



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Biotecnologia em Saúde

Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno  
total de *Bothrops lutzi*

Daniel Freire de Sousa

Fortaleza – CE  
2010



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno  
total de *Bothrops lutzi*

Daniel Freire de Sousa

Fortaleza – CE  
2010

Daniel Freire de Sousa

Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi*

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA  
2010

S696e Sousa, Daniel Freire de  
Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total  
de *Bothrops Lutzii* / Daniel Freire de Sousa. -- Fortaleza, 2010.  
151 f. ;il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro  
Área de concentração: Biotecnologia em Saúde  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de  
Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, 2010.

1. Toxinologia. 2. Rins. 3. Vasos sanguíneos. I. Monteiro, Helena Serra  
Azul (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em  
Biotecnologia. III. Título

CDD 660.6

CDD 639.2

# Daniel Freire de Sousa

Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi*

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 07/10/2010

## Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará – UFC

## DEDICATÓRIA

*À minha família, especialmente  
minha mãe, Rosa Freire, e minhas tias  
e tios; só eles sabem o quanto se  
esforçaram pra me trazer até aqui!*

*À Jamile Magalhães Ferreira,  
que sabe o quanto ela foi e é  
importante!*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosa Freire e à minha família (Tias: Antônia, Rita e Roseli; Tios: Roberto e José e Avós: Maria Freire e José Simão); agradeço por todos os esforços, incentivos e experiências nas quais fizeram com que eu chegasse até aqui... Não há palavra no mundo que traduzam toda essa gratidão!

À Jamile Magalhães, que incondicionalmente, em situações favoráveis e desfavoráveis, concordando ou não concordando, esteve sempre ao meu lado, e como sempre digo pra ela, você sabe o quanto foi, o quanto é e o quanto vai ser importante na minha vida. Muito obrigado pela paciência!

Meu eterno agradecimento à Dra. Helena Serra Azul, minha orientadora, que além de todos os conhecimentos passados e lições de vida, tenho que agradecer principalmente pela confiança em mim depositada, pois orientar um aluno recém formado e imaturo direto em um programa de doutorado não deve ser fácil! Muito obrigado!

Professora Alice Martins, obrigado por ter me orientado na iniciação científica e ter me apresentado a Dra. Helena, por ter desenvolvido em mim um espírito crítico e ter aberto as portas da academia. Obrigado minha eterna orientadora!

Agradeço, também, à Dra. Suzana Glória, pelas palavras de incentivo e pela constante atenção.

Aos colegas de pós-graduação do LFAVET: Terentia Norões, Rafael Ximenes, Roberta Jeane, Paulo César, Marta, Fabíola Carine, Profa. Alcínia, Profa. Marinetes, Antônio Gomes Neto e Diogo Augusto.

Aos alunos de IC que conheci no LFAVET, todos eles: Caio Abner, Natasha, João Paulo Saraiva, João Victor, Pedro, João Paulo Barbosa, Aline

Sampaio, Aline Araújo, Daniel de Paula, foi um prazer conhecê-los; claro que eu não ia esquecer da Bia (Beatriz Serra Azul), obrigado!.

Meu agradecimento especial vai para o grande amigo Claudênio Diógenes, que sempre esteve presente em todos meus caminhos acadêmicos. Obrigado cara! Que nossa amizade se perpetue cada vez mais.

Devo minha tese a uma herança, herança do Rafael Jorge, Rafinha, abrigado por tudo! Inclusive nos momentos que você teve a paciência de escutar minhas reclamações, mais ainda! Devo a você meus primeiros experimentos e o veneno com o qual eu trabalhei. Valeu por tudo!

Aos eternos alunos que conheci no Laboratório de Bioquímica Clínica, onde eu sou um anexo e me sinto muito bem como tal! Obrigado pela companhia de todos vocês e as experiências trocadas: Olavo Christian, Pablo Stefan, Cleidiana Aprígio, Grazielle Gomes, Vânia Angélica, Roberto Falcão, Jânio Emanuel, Cynara Cortez e Gervásio Alberto; além dos novatos: Richard Rarison, Paulo Arthur, Nayane Sales, Liana Silveira, Hector Galdino, Karolline Thomaz, Julyana Sales, Renata Sampaio.

Sílvia Freire, Francisca Alves, Sr. Juciê e Sr. Bento, obrigado pela dedicação nas determinações bioquímicas e pelos animais utilizados nos experimentos, se não fossem vocês nada disso existiria. Obrigado por todas as horas de dedicação!

Falando em Bioquímica Clínica, não me esqueci dos agora colegas de pós-graduação, Mariana Brito, Thamires Fontenele e Tiago Melo. Pessoal, obrigado pelos conselhos e atenção dada quando precisei.

Tenho que agradecer, também, ao René Duarte e á Renata Alves, atuais professores, mas que conheci como alunos e que me ensinaram muito, tanto sobre a vida, quanto à ciência. Valeu!



Meus sinceros agradecimentos à Professora Maria Goretti, no mínimo uma entusiasta, professora, obrigado pelas palavras de incentivo e pela confiança no que faço, além dos caminhos que a senhora abre pra mim.

Aos amigos de doutorado Antônio Carlos, vulgo Carlinhos e ao grande mestre Professor Célio, poço de conhecimento que a literatura preconiza! Obrigado pelos momentos bons durante essa jornada!

Ao Professor Said Fonseca, a quem sempre recorri quando precisei e por todos os conselhos dados, fora a paciência. Esse é um exemplo de profissional e de farmacêutico, pode ser que quando eu crescer eu chegue lá... Obrigado!

Ainda no segmento dos mestres, tenho que agradecer ao professor Dalgimar Beserra, que além de ter contribuído diretamente para esse trabalho, foi extremamente amigável, sincero e uma fonte de conhecimentos. Professor Dalgi, valeu por tudo mesmo!

Meus agradecimentos também vão para outro cara fantástico, o Professor Pedro Magalhães, exemplo de ética, calma e conhecimento, além de descontração. Professor, obrigado!

Falando do mestre, tenho que falar dos discípulos. O que a Terezinha Brito e o Francisco José Batista (Franzé) fizeram por mim não é tão comum. Continuem assim que serão professores excelentes pois vocês são demais e muito solícitos. Obrigado!

Meus agradecimentos aos outros alunos do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFAMULI): Breno, Hélder, Alfredo, Carol e Jéssica, sintam todos a minha gratidão, inclusive aqueles que não foram citados.

