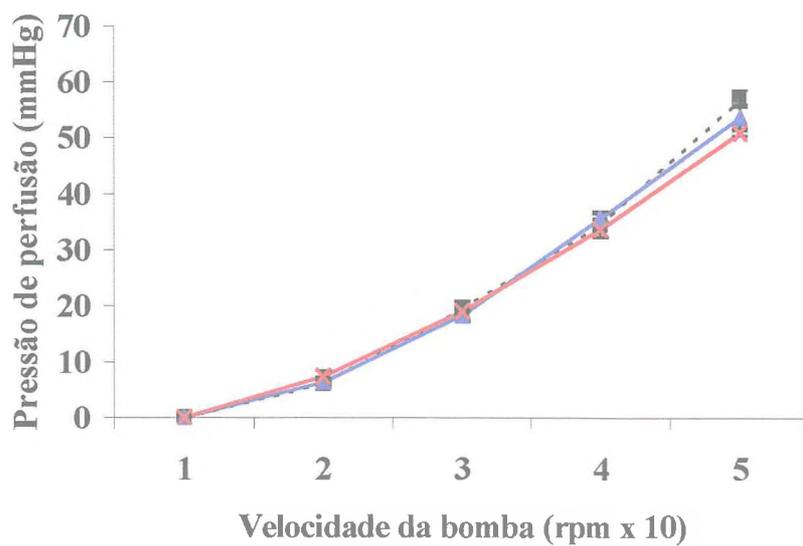


Figura 11 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X pressão de perfusão

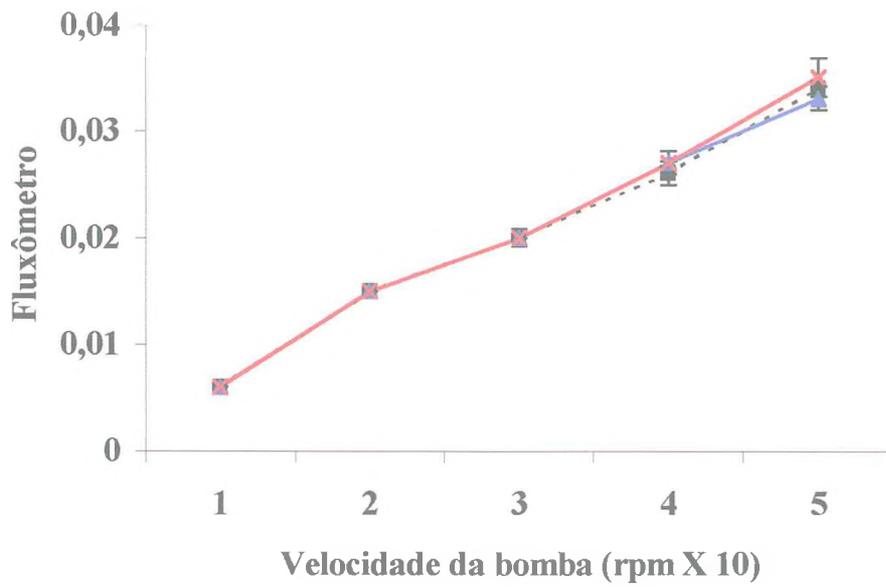


Figura 12 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X fluxômetro

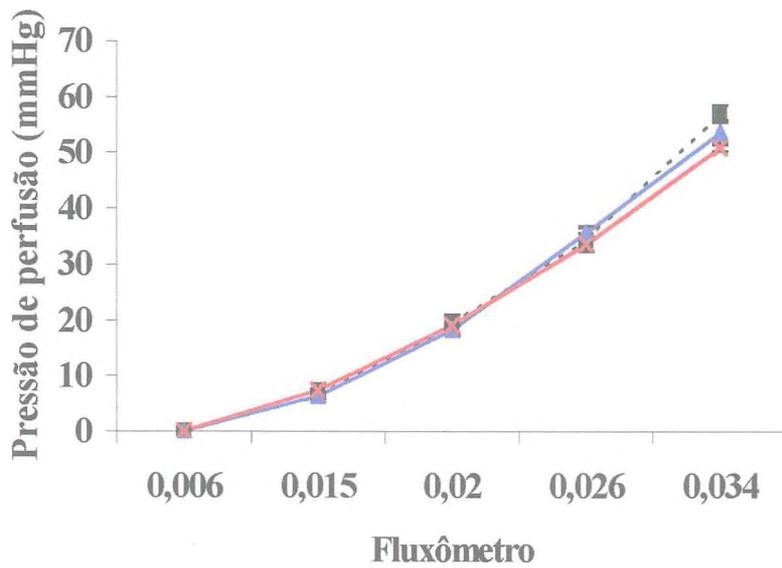


Figura 13 - Calibração do sistema. Fluxômetro X pressão de perfusão

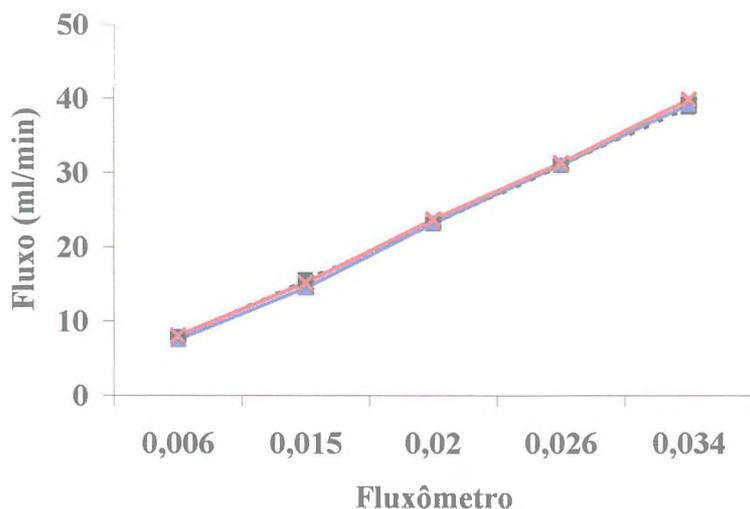


Figura 14 – Calibração do sistema. Fluxômetro X fluxo

8 - Técnica Cirúrgica

Após a anestesia do animal com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso vivo, com aplicação intraperitoneal (IP), injetamos na veia femural, devidamente identificada, 3 ml de manitol 20%, com intuito de melhorar a diurese do animal. Após assepsia do ventre do mesmo, fizemos uma incisão da parede abdominal com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para aumentar o campo cirúrgico. Rebatemos as vísceras para o lado esquerdo para visualização do rim direito e consequente limpeza do excesso de tecido gorduroso presente na área. Em seguida, isolamos o ureter, o que foi canulado através de tubo de polietileno (PE50). Com o intuito de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para com isso providenciar a descapsulação do rim. Cumpridos estes procedimentos, canulamos a artéria renal, a partir da artéria mesentérica superior. Após sua identificação, a artéria mesentérica superior foi ocluída em seu lado

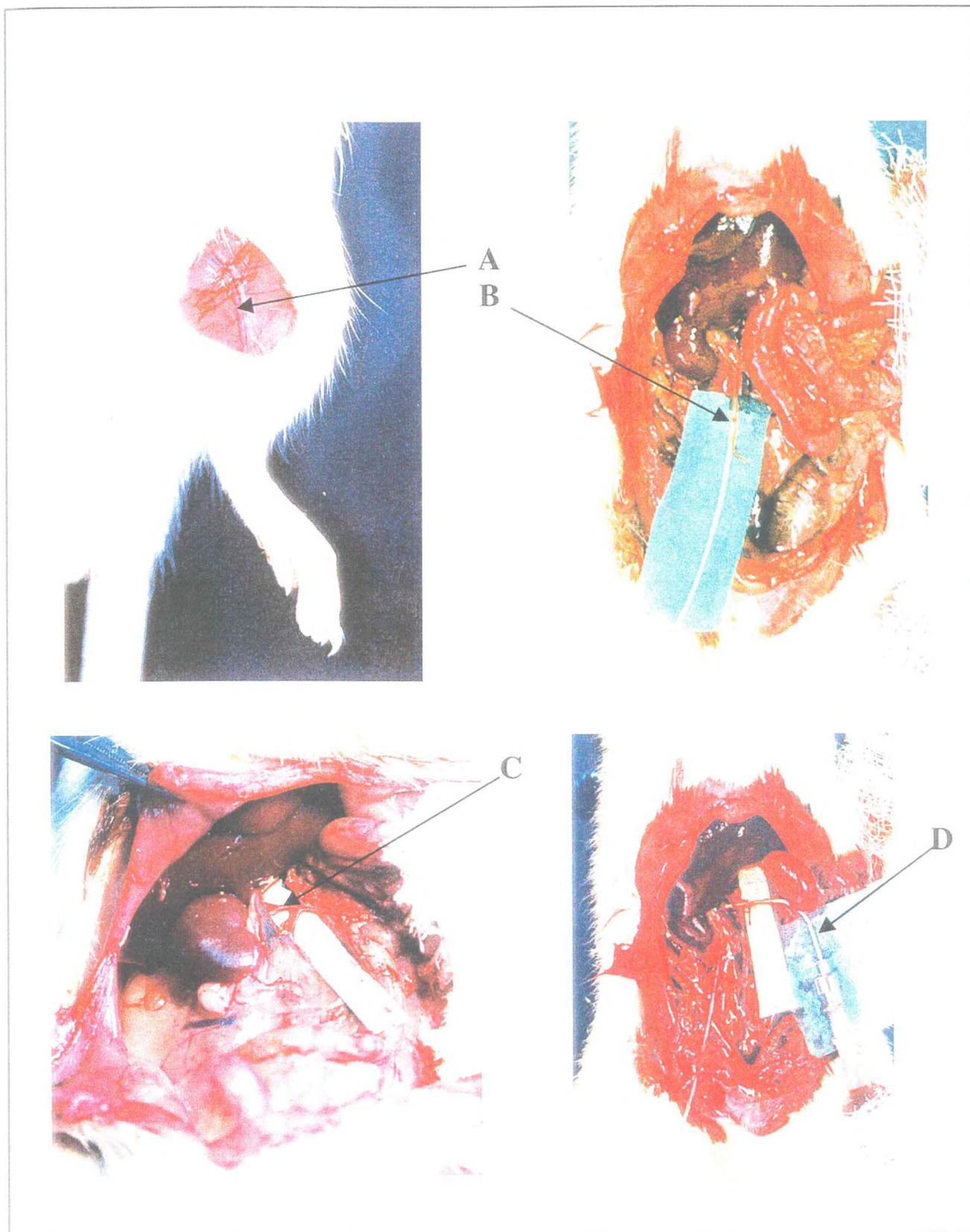
direito e pinçado no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido introduzíamos a cânula por 3 a 5 mm e daí fixamos cânula e artéria. Logo a seguir, os órgãos foram isolados com pinças e seccionados, promovendo a retirada do rim e ureter, devidamente liberados. Com o rim já acoplado ao sistema, esperamos um período de aproximadamente 30 minutos para sua adaptação ao sistema *in vitro* (Figura 15).

9 - Protocolo Experimental

Os experimentos foram iniciados após a adaptação do órgão ao sistema num tempo de aproximadamente 20 minutos. O tempo total de perfusão do órgão foi sempre de 120 minutos. Durante esse período, coletamos a cada 5 minutos a medida do fluxômetro e a pressão do perfusato. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, coletamos a urina e o perfusato, de modo que na hora de coletar o último não se trocava o coletor de urina e vice e versa. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os frascos de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e osmolaridade. Sempre aos 30 minutos, administramos o veneno de *Bothrops jararacussu*.

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

Figura 15 - Técnica cirúrgica. A= veia femural; B= ureter canulado; C= artéria mesentérica; D= cânula arterial.



10 - Avaliação bioquímica

Perfusato e urina foram coletados em intervalos de 10 minutos, de forma intercalada, conforme o protocolo experimental acima descrito. Com este material realizamos testes bioquímicos de dosagem de sódio, potássio, pelo método de fotometria de chama (Flame photometer – modelo 443 IL). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta descrita por Fonteles e Leibach (1982). Finalmente medimos a osmolaridade das amostras com um osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR). Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

11 - Histologia

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

Todas as lâminas da perfusão renal foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

12 - Cálculo dos parâmetros renais

Utilizamos as seguintes fórmulas para determinação dos parâmetros funcionais renais (Martinez-Maldonado et al., 1978; Fonteles, 1980):

➔ PP - pressão de perfusão (mmHg) - obtido do manômetro de mercúrio

➔ FU - fluxo urinário ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

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

➔ FPR - fluxo plasmático renal ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

$$\text{FPR} = \text{Fluxo registrado a cada 10 min.} / \text{intervalo de tempo} \times \text{peso do rim}$$

➔ RVR - resistência vascular renal ($\text{mmHg/ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

$$\text{RVR} = \text{PP} / \text{FPR}$$

➔ RFG - ritmo de filtração glomerular ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

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

DOUin = densidade ótica da inulina na urina

DOPin = densidade ótica da inulina no perfusato

➔ FNa^{-} - sódio filtrado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

$$\text{FNa}^{-} = \text{RFG} \times \text{PNa}^{-}, \text{ onde}$$

PNa^{-} = concentração de sódio no perfusato

➔ ENa^{-} - sódio excretado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

$$\text{ENa}^{-} = \text{FU} \times \text{UNa}^{-}, \text{ onde}$$

UNa^{-} = concentração de sódio na urina

➔ TNa^{-} - sódio transportado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =

$$\text{TNa}^{-} = \text{FNa}^{-} - \text{ENa}^{-}$$

➔ $\% \text{TNa}^{-}$ - percentual de sódio transportado =

$$\% \text{TNa}^{-} = \text{TNa}^{-} \times 100 / \text{FNa}^{-}$$

➔ C_{osm} - clearance osmótico ($ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$C_{osm} = (U_{osm} / P_{osm}) \times FU, \text{ onde}$$

U_{osm} = osmolaridade urinária

P_{osm} = osmolaridade do perfusato

➔ C_{H_2O} - clearance de água livre ($ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$C_{H_2O} = FU - C_{osm}$$

➔ $dTNa^+$ - transporte distal de sódio ($ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$dTNa^+ = C_{H_2O} \times PNa^+$$

➔ $AdNa^+$ - aporte distal de sódio ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

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

➔ $pTNa^+$ - transporte proximal de sódio ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$pTNa^+ = FNa^+ \times AdNa^+$$

➔ $\%pTNa^+$ - percentual de transporte proximal de sódio

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

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

13 - Estatística

Usamos computador PC - Pentium (133Hz) e programa Sigmastat para análise estatística dos dados, expressos por média \pm EPM. Os valores dos parâmetros renais dos quatro grupos aqui avaliados foram comparados por ANOVA e teste

comparativo entre os grupos, feito por “teste T de Bonferoni”, com significância de * $p < 0,05$.

Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos.

Resultados

Parte 1 - Toxicidade aguda com determinação da DL50

Durante o período de observação de 1 hora após a inoculação do veneno, foi visto, para todos os animais, sem relação com a dose empregada, sinais de hipocinesia, ptose palpebral bilateral e perda de postura. Nenhum animal faleceu durante este período inicial de observação. No tempo de 24 horas morreram 0, 1, 2, e 6 animais, respectivamente nas doses de 2, 4, 8 e 16 mg/kg de peso vivo. Os animais que sobreviveram, apresentaram completa recuperação do quadro acima descrito.

Com a análise dos dados obtidos através do método dos probitos, encontramos a DL50 no valor de $9,5 \pm 0,44$ mg/kg (Tabela 04 e Figura 16).

A leitura das lâminas nos mostrou que nas doses de 16 e 8 mg/kg os rins apresentaram grande congestão, dilatação das células tubulares, edema intersticial com exudação granulocitária e presença de cilindros protéicos. Nas doses menores encontramos apenas a congestão e notamos a presença dos cilindros protéicos.

Os baços apresentaram congestão em todas as doses e ainda hiperplasia de polpa branca. O fígado apresentou apenas congestão, assim como o cérebro e o coração. Em apenas um animal o coração apresentou sinais de destruição muscular, obtido na dose de 8 mg/kg.

Os pulmões apresentaram congestão e em diversos casos a presença de exudação granulocitária. Em apenas um caso foi diagnosticado quadro de broncopneumonia aguda. Todos estes resultados foram compilados nas tabelas 5, 6, 7, e 8 e as alterações histológicas como nas fotos em anexo.

Tabela 4 -Toxicidade aguda do veneno de *Bothrops jararacussu* e cálculo da DL50

Grupo ⁿ	Dose (mg/kg)	Nº de animais mortos	% de mortalidade	% de mortalidade corrigida	Probitos	DL50 ⁺ ± E. P. M. *
I	2,0	0	0	4,17	3,25	
II	4,0	1	16,7	16,7	4,03	9,5 ± 0,44
III	8,0	2	33,3	33,3	4,56	
IV	16,0	6	100	95,8	6,73	

n = 6 animais por grupo

* (Miller e Tainter, 1944)

Figura 16 - Cálculo da DL 50 em ratos usando veneno de *Bothrops jararacussu*

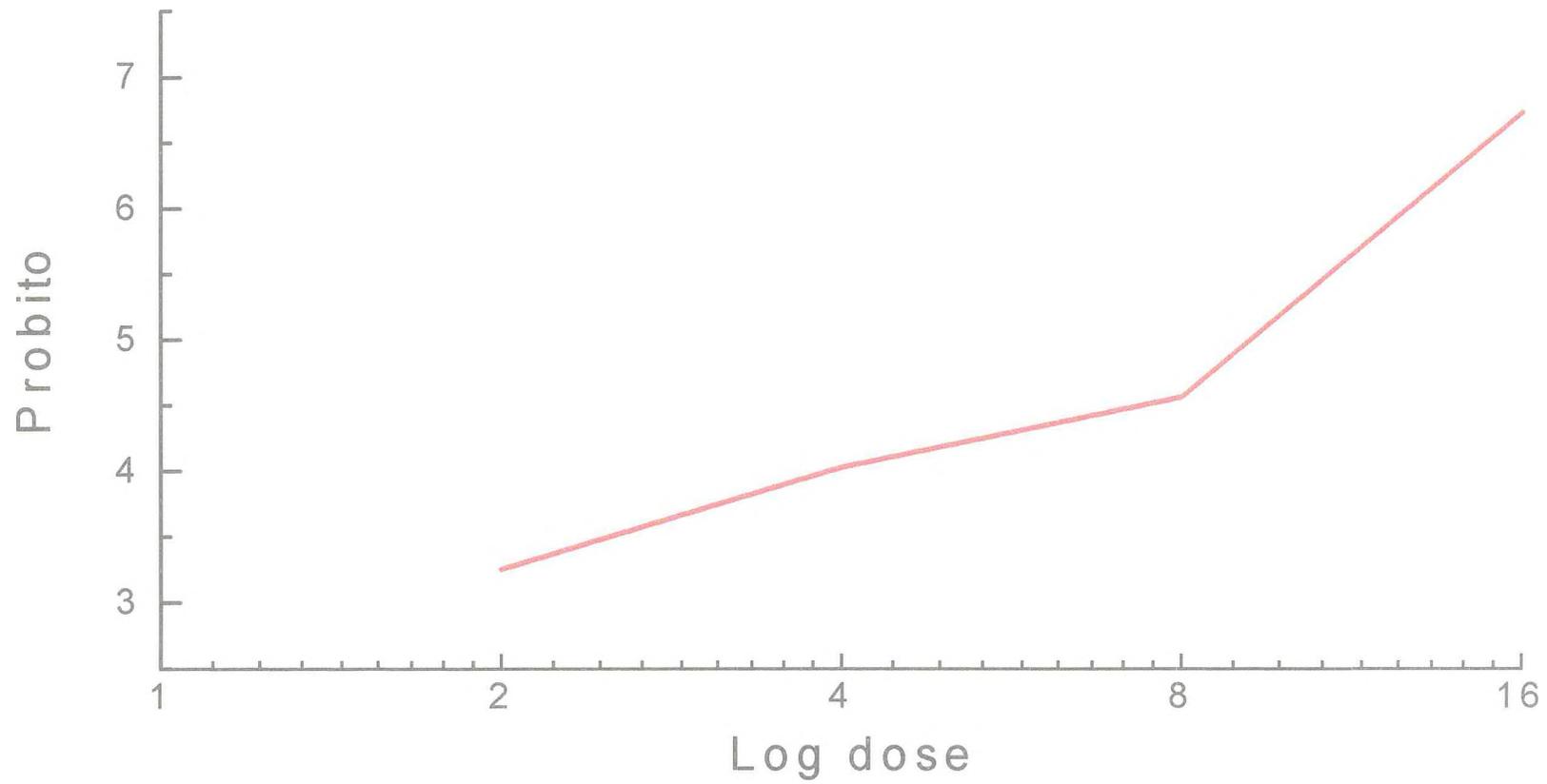


Tabela 5 - Alterações patológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar na dose de 2,0 mg/kg.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Rim	Congestão	Congestão presença de raros cilindros protéicos	Congestão e tumefação do epitélio tubular	Congestão	Congestão	Congestão , presença de raros cilindros protéicos tubulares
Baço	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão	Congestão e hiperplasia de polpa branca
Fígado	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Pulmão	Congestão e exudação granulocitária discreta	Congestão	Congestão	Congestão e discreta exudação granulocitária	Congestão	Congestão
Coração	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Cérebro	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão

Tabela 6 - Alterações patológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar na dose de 4 mg/kg.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Rim	Congestão	Congestão e raros cilindros protéicos	Congestão	Congestão e raros cilindros protéicos	Congestão e raros cilindros protéicos	Congestão e raros cilindros protéicos
Baço	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Fígado	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Pulmão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão e discreta infiltração granulocitária	Congestão	Congestão e infiltração granulocitária
Coração	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Cérebro	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão

Tabela 7 - Alterações patológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar na dose de 8 mg/kg.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Rim	Cilindros protéicos, presença de granulócitos e tumefação turva	Dilatação dos túbulos, congestão e presença de cilindros	Congestão, dilatação tubular e tumefação	Congestão, dilatação tubular e raros cilindros protéicos	Congestão com tumefação das células tubulares, presença de raros cilindros protéicos	Congestão com degeneração vacuolar dos túbulos
Baço	Congestão com hiperplasia de polpa branca	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão e hiperplasia de polpa branca	Congestão
Fígado	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Pulmão	Pavimentação e discreta exudação de neutrófilos e eosinófilos ao redor dos vasos	Congestão	Congestão e leve exudação de granulócitos	Congestão e leve exudação granulocitária ao redor dos vasos	Congestão	Congestão
Coração	Congestão	Congestão, destruição de fibras musculares	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Cérebro	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão

Tabela 8 - Alterações patológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos Wistar na dose de 16 mg/kg.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Rim	Edema intersticial, congestão, exudação granulocitária intersticial	Edema intersticial, congestão, cilindros protéicos raros	Congestão, dilatação tubular	Congestão, edema intersticial e dilatação tubular. Princípio de necrose tubular, tumefação turva e alguns cilindros	Congestão e dilatação tubular	Congestão e dilatação tubular
Baço	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão
Fígado	Congestão	Congestão	Congestão	Esteatose e congestão	Congestão	Congestão
Pulmão	Marginação e exudação de granulócitos leucocitários	Congestão	Congestão	Broncopneumonia e congestão	Congestão e infiltração discreta de granulócitos	Congestão
Coração	Congestão	Congestão	Congestão e hemorragia	Congestão	Congestão	Congestão
Cérebro	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão	Congestão

Parte 2 - Avaliação hematológica

1- Avaliação dos grupos controle

Grandes diferenças foram encontradas quando analisamos os parâmetros sanguíneos de ratos em trabalhos já publicados, principalmente nos casos de animais de outro país. Na tentativa de solucionar tais diferenças todos os 24 animais dos 4 diferentes grupos controle foram usados para criar uma tabela de valores de referência com um intervalo de confiança de 95% (Tabela 9). Cada grupo tratado e seu correspondente grupo controle foi analisado nos tempos 2, 6, 12 e 24 horas. A tabela 9 foi usada para comprovar que todos os valores encontrados nos grupos controle ficaram dentro dos parâmetros de referência normal.

2- Ação do veneno de *B. jararacussu* nos parâmetros sanguíneos

Houve redução significativa do número de eritrócitos nos tempos de 6, 12 e 24 horas (Tabela 10 e Figura 17). A hemoglobina foi reduzida no tempo de 12 horas (Tabela 10 e Figura 18), e o hematócrito diminuiu com os tempos de 12 e 24 horas (Tabela 10 e Figura 19).

Houve diferença estatística para o número de plaquetas (Tabela 10 e Figura 20) e concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT), conforme Tabela 11 e Figura 24, quando comparados com os respectivos controles em todos os tempos avaliados.

Encontramos aumento para o volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nos tempos de 12 e 24 horas (Tabela 10 e Figuras 21 e 22, respectivamente). Entretanto, a hemoglobina corpuscular média (HCM) sofreu aumento nos tempos de 6, 12 e 24 horas (Tabela 10 e Figura 23).

O número total de leucócitos aumentou significativamente para todos os tempos avaliados (Tabela 11 e Figura 25). Na contagem diferencial dos glóbulos brancos obtivemos aumento do número de neutrófilos nos tempos de 2, 6 e 12 horas (Tabela 11 e Figura 26), de linfócitos nos quatro tempos analisados (Tabela 11 e Figura 27), dos eosinófilos apenas as 24 horas (Tabela 11 e Figura 28), e dos monócitos após 2 e 6 horas da aplicação do veneno (Tabela 11 e Figura 29). No tocante às outras células da série branca como bastões, basófilos, mielócitos e metamielócitos não houve diferença significativa quando comparadas com os grupos controle.

Tabela 9 - Valores sanguíneos normais para ratos Wistar

Parâmetros sanguíneos	Valores de referência
Eritrócitos ($\times 10^6 / \text{mm}^3$)	4,27 - 8,50
Hemoglobina (g/dl)	11,9 - 24,1
Hematocrito (%)	30,7 - 48
Plaquetas ($\times 10^5 / \text{mm}^3$)	1,0 - 3,78
Proteínas totais (g/dl)	5,08 - 8,24
VCM (fl)	42,83 - 90,63
CHCM (%)	31,34 - 56,27
HCM (pg)	16,91 - 50,92
Leucócitos ($\times 10^4$)	0,17 - 0,39
Mielócitos ($/\text{mm}^3$)	0 - 0
Metamielócitos ($/\text{mm}^3$)	0 - 12
Bastões ($/\text{mm}^3$)	0 - 215
Segmentados ($\times 10^4 / \text{mm}^3$)	0,026 - 0,12
Linfócitos ($\times 10^4 / \text{mm}^3$)	0,11 - 0,29
Eosinófilos ($/\text{mm}^3$)	0 - 95,5
Basófilos ($/\text{mm}^3$)	0 - 0
Monócitos ($/\text{mm}^3$)	0 - 167

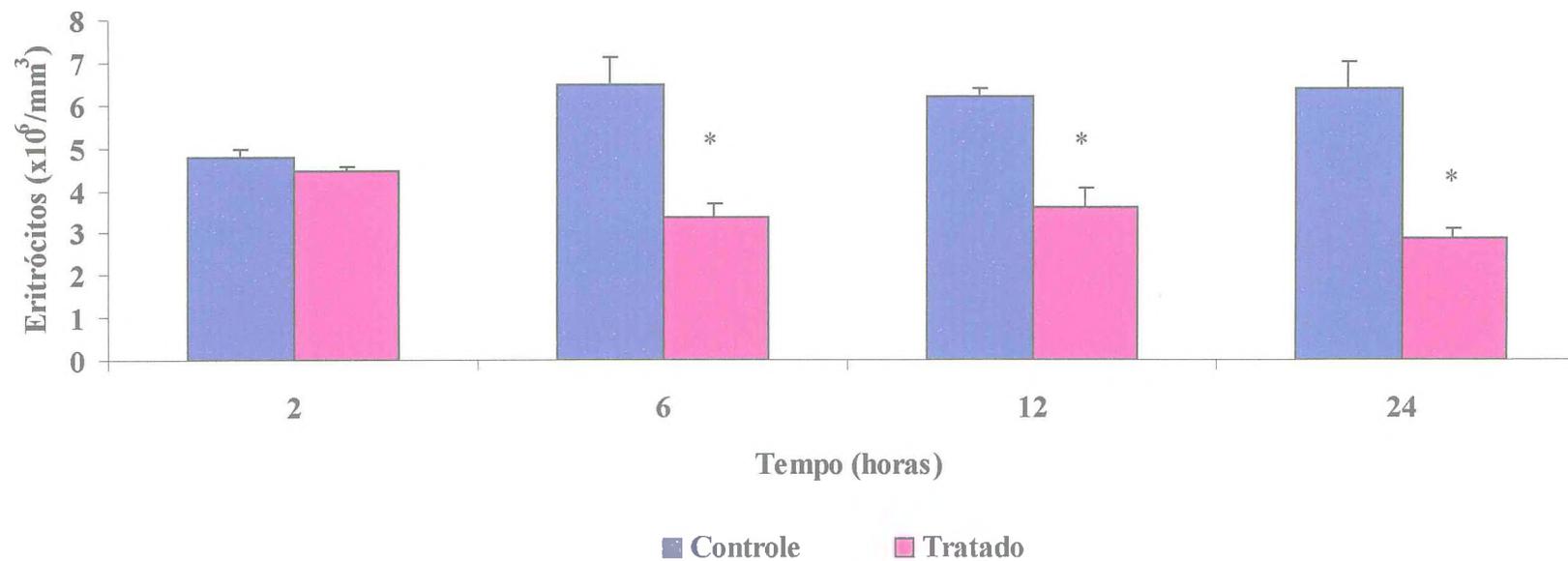
Análise estatística (n=24) com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 10 - Valores para o eritrograma em ratos Wistar na ausência (n= 6) e presença (n=6) do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (9,5 mg/kg).