Obrigado pela amizade e pela atenção da Senhora Magalhães, ou popularmente conhecida como Patrícia Fonseca. Obrigado por tudo. Esse meu agradecimento se estende também ao meu camarada pernambucano Rodrigo

Siqueira, cujo único defeito ele sabe qual é! Valeu pelos bons momentos de conversa.

Tenho que agradecer especialmente a um sujeito chamado de Davi Jucá, cara gente boa e cuca fresca. Não esquecendo, claro, do Moisés Tolentino, do Vasco, do João Paulo e do Wylli, cujo sobrenome queniano não sei.

Professor Armênio, Beleza! Obrigado por tudo, inclusive pelos empréstimos de PE.

Ticiano Praciano, Juliana Freire, Suzana Bezerra, Taiana Pierdoná e Nathália, valeu pelos momentos divertidos no laboratório.

Não me esqueci dos colegas da RENORBIO, como o João Marcos, o Heraldo, a Fátima, o Ari, a professora Rita de Cássia, a Patrícia Facó, a Fabrícia Martins e a Paula Mathias. Agradeço a eles e a toda a turma.

Obrigado ao pessoal do Laboratório de Cultivo Celular (LCC), especialmente a Alba Fabíola e o Rodrigo Tavares, além da Kamila, Tiala, Gedaylon e Marcos.

Ramon Róseo, valeu por esses momentos de desespero e experimentos urgentes, só você sabe como deve ter sido difícil. Ficam meus agradecimentos e que você tenha muito sucesso.

Tenho que agradecer também à professora Diva Borges pela disponibilização do veneno, sem ela, nada disso seria possível!

Alexandre Havt, valeu pela eficiência, não somente do *real time*, mas pela sua e a dos seus genes, literalmente. Obrigado!

Aos secretários Karine Ribeiro e Paulo Wanderson do Programa de Pós Graduação da RENORBIO pela colaboração durante a realização desse trabalho.

Não poderia esquecer do Emídio Alves e da Márcia Borges, casal que sempre me aturou e escutou minhas bobagens. Tem também a Aura, secretária da Pós-graduação da Farmacologia. Meu muito obrigado!

Agradeço ao professor José Ferreira Nunes, sempre solícito e um excelente coordenador de pós-graduação. Agradeço aos outros componentes que fazem a coordenação da RENORBIO.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todas as condições dadas para o desenvolvimento dessa tese.

Aos animais de experimentação utilizados neste trabalho, cujo sacrifício de suas vidas, espero não ter sido em vão.

Meu agradecimento aos funcionários do LACT e do IBISAB, todos foram importantes!

Agradeço a todos os meus professores e colegas da graduação e pós-graduação, obrigado por tudo!

Não posso deixar de agradecer à minha primeira turma de alunos da Bioquímica Clínica I do curso de Farmácia da UFC (2013.1/2013.2). Obrigado galerinha, foi uma das melhores experiências da minha vida!

A quem eu esqueci, peço minhas desculpas, mas todos foram muito importantes para esse trabalho! Obrigado por tudo!

**“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem!”**

**João Guimarães Rosa - Escritor**

## RESUMO

A toxilogia é a ciência que se dedica ao estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas e animais, estando intimamente relacionada com a Biotecnologia em Saúde, uma vez que possibilita desvendar os mecanismos de ação das toxinas, desenvolvendo ferramentas farmacológicas, novos protocolos de tratamentos e favorecendo a melhores prognóstico. Inclui-se nesse contexto o estudo de toxinas de novas espécies de serpentes, como a *Bothrops lutzi*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da serpente *B. lutzi*. Os estudos em rim isolado de rato foram realizados em um sistema de perfusão que permite avaliar as possíveis alterações dos parâmetros renais, além de estudos com células epiteliais de túbulos renais de cachorro (MDCK), observando-se a possível expressão de genes pró-apoptóticos. Estudaram-se, ainda, as possíveis alterações vasculares induzidas por esse veneno em anéis de aorta e leitos vasculares mesentéricos. Os resultados encontrados demonstraram que a peçonha de *B. lutzi* (VBL) promoveu alterações significativas em todos os parâmetros renais estudados, principalmente na diminuição da pressão de perfusão ( $PP_{\text{controle } 90\text{min}} = 108,69 \pm 5,08 \text{ mmHg}$  vs.  $PP_{\text{VBL } 1,0\mu\text{g/mL } 90\text{min}} = 73,55 \pm 2,79 \text{ mmHg}$ ) e da resistência vascular renal ( $RVR_{\text{controle } 90\text{min}} = 5,32 \pm 0,57 \text{ mmHg. mL}^{-1}. \text{g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $RVR_{\text{VBL } 1,0\mu\text{g/mL } 90\text{min}} = 3,39 \pm 0,30 \text{ mmHg. mL}^{-1}. \text{g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ), além do aumento do fluxo urinário ( $FU_{\text{controle } 120\text{min}} = 0,160 \pm 0,020 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $FU_{\text{VBL } 10,0\mu\text{g/mL } 120\text{min}} = 0,981 \pm 0,103 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ) e do ritmo de filtração glomerular ( $RFG_{\text{controle } 120\text{min}} = 0,697 \pm 0,084 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $RFG_{\text{VBL } 10,0\mu\text{g/mL } 120\text{min}} = 3,152 \pm 0,342 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ) em pelo menos uma das concentrações estudadas. O dado mais relevante é que essa peçonha é altamente lesiva aos túbulos renais, sendo tal fato demonstrado com a redução do percentual de transporte dos eletrólitos sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) em todas as concentrações estudadas, independentemente da redução da PP, onde esses parâmetros foram reduzidos em pelo menos 10,0% quando comparado aos controles. Também foram observadas lesões tubulares nas análises histológicas (indícios de apoptose/dano celular direto), bem como foi constatada redução da viabilidade das células MDCK em até 92,34% (VBL 100 $\mu\text{g/mL}$ ); não se verificou a expressão de genes pró-apoptóticos CASP-3 e CASP-8 nesse protocolo ( $\text{CASP-3}_{\text{controle}} = 1,09 \pm 0,08$  vs.  $\text{CASP-3}_{\text{VBL}} = 1,01 \pm 0,08$ ;  $\text{CASP-8}_{\text{controle}} = 1,04 \pm 0,05$  vs.  $\text{CASP-8}_{\text{VBL}} = 0,93 \pm 0,06$ ). A redução da PP parece estar relacionada ao relaxamento de vasos renais, cujos efeitos vasodilatadores foram observados nos anéis de aorta, com relaxamento de 23,89% (VBL 20,0 $\mu\text{g/mL}$ ) embora não se tenha observado tais efeitos em leito vascular mesentérico. Assim, o veneno de *B. lutzi* parece comprometer principalmente os túbulos renais, independentemente das ações vasculares, além da morte celular ter ocorrido independentemente da expressão de genes pró-apoptóticos.

**Palavras-chave:** Toxinologia, Rins, Vasos sanguíneos.

## ABSTRACT

Toxinology is a science dedicated to the study of toxins derived from microorganisms, plants and animals; as it is closely related to health biotechnology, it allows to reveal the mechanisms of action of toxins, to develop pharmacological tools, new treatment protocols and to improve better prognoses. The study of toxins of new species of snakes such as *Bothrops lutzi* is included in this context. The aim of this study was to evaluate the renal and vascular changes promoted by the snake *B. lutzi* venom. Studies with isolated rat kidneys were performed in a perfusion system that allows to evaluate possible changes in renal parameters; further studies with renal tubular epithelial cells of dog (MDCK), permitted to observe the possible expression of pro-apoptotic genes. We studied also the possible vascular changes induced by this venom in aortic rings and mesenteric vascular beds. The results showed that the *B. lutzi* venom of (BLV) induced significant changes in all renal parameters studied, mainly the reduction of perfusion pressure ( $PP_{\text{control } 90\text{min}} = 108.69 \pm 5.08 \text{ mmHg}$  vs.  $PP_{\text{BLV } 1.0\mu\text{g/mL } 90\text{min}} = 73.55 \pm 2.79 \text{ mmHg}$ ) and renal vascular resistance ( $RVR_{\text{control } 90\text{min}} = 5.32 \pm 0.57 \text{ mmHg. mL}^{-1}. \text{g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $RVR_{\text{BLV } 1.0\mu\text{g/mL } 90\text{min}} = 3.39 \pm 0.30 \text{ mmHg. mL}^{-1}. \text{g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ), while increasing urinary flow ( $UF_{\text{control } 120\text{min}} = 0.160 \pm 0.020 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $UF_{\text{BLV } 10.0\mu\text{g/mL } 120\text{min}} = 0.981 \pm 0.103 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ) and glomerular filtration rate ( $GFR_{\text{control } 120\text{min}} = 0.697 \pm 0.084 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$  vs.  $GFR_{\text{BLV } 10.0\mu\text{g/mL } 120\text{min}} = 3.152 \pm 0.342 \text{ mL.g}^{-1}. \text{min}^{-1}$ ) in at least one of the concentrations studied. The most relevant fact is that this poison is highly toxic to the renal tubules, and this fact was demonstrated by the decrease of the percentage of transport of sodium (Na<sup>+</sup>), potassium (K<sup>+</sup>) and chloride (Cl<sup>-</sup>) in all concentrations, regardless of PP reduction. These parameters were reduced by at least 10.0% when compared to controls. Tubular damages were also observed by histological analysis (evidence of apoptosis/direct cellular damage); reduction of MDCK cell viability was noticed up to 92.34% (BLV 100.0 $\mu\text{g/mL}$ ); the expression of pro-apoptotic genes CASP-3 and CASP-8 was not observed in this protocol ( $\text{CASP-3}_{\text{control}} = 1.09 \pm 0.08$  vs.  $\text{CASP-3}_{\text{BLV}} = 1.01 \pm 0.08$ ;  $\text{CASP-8}_{\text{control}} = 1.04 \pm 0.05$  vs.  $\text{CASP-8}_{\text{BLV}} = 0.93 \pm 0.06$ ). PP reduction seems to be related to the relaxation of renal vessels of which vasodilatory effects were observed in aortic rings, with relaxation of 23.89% (BLV 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ), though we have not observed such effects in the mesenteric vascular bed. Thus, *B. lutzi* venom seems to affect mainly renal tubules, independently from the vascular actions; in addition, cellular death has occurred regardless of nonexpression of pro-apoptotic genes.

**Key words:** Toxinology, Kidneys, Blood vessels.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

% - símbolo de valor percentual

%TCl<sup>-</sup> - percentual de cloreto transportado

%TK<sup>+</sup> - percentual de potássio transportado

%TNa<sup>+</sup> - percentual de sódio transportado

%TpCl<sup>-</sup> - percentual de cloreto proximal transportado

%TpK<sup>+</sup> - percentual de potássio proximal transportado

%TpNa<sup>+</sup> - percentual de sódio proximal transportado

μEq.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - miliequivalente por grama por minuto

® - marca registrada

μg - micrograma

μg/mL - micrograma por mililitro

A - adenina

Ach - acetilcolina

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

CA - Califórnia

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar - complementary  
*deoxyribonucleic acid*

CE<sub>50</sub> - Concentração necessária para se observar 50% dos efeitos

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

Cosm - clearance osmótico

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

cm - centímetros

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados

$C_T$  - ciclo limiar - *threshold cycle*

SDS - dodecil sulfato de sódio

dNTP - desoxiribonucleotídeos

DNA - ácido desoxirribonucléico - *deoxyribonucleic acid*

DOP in - densidade ótica da inulina no perfusato

DOU in - densidade ótica da inulina na urina

DTT - DL-ditiotreitol

$E_{Cl^-}$  - potássio excretado

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

$E_{K^+}$  - potássio excretado

$E_{MAX}$  - efeito máximo

$E_{Na^+}$  - sódio excretado

EPM - erro padrão da média

EUA - Estados Unidos da América

F - senso - *forward*

$F_{Cl^-}$  - cloreto filtrado

Fen - fenilefrina

$FK^+$  - potássio filtrado

$F_{Na^+}$  - sódio filtrado

FPR - fluxo de perfusão renal

FU - fluxo urinário

G - guanina

g - grama

xG - força da gravidade

gF - grama-força



HE - hematoxilina-eosina

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IL - interleucina

IL-1 - interleucina 1

IL-10 - interleucina 10

IL-6 - interleucina 6

IRA - insuficiência renal aguda

K<sup>+</sup> - potássio

KCl - cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de magnésio dibásico

LCC - Laboratório de cultivo celular

L/h - litros por hora

LFAVET - Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas

LDH - enzima lactato desidrogenase

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio

MDCK - *Madin-Darby canine kidney* - células caninas renais de *Madin Darby*

mg - miligrama

mg/Kg - miligrama por kilograma

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - sulfato de magnésio heptahidratado

min - minuto

mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - mililitro por grama por minuto

mL/min - mililitros por minuto

mM - milimolar

mmHg - milímetros de mercúrio

mmHg. mL<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - milímetros de mercúrio por mL por grama por minuto