Eritrograma	Tempo	02 horas		06 horas		12 horas		24 horas	
		Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)		4,8 \pm 0,19	4,5 \pm 0,08	6,5 \pm 0,65	3,4 \pm 0,29 *	6,2 \pm 0,2	3,6 \pm 0,46 *	6,4 \pm 0,64	2,9 \pm 0,23 *
Hemoglobina (g/dl)		22,2 \pm 0,99	21,8 \pm 1,09	15,3 \pm 0,4	14,9 \pm 1,38	16,3 \pm 0,9	12,3 \pm 1,2 *	13 \pm 0,5	13,2 \pm 1,12
Hematócrito (%)		43 \pm 1,75	40,7 \pm 0,61	33 \pm 0,93	35 \pm 2,28	41,3 \pm 0,88	26 \pm 2,75 *	35,8 \pm 1,28	22 \pm 2,32 *
Plaquetas ($\times 10^5/\text{mm}^3$)		1,16 \pm 0,07	0,7 \pm 0,08 *	1,87 \pm 0,07	0,4 \pm 0,04 *	2,18 \pm 0,09	0,4 \pm 0,06 *	3,08 \pm 0,5	0,9 \pm 0,07 *
VCM (fl)		90,2 \pm 0,24	89,7 \pm 0,31	53,03 \pm 4,1	103,4 \pm 6,7 *	67,06 \pm 2,9	74,1 \pm 4,8	58,5 \pm 6,08	77,3 \pm 5,9
CHCM (%)		51,9 \pm 2,64	53,6 \pm 2,15	46,4 \pm 0,87	42,9 \pm 3,47	39,4 \pm 1,94	48,6 \pm 4,98	36,5 \pm 1,61	60,8 \pm 5,3 *
HCM (pg)		46,9 \pm 2,4	48,1 \pm 1,91	24,6 \pm 1,88	43,6 \pm 3,2 *	26,3 \pm 1,4	35,3 \pm 3,4 *	21,2 \pm 1,98	46,8 \pm 4,8 *

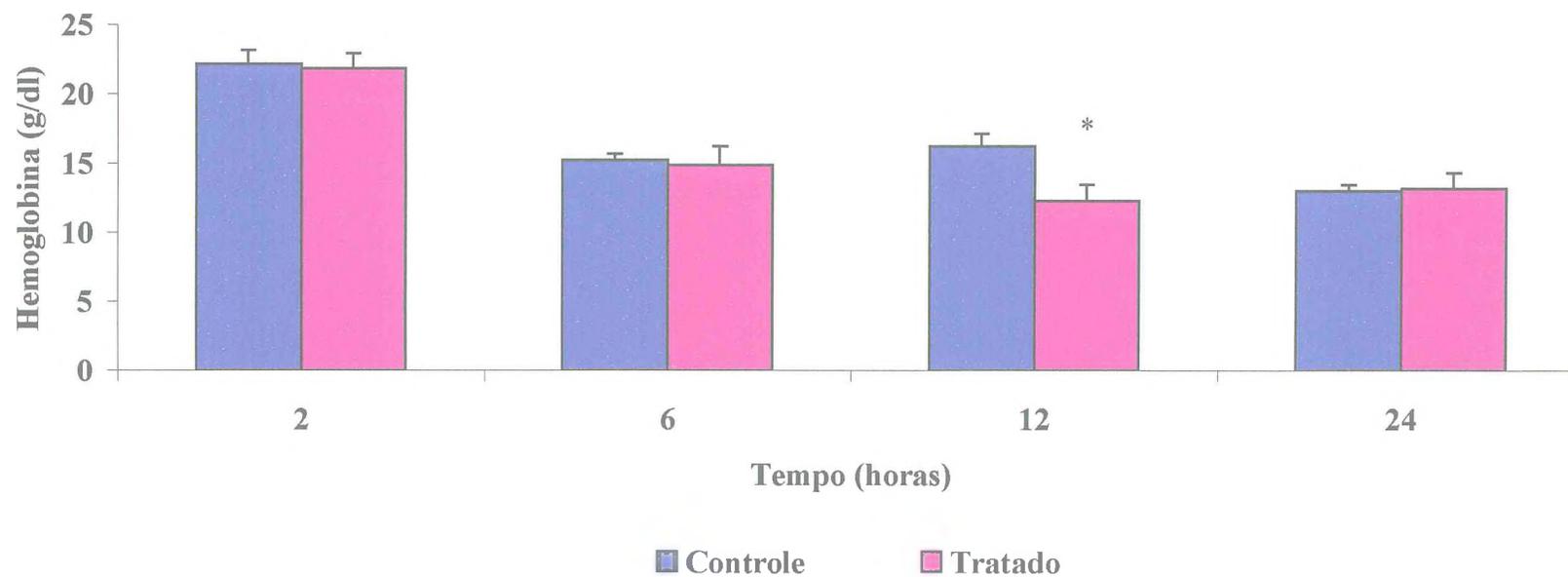
VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração corpuscular média; HCM – hemoglobina corpuscular média. Dados apresentados por média \pm EPM (* p < 0,05).

Figura 17 - Número de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



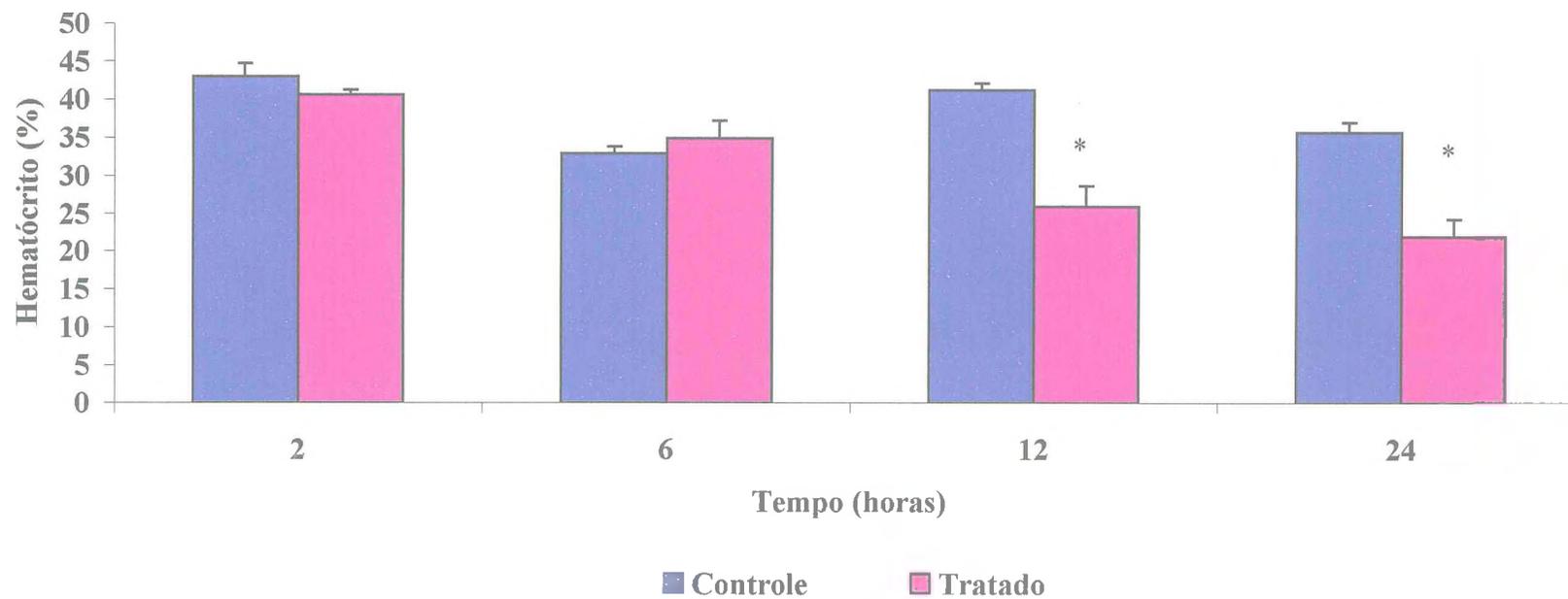
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 18 - Concentração da hemoglobina (g/dl) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



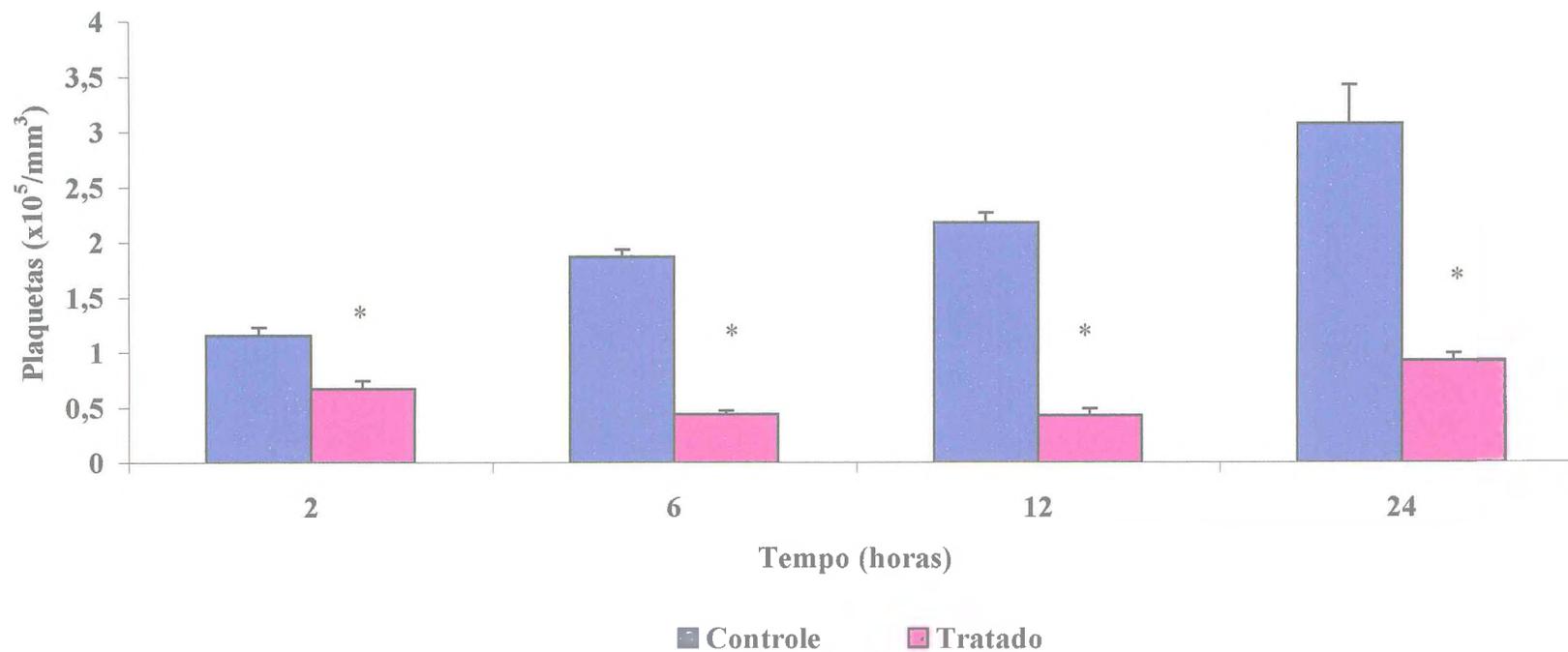
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 19 - Valores do hematócrito (%) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



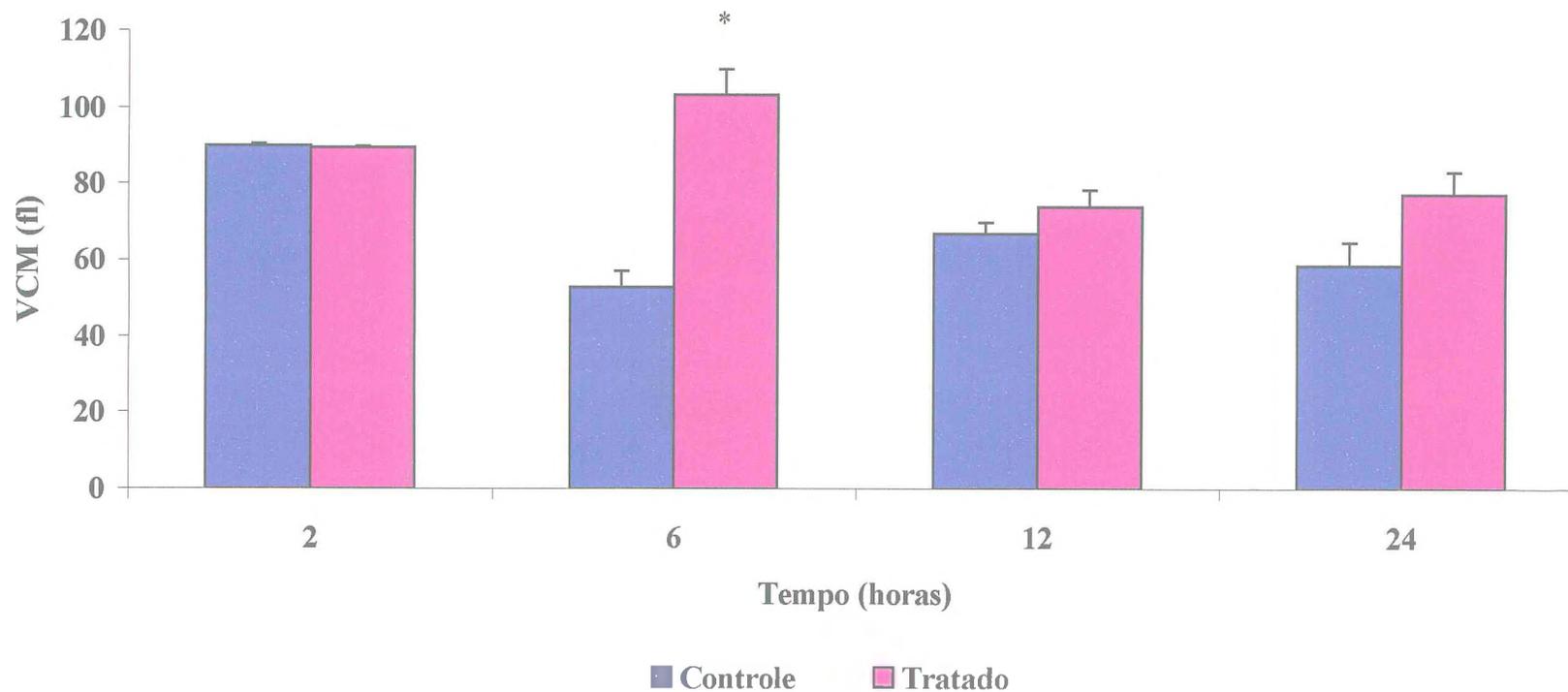
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 20 - Número de plaquetas ($\times 10^5/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



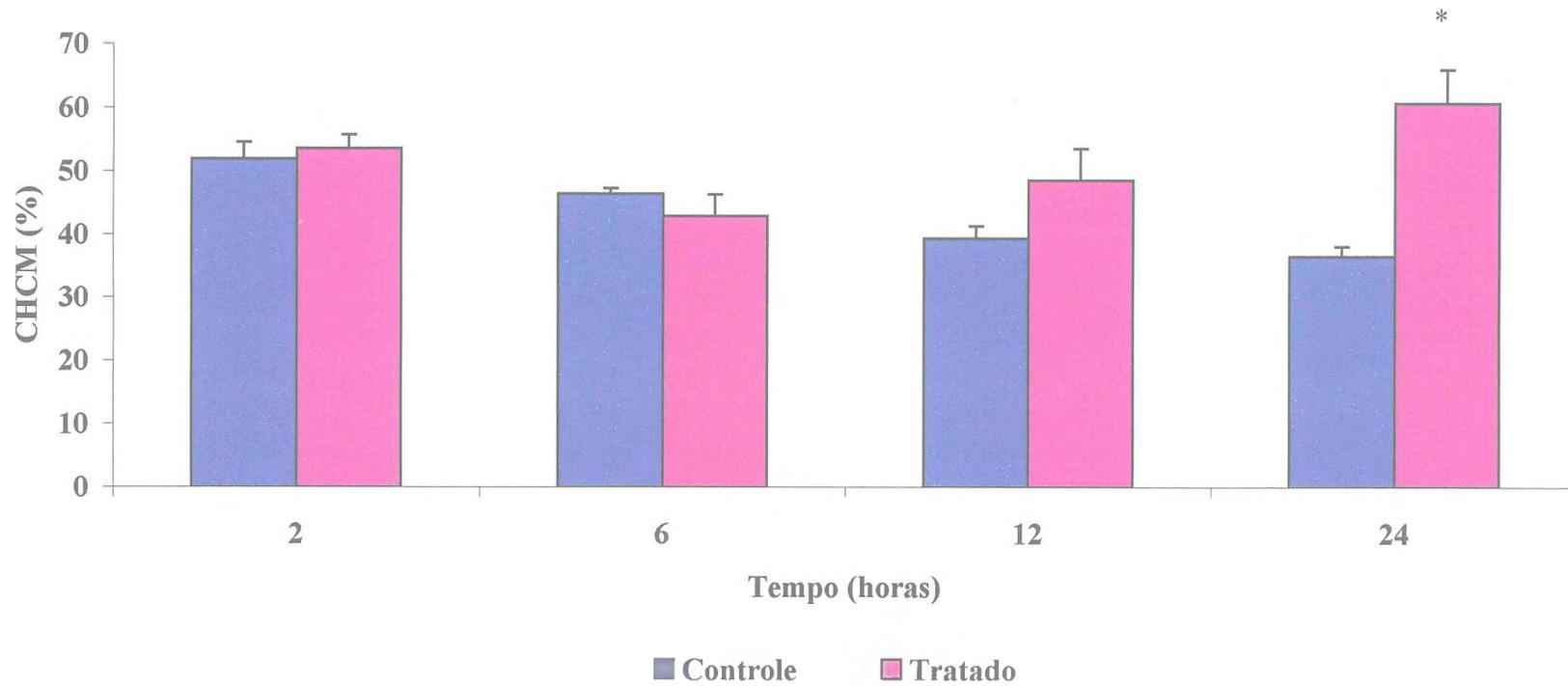
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 21 - Valores do volume corpuscular médio = VCM (fl) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



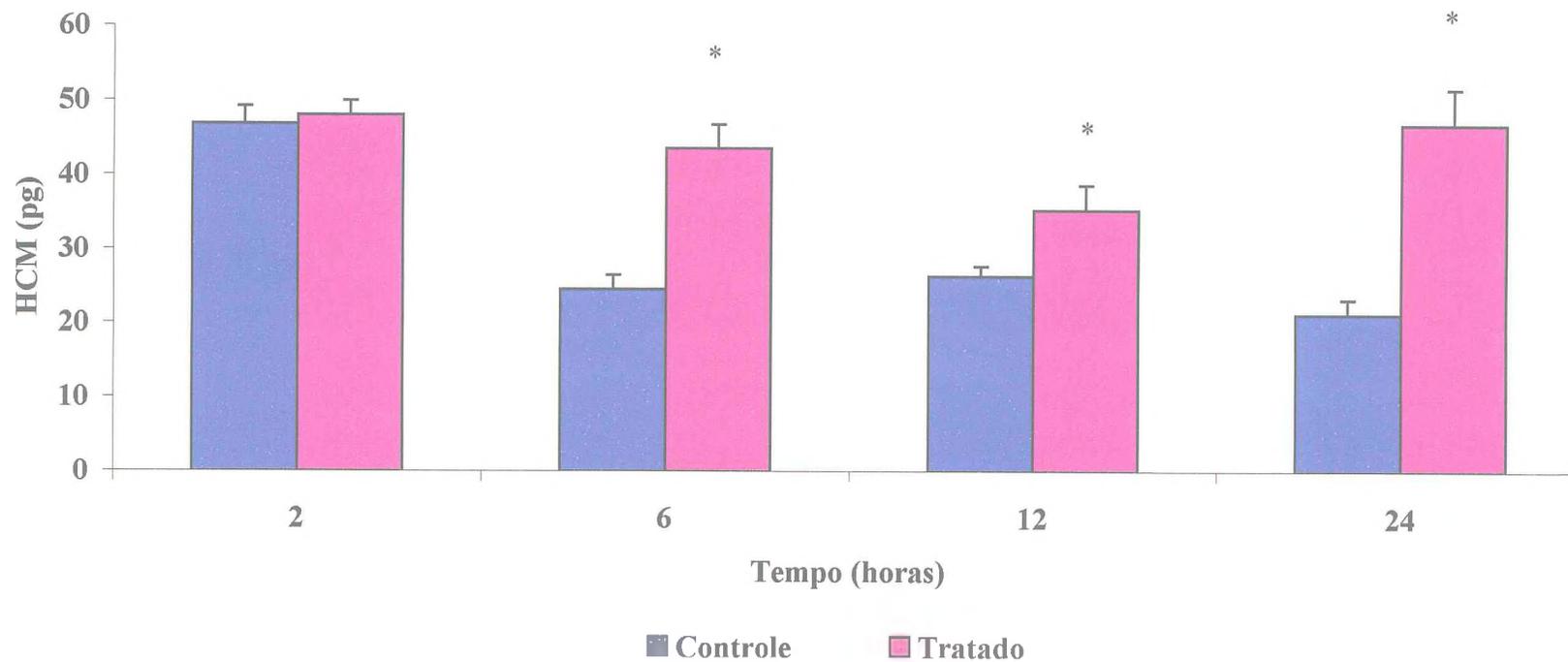
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 22 - Valores da concentração de hemoglobina corpuscular média = CHCM (%) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 23 - Valores da hemoglobina corpuscular média – HCM (pg) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



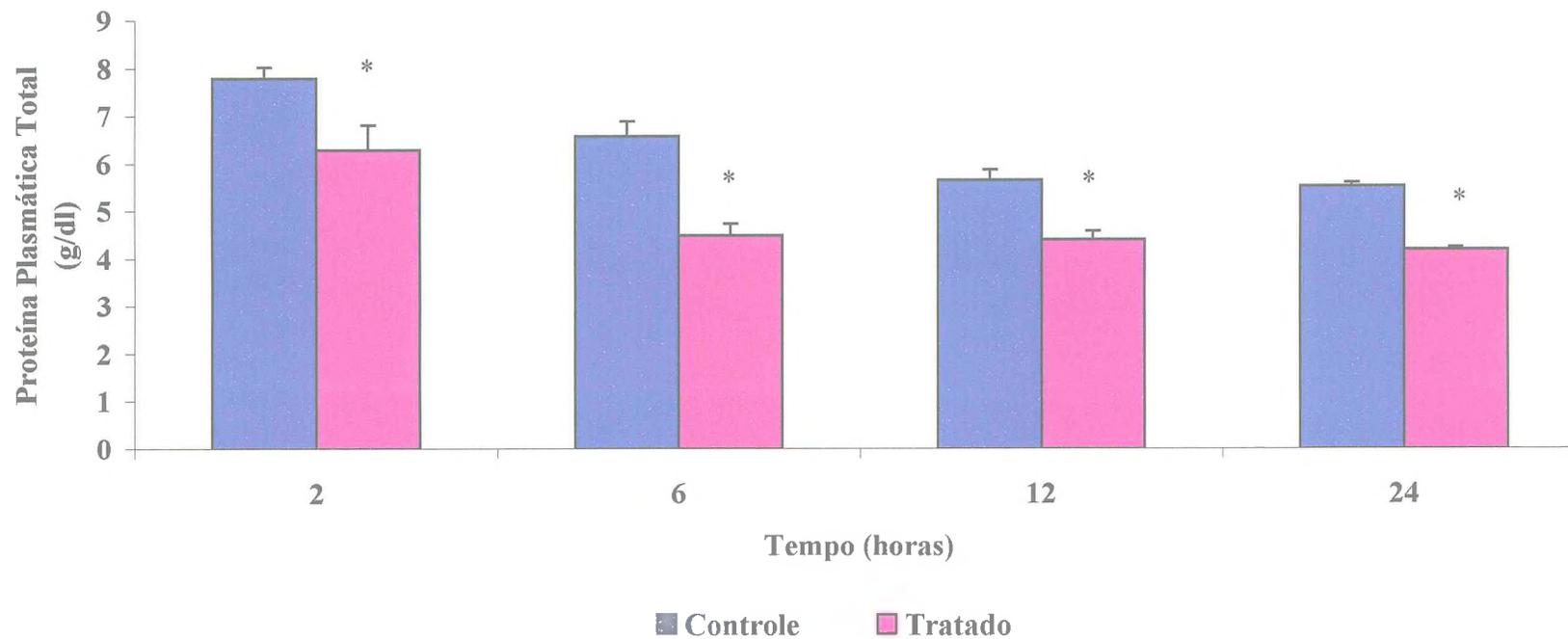
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Tabela 11 - Dosagem das proteínas plasmáticas totais e valores para o leucograma em ratos Wistar na ausência (n= 6) e presença (n=6) do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (9,5 mg/kg).

Leucograma	Tempo	02 horas		06 horas		12 horas		24 horas	
		Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
PPT (g/dl)		7,8 ± 0,23	6,3 ± 0,52 *	6,58 ± 0,32	4,5 ± 0,24 *	5,66 ± 0,22	4,4 ± 0,19 *	5,52 ± 0,09	4,2 ± 0,06 *
Leucócitos (x/10 ⁴ /mm ³)		0,33 ± 0,01	0,88 ± 0,04 *	0,28 ± 0,03	0,89 ± 0,04 *	0,29 ± 0,02	0,74 ± 0,01 *	0,22 ± 0,04	0,62 ± 0,05
Neutrófilos (x/10 ⁴ /mm ³)		0,09 ± 0,008	0,41 ± 0,05 *	0,06 ± 0,007	0,42 ± 0,03 *	0,07 ± 0,014	0,32 ± 0,06 *	0,05 ± 0,012	0,11 ± 0,03
Linfócitos (x/10 ⁴ /mm ³)		0,23 ± 0,02	0,43 ± 0,04 *	0,21 ± 0,03	0,44 ± 0,04 *	0,21 ± 0,02	0,40 ± 0,09 *	0,15 ± 0,02	0,48 ± 0,05
Eosinófilos (x10 ² /mm ³)		0,23 ± 0,11	1,09 ± 0,54	0,27 ± 0,10	0,75 ± 0,27	0,25 ± 0,09	0,29 ± 0,15	0,49 ± 0,24	2,15 ± 0,57
Monócitos (x/10 ² /mm ³)		0,53 ± 0,20	2,82 ± 0,48 *	0,55 ± 0,14	1,30 ± 0,27 *	1,15 ± 0,34	1,24 ± 0,46	0,66 ± 0,14	1,05 ± 0,23

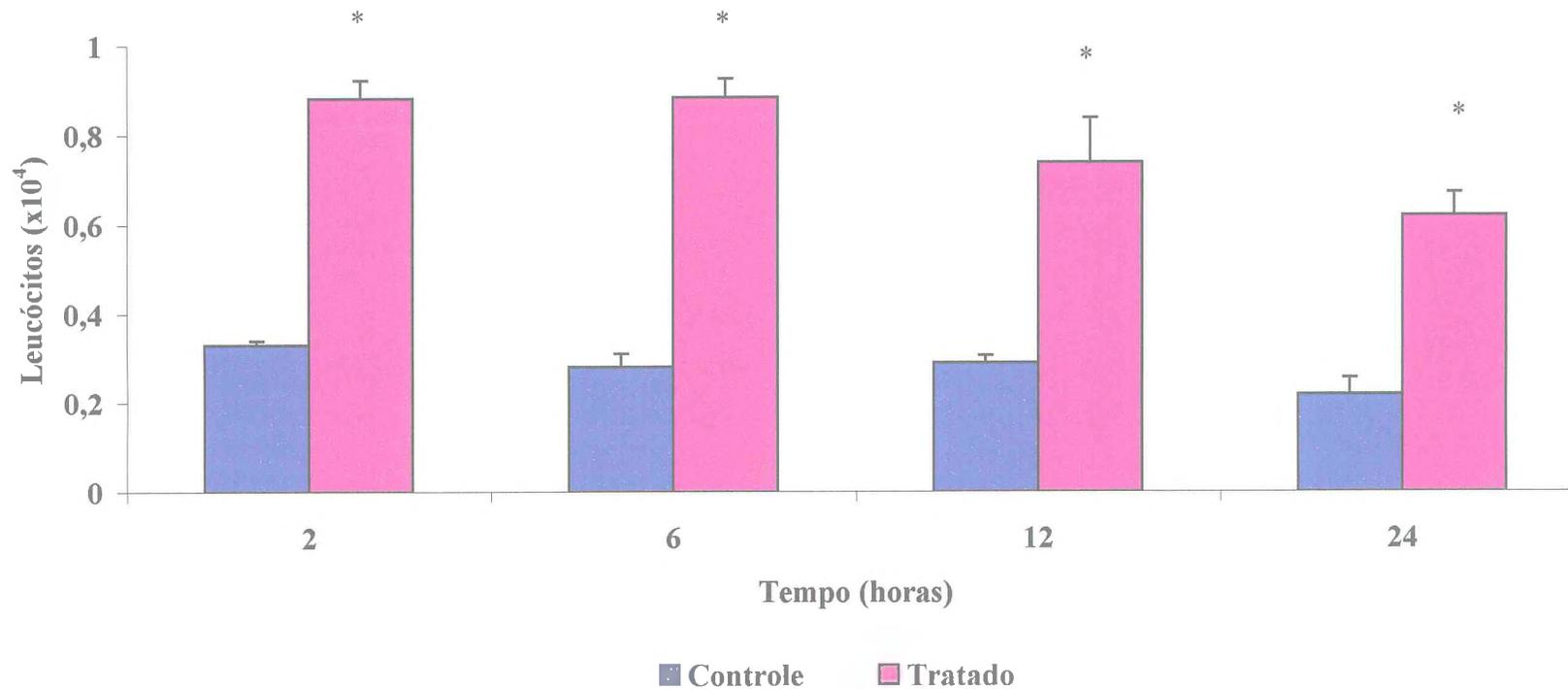
PPT – Proteínas plasmáticas totais. Dados apresentados por média ± EPM (* p < 0,05).