MO - Missouri

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio

n - letra que representa o número da amostra estudada

nm - nanômetros

NaCl - cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de sódio dibásico

NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio

NO - óxido nítrico

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NUROF - Núcleo Regional de Ofiologia

°C - graus Celsius

p/v - peso por volume

PBS - tampão fosfato - *phosphate buffer solution*

PCR - reação da polimerase em cadeia - *polymerase chain reaction*

PE-20 - tubo de polietileno número 20

PE-30 - tubo de polietileno número 30

pg - picograma

pH - potencial hidrogeniônico

Posm - osmolaridade do perfusato

PP - pressão de perfusão

qPCR - reação da polimerase em cadeia quantitativa - *quantitative polymerase chain reaction*

R - antisenso - *reverse*

RNA - ácido ribonucléico - *ribonucleic acid*

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RFG - ritmo de filtração glomerular

RVR - resistência vascular renal

SBF - soro bovino fetal

T - timina

TCl<sup>-</sup> - cloreto transportado

TK<sup>+</sup> - potássio transportado

TNa<sup>+</sup> - sódio transportado

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

USP - Universidade de São Paulo

Uosm - osmolaridade urinária

U/L - Unidade internacional por litro

VBL - veneno de *Bothrops lutzi*

vs.- *versus*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma para identificação das serpentes venenosas do território brasileiro.....	<b>39</b>
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos casos de acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero envolvido .....	<b>40</b>
<b>Figura 3.</b> Subespécies que compunham o complexo <i>Bothrops neuwiedi</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 4.</b> Reclassificação do complexo <i>Bothrops neuwiedi</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b> Fluxograma dos diferentes nomes da serpente <i>Bothrops lutzi</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 6.</b> Fotografias da serpente <i>Bothrops lutzi</i> , retratando suas características morfológicas .....	<b>47</b>
<b>Figura 7.</b> Exemplares de <i>Bothrops lutzi</i> encontradas por Loebmann (2009), demonstrando seus padrões de cores principais e alguns caracteres diagnósticos .....	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Mapa altimétrico retratando a distribuição geográfica e os locais de registro da serpente <i>Bothrops lutzi</i> ; indicação das localidades de ocorrência conhecidas anteriormente e o registro na Chapada da Ibiapaba .....	<b>49</b>
<b>Figura 9.</b> Principais componentes dos venenos de serpentes .....	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Fluxograma da patogênese da nefropatia após acidentes botrópicos.....	<b>54</b>
<b>Figura 11.</b> Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado .....	<b>62</b>
<b>Figura 12.</b> Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado .....	<b>62</b>
<b>Figura 13.</b> Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>63</b>

<b>Figura 14.</b> Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema.....	<b>63</b>
<b>Figura 15.</b> Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>64</b>
<b>Figura 16.</b> Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado .....	<b>65</b>
<b>Figura 17.</b> Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas .....	<b>65</b>
<b>Figura 18.</b> Identificação e canulação do ureter.....	<b>66</b>
<b>Figura 19.</b> Visualização da artéria mesentérica e da artéria renal, na qual também se identifica a artéria aorta .....	<b>67</b>
<b>Figura 20.</b> Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.....	<b>67</b>
<b>Figura 21.</b> Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.....	<b>68</b>
<b>Figura 22.</b> Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados.....	<b>70</b>
<b>Figura 23.</b> Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	<b>74</b>
<b>Figura 24.</b> Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney) .....	<b>75</b>
<b>Figura 25.</b> Esquema gráfico do isolamento de RNA total por automação no equipamento QiaCube® (Qiagen®).....	<b>77</b>
<b>Figura 26.</b> Visualização do segmento torácico da aorta .....	<b>81</b>
<b>Figura 27.</b> Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado.....	<b>81</b>
<b>Figura 28.</b> Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares .....	<b>82</b>
<b>Figura 29.</b> Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada...	<b>82</b>

<b>Figura 30.</b> Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato .....	<b>83</b>
<b>Figura 31.</b> Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.....	<b>83</b>
<b>Figura 32.</b> Isolamento da artéria mesentérica superior .....	<b>86</b>
<b>Figura 33.</b> Canulação da artéria mesentérica superior.....	<b>87</b>
<b>Figura 34.</b> Leito vascular mesentérico ainda ligado ao intestino do animal.....	<b>87</b>
<b>Figura 35.</b> Leito vascular mesentérico isolado e acoplado ao sistema.....	<b>88</b>
<b>Figura 36.</b> Foto do sistema de leito vascular mesentérico isolado de rato .....	<b>88</b>
<b>Figura 37.</b> Esquema do sistema de leito vascular mesentérico isolado de rato .	<b>89</b>
<b>Figura 38.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) na pressão de perfusão renal (PP) .....	<b>92</b>
<b>Figura 39.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) na resistência vascular renal (RVR) .....	<b>94</b>
<b>Figura 40.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no fluxo urinário (FU) .....	<b>95</b>
<b>Figura 41.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no ritmo de filtração glomerular (RFG).....	<b>96</b>
<b>Figura 42.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ) .....	<b>98</b>
<b>Figura 43.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) .....	<b>99</b>
<b>Figura 44.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte de cloreto (%TCl).....	<b>100</b>

<b>Figura 45.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte proximal de sódio (%TpNa <sup>+</sup> ) .....	<b>101</b>
<b>Figura 46.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte proximal de potássio (%TpK <sup>+</sup> ) .....	<b>102</b>
<b>Figura 47.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%TpCl <sup>-</sup> ) .....	<b>103</b>
<b>Figura 48.</b> Efeitos do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) no clearance osmótico (C <sub>osm</sub> ) .....	<b>104</b>
<b>Figura 49.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos e glomérulo normais.....	<b>105</b>
<b>Figura 50.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos e glomérulo normais.....	<b>105</b>
<b>Figura 51.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos normais.....	<b>106</b>
<b>Figura 52.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais .....	<b>106</b>
<b>Figura 56.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (0,1µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular e glomérulo normais.....	<b>107</b>
<b>Figura 57.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (1,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular e glomérulo normais.....	<b>107</b>
<b>Figura 58.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (10,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular e glomérulo normais.....	<b>108</b>