Figura 24 - Concentração das proteínas plasmáticas totais (g/dl) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



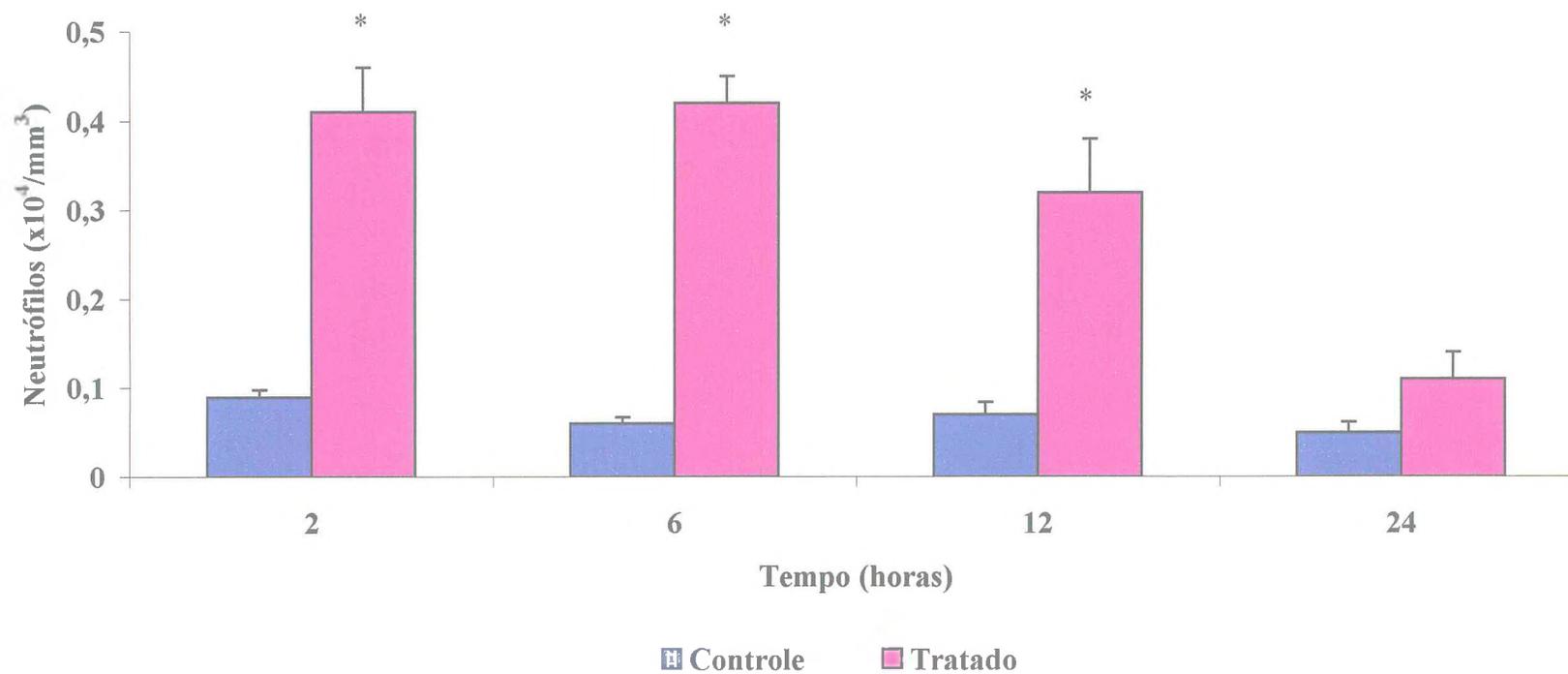
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 25 - Número total de leucócitos ($\times 10^4/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



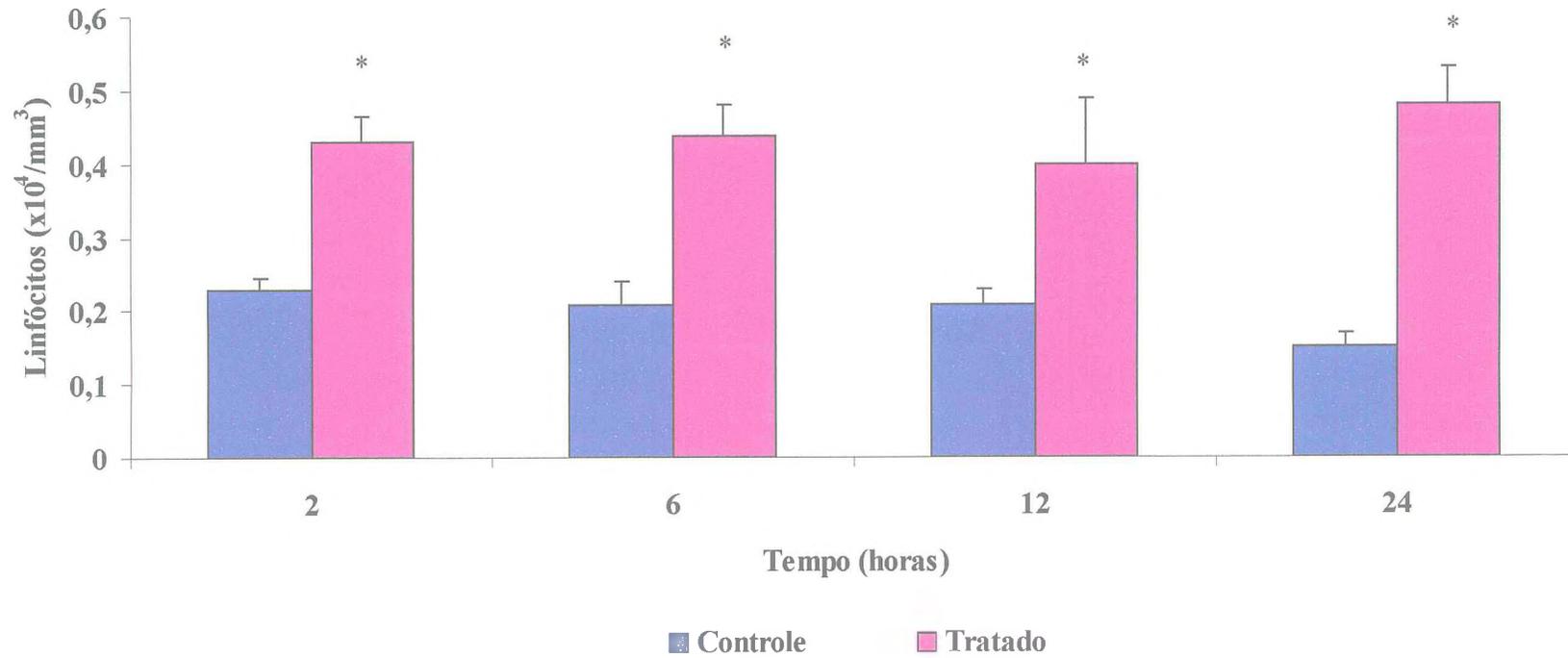
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 26 - Número de neutrófilos ($\times 10^4/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



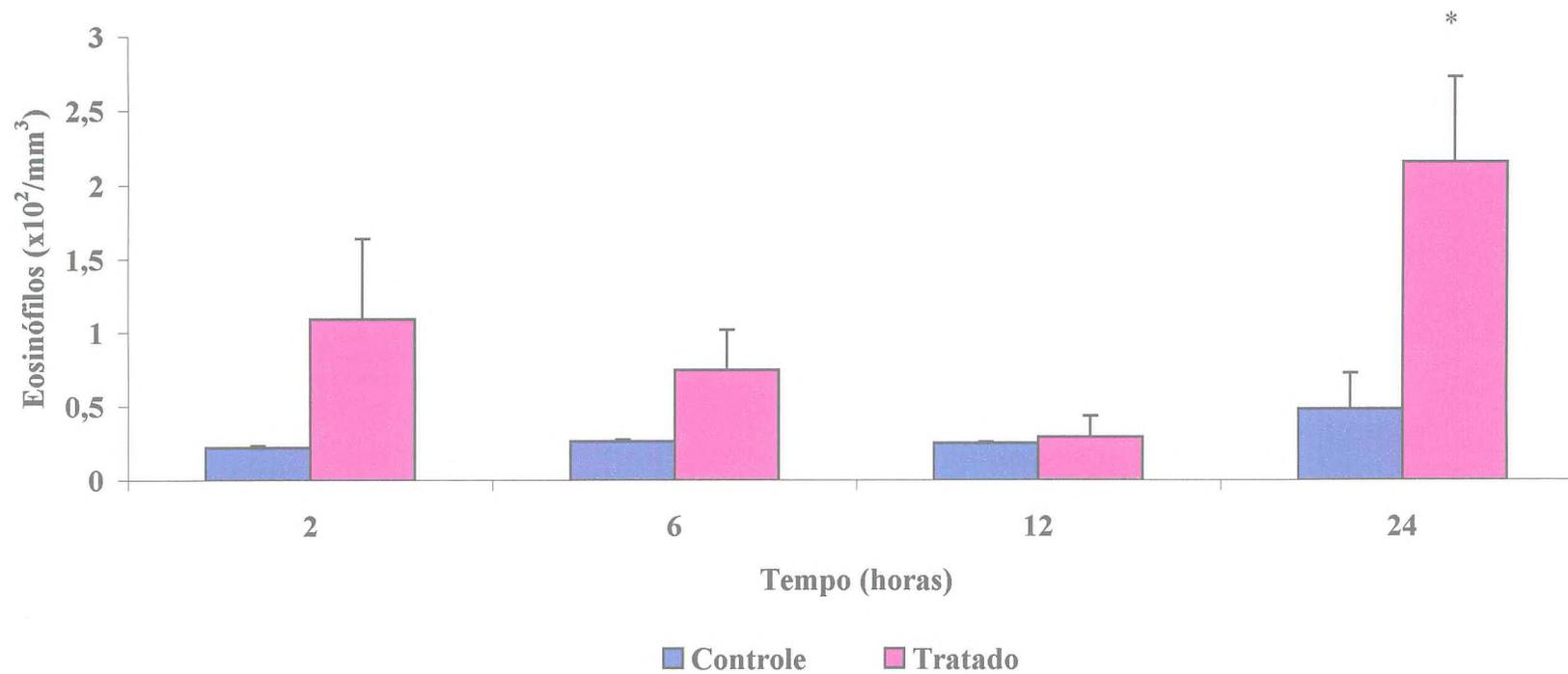
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 27 - Número de linfócitos ($\times 10^4/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



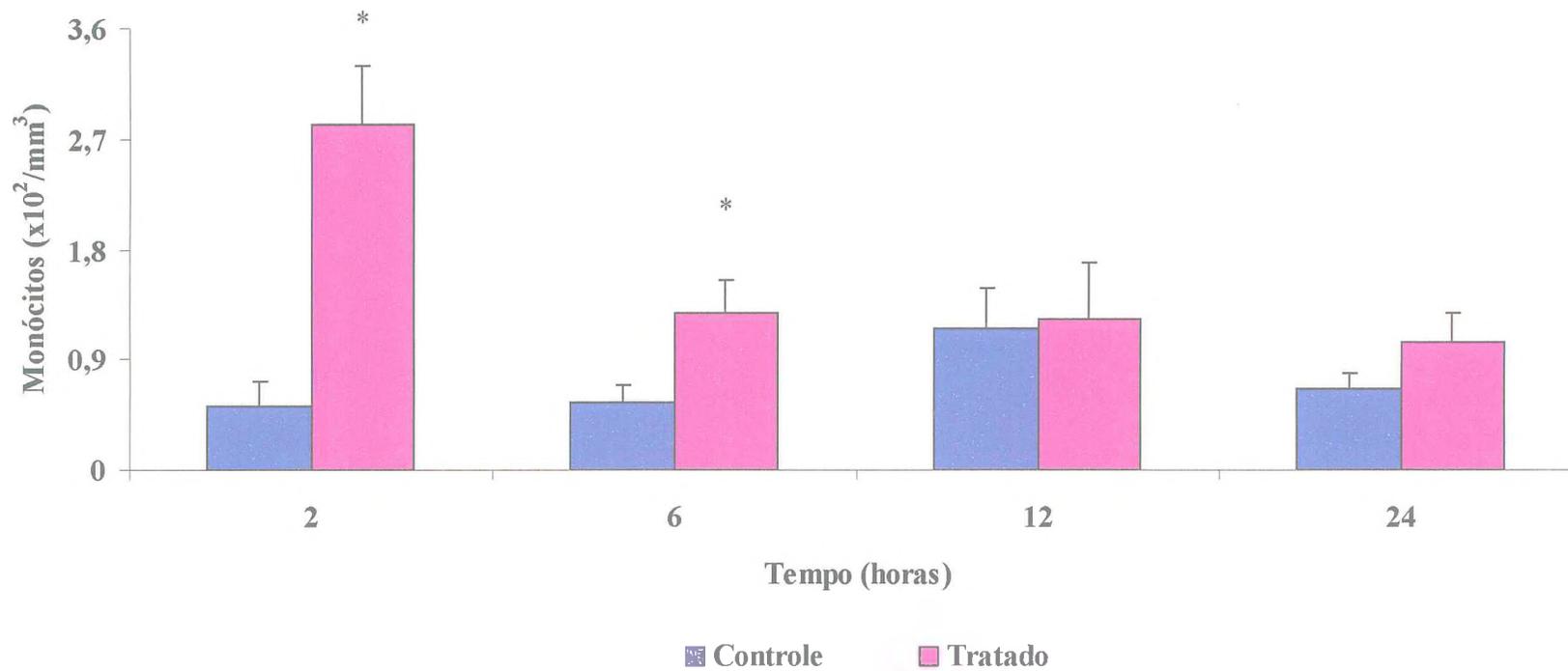
Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 28 - Número de eosinófilos ($\times 10^2/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Figura 29 - Número de monócitos ($\times 10^2/\text{mm}^3$) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu*.



Dados apresentados por média \pm EPM (* $p < 0,05$).

Parte 3 - Perfusão renal

1- Avaliação dos grupos controle

Foram realizados seis experimentos controle para avaliação dos parâmetros funcionais renais sob influência apenas da solução perfusora de Krebs-Henseleit modificada, e para posterior comparação com os grupos tratados com veneno de *Bothrops jararacussu*. Todos os parâmetros mantiveram-se estáveis durante os 120 minutos de experimento (Tabelas 12, 13 e 14).

2- Efeito do veneno de *Bothrops jararacussu*

Doses do veneno liofilizado nas quantidades de 0,3 1 e 3 mg, diluídas em 1ml de água destilada, foram adicionadas ao sistema com 100ml de solução perfusora após os trinta minutos iniciais de experimento. Intensas alterações da função renal foram observadas após a aplicação do veneno, (tabelas 15 a 28).

Uma vez comparados o grupo controle e os tratados, a pressão de perfusão e a resistência vascular renal apresentaram queda significativa aos 90 e 120 minutos de experimento para todos os grupos avaliados. Quando analisamos apenas os animais tratados, obtivemos diferenças estatísticas aos 90 minutos entre os grupos com 3 e 10 μ g e entre 10 e 30 μ g para o parâmetro pressão de perfusão. Aos 120 minutos, a pressão de perfusão dos grupos tratados foi estatisticamente diferente entre os grupos com 3 μ g e 30 μ g e entre 10 μ g e 30 μ g. No parâmetro resistência vascular renal, todos os grupos com veneno foram diferentes entre si aos 120 minutos (Tabelas 15 e 16 e Figuras 30 e 31).

O fluxo urinário aumentou intensamente aos 120 minutos com 10 e 30 μ g, quando comparamos o grupo controle com os tratados. Quando analisamos apenas os

grupos tratados, encontramos diferenças estatísticas entre 3 e 30 μ g aos 90 minutos. Aos 120 minutos, todos os grupos foram diferentes entre si (Tabela 17 e Figura 32).

O ritmo de filtração glomerular foi reduzido em relação ao grupo controle, aos 60 minutos em 10 e 30 μ g. Contudo, aos 120 minutos não observamos diferença estatística para 10 μ g, porém houve aumento com 30 μ g. Na comparação dos grupos de veneno entre si, houve diferença aos 120 minutos entre 3 e 30 μ g e ainda entre 10 e 30 μ g (Tabela 18 e Figura 33).

Após comparação com o grupo controle obtivemos queda significativa para o percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁻) nos tempos de 90 e 120 minutos (Tabela 19 e Figura 34) e redução do percentual de transporte de potássio (%TK⁻) aos 120 minutos em todos os grupos tratados. Porém, para o segundo parâmetro, obtivemos queda entre 10 e 30 μ g aos 60 minutos (Tabela 20 e Figura 35). Houve diminuição do percentual de transporte de cloro (%TCl) em todas as doses empregadas nos tempos de 90 e 120 minutos (Tabela 21 e Figura 36). Constatamos diferenças estatísticas entre os grupos tratados para o percentual de transporte de potássio (%TK⁻), aos 60 minutos, entre 3 μ g e 10 μ g e ainda entre 3 μ g e 30 μ g (Tabela 20 e Figura 35). Os grupos tratados para o percentual de transporte de cloro (%TCl) foram diferentes estatisticamente, aos 120 minutos, entre 3 μ g e 10 μ g e entre 3 μ g e 30 μ g (Tabela 21 e Figura 36).

Todos os grupos tratados foram reduzidos em relação ao grupo controle aos 120 minutos para o percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺), contudo, com 30 μ g essa redução foi iniciada aos 90 minutos (Tabela 22 e Figura 37). O percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁻) caiu aos 120 minutos nas três doses e ainda aos 60 minutos com 30 μ g (Tabela 23 e Figura 38). No percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl) houve queda aos 120 minutos para todas as doses, porém com 30 μ g de

veneno esta queda iniciou-se aos 90 minutos (Tabela 24 e Figura 39). Durante análise dos grupos tratados entre si, observamos diferenças estatísticas aos 60 minutos para o percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) entre 3μg e 30μg e entre 3μg e 10μg. Aos 120 minutos essa diferença foi entre 3μg e 30μg (tabela 23 e Figura 38). O percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl) apresentou diferença aos 120 minutos nos grupos tratados entre os grupos de 3μg e 10μg e entre 3μg e 30μg (Tabela 24 e Figura 39).

Houve aumento da excreção de sódio (ENa⁻), potássio (EK⁺) e cloro (ECl) no tempo de 120 minutos somente para os grupos de 10μg e 30μg, quando comparamos os grupos tratados ao grupo controle. Os grupos tratados foram todos diferentes entre si, aos 120 minutos, para os três parâmetros. (Tabelas 25, 26 e 27 e Figuras 40, 41 e 42). Para o sódio excretado (ENa⁻) e cloro excretado (ECl) houve ainda diferença entre os grupos de 3μg e 30μg no tempo de 90 minutos (Tabela 25 e Figura 41).

Para o parâmetro *clearance* osmótico encontramos diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados, aos 120 minutos de perfusão, nos grupos de 10μg e 30μg. Quando comparamos os três grupos tratados, todos foram diferentes entre si aos 120 minutos (Tabela 28 e Figura 43).

A análise microscópica dos rins perfundidos mostrou presença de material protéico nos glomérulos nos grupos de 10 e 30 μg de veneno, com maior intensidade no grupo de maior concentração. A presença de material protéico nos túbulos surgiu já com o grupo de 3μg aumentando de intensidade com o aumento da concentração do veneno. De acordo com estes resultados podemos afirmar que os achados histopatológicos seguiram lógica dose-dependente. Os resultados histológicos estão nas fotos em anexo.

Tabela 12 - Parâmetros renais após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% albumina bovina (n=6).

Tempo (min)	PP	RVR	FU	RFG
30	118,13 ± 1,39	4,66 ± 0,22	0,18 ± 0,02	0,78 ± 0,10
60	120,35 ± 1,77	4,73 ± 0,22	0,21 ± 0,02	0,76 ± 0,06
90	117,51 ± 1,77	4,99 ± 0,62	0,21 ± 0,02	0,78 ± 0,09
120	113,54 ± 3,03	5,30 ± 0,60	0,20 ± 0,02	0,74 ± 0,07

Dados apresentados por média ± EPM (*p< 0,05).

PP = pressão de perfusão; RVR = resistência vascular renal; FU = fluxo renal; RFG = ritmo de filtração glomerular.

Tabela 13 - Parâmetros renais após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% albumina bovina (n=6).

Tempo (min)	%TNa ⁺	%TK ⁺	%TCl ⁻	%pTNa ⁺	%pTK ⁺	%pTCl ⁻
30	82,53 ± 1,94	71,40 ± 3,05	79,52 ± 1,54	81,03 ± 2,67	69,89 ± 3,56	78,53 ± 1,98
60	82,20 ± 1,62	72,80 ± 3,06	79,21 ± 1,38	79,22 ± 2,58	69,84 ± 3,89	77,19 ± 2,10
90	81,71 ± 1,89	74,41 ± 3,82	78,47 ± 1,97	78,47 ± 2,93	71,17 ± 4,80	76,19 ± 2,60
120	81,30 ± 1,26	74,78 ± 3,84	76,97 ± 1,57	79,24 ± 3,90	72,73 ± 5,99	74,02 ± 2,23

Dados apresentados por média ± EPM (*p< 0,05).

%TNa⁺ = percentual de transporte de sódio; %TK⁺ = percentual de transporte de potássio; %TCl⁻ = percentual de transporte de cloro; %pTNa⁺ = percentual de transporte proximal de sódio; %pTK⁺ = percentual de transporte proximal de potássio; %pTCl⁻ = percentual de transporte proximal de cloro.

Tabela 14 - Parâmetros renais após perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% albumina bovina (n=6).

Tempo (min)	ENa ⁺	EK ⁺	ECl ⁻	Cosm.
30	17,26 ± 1,23	0,91 ± 0,11	19,60 ± 2,60	0,15 ± 0,008
60	18,41 ± 1,18	1,05 ± 0,10	20,05 ± 2,35	0,16 ± 0,02
90	19,45 ± 1,07	0,92 ± 0,08	20,64 ± 2,59	0,16 ± 0,003
120	19,10 ± 1,17	0,91 ± 0,11	22,72 ± 3,96	0,13 ± 0,005

Dados apresentados por média ± EPM (*p< 0,05).

ENa⁺ = sódio excretado; EK⁺ = potássio excretado; ECl⁻ = cloro excretado; Cosm = clearance osmótico.

Tabela 15 - Avaliação da pressão de perfusão (PP) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	118,13 ± 1,18	110,55 ± 0,89	110,70 ± 3,51	109,51 ± 4,17
60	120,35 ± 0,44	90,38 ± 7,70	93,64 ± 4,80	79,29 ± 16,04
90	117,51 ± 0,50	65,99 ± 2,10 (*)	78,31 ± 2,60 (* b)	58,90 ± 1,44 (* c)
120	113,54 ± 0,72	63,47 ± 0,70 (*)	61,92 ± 3,08 (*)	46,23 ± 2,70 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

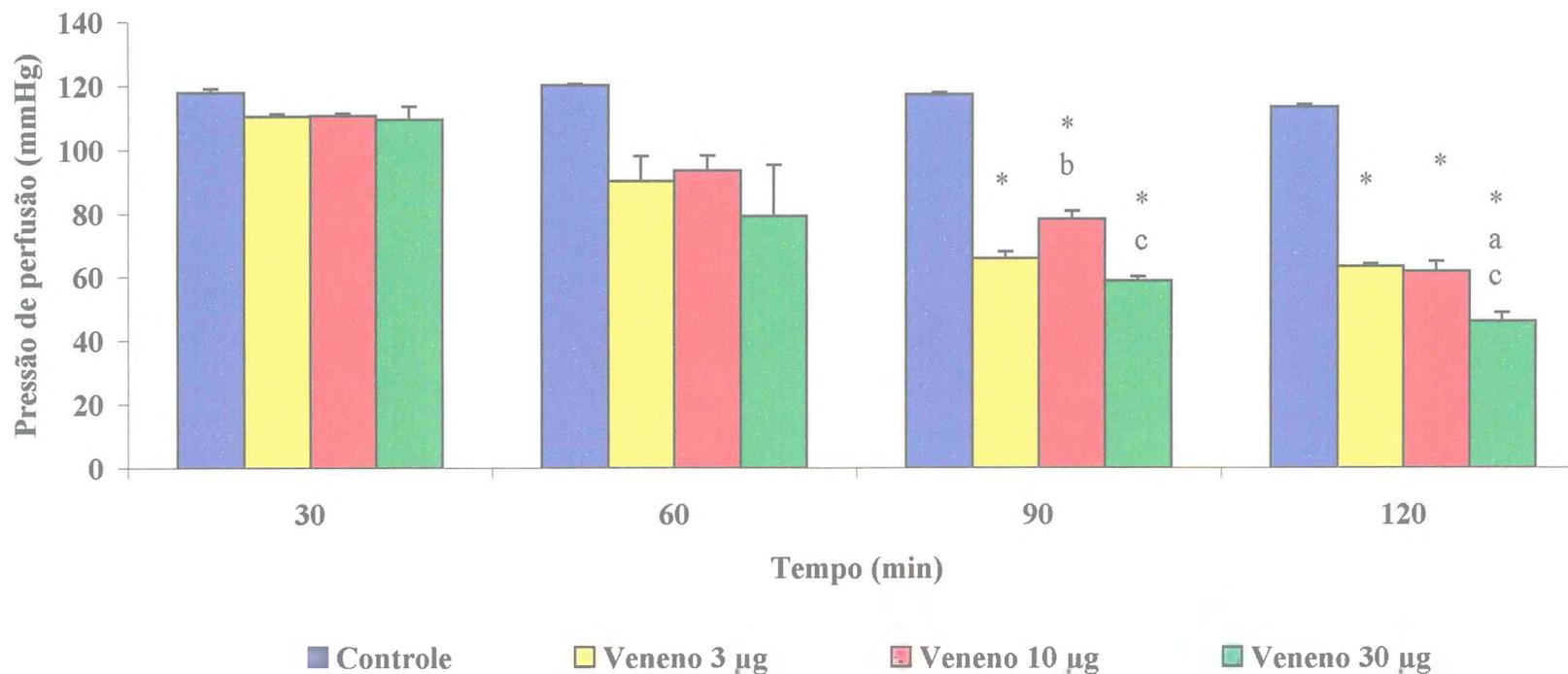
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 30 - Pressão de perfusão (mmHg) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg; b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg; c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg.

Tabela 16 - Avaliação da resistência vascular renal (RVR) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	4,66 ± 0,057	4,86 ± 0,063	4,33 ± 0,03	4,52 ± 0,17
60	4,73 ± 0,028	3,90 ± 0,32	3,66 ± 0,18	3,23 ± 0,66
90	4,99 ± 0,28	2,88 ± 0,09 (*)	3,04 ± 0,12 (*)	2,33 ± 0,05 (*)
120	5,30 ± 0,07	2,76 ± 0,02 (*)	2,30 ± 0,11 (* b)	1,84 ± 0,10 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

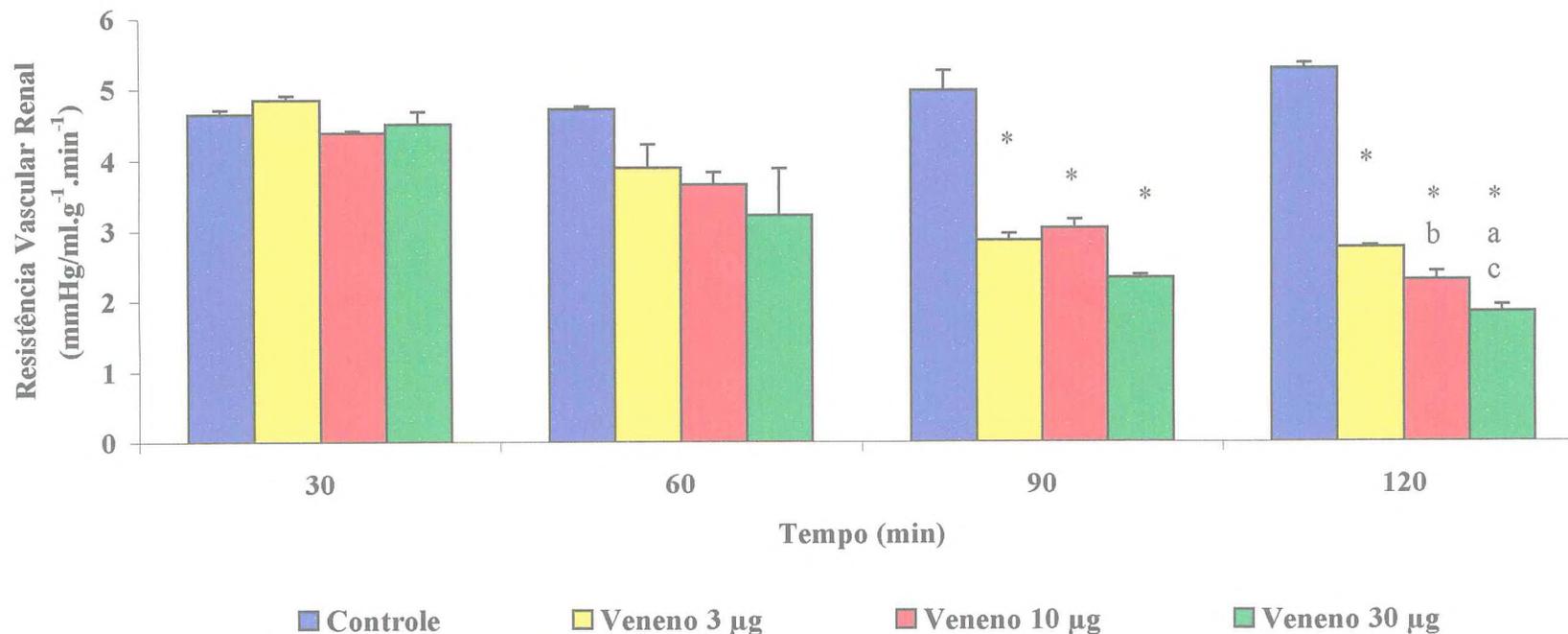
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 31 - Resistência vascular renal ($\text{mmHg/ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de $3\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g/ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$; b = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$; c = diferença estatística entre grupos de $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$.

Tabela 17 - Avaliação do fluxo urinário (FU) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	0,17 ± 0,013	0,22 ± 0,01	0,17 ± 0,008	0,18 ± 0,03
60	0,20 ± 0,008	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,05	0,07 ± 0,03
90	0,21 ± 0,0	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,37 ± 0,12 (a)
120	0,20 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,37 ± 0,04 (* b)	0,81 ± 0,04 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

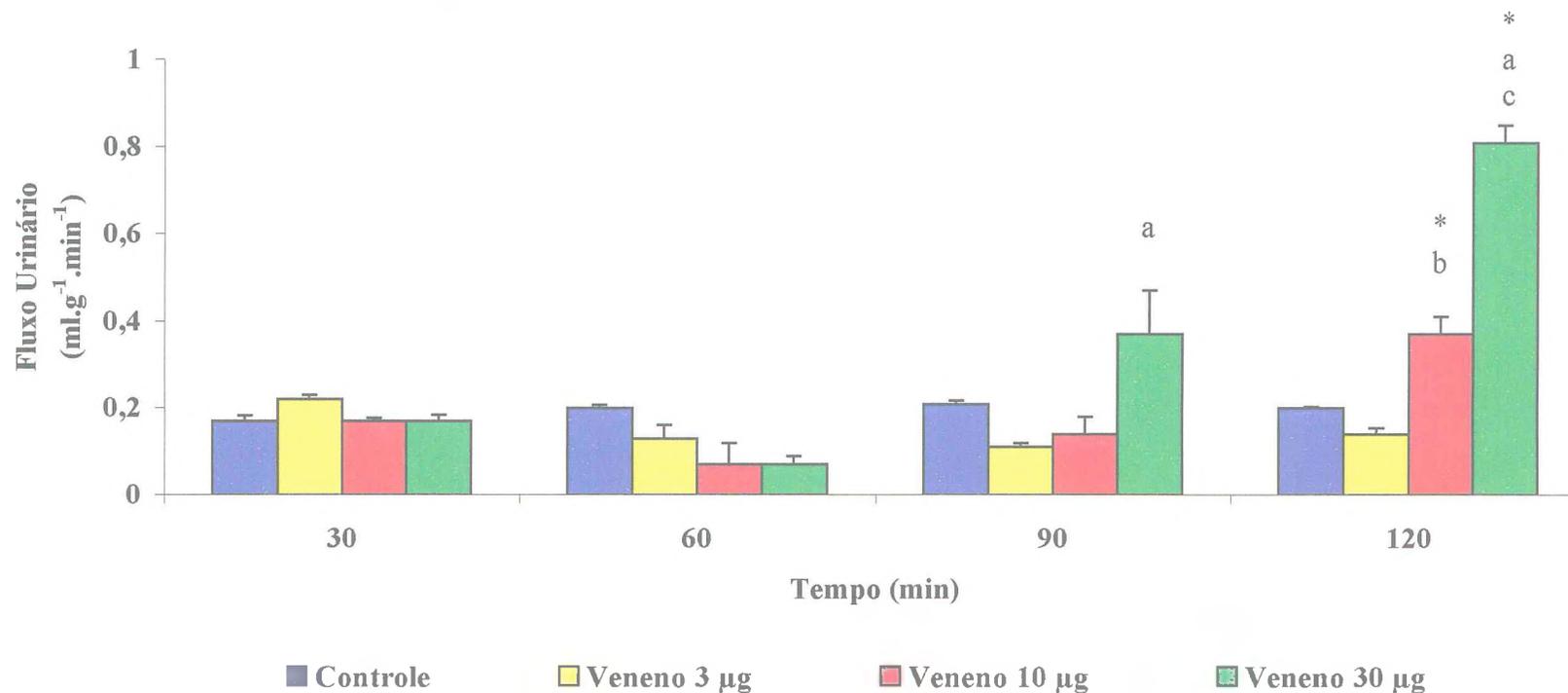
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 32 - Fluxo urinário ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de $3\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g/ml}$



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$; b = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$; c = diferença estatística entre grupos de $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$.

Tabela 18 - Avaliação do ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	0,78 ± 0,040	1,28 ± 0,096	1,05 ± 0,126	1,10 ± 0,072
60	0,75 ± 0,008	0,63 ± 0,163	0,25 ± 0,182 (*)	0,23 ± 0,131 (*)
90	0,78 ± 0,049	0,46 ± 0,023	0,39 ± 0,101	0,99 ± 0,226
120	0,74 ± 0,020	0,52 ± 0,065	0,83 ± 0,095	1,98 ± 0,057 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

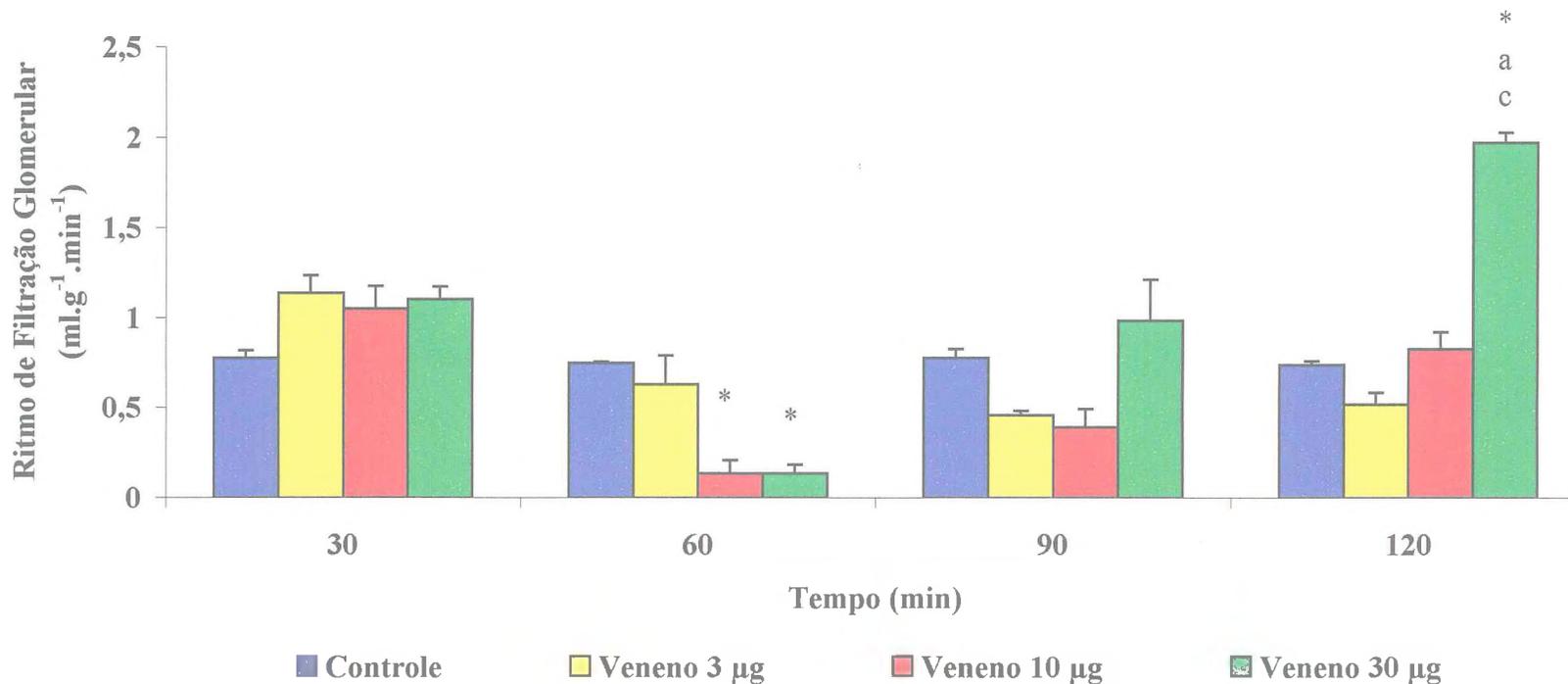
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 33 - Ritmo de filtração glomerular ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de $3\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g/ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$; c = diferença estatística entre grupos de $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$.

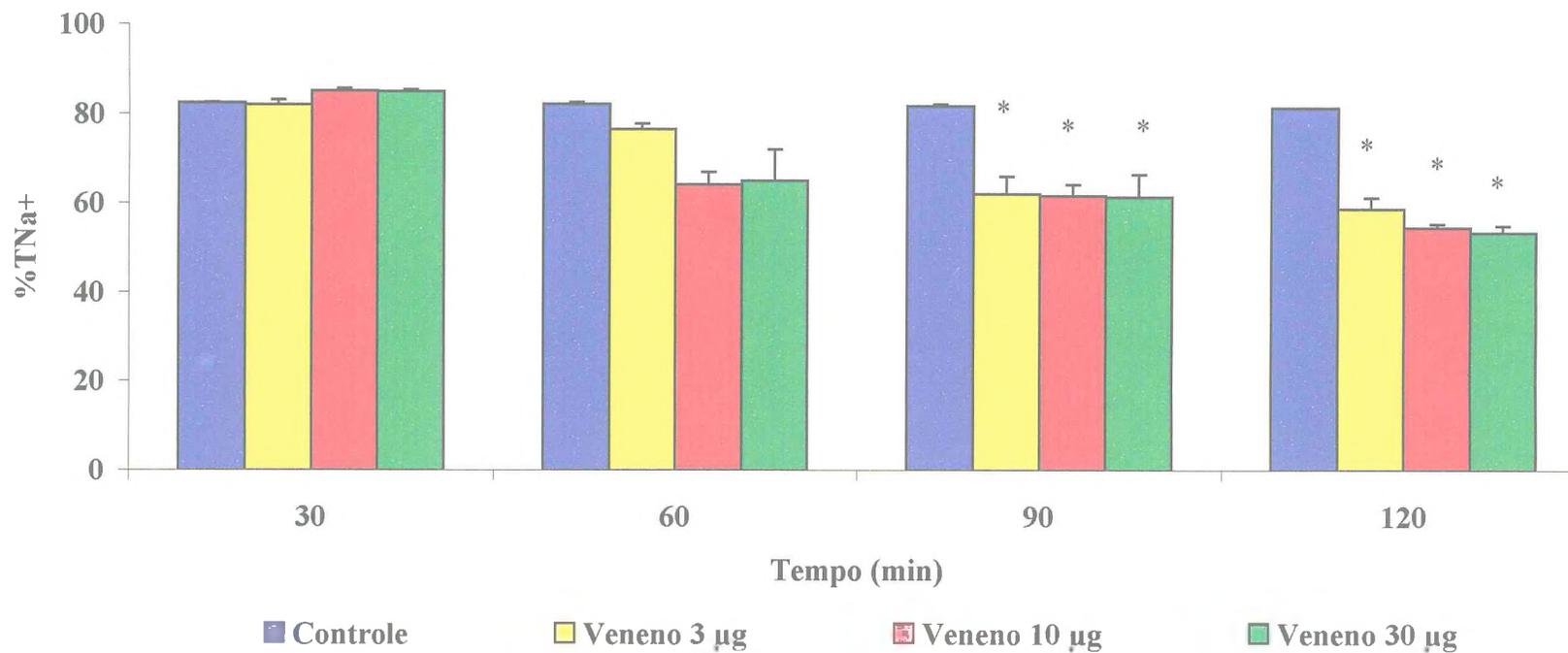
Tabela 19 - Avaliação percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	82,53 ± 0,10	82,13 ± 1,0	85,09 ± 0,53	85,03 ± 0,48
60	82,20 ± 0,46	76,58 ± 1,31	64,20 ± 2,81	65,06 ± 6,99
90	81,71 ± 0,55	62,20 ± 3,84 (*)	61,70 ± 2,50 (*)	61,49 ± 5,0 (*)
120	81,30 ± 0,03	58,79 ± 2,49 (*)	54,49 ± 0,95 (*)	53,41 ± 1,62 (*)

Dados apresentados por média ± EPM (* p< 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

Figura 34 - Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg.



Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado.

Tabela 20 - Avaliação percentual de transporte de potássio (%TK⁺) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	71,40 ± 0,46	73,90 ± 1,24	72,34 ± 2,47	62,05 ± 2,97
60	72,80 ± 0,91	70,79 ± 0,56	51,37 ± 1,96 (* b)	50,09 ± 6,61 (* a)
90	74,41 ± 0,97	61,17 ± 3,35	61,07 ± 2,70	60,59 ± 5,14
120	74,78 ± 0,14	58,73 ± 2,45 (*)	53,13 ± 0,86 (*)	52,14 ± 1,89 (*)

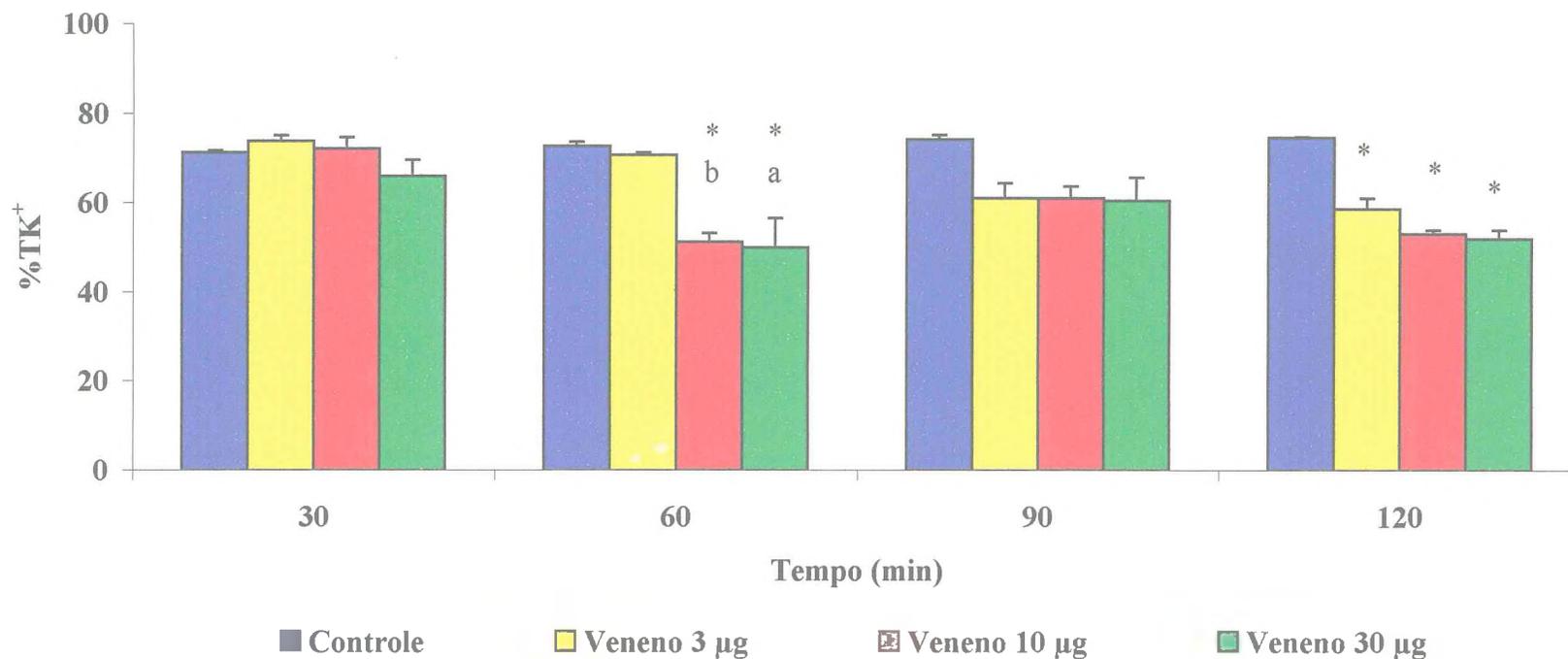
Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

Figura 35 - Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg; b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg.

Tabela 21 - Avaliação percentual de transporte de cloro (%TCl) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	79,52 ± 0,18	79,54 ± 1,58	81,24 ± 1,05	82,91 ± 0,60
60	79,21 ± 0,54	72,87 ± 1,70	58,58 ± 3,82	60,35 ± 7,90
90	78,47 ± 0,81	62,62 ± 2,90 (*)	61,02 ± 2,10 (*)	59,96 ± 4,85 (*)
120	77,10 ± 0,29	61,29 ± 2,90 (*)	52,26 ± 1,0 (* b)	49,45 ± 1,40 (* a)

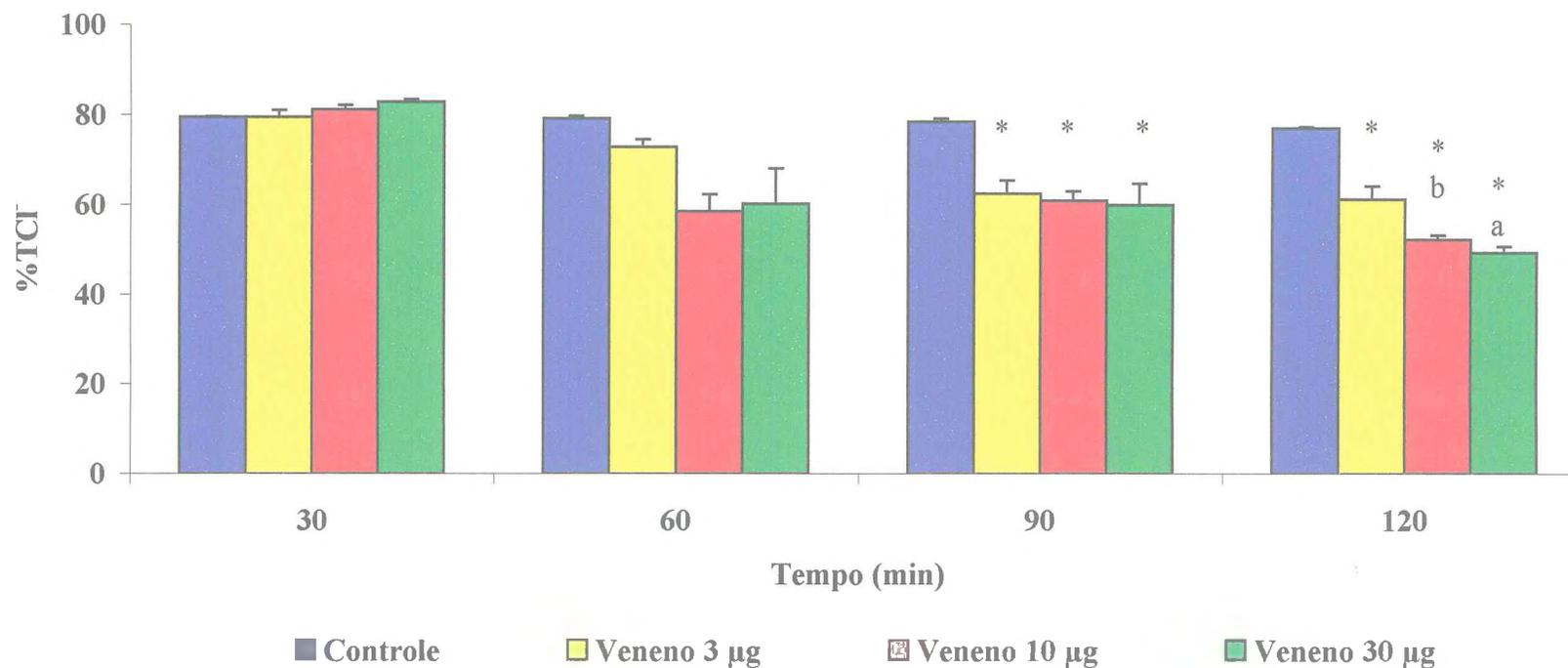
Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

Figura 36 - percentual de transporte tubular de cloro (%TCl) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg; b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg.

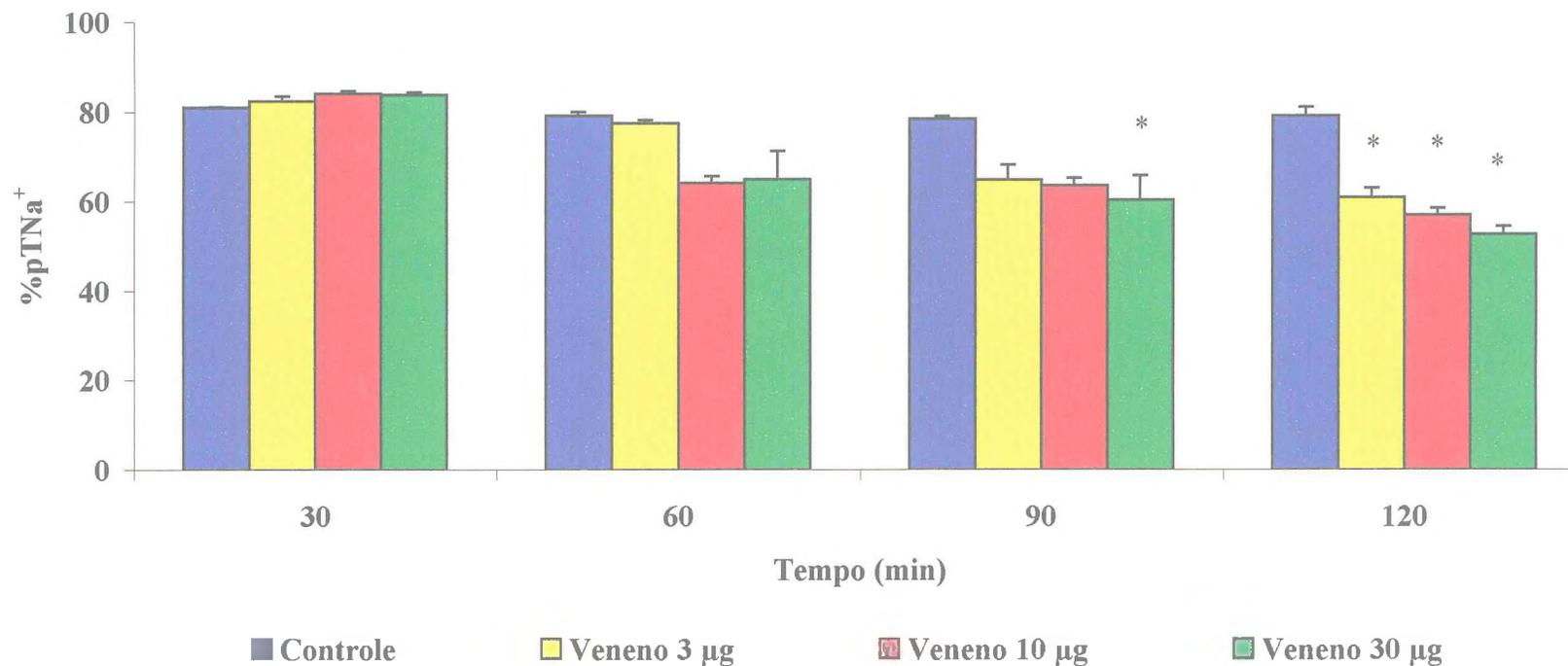
Tabela 22 - Avaliação percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	81,03 ± 0,24	82,54 ± 1,12	84,20 ± 0,53	83,85 ± 0,48
60	79,22 ± 0,85	77,48 ± 0,80	64,28 ± 1,49	65,14 ± 6,30
90	78,47 ± 0,62	64,92 ± 3,40	63,66 ± 1,68	60,41 ± 5,50 (*)
120	79,24 ± 1,95	61,02 ± 2,05 (*)	57,14 ± 1,47 (*)	52,69 ± 1,85 (*)

Dados apresentados por média ± EPM (* p< 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

Figura 37 - percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado.

Tabela 23 -Avaliação percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	69,89 ± 0,24	74,31 ± 1,0	71,44 ± 2,40	60,87 ± 2,99
60	69,84 ± 1,32	71,68 ± 0,74	51,46 ± 2,70 (b)	50,17 ± 7,30 (* a)
90	71,17 ± 0,97	63,91 ± 2,90	63,02 ± 1,99	59,52 ± 5,70
120	72,73 ± 1,87	60,96 ± 1,98 (*)	55,79 ± 1,38 (*)	51,41 ± 2,11 (* a)

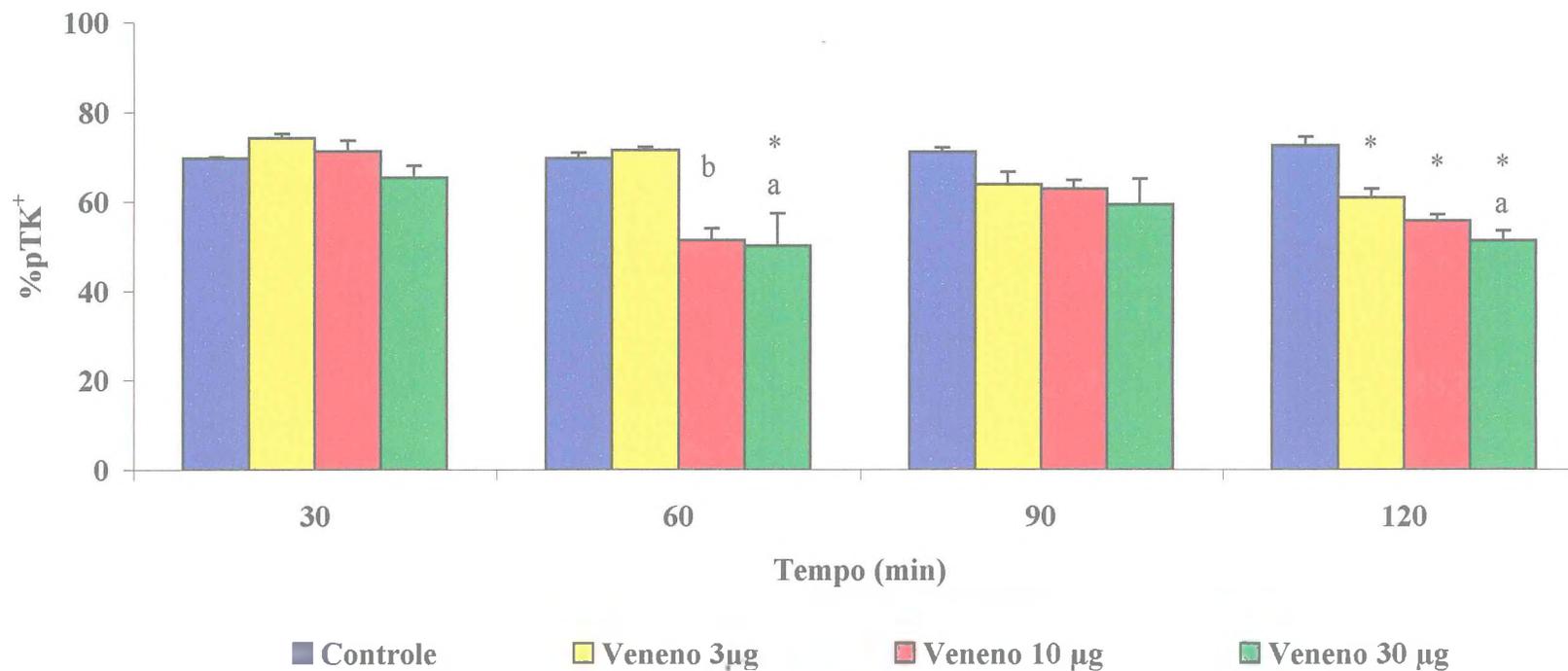
Dados apresentados por média ± EPM (p< 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

Figura 38 - Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média ± EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg; b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg.