<b>Figura 59.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (0,1µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular.....	<b>108</b>
<b>Figura 60.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (1,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular.....	<b>109</b>
<b>Figura 61.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (10,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular.....	<b>109</b>
<b>Figura 62.</b> Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL) .....	<b>110</b>
<b>Figura 63.</b> Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle .....	<b>111</b>
<b>Figura 64.</b> Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno de <i>Bpthrops lutzi</i> .....	<b>111</b>
<b>Figura 65.</b> Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL) .....	<b>112</b>
<b>Figura 66.</b> Razão de expressão dos genes CASP-3 e CASP-8 em células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (0,39µg/mL) por 24h .....	<b>113</b>
<b>Figura 67.</b> Tônus do anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) e fenilefrina (1µM).....	<b>114</b>
<b>Figura 68.</b> Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) e fenilefrina (1µM) .....	<b>115</b>



<b>Figura 69.</b> Comportamento do anel de aorta isolado de rato exposto à fenilefrina (1 $\mu$ M) por 60min .....	<b>116</b>
<b>Figura 70.</b> Traçado obtido nos experimentos com fenilefrina (1 $\mu$ M) .....	<b>116</b>
<b>Figura 71.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) em anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M .....	<b>117</b>
<b>Figura 72.</b> Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) em diferentes concentrações (0,1-30,0 $\mu$ g/mL) .....	<b>117</b>
<b>Figura 73.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) por 5 e 20 minutos em anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M.....	<b>119</b>
<b>Figura 74.</b> Traçado representativo obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL; 1,0-20,0 $\mu$ g/mL) por diferentes períodos de tempo (5 e 20min) .....	<b>119</b>
<b>Figura 75.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) em anel de aorta isolado de rato com e sem endotélio pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M ....	<b>121</b>
<b>Figura 76.</b> Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato com endotélio pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL; 1,0-20,0 $\mu$ g/mL) .....	<b>121</b>
<b>Figura 77.</b> Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato sem endotélio pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL; 1,0-20,0 $\mu$ g/mL) .....	<b>122</b>
<b>Figura 78.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) na curva concentração-efeito de fenilefrina (0,001-30 $\mu$ M) em anel de aorta isolado de rato com endotélio.....	<b>123</b>
<b>Figura 79.</b> Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato com endotélio na curva concentração-efeito de fenilefrina antes e com a presença do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL; 20,0 $\mu$ g/mL) .....	<b>124</b>

<b>Figura 80.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL – 20,0µg/mL) em anel de aorta isolado de rato com endotélio sobre a concentração necessária para obtenção de 50% do efeito da fenilefrina (CE <sub>50</sub> ).....	<b>125</b>
<b>Figura 81.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL – 20,0µg/mL) em anel de aorta isolado de rato com endotélio sobre o efeito máximo da fenilefrina (E <sub>MAX</sub> ). .....	<b>125</b>
<b>Figura 82.</b> Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado.....	<b>127</b>
<b>Figura 83.</b> Efeito de diferentes concentrações de fenilefrina (1-10µM) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico .....	<b>128</b>
<b>Figura 84.</b> Traçado do efeito de diferentes concentrações de fenilefrina (1-10µM) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico .....	<b>129</b>
<b>Figura 85.</b> Efeito da fenilefrina (6µM) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico aos 20, 40 e 60min de infusão de fenilefrina .....	<b>130</b>
<b>Figura 86.</b> Traçado do efeito da fenilefrina (6µM) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico aos 20, 40 e 60min de infusão .....	<b>130</b>
<b>Figura 87.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico, com posterior infusão de fenilefrina 6µM para provar a viabilidade do órgão .....	<b>131</b>
<b>Figura 88.</b> Traçado do efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico, com posterior infusão de fenilefrina 6µM .....	<b>132</b>
<b>Figura 89.</b> Efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em infusão concomitante com fenilefrina 6µM.....	<b>133</b>
<b>Figura 90.</b> Traçado do efeito do veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em infusão concomitante com fenilefrina 6µM .....	<b>133</b>

**Figura 91.** Fotomicrografia dos leitos vasculares mesentéricos representativos de cada grupo estudado..... 134

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Prevalência de insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico.....	<b>53</b>
<b>Quadro 2.</b> Correlações clinicopatológicas renais após o envenenamento botrópico.....	<b>55</b>
<b>Quadro 3.</b> Sequência dos iniciadores usados na reação da polimerase em cadeia em tempo Real (qPCR).....	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>93</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>94</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>96</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>97</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>98</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores de percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>99</b>
<b>Tabela 7.</b> Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>100</b>
<b>Tabela 8.</b> Valores de percentual de transporte proximal de sódio (%TpNa <sup>+</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>101</b>

<b>Tabela 9.</b> Valores de percentual de transporte proximal de potássio (%TpK <sup>+</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>102</b>
<b>Tabela 10.</b> Valores de percentual de transporte proximal de cloreto (%TpCl <sup>-</sup> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>103</b>
<b>Tabela 11.</b> Valores de clearance osmótico (C <sub>osm</sub> ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>104</b>
<b>Tabela 12.</b> Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL) .....	<b>111</b>
<b>Tabela 13.</b> Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL) .....	<b>112</b>
<b>Tabela 14.</b> Valores da razão de expressão dos genes CASP-3 e CASP-8 em células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (0,39µg/mL) por 24h .....	<b>113</b>
<b>Tabela 15.</b> Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL .....	<b>115</b>
<b>Tabela 16.</b> Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato exposto à fenilefrina (1µM) em diferentes tempos (20, 40 e 60min).....	<b>116</b>
<b>Tabela 17.</b> Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato pré-contraindo com fenilefrina 1µM exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 0,1-10,0µg/mL .....	<b>118</b>