Tabela 24 - Avaliação percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	78,53 ± 0,42	79,94 ± 1,64	80,35 ± 1,0	81,74 ± 0,55
60	77,19 ± 0,93	73,76 ± 1,46	58,66 ± 2,60	60,42 ± 7,29
90	76,19 ± 1,01	65,36 ± 2,57	62,98 ± 1,48	58,89 ± 5,42 (*)
120	74,02 ± 0,17	63,52 ± 2,26 (*)	54,91 ± 1,56 (* b)	48,72 ± 1,62 (* a)

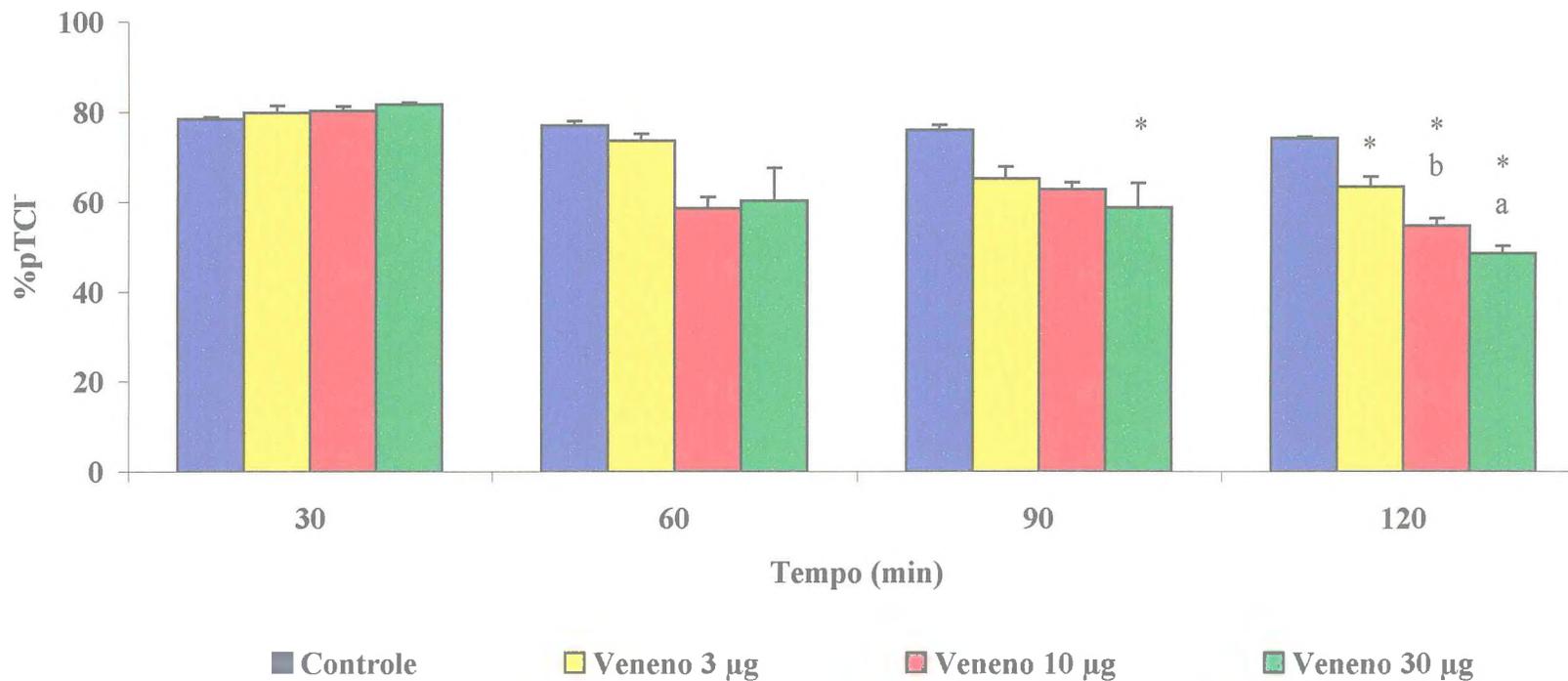
Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

Figura 39 - percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3µg, 10µg e 30µg/ml.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg; b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg.

Tabela 25 - Avaliação sódio excretado (ENa⁺) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	21,86 ± 1,15	26,61 ± 1,57	23,62 ± 1,0	22,89 ± 0,53
60	23,75 ± 0,77	15,25 ± 4,40	10,34 ± 7,10	8,81 ± 3,2
90	24,5 ± 0,27	14,07 ± 0,75	20,08 ± 5,93	51,58 ± 13,70 (a)
120	19,4 ± 0,75	18,11 ± 1,96	52,42 ± 6,0 (* b)	114,35 ± 7,10 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p < 0,05).

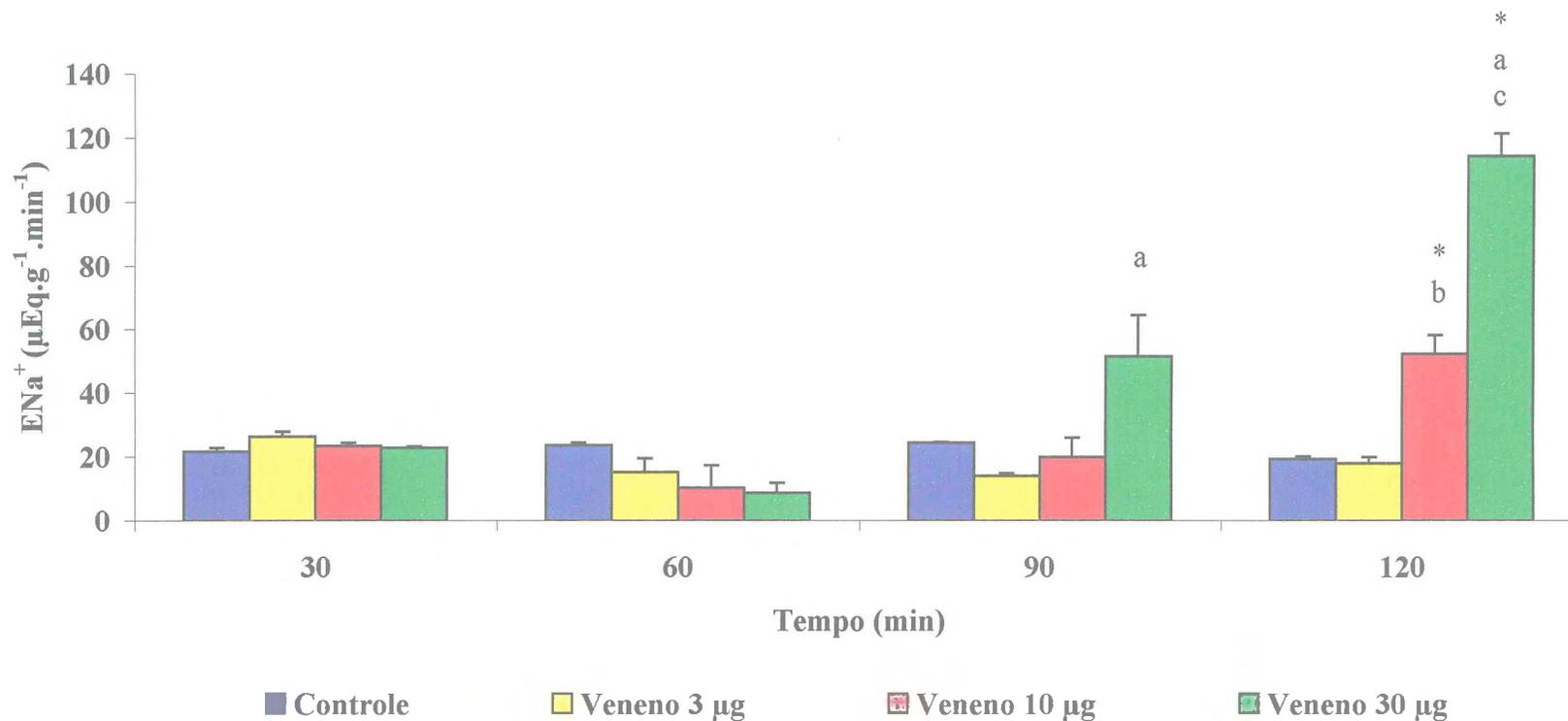
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 40 - Sódio excretado = ENa^+ ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3 μg , 10 μg e 30 $\mu\text{g/ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 30 μg ; b = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 10 μg ; c = diferença estatística entre grupos de 10 μg e 30 μg .

Tabela 26 - Avaliação potássio excretado (EK^+) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 μg)	Veneno (10 μg)	Veneno (30 μg)
30	1,28 \pm 0,018	1,36 \pm 0,069	1,31 \pm 0,029	1,28 \pm 0,03
60	1,35 \pm 0,03	0,78 \pm 0,22	0,50 \pm 0,37	0,62 \pm 0,4
90	1,16 \pm 0,008	0,59 \pm 0,02	0,71 \pm 0,21	1,85 \pm 0,48
120	0,98 \pm 0,04	0,74 \pm 0,08	1,84 \pm 0,20 (* b)	4,16 \pm 0,26 (* a c)

Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$).

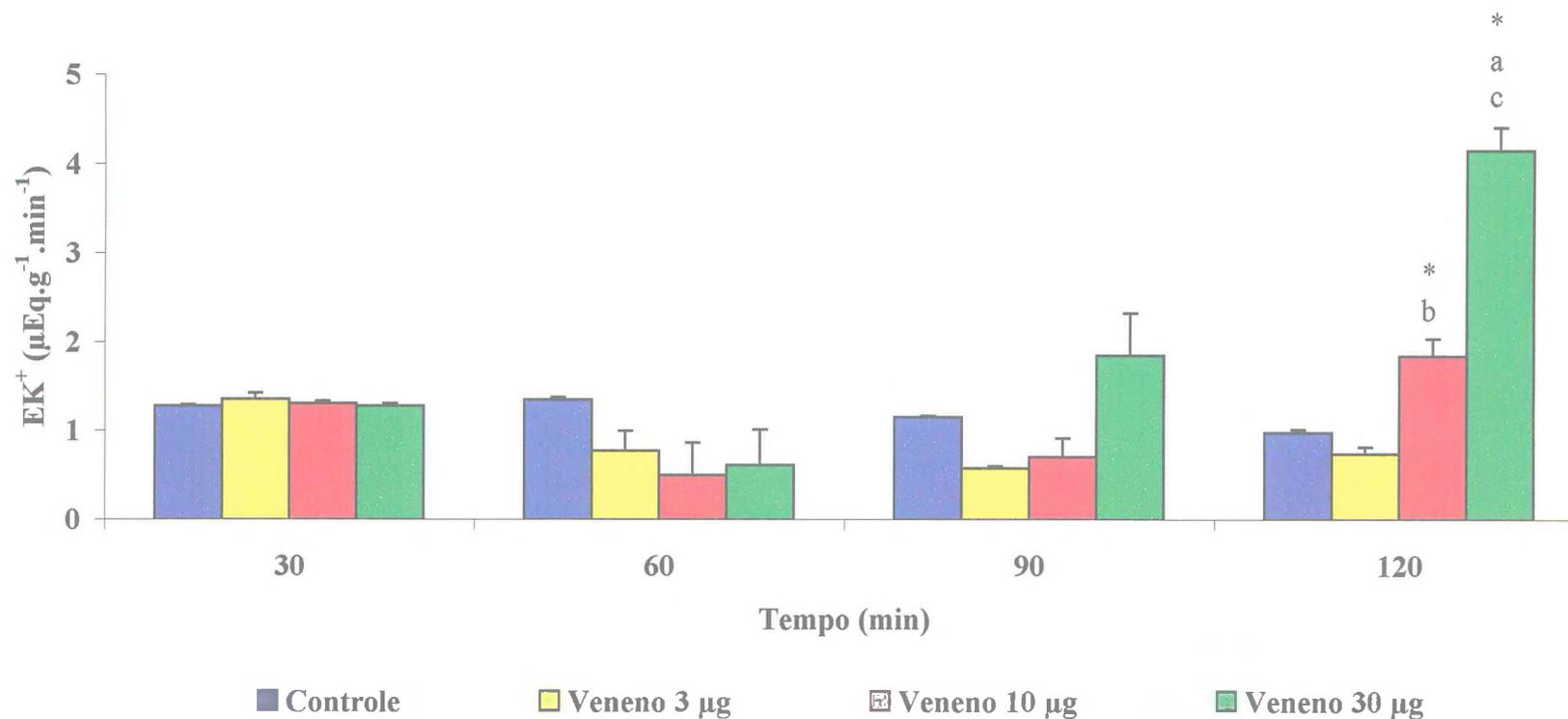
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 30 μg

b = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 10 μg

c = diferença estatística entre grupos de 10 μg e 30 μg

Figura 41 - Potássio excretado = EK^+ ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3 μg , 10 μg e 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 30 μg ; b = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 10 μg ; c = diferença estatística entre grupos de 10 μg e 30 μg

Tabela 27 - Avaliação cloro excretado (ECI) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/ml.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 µg)	Veneno (10 µg)	Veneno (30 µg)
30	19,60 ± 1,72	23,99 ± 1,27	23,36 ± 1,18	24,57 ± 0,83
60	20,05 ± 1,39	13,00 ± 4,24	9,91 ± 6,7	8,93 ± 3,68
90	20,64 ± 2,14	9,34 ± 0,41	17,27 ± 4,98	46,23 ± 11,40
120	22,72 ± 1,52	13,32 ± 1,65	46,35 ± 5,03 (* b)	104,37 ± 5,93 (* a c)

Dados apresentados por média ± EPM (p< 0,05).

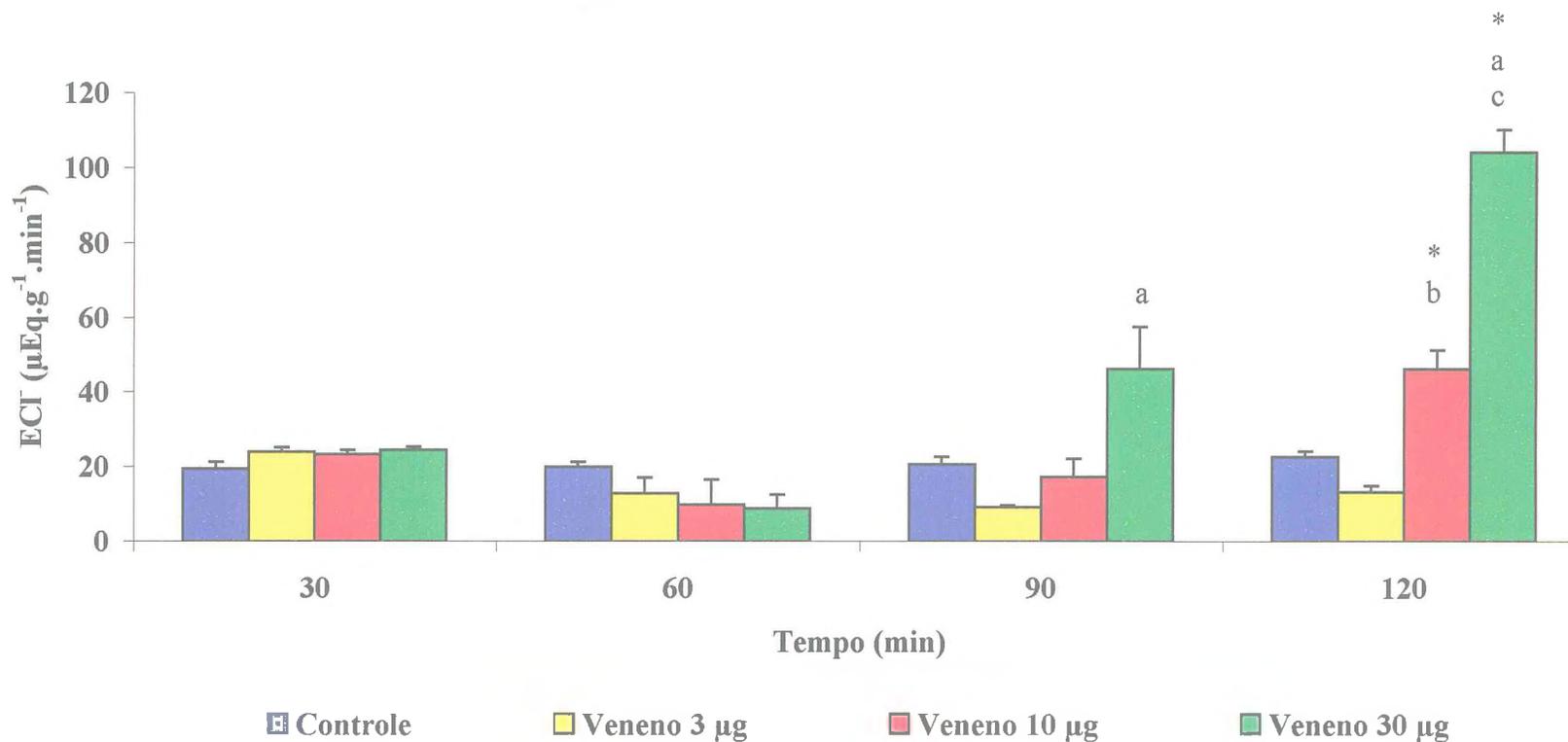
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3µg e 30µg

b = diferença estatística entre grupos de 3µg e 10µg

c = diferença estatística entre grupos de 10µg e 30µg

Figura 42 - Cloro excretado = ECL^- ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de $3\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g/ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$; b = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$; c = diferença estatística entre grupos de $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$.

Tabela 28 - Avaliação do Clearance osmótico (C_{osm}) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$.

Tempo (min)	Controle	Veneno (3 μg)	Veneno (10 μg)	Veneno (30 μg)
30	0,15 \pm 0,008	0,16 \pm 0,003	0,17 \pm 0,01	0,17 \pm 0,005
60	0,16 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,07 \pm 0,05	0,07 \pm 0,03
90	0,16 \pm 0,003	0,11 \pm 0,007	0,17 \pm 0,05	0,36 \pm 0,08
120	0,13 \pm 0,0057	0,15 \pm 0,018	0,39 \pm 0,05 (* b)	0,79 \pm 0,05 (* a c)

Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$).

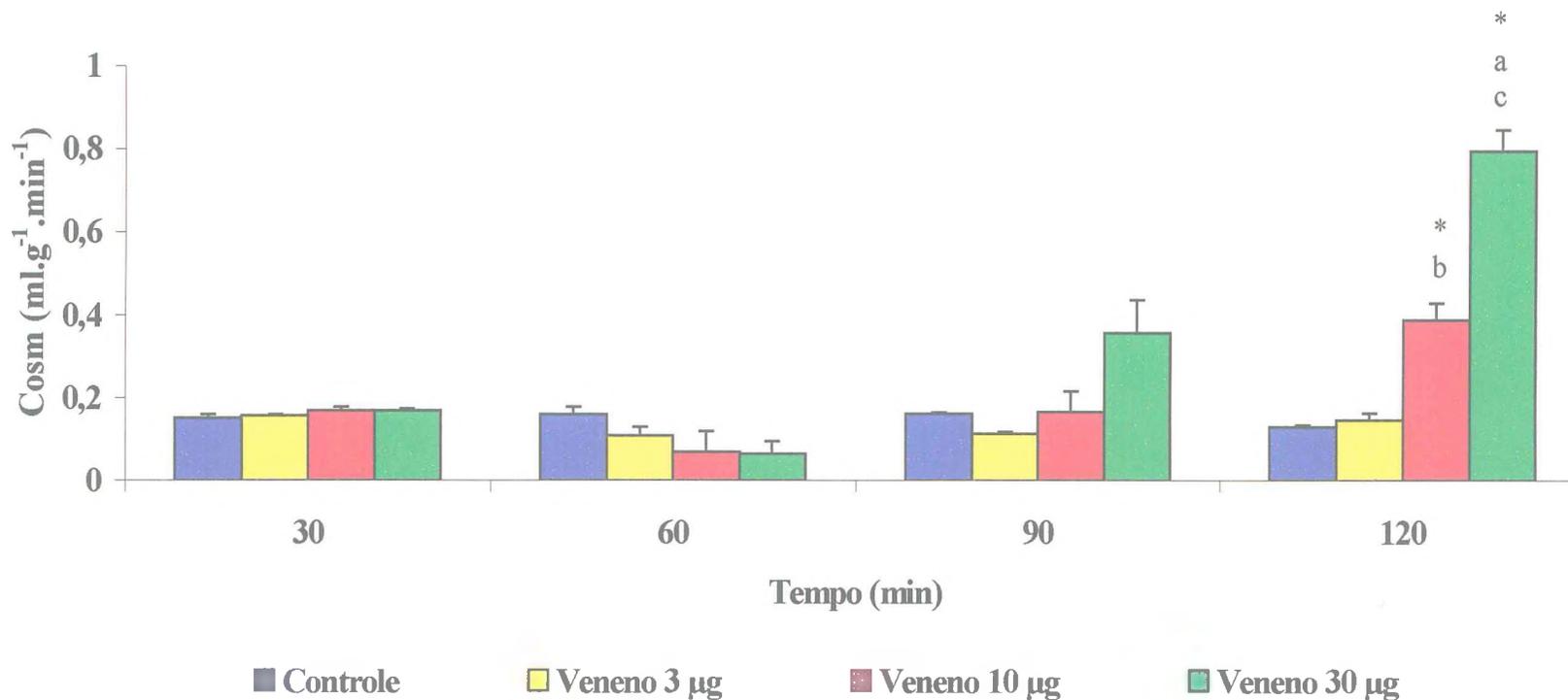
* = diferença estatística entre grupos controle e tratados

a = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 30 μg

b = diferença estatística entre grupos de 3 μg e 10 μg

c = diferença estatística entre grupos de 10 μg e 30 μg

Figura 43 - Clearance osmótico – Cosm ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno de *Bothrops jararacussu* nas concentrações de $3\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g/ml}$.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatística entre grupos controle e tratado; a = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$; b = diferença estatística entre grupos de $3\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$; c = diferença estatística entre grupos de $10\mu\text{g}$ e $30\mu\text{g}$.

Discussão

Inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de buscar um método ideal para a padronização da potência tóxica dos venenos ofídicos. Muitas variáveis interferiam nos modelos. Inicialmente a variável animal experimental foi resolvida com o uso de camundongos, substituindo pombos. Os primeiros apresentavam melhores condições à criação e melhores resultados diante da falta de reprodutibilidade dos testes com pombos (Furlanetto et al., 1973).

Outra variável que interferiu na determinação da DL50 dos venenos de serpentes foi a via de administração. Enquanto a via endovenosa causava mortes, após 10 minutos da aplicação, impossibilitando o cálculo, a via subcutânea resultava em valores de toxicidade muito baixos e amplas variações dos valores (Schöttler, 1954 e 1955/56). Este problema foi resolvido quando Silles-Villarreal et al. em 1978/79 demonstrou a eficiência do emprego da via intraperitoneal em camundongos para a titulação da toxicidade dos venenos.

No nosso trabalho, usamos para a determinação da DL50 a aplicação intraperitoneal, mas escolhemos ratos Wistar como animais experimentais. Essa decisão foi tomada em virtude da utilização desta espécie em todas as outras metodologias que se seguiriam após a determinação da DL50. Esperávamos com isso diminuir erros dependentes da variabilidade interespecífica.

Variações quantitativas e qualitativas dos componentes dos venenos ocorrem em serpentes do mesmo gênero, porém oriundas de regiões geográficas diferentes. (Glen et al., 1983; Aragón e Gubensek, 1981). De acordo com Taylor (1940),

fatores climáticos, sazonais, alimentares, sexuais e genéticos influenciam na composição da excreção glandular dos venenos.

Constatamos em diversos trabalhos (Siles-Villaruel et al., 1978/79; Perrone et al., 1989; Furtado et al., 1991; Dos-Santos et al., 1992) diferentes valores da DL50 para o veneno de *Bothrops jararacussu*. Todos utilizaram a via intraperitoneal e camundongos como animais experimentais, e, na sua grande maioria, a metodologia dos probitos. Diante de tais afirmativas, nos propusemos a determinar a DL50 do veneno por nós adquirido e a usar o mesmo animal em todos os experimentos.

Durante os procedimentos para a obtenção da DL50 constatamos, na primeira hora de observação, além da hipocinesia uma ptose palpebral bilateral. Após 24 horas, quando não vinham a óbito, estes sinais clínicos desapareciam. A ptose palpebral nos chamou atenção principalmente por ser este um sinal comum aos envenenamentos com cascavéis, veneno tipicamente neurotóxico e miotóxico (Soerensen, 1990).

Schöttler em 1955/56 analisou aplicações parenterais em camundongos por diversos venenos ofídicos, e relatou que após a administração por via subcutânea do veneno de *Bothrops jararacussu*, 10% dos animais sobreviventes apresentaram um quadro de exoftalmia. Este processo após 24 horas apresentava grandes proporções. Em alguns dias, o globo ocular estava necrosado e ainda foi observado hiperemia do nervo óptico. A dose utilizada quando do surgimento destes sinais não foi relatada.

Apesar de nenhum animal por nós manipulado ter apresentado sinais de exoftalmia em 24 horas após a aplicação do veneno em questão, a ptose palpebral poderia ser um indício importante de ação miotóxica. Sugerimos que esta ação presente no envenenamento crotálico (Soerensen, 1990), assim como no envenenamento por *B.*

jararacussu (Homsí-Brandeburgo et al., 1988) tenha causado o quadro de exoftalmia seguida de necrose, e que a ptose palpebral poderia ser um indício do surgimento desta exoftalmia.

A DL50 obtida em nosso trabalho foi de $9,5 \pm 0,44\text{mg/kg}$. Este valor corresponde a uma baixa toxicidade quando comparada com outros venenos ofídicos. Esta afirmativa pode ser assegurada a partir dos relatos feitos por Dos Santos et al. (1992), quando mostraram que o veneno de *B. jararacussu* era um imunógeno fraco. Furtado et al. (1991), estudando a ação das atividades bioquímicas e farmacológicas de sete venenos botrópicos e um veneno crotálico, observou que o veneno de *B. jararacussu* apresentava baixas quantidades de proteína por miligrama de veneno, reduzida atividade caseinolítica, e ainda alta dose mínima coagulante sobre fibrinogênio (menor quantidade de veneno que coagula uma solução de fibrinogênio bovino com 2g/litro); e uma alta dose mínima hemorrágica (menor quantidade de veneno, em μg , que, quando injetado intradérmico produz uma lesão hemorrágica de 10mm de diâmetro após 24 horas da aplicação), necrosante (menor quantidade de veneno, em μg , que, quando injetado intradérmico produz após 3 dias uma lesão necrosante característica) e edematogênica (menor quantidade de veneno que induz 30% do aumento máximo da espessura da pata injetada), quando comparadas aos outros sete venenos.

Sanchez et al. (1992) calculando a DL50 em aplicação endovenosa observou que o veneno de jararacuçu foi tão tóxico quanto os venenos crotálicos, também administrados pela mesma via. É muito diferente dos resultados obtidos para os outros venenos botrópicos. Porém este trabalho não sugeriu nenhuma hipótese diante do fato observado. Poderíamos sugerir com este fato a hipótese da presença de um componente

específico do veneno de jararacuçu, que não esteja presente nos outros venenos botrópicos, e que estaria proporcionando um efeito diferencial quando aplicado por via endovenosa.

Em análise microscópica, observamos congestão nos rins, pulmões, cérebro, coração, baço e fígado, ou seja, todos os tecidos coletados. No cérebro e fígado este quadro foi preponderante em todas as doses sem contudo apresentarem qualquer outra alteração.

Cotran et al. (1991a) definiram congestão ou hiperemia passiva como resultado de um distúrbio da drenagem venosa, que, na forma de processo localizado, ocorre quando o retorno venoso de uma extremidade é obstruído. Afirma ainda que a congestão das redes capilares está intimamente ligada com o desenvolvimento de edema. Schöttler (1951), estudando a toxicidade de diversos venenos de serpentes sul americanas através de achados *post mortem*, afirmou que os venenos botrópicos provocavam inicialmente congestão, que evoluía para o quadro de isquemia. Nada afirmou, porém, sobre o tempo decorrente entre os dois achados.

O processo congestivo nos nossos experimentos foi amplamente distribuído em diversos órgãos. Por conta de sua definição, “distúrbio da drenagem venosa possivelmente por obstrução dos vasos”, sugerimos que este processo congestivo foi oriundo de uma coagulação intravascular disseminada. Esta última se desenvolve pela ativação dos fatores da coagulação, promovendo consumo de fibrinogênio e conseqüente formação de coágulo de fibrina. A formação dos microtrombos pode provocar isquemia generalizada e morte.

O distúrbio de coagulação encontrado nos envenenamentos ofídicos botrópicos se desenvolve justamente pela presença de enzimas que ativam os fatores de coagulação, como a trombina-símile, que age diretamente sobre o fibrinogênio transformando-o em fibrina, com estrutura bastante instável. Este processo acaba gerando um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo excessivo de fatores coagulativos (França e Fan, 1992). Já foram fracionados do veneno de *Bothrops jararacussu* duas enzimas do tipo trombina (Zaganelli et al., 1996; Andrião-Escarso et al., 1997).

Os baços, além da congestão, apresentaram hiperplasia de polpa branca. Amorim et al. (1951) descreveram uma hiperplasia da polpa esplênica em envenenamento experimental por *Bothrops jararaca*.

Thomson (1983) definiu hiperplasia como um “aumento no número de células num tecido ou órgão”. Este aumento no número de células poderia ocorrer numa área localizada dentro de um órgão, e resultar num nódulo hiperplásico. Sua ocorrência não tem explicação conhecida. Foi relatada em baços e pâncreas de cães idosos.

Cotran et al. (1991b), descreveram o quadro de hiperplasia reativa do baço, que foi associada às alterações esplênicas encontradas em estados inflamatórios crônicos, antigenemia sistêmica, condições imunológico-inflamatórias, viremias e rejeições crônicas de enxerto.

O quadro de hiperplasia de polpa branca descrito, possivelmente deve estar relacionado ao quadro descrito por Cotran et al. (1991b), que correlaciona as alterações encontradas com processos inflamatórios. Este processo decorre, talvez, da reação do organismo aos componentes antigênicos dos venenos. Sano-Martins et al. (1995), trabalhando com veneno de *Bothrops jararaca*, demonstrou intensas alterações

hematológicas, como aumento do número de leucócitos, especialmente neutrófilos, indicando quadro inflamatório. Nossos achados de exudação granulocitária nos rins e pulmão reforçam tais afirmativas.

O edema intersticial observado nos rins pode ser explicado por duas ações presentes nos venenops botrópicos. Uma delas seria a ação coagulante já descrita, que promove a formação de microtrombos, diminuindo o fluxo sanguíneo. A estase sanguínea associada com o aumento da permeabilidade, causada pela liberação de substâncias vasoativas, como histamina e bradicinina, promoveriam o edema.

Presenciamos, nos rins, cilindros proteicos e tumefação turva dos túbulos. Tais achados são coerentes com as observações de Amorim et al. (1951) após envenenamento experimental com *Bothrops jararaca*, num diagnóstico de nefrose granulo-albuminóide.

Nos nossos experimentos observamos destruição da musculatura cardíaca e o quadro de broncopneumonia em apenas dois animais distintos. O indício de destruição miocárdica poderia estar relacionado à atividade miotóxica presente neste veneno (Moura da Silva et al., 1990).

Diante do quadro geral observado, podemos sugerir que o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* provocou coagulação intravascular disseminada associado a processo inflamatório e nefrose.

Alterações hematológicas causadas por animais venenosos têm sido investigadas desde tempos remotos (Zingali et al., 1990). Estas alterações são causadas por uma atividade hemolítica presente nos envenenamentos por serpentes do gênero

botrópico e crotálico, o qual pode ser explicado por consumo de fibrinogênio, e, conseqüentemente, interrupção do processo coagulativo.

Durante a coleta de sangue notamos um intenso extravasamento, no peritônio, de líquido avermelhado e lesões escurecidas no local da aplicação. Na manipulação dos animais observamos ainda, em alguns casos, a presença de urina escurecida. Os animais sobreviventes do grupo de 24 horas, quando sacrificados para coleta de material para futuras análises histopatológicas, não demonstraram os sinais acima descritos. Isto pode sugerir uma recuperação do quadro gerado pela aplicação do veneno. Contudo, Barraviera (1991) descreveu que as serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops neuwiedi* raramente causam hemorragia sistêmica.

Em nossos resultados observamos intensa redução no número de eritrócitos a partir de 6 horas após a inoculação experimental do veneno de *Bothrops jararacussu*. Hemorragias severas ao redor do local da picada são características do envenenamento viperídeo (Soto et al., 1988). Atividade proteolítica é comumente associada com os fatores hemorrágicos (Hagihara et al., 1985). Entretanto, proteínas hemorrágicas livres de atividade proteolítica já foram descritas (Ohsaka et al., 1960; Ovadia, 1978). Esta redução do número de eritrócitos pode estar associada com uma atividade hemolítica, uma característica comum às serpentes brasileiras (Cadillo et al., 1991), ou ainda em decorrência da ação de proteínas hemorrágicas (Kamiguti e Cardoso, 1989).

Atualmente, existem dois mecanismos descritos para o quadro de hemólise provocado por venenos ofídicos. O mecanismo de hemólise direta é mediado por um componente específico dos venenos, o fator lítico direto. O outro mecanismo é chamado hemólise indireta, quando uma fosfolipase A₂ converte a lecitina em lisolecitina. Este

agente vasoativo seria o responsável pela hemólise. Os dois mecanismos degradam a membrana do eritrócito e causam a liberação de hemoglobina (Cadillo et al., 1991). Em nossos experimentos a concentração de hemoglobina reduziu apenas no grupo de 12 horas. Possivelmente, se houvesse um quadro hemolítico provocado pelo envenenamento por *Bothrops jararacussu* redução seria mais intensa. Em contribuição a este achado, os valores do hematócrito contrastam com a leve diminuição da concentração de hemoglobina quando reduziram nos grupos de 12 e 24 horas. Contudo, os valores corpusculares médios aumentaram. Se estivesse realmente ocorrendo uma atividade hemolítica, os valores corpusculares médios deveriam estar diminuindo e não aumentando.

De acordo com Ohsaka (1979), metaloproteases conhecidas por hemorraginas causam sangramento por ação direta no endotélio vascular. O mecanismo de ação destas proteínas foi esclarecido após fracionamento. As hemorraginas agem inicialmente na permeabilidade vascular, causando simultaneamente a liberação de eritrócitos e albumina. Em seguida, causam dano nas paredes dos vasos (Kamiguti e Cardoso, 1989).

Após o fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*, Homsibrandeburgo et al. (1988) descreveram que este veneno apresenta uma atividade fosfolipásica A₂, assim como uma atividade coagulante, proteolítica e mionecrótica. Contudo, nenhuma das frações apresentou atividade hemorrágica, a qual poderia estar causando as lesões descritas acima. Mandelbaum et al. (1976, 1982, 1984), descreveram que as frações do veneno de *B. jararacussu* diferem substancialmente dos componentes isolados de outras serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*, como os encontrados nos

venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi*. Estes últimos causam mionecrose após massiva hemorragia intramuscular (Queiroz et al., 1984). Quando esta mionecrose ocorre após a ação dos fatores hemorrágicos, ela é secundária à ruptura da microcirculação local (Ownby et al., 1978). Assegurando tais fatos, Queiroz et al. (1985), estudando a ação mionecrótica do veneno de *B. jararacussu*, demonstraram que além da necrose muscular, este veneno causa trombose e necrose das artérias intramusculares.

Todas estas evidências sugerem que a redução do número de eritrócitos deve ser causada por efeito miotóxico, o qual poderia estar provocando destruição de tecido muscular e endotélio, promovendo o extravasamento sanguíneo encontrado em nossas observações clínicas.

O número de plaquetas diminuiu já com 2 horas da inoculação experimental, e persistiu até 24 horas. Além disso, não estavam agregadas, porém apresentavam intensa anisocitose. Iuan et al. (1990) e Thomazini et al. (1991) propuseram três hipóteses para explicar as alterações na função das plaquetas após o envenenamento ofídico. O veneno poderia estar bloqueando os receptores de membrana plaquetários, evitando a ação dos fatores agregantes. O baixo nível de fibrinogênio seria outra hipótese. De acordo com Bennet e Villaire (1979), as plaquetas necessitam de uma quantidade regular de fibrinogênio para manterem suas funções normais. A terceira hipótese seria os baixos níveis dos produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, os quais, em altas concentrações séricas, poderiam inibir a agregação plaquetária. Maiores investigações são necessárias para explicar com segurança qual das hipóteses explicaria a diminuição do número de plaquetas observado em nossos experimentos.

contagem leucocitária diferencial, talvez em função do pouco tempo de avaliação por nós utilizado, até 24 horas.

Após 12 horas o número de neutrófilos começou a diminuir enquanto o número de linfócitos se manteve alto, mostrando similaridades com um processo infeccioso, com um aumento de linfócitos, indicando tentativa de defesa imunológica. As similaridades persistem com as nossas observações do aumento do número de eosinófilos apenas com 24 horas. Estas células intensificam a fase linfocitária do processo.

O intenso aumento do número de monócitos apenas nos grupos de 2 e 6 horas pode ser explicado pelas observações de Flores et al. (1993), quando estudavam a migração neutrofílica em ratos induzida pelo veneno de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops alternatus*. Os autores concluíram que estes venenos induziram migração neutrofílica, e que os macrófagos como células residentes intensificaram o processo. Monócitos são células sanguíneas que se transformam em macrófagos nos tecidos (Thomson, 1983). A partir de tais afirmativas sugerimos que o aumento do número de monócitos esteja ligado ao importante papel dos macrófagos no processo inflamatório.

Podemos assegurar, após a administração experimental do veneno de *Bothrops jararacussu*, que este causou alterações hematológicas como eritrocitopenia, trombocitopenia e perda de proteínas plasmáticas. Notamos o surgimento de um processo inflamatório às expensas de neutrofilia, linfocitose e monocitose, sem contudo encontrarmos desvio à esquerda. Estudos futuros poderão esclarecer mais o mecanismo inflamatório envolvido com o envenenamento por *Bothrops jararacussu*.

O rim é um dos órgãos mais afetados nos acidentes ofídicos. O achado patológico mais comum é a insuficiência renal aguda secundária à necrose cortical (Da

Silva et al., 1979), necrose tubular aguda (Lopez et al., 1972), ou glomerulonefrite (McClure, 1935).

De acordo com Sitprija e Boonpucknavig (1979), o quadro de insuficiência renal é independente da aplicação do soro antiofídico. Estes autores afirmaram, ainda, que a ineficácia do soro na prevenção da doença pode ser talvez gerado pela demora da sua aplicação, em virtude do tempo decorrido entre a picada e a administração, e/ou por dose inadequada de soro.

Os achados clínicos que direcionam o diagnóstico para insuficiência renal aguda são, normalmente, oligúria ou anúria irresponsivas a altas aplicações endovenosas de diuréticos tipo furosemida. Outros dados laboratoriais, que se somam a estes, são altos níveis de uremia e creatinina sérica, além de baixa densidade urinária. O quadro de necrose cortical também foi associado a alguns achados laboratoriais por Matlin e Gary (1974), como duração da fase oligúrica entre 21 e 28 dias e a manutenção dos altos níveis de uréia e creatinina, mesmo durante a fase poliúrica,

Estes mesmos critérios foram usados por Amaral et al. (1985) para diagnosticar quadros suspeitos de necrose cortical em sete acidentes por *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*. Porém, mencionam que um outro caso, não publicado no referido artigo, de acidente humano por *Bothrops jararacussu*, onde a fase oligúrica durou 35 dias e a biopsia renal constatou necrose tubular. Constataram assim, que tais critérios nem sempre podem ser seguidos. Neste mesmo trabalho, Amaral descreveu após necropsia do indivíduo morto por acidente com *Bothrops jararacussu*, a presença de necrose coagulativa nos glomérulos, trombos fibrosos nas pequenas veias e capilares, necrose dos túbulos renais, além de congestão e hemorragia no interstício.

Apesar dos inúmeros achados concernentes a insuficiência renal aguda causada por necrose cortical, necrose tubular ou glomerulonefrite, a patogênese destes quadros ainda se encontra incerta. Os mecanismos propostos como possíveis causadores da insuficiência renal após acidente botrópico são a coagulação intravascular disseminada, a nefrotoxicidade direta atribuída à ação proteolítica do veneno, e/ou espasmo dos vasos renais decorrente da liberação de substâncias vasoativas. Já para o acidente crotálico, são sugeridos os mecanismos de ação hemolítica e nefrotóxica direta, a hipotensão arterial e choque. A rabdomiólise também já foi sugerida como mais um mecanismo que estaria envolvido no efeito lesivo ao rim nos acidentes por cascavéis (Amaral et al., 1986).

Do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* já foram fracionados e identificados a presença de um efeito miotóxico, causado por enzima sem efeito fosfolipásico A₂ e enzimas não miotóxicas com efeito fosfolipásico A₂ (Homs-Brandeburgo et al., 1988), dois fatores coagultivos do tipo trombina (Znganelli et al., 1996; Andrião-Escarso, et al. 1997), e um peptídeo P potenciador de bradicinina (Ferreira et al., 1992).

Após o estudo *in vitro* pelo método perfusão de rim isolado de rato, na presença do veneno de *Bothrops jararacussu*, em três diferentes concentrações, observamos queda da pressão de perfusão seguida pela redução da resistência vascular renal. Ambas com diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle, apenas aos 90 e 120 minutos. Contudo, logo após adição do veneno observamos uma brusca queda da pressão de perfusão e do ritmo de filtração glomerular.

A queda da pressão e resistência vascular, possivelmente originada pela liberação de bradicinina, potencializada pela presença de substância P encontrada no

veneno de *Bothrops jararacussu*, causou redução da resistência das arteríolas aferente e eferente, que foi rapidamente respondida por baixa pressão dos capilares glomerulares, e conseqüentemente redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e fluxo urinário.

Apesar de não observarmos diferença estatística no fluxo urinário logo após a aplicação do veneno, sua queda foi nítida em todos os experimentos das três concentrações empregadas, correspondendo nos dados de literatura à fase oligúrica dos acidentes ofídicos. Entretanto, essa fase oligoanúrica foi suplantada nos últimos trinta minutos dos experimentos, nos grupos com 10 e 30 μ g, por um efeito inverso. Este intenso efeito poliúrico foi mantido até o final dos experimentos, sem contudo notarmos qualquer aumento da pressão após a já referida queda.

A análise microscópica das lâminas com tecido renal após perfusão renal, com o veneno aqui estudado nas três concentrações, mostrou a presença de material protéico tanto nos glomérulos como nos túbulos, nos grupos com 10 e 30 μ g. Entretanto, não detectamos estas alterações nos glomérulos do grupo de 3 μ g. O que nos fez supor que possivelmente as alterações glomerulares, vistas para os outros grupos, estariam provocando o aumento do ritmo de filtração glomerular, e conseqüentemente do fluxo urinário.

Monteiro (1990), trabalhando com o veneno de *Bothrops jararaca* na mesma concentração de 10 μ g, observou as mesmas alterações glomerulares e tubulares por nós encontradas, além da presença do material protéico, porém, o efeito poliúrico não foi constatado.

Levantamos duas hipóteses para tentar explicar esse aumento do fluxo urinário. Koppen e Stanton (1997) descreveram que a pressão oncótica dos capilares

glomerulares apresenta uma correlação inversa com o ritmo de filtração glomerular. Assim, a presença do material protéico no espaço de Bowman denotaria que a maior quantidade de proteínas estava sendo filtrada, diminuindo a pressão oncótica dos capilares glomerulares. Isto promoveria um aumento do ritmo de filtração e maior fluxo urinário.

Os mesmos autores afirmaram que a bradicinina, estimulando a liberação de óxido nítrico ou fator de relaxamento vascular derivado do endotélio, promove o aumento do ritmo de filtração glomerular.

Sugerimos, diante de tais hipóteses, que logo após a aplicação do veneno houve queda do ritmo de filtração e fluxo urinário, associada com a brusca queda da pressão e resistência vascular. No entanto, este quadro sofreu modificação no final dos experimentos, onde alterações histopatológicas a nível glomerular e tubular, integradas com a provável liberação de bradicinina, promoveram o aumento do RFG e do fluxo urinário.

Em 1997, Murayama e seus colaboradores identificaram no veneno de *Bothrops jararaca*, após análise sequencial uma proteína precursora que codifica 7 peptídeos potenciadores de bradicinina e um peptídeo natriurético do tipo C. Uma análise mais apurada do veneno de *Bothrops jararacussu* poderá, talvez, identificar proteínas semelhantes às encontradas no veneno de *Bothrops jararaca* e assim explicariam melhor o fenômeno poliúrico encontrado em nossos estudos.

Todas estas explicações podem ser reforçadas a partir dos resultados obtidos no tocante ao aumento da excreção, e redução do transporte tubular dos íons sódio, potássio e cloro, assim como o aumento *clearance* osmótico, principalmente nos últimos trinta minutos dos experimentos. Guynton (1984) afirmou que a diminuição da reabsorção

tubular promoveria a maior retenção dos solutos nos túbulos renais, e conseqüentemente a maior retenção de água nos túbulos, promovendo maior volume urinário com maior concentração de solutos na urina. No entanto, não podemos afirmar se a redução do transporte destes íons foi exercida por ação lesiva do veneno sobre os túbulos, se a baixa pressão nos capilares peritubulares estaria envolvida, ou mesmo se ambos os efeitos estariam agindo em associação.

A quantidade de material protéico encontrada nos túbulos e glomérulos foi maior, quanto maior a dose de veneno empregada. Não obstante, no grupo de 3 μ g não houve a presença de material protéico nos glomérulos, apesar de sua presença nos túbulos. Vale ressaltar que no nosso grupo controle, assim como nos experimentos de Monteiro (1990) e Moraes (1984), observamos o mesmo material protéico tanto nos glomérulos quanto nos túbulos, possivelmente em virtude da albumina na solução perfusora. A diferença foi que os parâmetros renais nos grupos controles não foram afetados pelo material encontrado, enquanto no nosso grupo de 3 μ g obtivemos alterações no transporte tubular dos íons. Estas afirmações nos levaram a crer que a maior quantidade protéica, tanto nos glomérulos quanto nos túbulos, provocou as alterações nos parâmetros renais. Poderíamos, ainda, sugerir a possível existência de uma ação nos túbulos, independente da ação nos glomérulos.

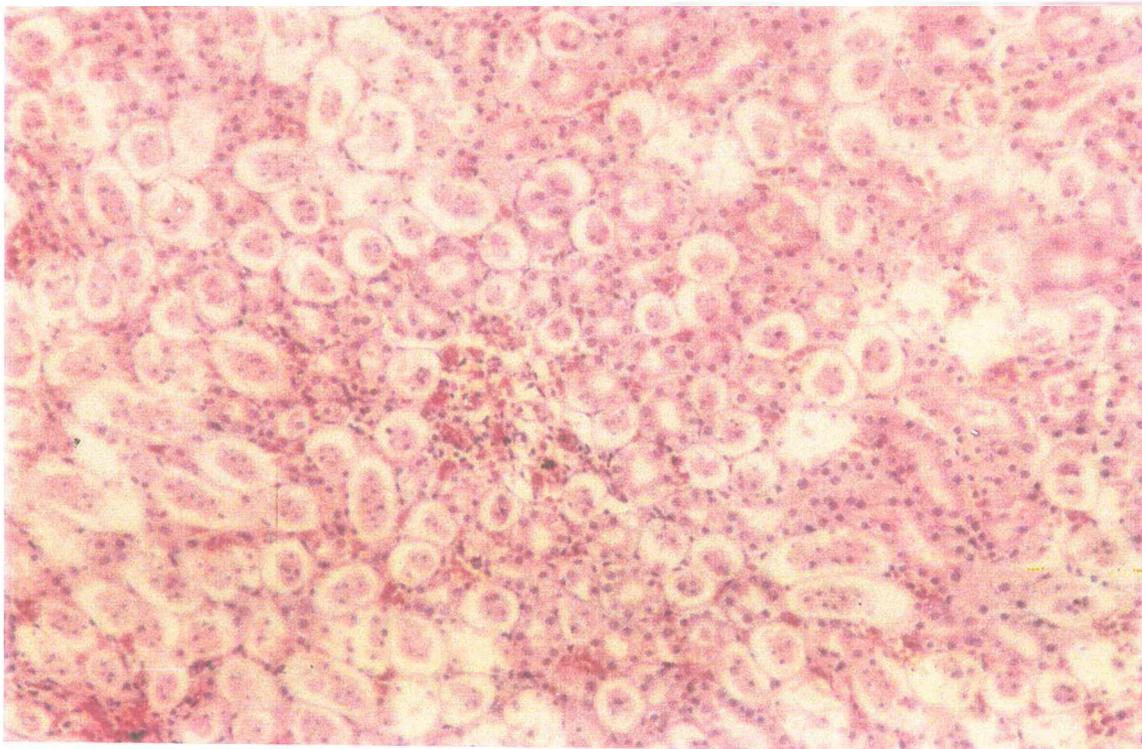
Conclusões

- ➔ A DL50 do veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos foi de $9,5 \pm 0,44$ mg/kg de peso vivo.
- ➔ Após aplicação intraperitoneal das diversas doses utilizadas para a determinação da DL50, sugerimos que os animais vieram a óbito possivelmente em virtude de um quadro de coagulação intravascular disseminada, associada a processo inflamatório e nefrose.
- ➔ Na avaliação do hemograma completo em ratos após envenenamento experimental observamos quadro de eritrocitopenia, trombocitopenia e perda de proteínas plasmáticas totais. Esse quadro foi associado a processo inflamatório às expensas de neutrofilia, linfocitose e monocitose sem a presença de desvio a esquerda.
- ➔ O veneno de *Bothrops jararacussu* causou intenso efeito nefrotóxico no modelo de rim isolado de rato, sendo este efeito identificado pela primeira vez.
- ➔ Evidenciamos este efeito nefrotóxico com a redução dos parâmetros de PP, RVR, %TNa⁻, %TK⁺, %TCl⁻, %pTNa⁻, %pTK⁺ e %pTCl⁻. O ritmo de filtração glomerular decresceu após a aplicação do veneno, porém, ao fim dos experimentos, aumentou. Este aumento foi observado ainda no parâmetro fluxo urinário, *clearance* osmótico e nas excreções de sódio, potássio e cloro.
- ➔ Com a análise histopatológica dos rins perfundidos, constatamos um efeito dose dependente nas três concentrações empregadas. Nos grupos com 10 e 30µg de veneno, tanto os glomérulos como os túbulos apresentavam material protéico. Contudo, no grupo com 3µg, não evidenciamos a presença de alterações nos

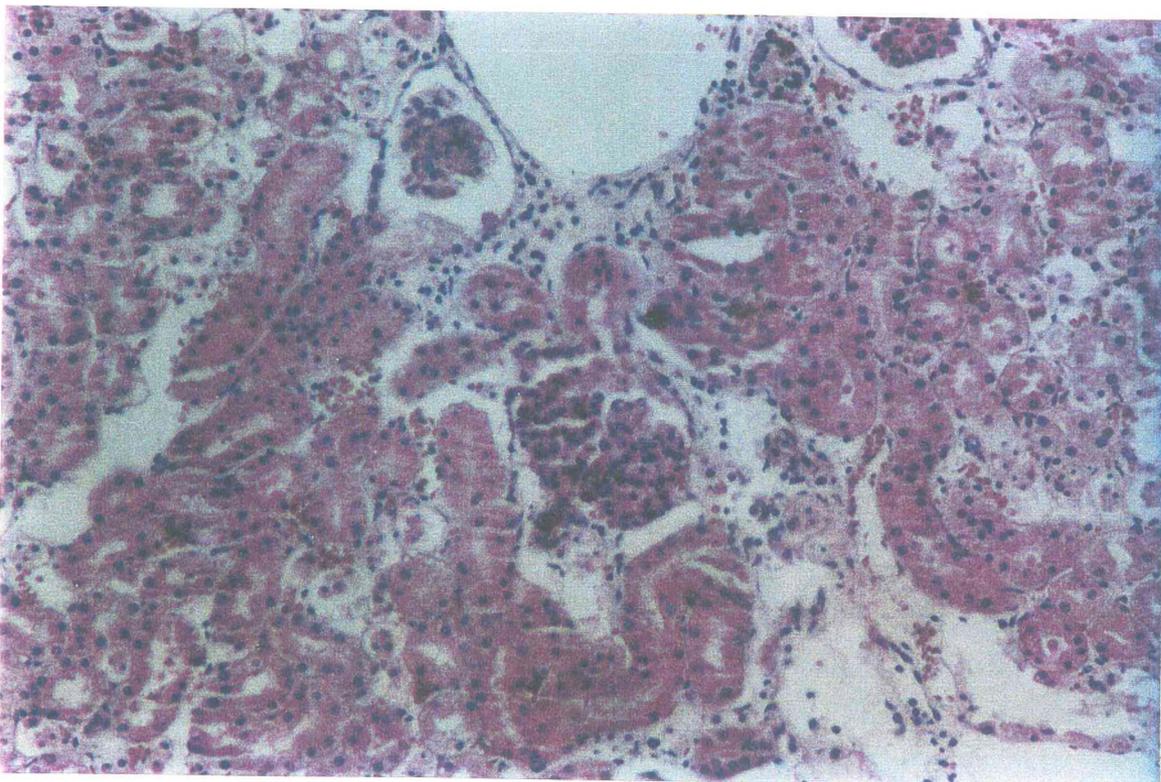
glomérulos. Isto sugere que o veneno de *Bothrops jararacussu* pode agir de forma independente nos túbulos renais.