<b>Tabela 18.</b> Valores do tônus do anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1µM exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 1,0µg/mL, 10,0µg/mL e 20,0µg/mL em diferentes tempos de exposição .....	<b>120</b>
<b>Tabela 19.</b> Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1µM exposto ao veneno da serpente <i>Bothrops lutzi</i> (VBL) nas concentrações de 1,0µg/mL, 10,0µg/mL e 20,0µg/mL em tecido com e sem endotélio .....	<b>122</b>
<b>Tabela 20.</b> Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato com endotélio em diferentes concentrações antes e depois da exposição ao veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (VBL - 20µg/mL) nas concentrações de 0,001µg/mL-30µM .....	<b>124</b>
<b>Tabela 21.</b> Valores da concentração necessária para obtenção de 50% do efeito da fenilefrina (CE <sub>50</sub> ) em anel de aorta com e sem endotélio antes e depois da exposição ao veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (VBL – 20,0µg/mL) .....	<b>126</b>
<b>Tabela 22.</b> Valores do efeito máximo da fenilefrina (E <sub>MAX</sub> ) antes e depois da exposição ao veneno de <i>Bothrops lutzi</i> (VBL).....	<b>126</b>
<b>Tabela 23.</b> Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações de fenilefrina (1-10µM) .....	<b>129</b>
<b>Tabela 24.</b> Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações de fenilefrina (6µM) aos 20, 40 e 60 minutos .....	<b>131</b>
<b>Tabela 25.</b> Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações VBL (3,0; 10,0 e 30,0µg/mL) .....	<b>132</b>
<b>Tabela 26.</b> Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações VBL (3,0; 10,0 e 30,0µg/mL) em infusão concomitante com fenilefrina 6µM.....	<b>134</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução/revisão da literatura .....</b>	<b>36</b>
1.1	Uma abordagem sobre biotecnologia .....	36
1.2	A importância do estudo de venenos e toxinas .....	37
1.3	As serpentes brasileiras.....	38
1.4	O gênero <i>Bothrops</i> .....	42
1.5	O complexo <i>Bothrops neuwiedi</i> .....	42
1.6	A <i>Bothrops lutzi</i> : O SURGIMENTO DE UMA “NOVA ESPÉCIE” .....	46
1.7	A composição do veneno botrópico e suas consequências clínicas .....	50
1.8	A insuficiência renal aguda nos acidentes botrópicos .....	53
1.9	As complicações hemodinâmicas.....	56
1.10	A importância do estudo da peçonhas de novas espécies .....	57
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>59</b>
2.1	Geral.....	59
2.2	Específicos .....	59
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>60</b>
3.1	Animais de experimentação.....	60
3.2	Células MDCK .....	60
3.3	Veneno, fármacos e reagentes utilizados .....	60



3.4	Quantificação de proteínas do veneno pelo método de bradfor .....	61
3.5	Perfusão de rim isolado .....	61
3.5.1	Sistema de perfusão renal .....	61
3.5.2	Calibração do sistema .....	63
3.5.3	Solução perfusora.....	64
3.5.4	Técnica cirúrgica.....	64
3.5.5	Protocolo experimental .....	68
3.5.6	Análises bioquímicas .....	69
3.5.7	Cálculos dos parâmetros renais avaliados .....	69
3.5.8	Estudo histológico renal.....	71
3.6	Ensaio com cultura de célula .....	72
3.6.1	Cultivo das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) .	72
3.6.2	Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade .....	72
3.6.2.1	Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) .....	72
3.6.3	Ensaio para avaliação de expressão gênica .....	76
3.6.3.1	Isolamento de rna total.....	76
3.6.3.2	Reação da transcriptase reversa .....	77
3.6.3.3	Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).....	78
3.7	Anel de aorta .....	80
3.7.1	Técnica cirúrgica .....	80
3.7.2	Protocolos experimentais .....	84

3.7.2.1 Exposição ao veneno sem pré-contração .....	84
3.7.2.2 Exposição ao veneno com pré-contração .....	84
3.7.2.3 Contração após exposição ao veneno .....	85
3.7.3 Estudo histológico dos aneis de aorta .....	85
3.8 Leito vascular mesentérico .....	85
3.8.1 Protocolos experimentais .....	89
3.8.1.1 Infusão de veneno isoladamente .....	89
3.8.1.2 Infusão de veneno concomitantemente com fenilefrina	90
3.8.2 Estudo histológico do leito vascular mesentérico .....	90
3.9 Análises estatísticas .....	90
3.10 Aspectos éticos.....	91
<b>4 Resultados.....</b>	<b>92</b>
4.1.1 Perfusão renal .....	92
4.1.2 Histologia dos rins perfundidos .....	105
4.2 Ensaio com cultura de células .....	110
4.2.1 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade .....	110

4.2.2 Avaliação da expressão gênica .....	112
4.3 Anel de aorta.....	114
4.3.1 Exposição ao veneno sem pré-contração.....	114
4.3.2 Exposição ao veneno com pré-contração.....	115
4.3.2.1 Exposição à concentrações cumulativas de veneno .....	115
4.3.2.2 Exposição ao veneno por 5min e 20min.....	118
4.3.2.3 Exposição do anel de aorta com e sem endotélio ao veneno	120
4.3.3 Efeito do veneno de <i>bothrops lutzi</i> na curva concentração-efeito de fenilefrina .....	123
4.4 Histologia dos anéis de aorta .....	127
4.5 Leito vascular mesentérico .....	128
4.5.1 Infusão de veneno em leito sem contração .....	128
4.5.2 Infusão de veneno concomitante com fenilefrina.....	132
4.5.2 Histologia do leito vascular mesentérico.....	134
<b>5 Discussão dos resultados .....</b>	<b>135</b>
<b>6 Considerações finais .....</b>	<b>145</b>

**7 Conclusão..... 147**

**Referências bibliográficas..... 148**

## 1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 UMA ABORDAGEM SOBRE BIOTECNOLOGIA

Desde o início de sua história o homem explora a natureza, principalmente plantas e animais, com o intuito de construir abrigos, produzir roupas, alimentar-se e medicar-se. Desse modo, mesmo sem saber, a humanidade iniciava as primeiras explorações tecnológicas, ocasionando o início do desenvolvimento econômico e do progresso social (GARCIA, 1995).

Pode-se reportar, então, que o homem praticava biotecnologia desde tempos imemoráveis. Atualmente, as definições mais modernas se referem a um conjunto de ferramentas, geralmente oriundas de técnicas de engenharia genética e biologia molecular, que modificam organismos para geração de um produto que possa ser aproveitado industrialmente ou em larga escala (BIOLOGIA E SAÚDE, 2009).