ANEXO

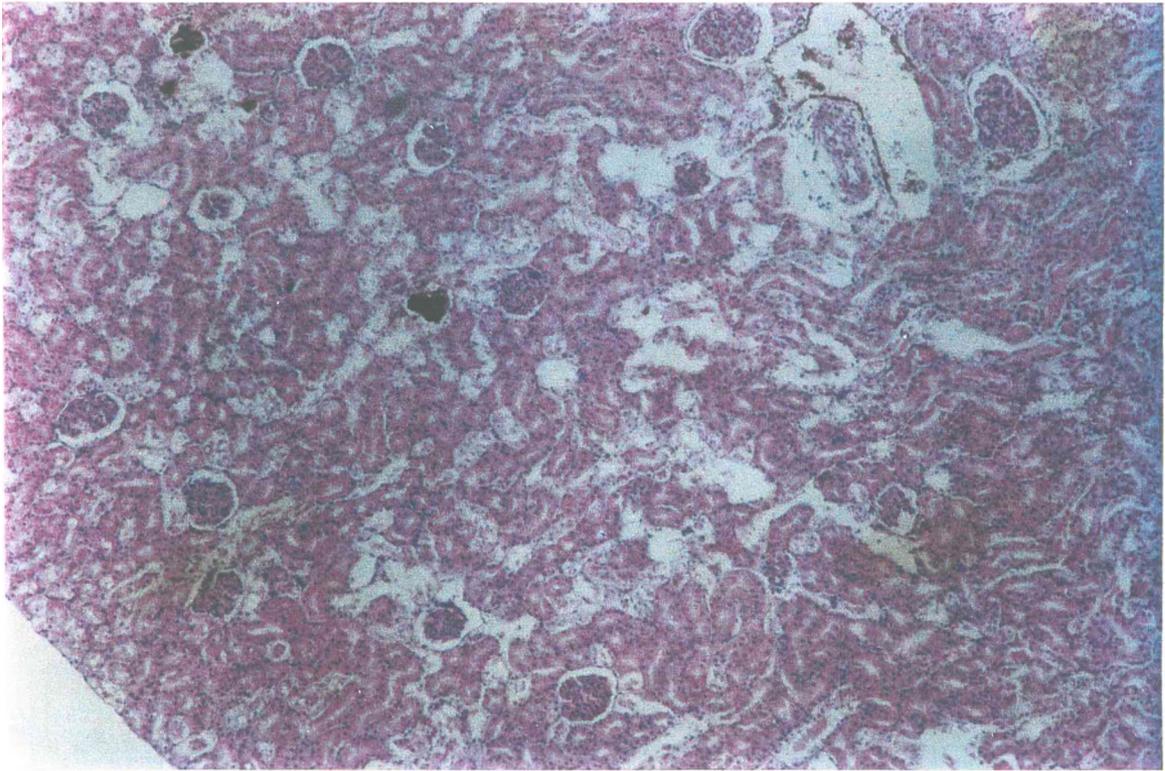
Estudo da Toxicidade



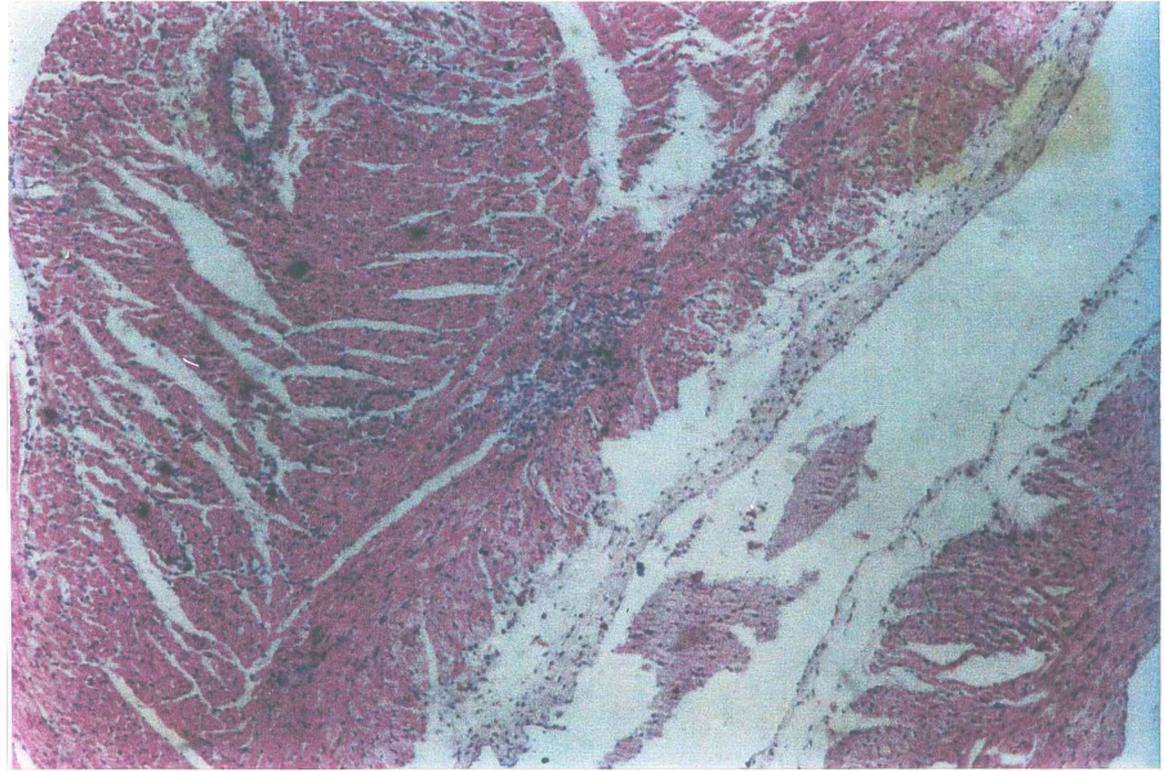
A - Edema intersticial no rins



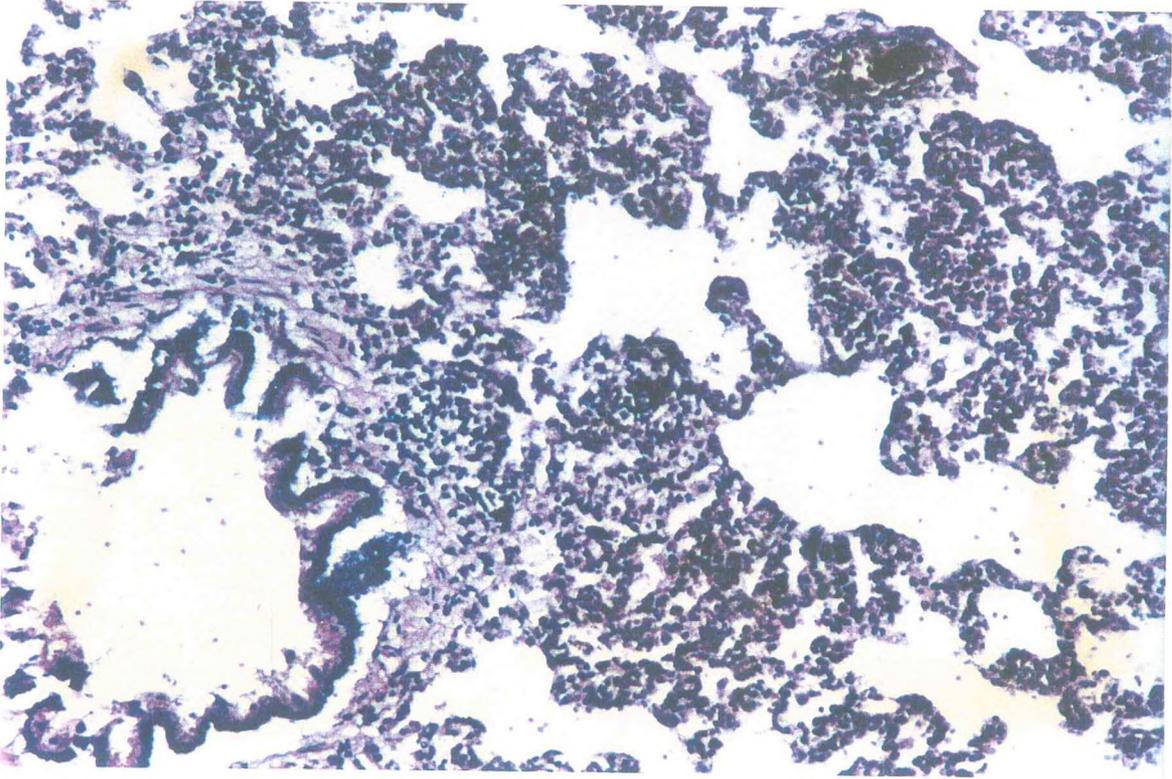
B - Exudação granulocitária nos rins



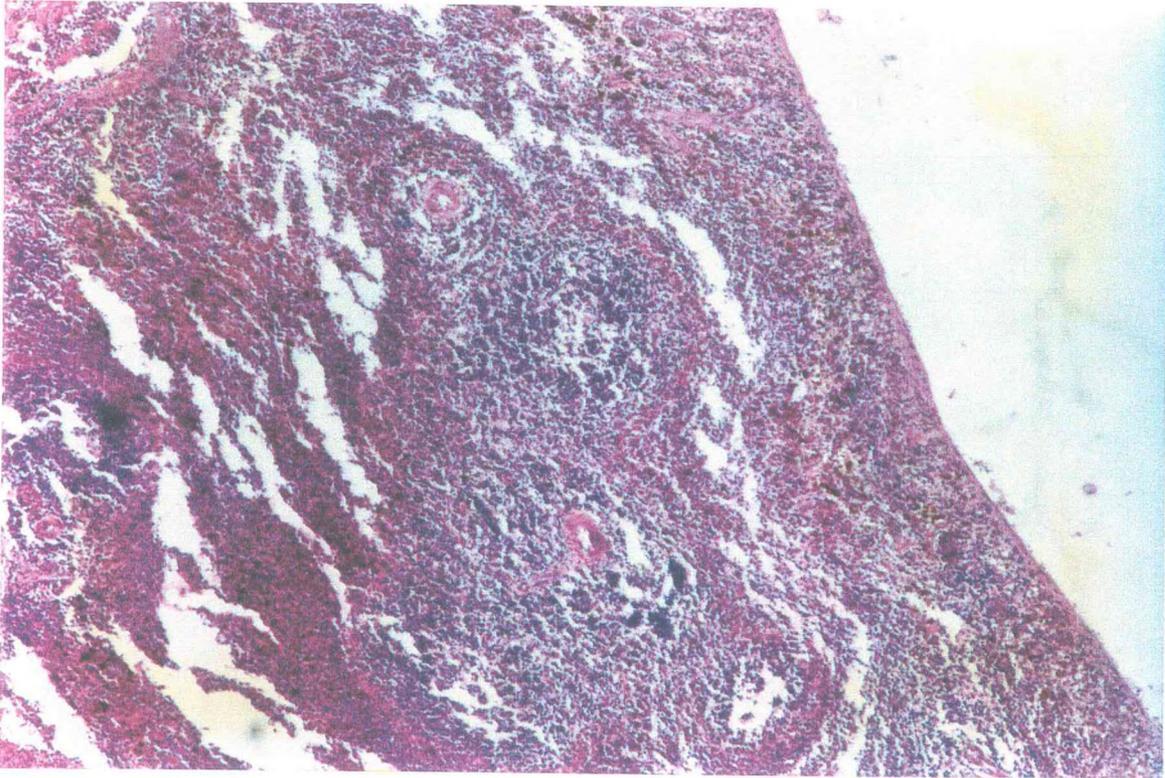
C- Dilatação das células tubulares renais



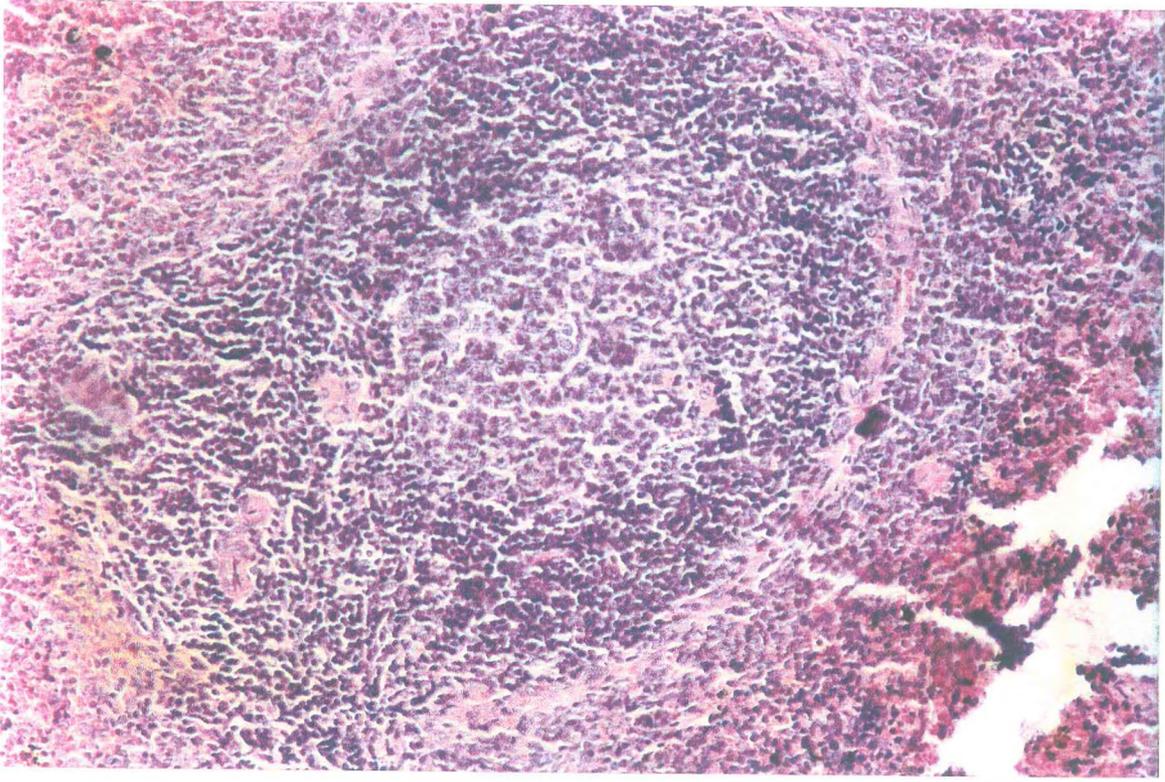
D - Miocardite com destruição muscular



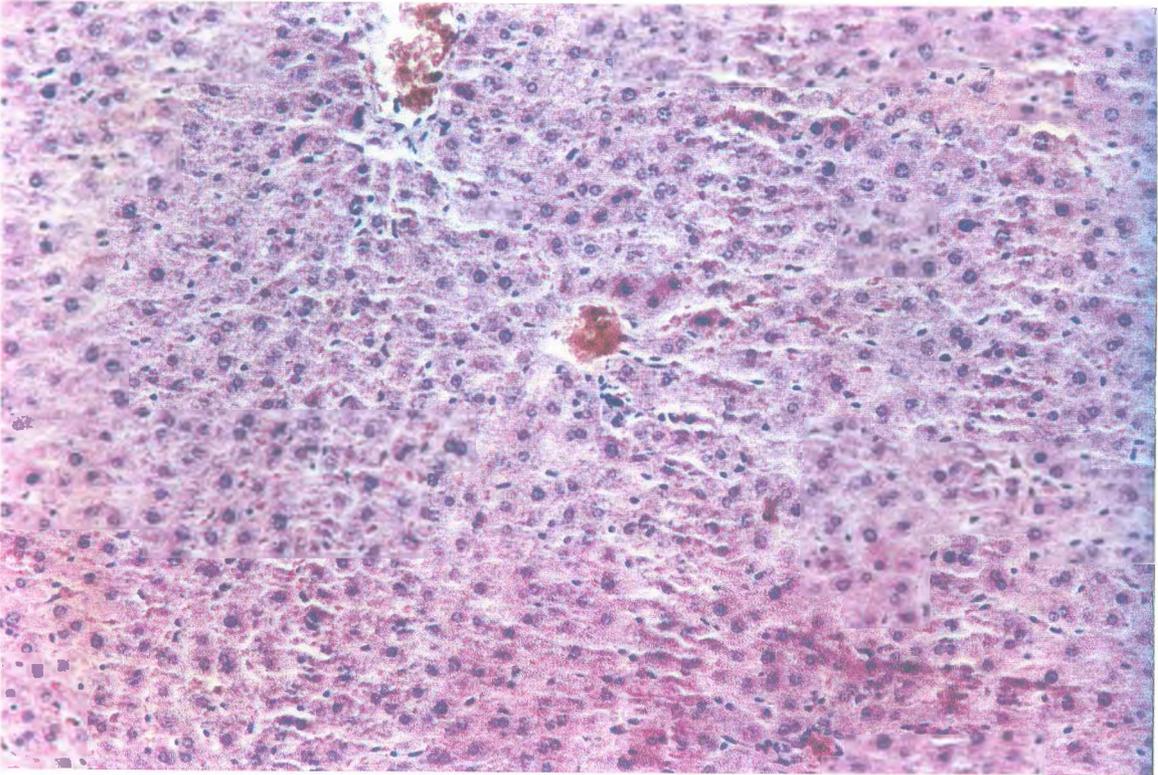
E - Broncopneumonia



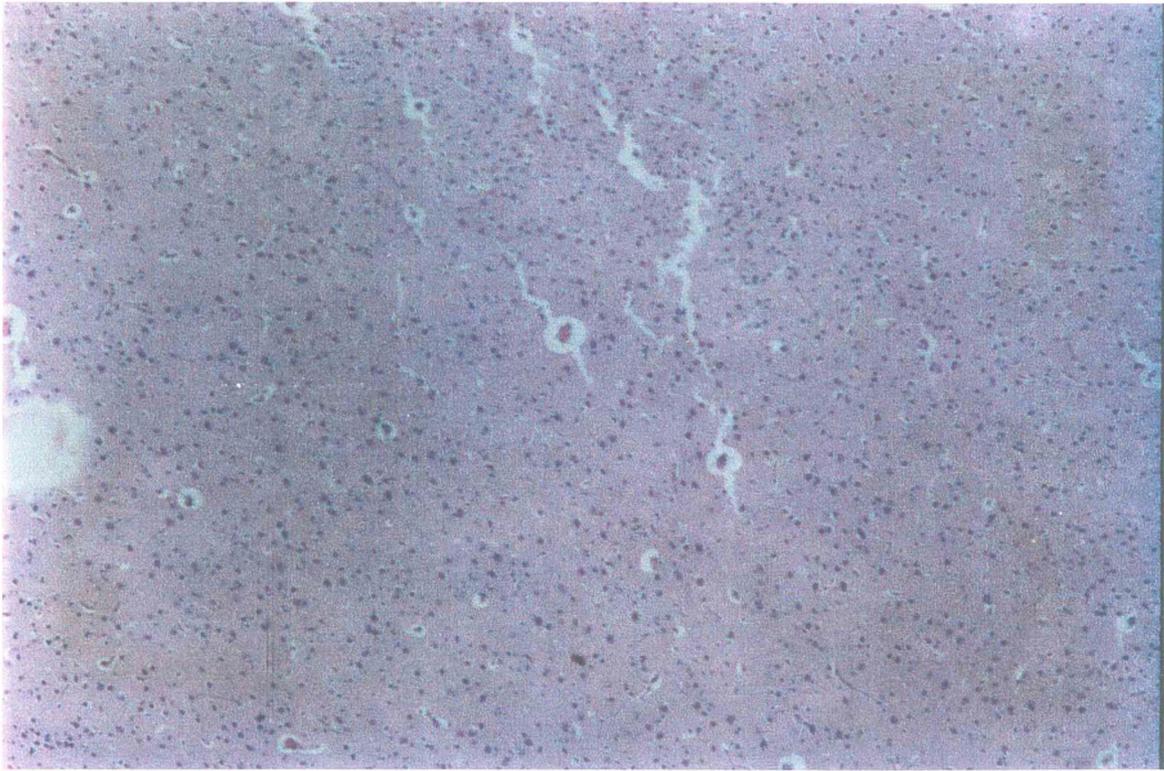
F - Hiperplasia de polpa branca aumento de 40X



G - Hiperplasia de polpa branca do baço aumento 100X



H - Congestão hepática

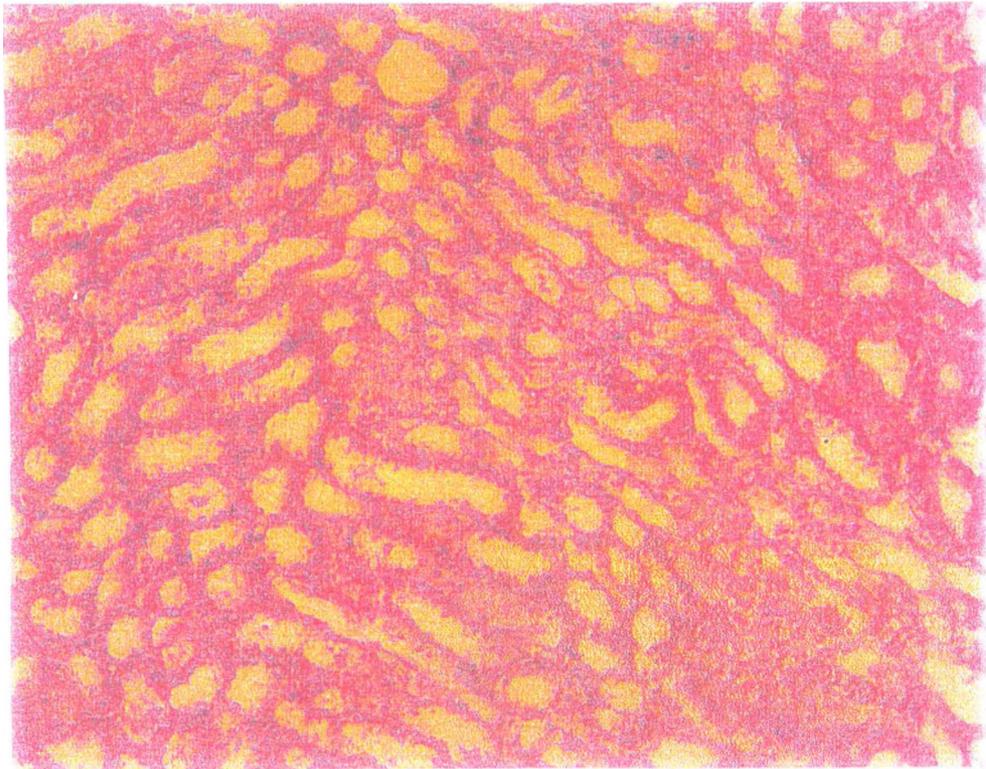


I - Congestão cerebral

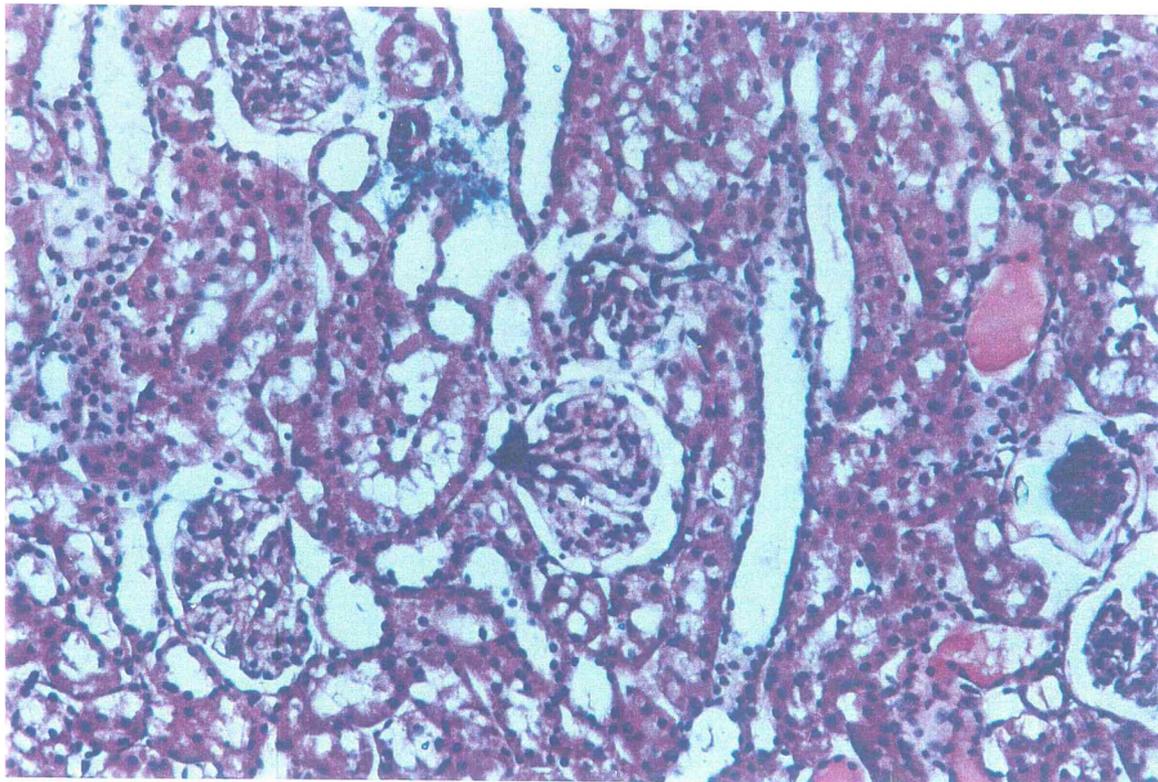
Perfusão renal



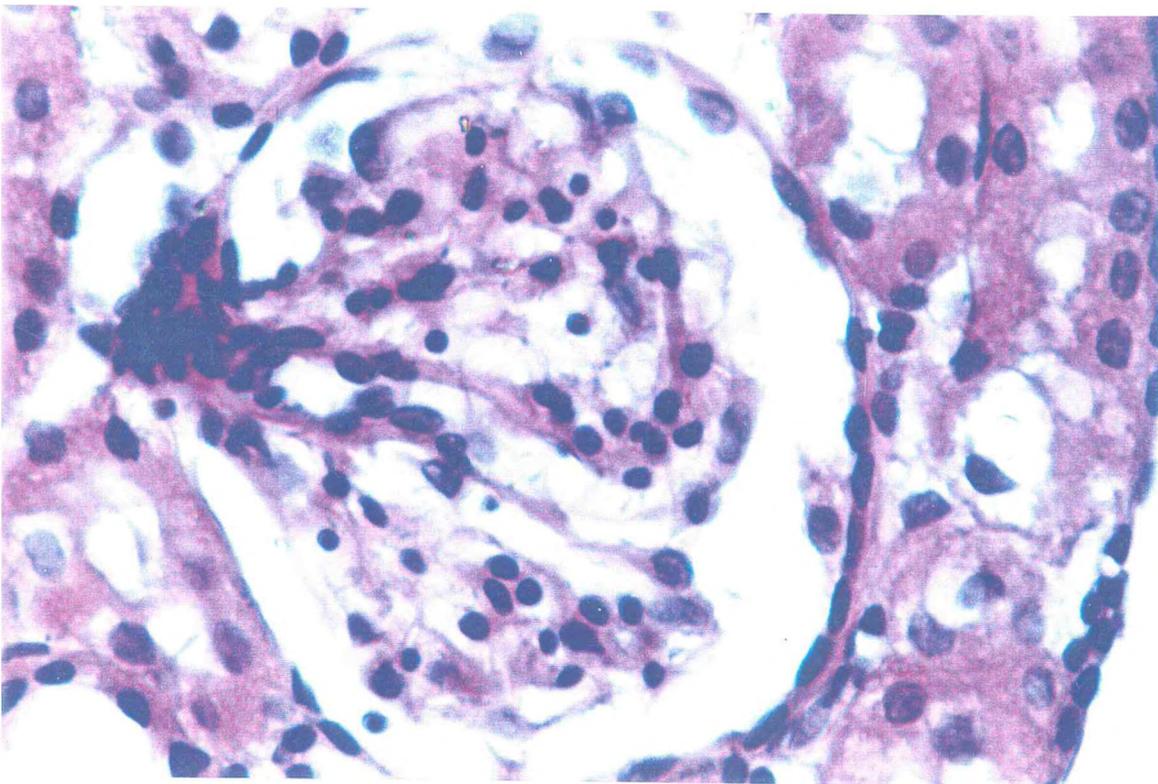
A - Rim controle apresentando glomérulo sem alteração (800x)



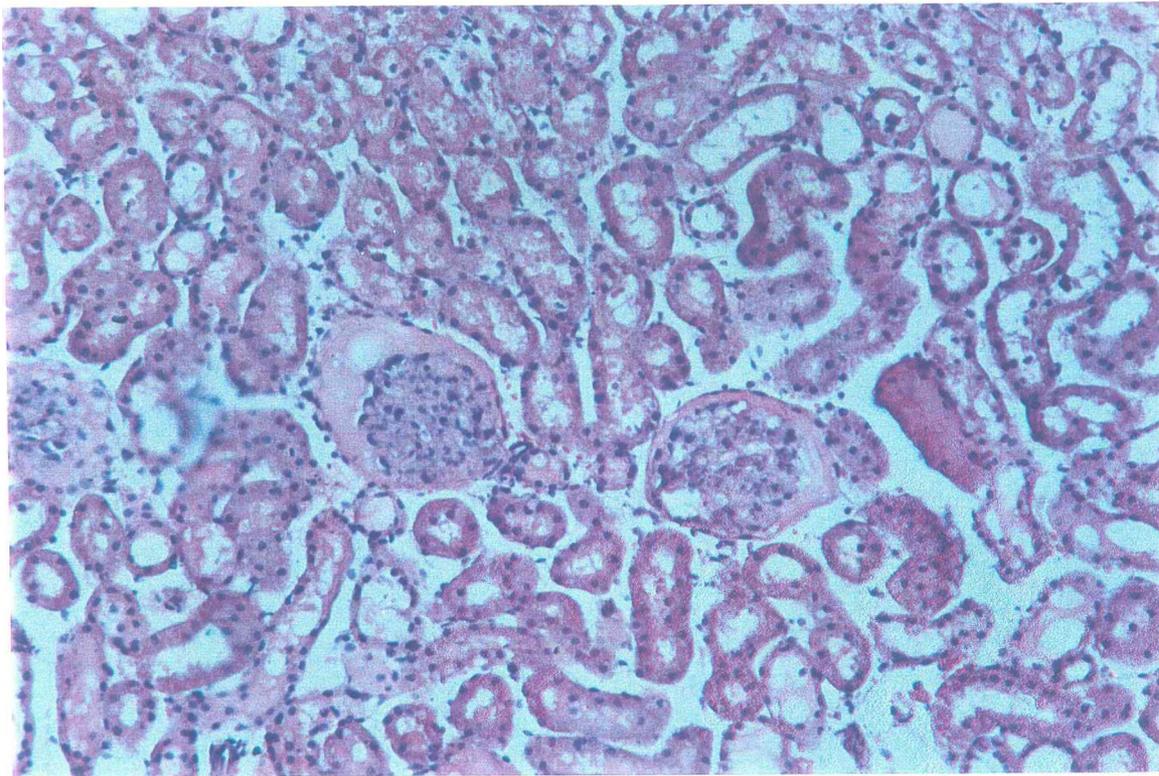
B - Rim controle: túbulos sem alteração (100x)



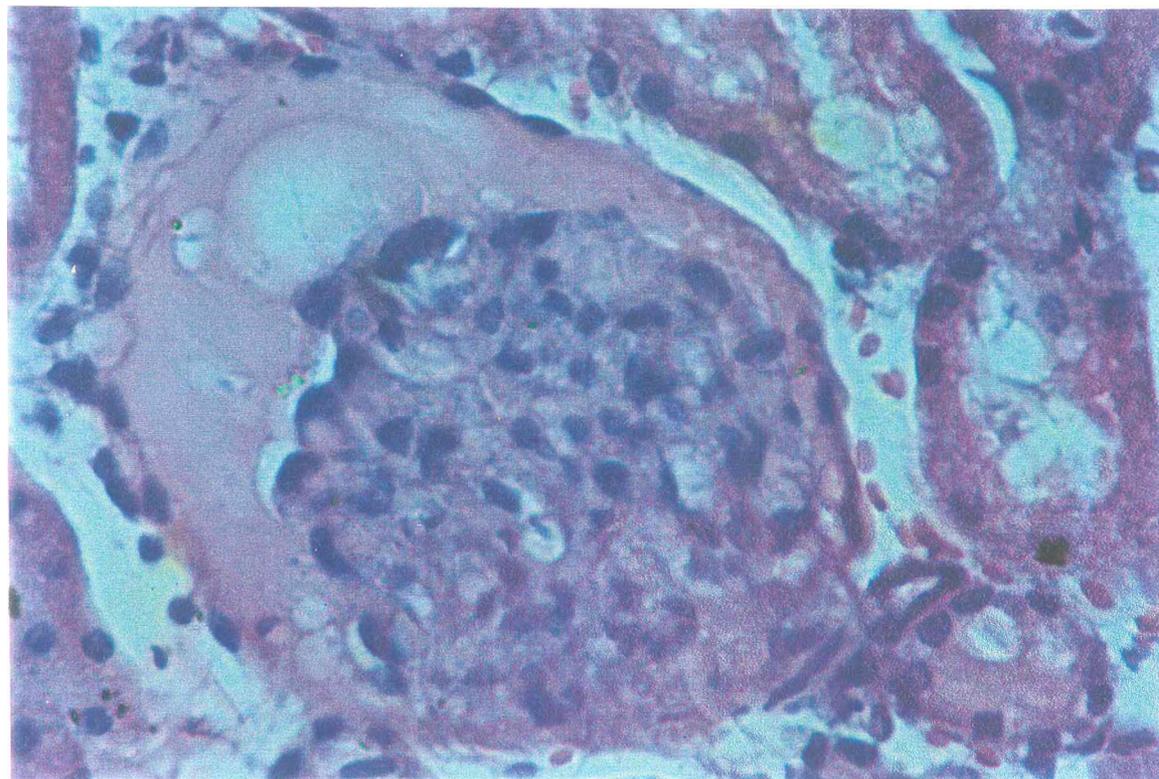
C - Glomérulos sem alteração e túbulos com pouco material protéico, 3 μ g de veneno (100x)



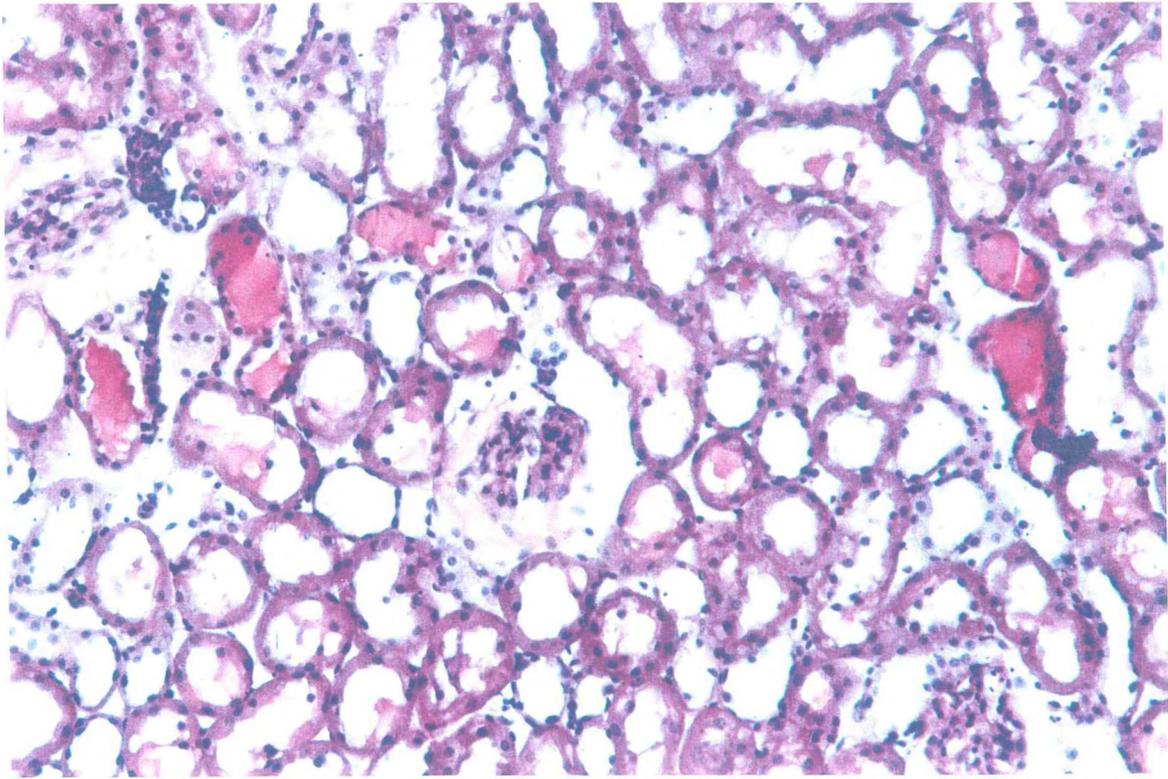
D - Glomérulo sem alteração na concentração de 3 μ g de veneno (800x)



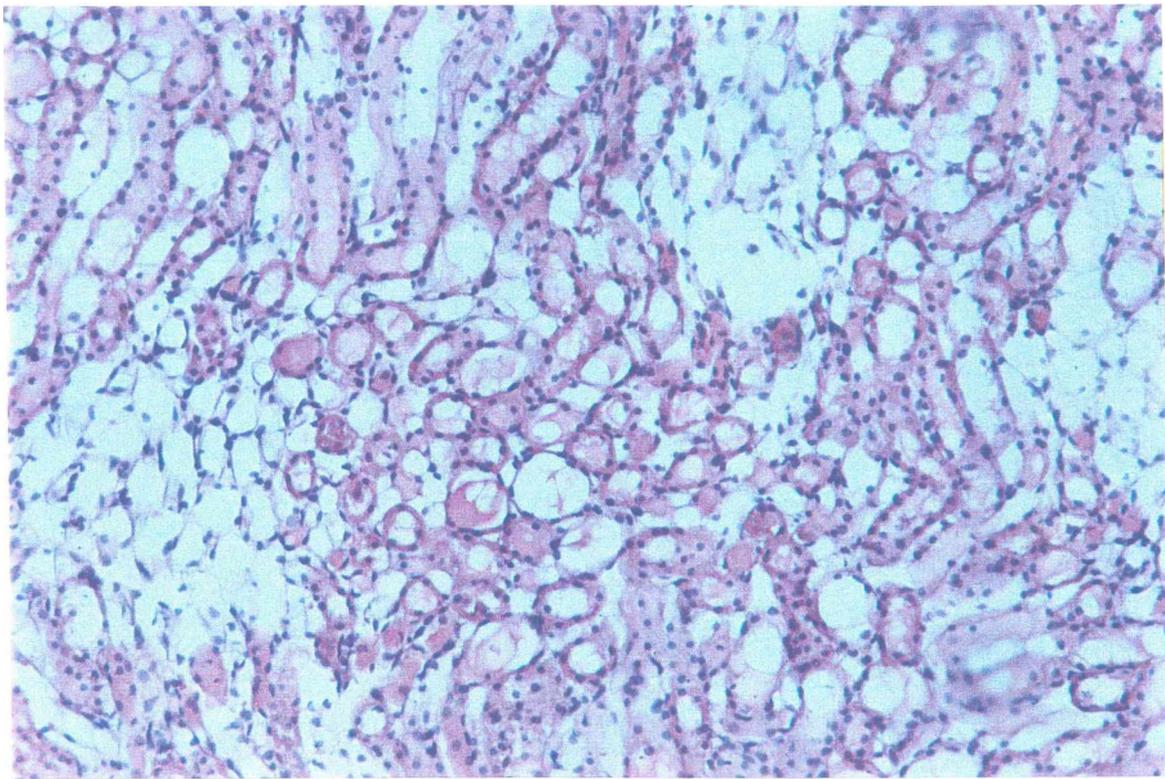
E - Glomérulos e túbulos com material protéico, 10 μ g de veneno (100x)



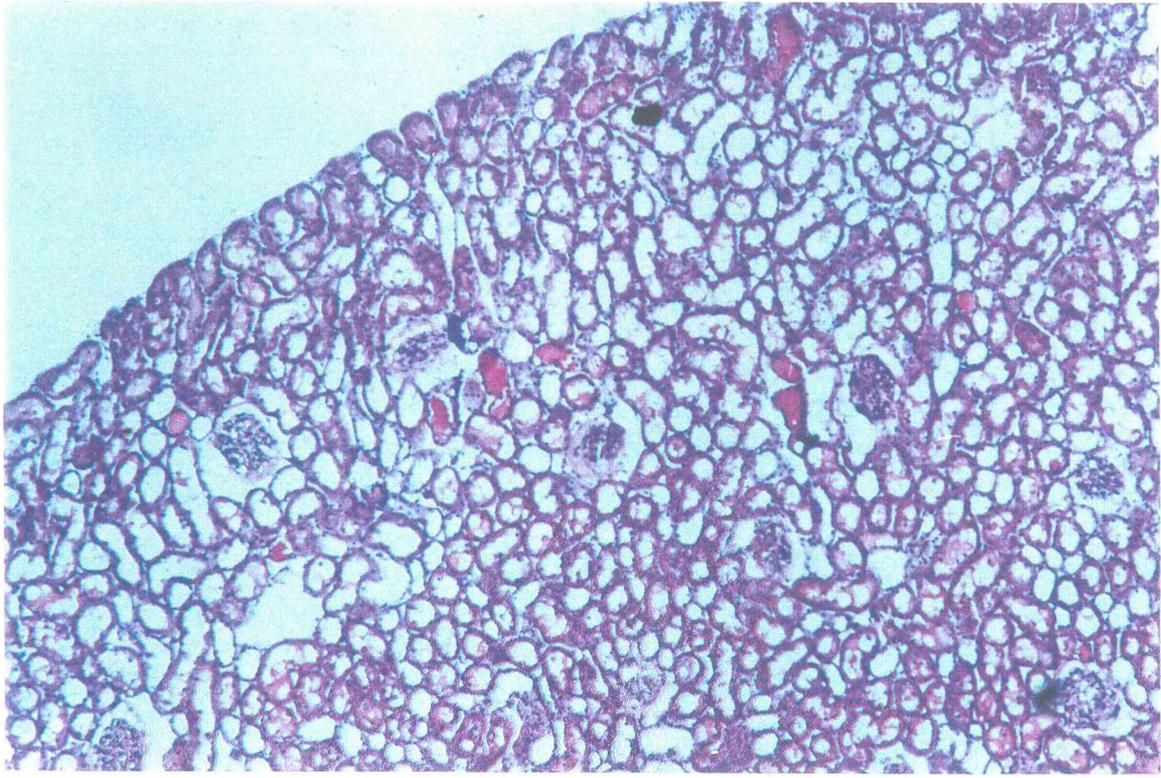
F - Glomérulo com material protéico com 10 μ g de veneno (800x)



G - Glomérulos e túbulos com material protéico na concentração de $30\mu\text{g}$ de veneno (100x)



H - Túbulos renais com material protéico na concentração de $30\mu\text{g}$ (40x)



I - Panorama renal na presença de veneno de *Bothrops jararacussu* na concentração de 50µg.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, T.V. Hematologia. In: MOURA, R.A.A. **Técnicas de Laboratório**. Rio De Janeiro: Livraria Atheneu, 2^a ed. cap. 31, p. 553-564, 1982.
- AMARAL, C.F.S., DA SILVA, A., GODOY, P., MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 877-885, 1985.
- AMARAL, C. F. S., REZENDE, N.A., SILVA, O.A., RIBEIRO, M.M.F., MAGALHÃES, R.A., REIS, R.J., CARNEIRO, J.G., CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidente ofídico botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.28, p. 220-227, 1986.
- AMORIM, M.F. FRANCO DE MELLO, R., SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. **Mem. Inst. Butantan**, v. 23, p. 63-90, 1951.
- AMORIM, M.F., MELLO, R.F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. **Amer. J. Path.**, v. 30, p. 479-499, 1954.
- AMORIM, M.F., MELLO, R.F., SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. **Mem. Inst. Butantan**, v. 34, p.137-157, 1969.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., SAMPAIO, S.V., CUNHA, O.A.B., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., GIGLIO, R.J.. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. **Toxicon**, v. 35 n. 7, p. 1043-1052, 1997.
- ARAGON, F., GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. **Toxicon**, v. 19, p. 797-805, 1981.
- ARAÚJO FILHO, R.M. **Efeitos comparativos do Glutation (GSH) em dois modelos de solução preservadora no rim perfundido do coelho**. Fortaleza, 1995. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, UFC.
- ASSAKURA, M.T., REICHL, A.P., ASPERTI, M.C., MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v. 23, p. 691-706, 1985.
- AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. **Toxicon**, v. 16, p. 71-75, 1978.

- BAHLMAN, J., GIEBISCH, G. OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq. Bras. Med.**, v. 65, n. 4, p. 345-355, 1991.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **JBM**, v.65, n. 4, p. 209-250, 1993.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero “*Lachesis*” In: BARRAVIERA, B. (coord.) **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.21, p.297.
- BARRAVIERA, B., PEREIRA, P.C.M. Acidentes por Serpentes do Gênero “*Bothrops*” In: BARRAVIERA, B. (coord.) **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. Cap.19, p.261.
- BELLUOMINI, H.E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v. 12, n. 12, p. 82-95, 1984.
- BENNET, S.J., VILAIRE, G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. **J. Clin. Invest.**, v. 64, p. 1393-1401, 1979.
- BJARNASON, J.B., FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) **Snakes a Natural History**. New York: Sterling Publishing Co., 1997, p.194- 209.
- BOQUET, P. History of snakes venom research. In: LEE, C.Y. (edit.) **Snake Venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. cap. 1, p. 3-13.
- BOWMAN, R.H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat Kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 7, p. 1604-1612, 1970.
- BOWMAN, R.H., MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and elotrolyte in perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 2, p. 426-430, 1974.
- BRANDÃO, J.S. Hércules e os doze trabalhos. In: _____. **Mitologia Grega**. Petrópolis: Vozes, 1989. cap. 3, p. 89-147.
- BRASIL, Ministério da Saúde: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animias peçonhentos. Brasília, 1998.

- CADILLO, E.M., FERREYRA, C.B., ZAVALETA, A. Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*. (Serpentes: *Viperidae* y *Elapidae*). **Rev. Biol. Trop.**, v. 39 n. 2, p. 311-314, 1991.
- CARDOSO, J.L.C., FAN, H.V., FRANÇA, F.O.S., JORGE, M.T., LEITE, R.P., NISHIOKA, A.S., AVILA, A., SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., SANTORO, M.L., CHUDZINSKI, A.M., CASTRO, S.C.B., KAMIGUTI, A.S., KELEN, E.M.A., HITARA, M.H., MIRANDOLA, R.M.S., THEAKSTON, R.D.G., WARREL, D.A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. **Quart. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993.
- CARLINE, E. A. **Farmacologia Prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, p. 139-142, 1973.
- CARVALHO, W.F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematológica. Belo Horizonte: Cooperativa Editora e de Cultura Médica Ltda, 4ª ed, p. 79-91, 1986.
- CHUGH, K.S., AIKAT, B.K., SHARMA, B.K., DASH, S.C., THOMAS MATHEW, M., DAS, K.C. Acute renal failure following snakebite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, n. 4, p. 692-697, 1975.
- CLARKSON, A.R., MACDONALD, M.K., FUSTER, V., CASH, J.D., ROBSON, J.S. Glomerular coagulation in acute ischaemic renal failure. **Quart. J. Med.**, v. 39, p. 585-599, 1970.
- COHEN, J.J., KOOK, Y.J., LITTLE, J.R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 226, p. 103-121, 1977.
- CORMACK, H.D. **Ham Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9ª ed., cap. 1, p. 3-9, 1991.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Distúrbios hídricos e hemodinâmicos. In: _____ **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a, 4ª ed, cap. 3, p. 71-100.
- _____. Doenças dos Leucócitos, Linfonodos e Baço. In: _____. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991b, 4ª ed, cap. 15, p. 577-619.
- DA SILVA, O.A., LÓPEZ, M., GODOY, P. Bilateral cortical necrosis and calcification of the kidneys following snake bite. A case report. **Clin. Nephrol.**, v. 11, p. 136-139, 1979.

- DATE, A., SHASTRY, J.C.M. Renal ultrastructure in cortical necrosis following Russel's viper envenomation. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 3-9, 1981.
- DE MELLO, G., MAACK, T. Nephron function of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 231, n. 6, p. 699-707, 1976.
- DICHI, J., BURINI, R.C. Metabolismo e regulação dos níveis plasmáticos de albumina. **Cad. Nutr. SBAN**, v. 3, p. 99-127, 1991.
- DOS-SANTOS, M.C., GONÇALVES, L.R.C, FORTES-DIAS, L.C., CURY, Y. GUTIERREZ, J.M., FURTADO, M.F. A eficácia do antiveneno Botrópico-Crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n.2 p.77-83, 1992.
- FEITOSA, R.F.G. **Efeitos renais e pulmonares do veneno de cascavel (*Crotalus durissus cascavella*) em ratos. Estudos epidemiológicos dos acidentes ofídicos no Ceará.** Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.
- FERREIRA, S.H., BARTELT, D.C., GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p.2583-2593, 1970.
- FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., LEBRUN, I., BATISTA, M.B.C., PREZOTO, B.C., ANDREONI, A.S.S., ZELNIK, R., HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (Peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 33-40, 1992.
- FLECK, A. Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 48, p. 347-354, 1989.
- FLORES, C.A., ZAPPELLINI, A., PRADO-FRANCHESCHI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1551-1559, 1993.
- FOHLMAN, J., EAKER, D. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A from the venom of the common sea snake *Enhydrina schistosa* Causing myoglobinuria in mice. **Toxicon**, v. 15, p. 387-397, 1977.
- FONTELES, M.C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim solado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal.** Fortaleza, 1980. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.
- FONTELES, M.C., LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, v. 90, p. 159-161, 1982.

- FOURCADE, P. Mythology. In: Bauchot, R. (edit) **Snakes a Natural History**. New York: Sterling Publishing Co., 1997, p.184-193.
- FRANÇA, F.O.S., FAN, H.W. Acidente botrópico. In: Schvartsman S (Edit.), **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos 2^a** ed., São Paulo: Sarvier, 1992. cap.13 p. 149-160.
- FRIEDERICH, C., TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmac.**, v. 20, p. 1549-1556, 1971.
- FURLANETO, R.S., ROLIM ROSA, R.,SILES VILLARROEL, M., SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos – *Mus musculus* – Linnaeus, 1758. I- Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 99-107, 1973.
- FURTADO, M.F.D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.
- FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S, ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n.2, p. 219-226, 1991.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.,. Técnicas Hematológicas. In: GARCIA-NAVARRO, C.E.K, PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo Livraria Varella Ltda. 1994, cap. 9, p.69-90.
- GLEN, J.L., STRAIGHT, R.C., WOLFE, M.C., HARDY, D.L. Geographical variations in *Crotals scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. **Toxicon**, v.21, n. 1, p. 119-130, 1983.
- GRANTSAU, R. As cobras venenosas do Brasil. 1^a ed.. Bandeirante S.A. Gráfica e Editora São Bernardo do Campo, 1991.
- GUALTIÉRI, V.B.F. Toxicologia dos venenos de ofídios brasileiros. **Rev. Homeopatic.**, v. 174, p. 33-39, 1987.
- GUIMARÃES, J.A., FONSECA NETO, M.D., ROUQUAYROL M.Z., LIMA VERDE J.S. **Acidentes ofídicos: identifique-previna-trate**. Fortaleza: CEATOX, 1989.

- GUTIERREZ, J.M., OWNBY, C.L., ODELL, G.V. Isolation and partial characterization of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-123, 1984.
- GUTIERREZ, J.M., CHAVES, S. GENE, J.A., LOMONTE, B. CAMACHO, Z. SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 27, p.735-745, 1989.
- GUYTON, A.C. Formação de urina pelo rim: filtração glomerular, função tubular e depuração plasmática. In: _____. **Tratado de Fisiologia Médica**, Rio de Janeiro: Interamericana, 1984, cap. 34, p. 349-363.
- HADLER, W.A., VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin IV. Nephrotoxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 1001- 1008, 1966.
- HAGIHARA, S., KOMORY, Y., TU, A.T. Proteolytic specificity of hemorrhagic toxin b from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) venom. **Comp. Biochem Physiol.**, v. 82c, p. 21-31,1985.
- HAMILTON, R.L., BENNY, N.M., WILLIAMS, M.C., SEVERINGHAUS, E.M.A. Simple and inexpensive membrane "lung"for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 667-668, 1974.
- HANSON, R.W., BALLARD, F.S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of comercial serum albumin. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 667-668, 1968.
- HAWGOOD, B., SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 4, p. 293-306, 1979.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H, RODRIGUES-SIMIONI, L., GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26 n. 7, p. 615-627, 1988.
- IUAN, F.C., THOMAZINI, I.A., CARVALHO, I., CASSINELI, V.J., CARREIRA, D.M.G., PEREIRA, P.C.M., BARRAVIERA, B. Estudo da função plaquetária em pacientes que sofreram acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Anais... Natal, p. 89, 1990.
- IWANAGA, S., SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. (ed) **Snake Venoms**. New York: Springer Verlag, 1979, p. 61-158.
- JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Acidentes por animais peçonhentos. **Rev. Med. IAMSPE**, v. 15, p. 10-20, 1984.

- _____. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.36, n. 2, p.66-77, 1990.
- KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by venoms of South American Snakes. **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 955-963, 1989.
- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C.Y. (ed) **Snake Venoms**. New York: Springer Verlag, 1979, cap 5, p. 159-212.
- KERBAUY, J., MIEZA, M.A. Interpretação clínica do hemograma. In: GUIMARÃES, R.X., GUERRA, C.C.C. **Clínica e Laboratório: interpretação clínica das provas laboratoriais**. São Paulo: Sarvier, 1990, 4ª ed, p. 273-278.
- KOEPPEN, B.M., STANTON, B.A. Glomerular filtration and renal blood flow. In: _____. **Renal Physiology**. St. Louis: Mosby, 1997, 2ª ed., cap. 3, p.31-51.
- LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J. CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 5ª ed., cap. 21, p. 390-518, 1977.
- LITTLE, J.R., COHEN, J.J. Effect of albumin concentration of functional isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 3, p. 512-517, 1974.
- LOMONTE, B., GUTIERREZ, J.M. A new muscle damage toxin, myotoxin II, from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733, 1989.
- LÓPEZ, M., FOSCARINI, L.G., ALVARES, J.M., DINIZ FILHO, I., MARRA, U.D., PROCÓPIO, N.P.M.M. Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. **Rev. Ass. Med. Minas Gerais**, v. 23, p. 107-112, 1972.
- MAC CLURE, E. Glomerulonefrite aguda difusa consequente a envenenamento por cobra (*Bothrops jararacussu*). **Bol. Sec. Geral Saúde Assit.**, v. 3, p. 35-49, 1935.
- MANDELBAUM, F.R., ASSAKURA, M.T., REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v. 22, p.193-206, 1984.
- _____. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 20, p. 955-963, 1982.
- _____. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OSHAKA, A. et al. **Animal, Plant and Microbial Toxins**. New York: Plenum Press, 1976, vol. I, p. 111-121.

- MARTINEZ-MALDONATO, M. STAWROULAKI-TSAPARA, A., TSAPARA, N., SUKI, W.N., EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: alterations in water and eletrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 80, n.3, p. 445-461, 1978.
- MURAYAMA, N., KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C., SANO-MARTINS, I.S., CHUDZINSKI, A.M., SANTORO, M.L., MORENA, P., TOMY, S.C., ANTONIO, L.C., MIHARA, H., KELEN, E.M.A. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Thromb. Haemostat.**, v. 63, p.449-453, 1990.
- MURAYAMA, N., HAYASHI, M.A., OHI, H., FERREIRA, L.A., HERMANN, V.V., SAITO, H., FUJITA, Y., HIGUCHI, S., FERNANDES, B.L. YAMANE, T. DE CAMARGO, A.C. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 4, p. 1189-1193, 1997.
- MATLIN, R.A., GARY, N.E. Acute cortical necrosis. Case reported and review of the literature. **Am. J. Med.**, v. 56, p. 110-115, 1974.
- MATTINSON, C. The Encyclopedia of Snakes. Facts on File. New York, 1995.
- MEHRTENS, J.M. Living snakes of the world. New York: Sterling Publishing Co., 1987.
- MILLER, LC., TAINTER, M.L. Estimulation of the DL50 and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biog. Med.**, v. 57, p. 261-264, 1944.
- MONTEIRO, H.S.A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina.** Campinas, 1990. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Campinas, UNICAMP.
- MORAES, M.E.A. **Perfusão de rim isolado de coelho: estudo comparativo de aminoglicosídeos.** Fortaleza, 1984. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.
- MOREIRA LIMA, A.A. **Estudos dos efeitos das toxinas do *V. cholerae* e *E. coli* no rim isolado de rato.** Fortaleza, 1983. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v. 28, n. 11, p. 1293-1301, 1990.

- MOURA DA SILVA, A.M., DESMOND, H., LAING, G. THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.
- NAHAS, L., KAMIGUTI, A. S., BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venom. **Thrombos. Haemostas.**, v. 41, p. 314-328, 1979.
- NIEMIAROWSKI, S., KIRBY, E.P., BUDZYNSKI, T.M., STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. **Thromb. Res.**, v. 10, p. 863-875, 1977.
- NIENBOM, H.E., PERAZZO, J.C., MONSERRAT, A.I., Vidal, J.C. Contribution of phospholipase A₂ to lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**, v. 24, p. 807-815, 1986.
- OHSAKA, A., IKEGAWA, H., KONDO, S. Two hemorrhagic principles derived from habu snake venom and their differences in zone electrophoresis. **Japanese J. Med. Sci. Biol.**, v. 13, p. 73-79, 1960.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. Berlin: Springer, 1979, cap. 14, p. 480-546.
- OVADIA, M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palaestinae*. **Toxicon**, v. 16, p.479-487, 1978.
- OWNBY, C.L., BJARNASON, J., TU, A.T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Amer. J. Pathol.**, v. 93, p. 201-218, 1978.
- PERRONE, M.A.L., SILES-VILLARROEL, M., FURTADO, M.F.D. Estudo comparativo entre venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná, com algumas espécies morfológicamente duvidosas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 1, p. 25-31, 1989.
- PUCH, R.N.H., THEAKSTON, R.D.G. Fatality following use of a tourniquete after viper bite envenoming. **Ann. Trop. Med. Parast.**, v. 81, n. 1, p. 77-78, 1987.
- PUERTO, G. Acidentes por Cobras In: SCHVARTSMAN, S. (coord.) **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. cap.13, p.143-149.
- QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle and regeneration after envenomation y *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, p. 339- 345, 1984.

- QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., RODRIGUES-SIMIONI, L., GIGLIO, J.R. Histopathological changes caused by a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Comparison with the effects of whole venom. Abstract. **Toxicon**, v. 23, p. 36-41, 1985.
- RAAB, W., KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p. 1017-1020, 1966.
- RAGE, J. Diversity of snakes. In: Bauchot, R. (edit) **Snakes a Natural History**. New York: Sterling Publishing Co., 1997, p.34-47.
- REICHL, A.P., SERRANO, S.M.T., ASSAKURA, M.T., MANDELBAUM, F.R. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 225-237, 1989.
- REID, H.A. Cobra-bites. **Brit. Med. J.**, v. 2, p. 540-561, 1964.
- REID, H.A., THEAKSTON, R.D.G. The management of snake bite. **Bull. World Health Org.**, v. 61, n. 6, p. 885-895, 1983.
- REZENDE, N.A., Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Biol. Res.**, v. 22, p. 407-416, 1989.
- RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T. Acidente por serpente venenosa: danos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21 (supl), p. 121-122, 1988.
- _____. Alteração na coagulação sanguínea e sangramento no acidente botrópico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21 (supl.), p. 120-121, 1988.
- ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano In: SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. cap. 1, p. 1.
- ROSENFELD, G., KELEN, E.M.A., NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. classification in different types and activities. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 30, p. 117-132, 1960/62.
- ROSENFELD, G. NAHAS, L., KELEN, G.M.A. Coagulant, proteolytic and hemolytic properties of some snake venoms. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E., DEULOFEU, V. **Venoms animals and their venoms**. New York, Academic Press, 1968. v. 1, cap. 9, p. 229-273.
- ROSENFELD, G. Acidentes por Animais Peçonhentos. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991, 8ª ed. cap. 115, p. 951-962.

- ROSS, B.D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.
- ROSS, B.D., EPSTEIN, F.H., LEAF, A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 225, n. 5, p. 1165-1171, 1973.
- ROZE, J.A. New world coral snakes (*Elapidae*): a taxonomic and biological summary. **Mem. Inst. Butantan**, v.46, p.305-338, 1982.
- RUSSEL, F.E. **Snake Venom Poisoning**. New York: Scholium International Grat Neck, 1983.
- SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G., DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.
- SANO-MARTINS, I.S., SANTORO, M.L., MORENA, P., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., TOMY, S.C., ANTONIO, L.C., NISHIKAWA, A.K., GONÇALVES, I.L.C., LARSSON, M.H.A., HAGIWARA, M.K., KAMIGUTI, A.S. Hematological changes inuced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. **Braz. J. Med Biol. Res.**, v. 28, p. 303-312, 1995.
- SANT, S.M., PUNDARE, N.M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to renal lesions. **J. postgrad. Med.**, v. 18, p. 181-188, 1972.
- SCHÖTTLER, W.H.A. Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. **Amer. J. Trop. Med.**, v. 31, p. 489-499, 1951.
- _____. Aspectos metodológicos da titulação de soros anti-peçonhentos. **Mem. Inst. Butantan**, v.36, p. 249-256, 1954.
- _____. Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 27, p. 73-83, 1955/56.
- SCHUREK, H.J. Application of the isolated perfused rat kidney. **Contr. Nephrol.**, v. 19, p. 176-190, 1980.
- SCHUREK, H.J., LOHFERT, H., HIERHOLZER, K. Na⁻ reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na⁻ - load). **Pflugers Arch. Ges. Physiol.**, v. 319, p. 1285, 1970.
- SEEDAT, Y.K., REDDY, J., EDINGTON, D.A. Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. **Nephron**, v. 13, p. 455-463, 1974.

- SHASTRY, J.C.M., DATE A., CARMAN, R.H.,JOHNY, K.V. Renal failure following snake bite: a clinicopathological study of nineteen patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, n. 5, p. 1032-1038, 1977.
- SILLES-VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R.S. Padronização da Titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 311-323, 1978/79.
- SILVA M.V., BUONONATO, A.M. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 47/48, p. 121-126, 1983/84.
- SILVA, O.A., LÓPEZ, M., GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n. 2, p. 401-407, 1979.
- SITPRIJA, V. BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephotoxity. In: LEE, C.Y. (edit.) **Snake Venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. cap. 28, p. 997-1018.
- SITPRIJA, V. SRIBHIBHADH, R. BENYAJATI, C. Hemodialysis in poisoning by sea-snake. **Brit. Med. J.**, v. 3, p. 218-219, 1971.
- SOERENSEN, B. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos. In: SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. cap. 5, p. 91-107.
- SOTO, J.G., PEREZ, J.C., MINTON, S.A. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 9, 875-882, 1988.
- TAKAHASHI, T., OHSAKA, A. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: complete separation of the principles from proteolytic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 207, p. 65-75, 1970.
- TAYLOR, J. Observations relative to the standardization of cobra antivenene. **Indian J. M. Research**, v. 28, p. 279-287, 1940.
- THOMAZINI, I., IUAN, F.C., CARVALHO, I., HERNANDES, D.A., AMARAL, I.F., PEREIRA, P.C.M., BARRAVIERA, B. Evaluation of platelet function and of serum fibrinogen levels in patients bitten by snakes of the genus *Crotalus*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 51-52, 1991.
- THOMSON, R.G. Distúrbios do crescimento. In: _____. **Patologia Geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, cap 5, p. 256-286.
- TRIMBLE, M.E., BOWMAN, R.H. Renal Na⁺ and K⁺ transport: effectas of glucose, pelmitate and alfa-bromopalmitate. **Am. J. Physiol.**, v. 225, n. 5, p. 771-784, 1973.

- TROIANO, J.C. Manejo Sanitario de Reptiles en Cautiverio. RA Prensa Veterinária Argentina. 1^a ed, Buenos Aires, 1991.
- VARAGUNAM, T. PANABOKKE, R.G. Bilateral cortical necrosis of the kidney following snake bite. **Postgrad. Med. J.**, v. 46, p. 449-451, 1970.
- VARANDA, E.A., GIANNINI, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes In: BARRAVIERA, B. (coord.) **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.14, p.205.
- VIDAL, J.C., STOPPANI, A.O.M. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Archs. Biochem. Biophys.**, v. 145, p 543-552, 1971.
- VIDAL, J.C., MOLINA, H., STOPPANI, A.O.M. A general procedure for the isolation and purification of phospholipases A₂ isoenzymes from *Bothrops* venom. **Acta. Physical. Latinoam.**, v. 23, p 91-104, 1972.
- VITAL BRAZIL, O., FARINA, R., YOSHIDA, L., OLIVEIRA, V.A. Pharmacology of crystalline crotoxin. III – cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p. 993-1000, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 26, p. 212-218, 1980.
- VITAL BRAZIL, O. Peçonhas In: CORBETT, C.E. **Farmacodinâmica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 71, p.1044-1074.
- ZAGANELLI, G.L., ZAGANELLI, M.G.M., MAGALHÃES, A., DINIZ, C.R., LIMA, M.E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*) **Toxicon**, v. 34, p. 807-819, 1996.
- ZINGALI, B.R., CARLINI, C.R., FRANCISCHETTI, I.M., GUIMARÃES, J.A. *Bothrops jararaca* snake venom: Effects on platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 58, p. 303-316, 1990.