Outros autores, entretanto, já retratam o tema como sendo um conjunto amplo de tecnologias que envolvem a utilização de seres vivos ou parte deles para gerar produtos, processos ou serviços. Os resultados desse ramo científico podem ser aplicados em diversas áreas e que, obviamente, não se restringe somente à utilização de técnicas de biologia molecular e modificações genéticas, mas conhecimentos aplicáveis em diversos setores como agropecuária, meio-ambiente, indústria e saúde (RENORBIO, 2008a).

Dessa forma, pode-se dividir a biotecnologia em quatro grandes áreas de concentração:

- a) Biotecnologia agropecuária;
- b) Biotecnologia industrial;
- c) Biotecnologia em recursos naturais;
- d) Biotecnologia em saúde.

(RENORBIO, 2008b)

O presente trabalho aborda, então, assuntos de duas áreas biotecnológicas. No caso, a biotecnologia de recursos naturais, uma vez que faz o uso de peçonha oriunda de uma serpente, cujos constituintes podem ter potencial para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas; além da biotecnologia em saúde, por gerar uma série de conhecimentos de ciência básica que possam vir colaborar em protocolos de tratamento de pacientes acidentados com serpentes do gênero *Bothrops*, mais especificamente com a espécie *Bothrops lutzi*.

Assim, torna-se necessário definir esses termos, biotecnologia em recursos naturais e biotecnologia em saúde. Biotecnologia em recursos naturais compreende a utilização de seres vivos ou parte deles (células, extratos, moléculas, etc.) em processos e serviços. Enquanto que a biotecnologia em saúde é compreendida, em toda a sua abrangência, como qualquer exploração tecnológica da biodiversidade para resolver problemas de saúde, seja na aplicação de desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, de agentes terapêuticos/profiláticos e/ou protocolos de tratamento, incluindo acidentes com animais peçonhentos (GARCIA, 1995).

## 1.2 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE VENENOS E TOXINAS

A ciência que se dedica ao estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas e animais é denominada Toxinologia e está em contínua expansão no Brasil e no mundo. Encontram-se inseridos neste contexto as plantas tóxicas, as bactérias e fungos produtores de toxinas, as aranhas, os sapos, os escorpiões, as abelhas, as vespas, as lacraias, as lagartas venenosas, os animais marinhos, as serpentes, dentre outros. O conhecimento dos mecanismos de ação das toxinas e anti-toxinas animais e vegetais faz-se necessário para a busca de técnicas de diagnóstico, tratamentos alternativos ao envenenamento e/ou para o desenvolvimento de novos fármacos (SOARES, 2005).

Essas toxinas estão, normalmente, envolvidas em mecanismos de defesa, além de possuírem características de letalidade, uma vez que são utilizadas para captura, abate e digestão de possíveis inimigos ou presas. Para tal, as mesmas devem ser biologicamente ativas, havendo possíveis aplicabilidades terapêuticas

para elas. Essa atividade estimula estudos que podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas e para a compreensão de mecanismos de ação, proporcionando a melhoria nos protocolos de tratamento de pacientes envolvidos em acidentes com esses seres vivos (LEWIS & GARCIA, 2003).

Podem ser citados como exemplos de aplicações dessas toxinas na terapêutica agentes como a toxina botulínica, derivada de microorganismos e que é amplamente utilizada na medicina estética e em pacientes com patologias motoras. Outra droga é o *curare*, alcalóide letal que é um bloqueador neuromuscular que foi introduzido na prática da anesthesiologia em procedimentos cirúrgicos. Esse alcalóide serviu de protótipo para o desenvolvimento do relaxante muscular conhecido como atracúrio (RANG, *et al.*, 2007)

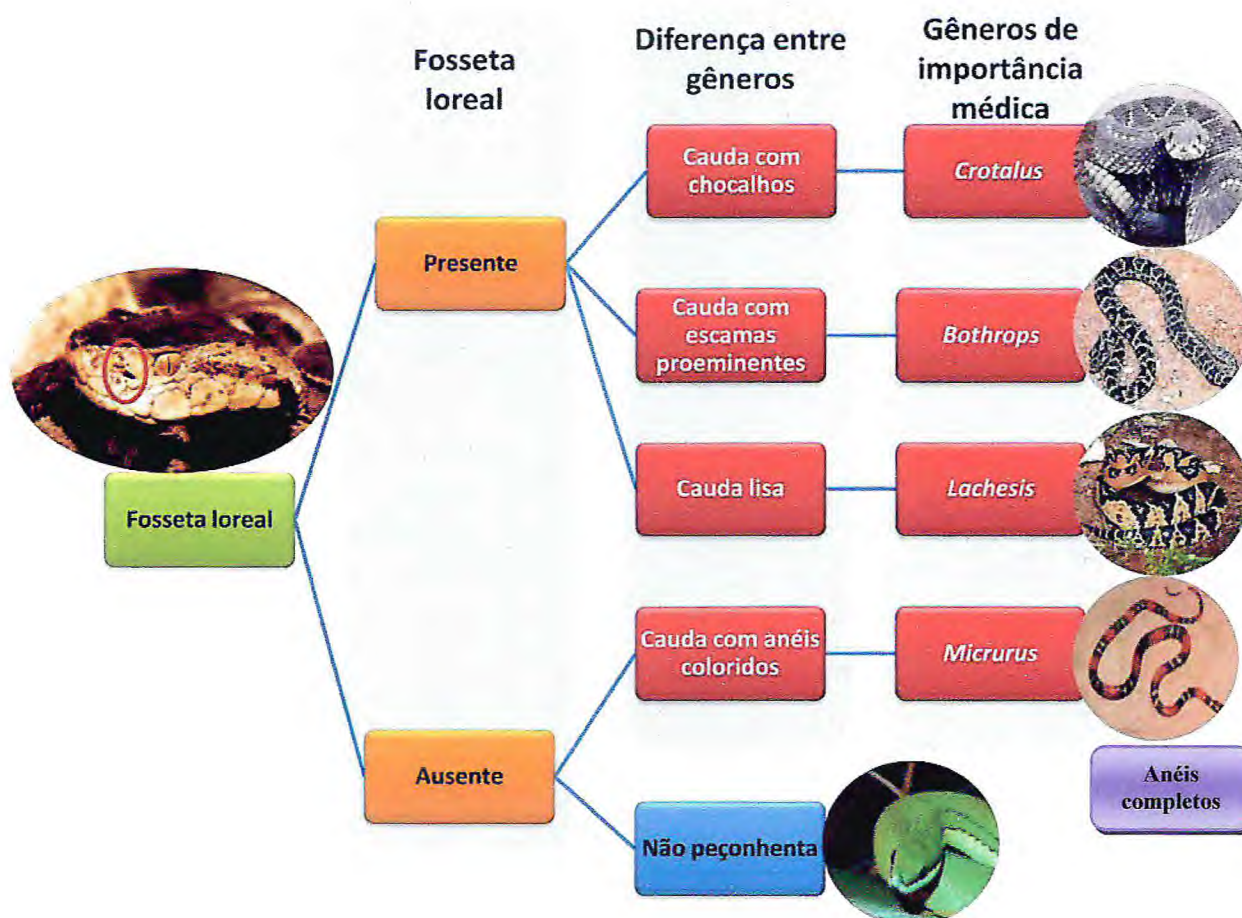
Um marco científico importante na história da toxinologia e da farmacologia foi a utilização de um peptídeo oriundo de uma peçonha de uma serpente (*Bothrops jararaca*) que foi utilizado como protótipo para o desenvolvimento de agentes empregados para o tratamento de doenças cardiovasculares com ampla aplicabilidade clínica. Esse agente terapêutico é o captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, cujos estudos de sua atividade foram iniciados por Rocha e Silva *et al.* (1949), culminando com as pesquisas de Sérgio Ferreira (FERREIRA, 1965), acarretando o posterior desenvolvimento da molécula final desenvolvida por Cushman e Odentti (LEWIS & GARCIA, 2003).

Observam-se que são diversos os grupos de organismos venenosos e peçonhentos passíveis de serem estudados. Uma das classes mais estudada é a *Reptilia*, mais especificamente a subordem *Serpentes* (ANDRADE-FILHO, 2001)

### 1.3 AS SERPENTES BRASILEIRAS

Há cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo e elas são distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, existem 358 espécies pertencentes a 78 gêneros. O nosso país contribui com aproximadamente 12% da diversidade desses

animais, sendo que no território brasileiro há 16% de todos os gêneros encontrados no mundo. Do número total de espécies que habitam o Brasil, 284 (79%) delas não são de interesse médico, uma vez que seus venenos não oferecem toxicidade aos seres humanos ou os animais não possuem aparelho inoculador eficiente. Vinte (20) espécies (6%) das serpentes são moderadamente perigosas, uma vez que conseguem inocular o veneno, mas não de maneira tão eficiente, devido a localização de suas presas (família *Colubridae*). Do total das serpentes brasileiras, 54 espécies são verdadeiramente peçonhentas (15%), sendo que 27 são da família *Elapidae* (“cobra coral”) e 27 são víboras com fosseta loreal (outros gêneros - família *Viperidae*) (SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO, 2008). Assim, os gêneros de importância médica no Brasil são *Micrurus*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, que podem ser diferenciados de acordo com o fluxograma a seguir (figura 1):

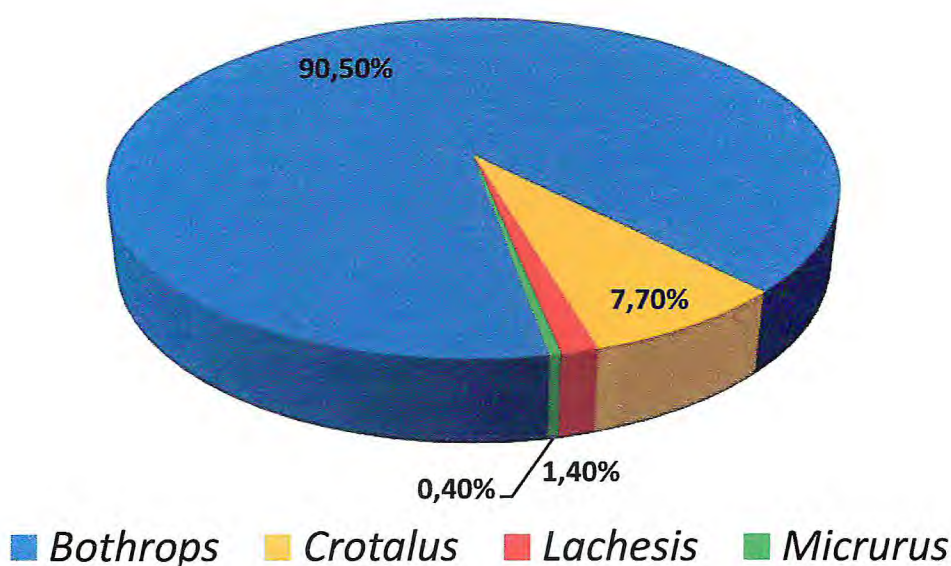


**Figura 1.** Fluxograma para identificação das serpentes venenosas do território brasileiro (ARAÚJO, 2003).



A organização mundial de saúde estima que, no mundo, ocorram por volta de 5.400.000 acidentes com serpentes peçonhentas. Desses acidentes, ocorrem cerca de 125.345 mortes ao ano, com taxa de mortalidade de 2,3%. Na Ásia ocorrem cerca de 100.000 acidentes/ano, enquanto que na África estima-se a ocorrência de 20.000 casos de picadas por serpentes anualmente. Entretanto esses dados são subestimados, o que torna o tema preocupante, uma vez que o número de casos de envenenamentos ofídicos deve ser bem maior (SITPRIJA, 2006).

No Brasil, são notificados anualmente 20.000 casos de acidentes ofídicos (CASTRO, 2006; CARREIRO *et al.*, s/d), dos quais 0,4% deles são com serpentes do gênero *Micrurus* (elapídico), 1,4% são com o gênero *Lachesis*, 7,7% com *Crotalus* e 90,0% com *Bothrops* (figura 2). Deve ser feita a ressalva de que há subnotificações, principalmente no Norte, ou seja, tanto o número de casos como o percentual atribuído a cada gênero pode variar bastante. Outro fato relevante e que deve ser destacado é que esse percentual deve variar de região para região, dada a dimensão continental do Brasil e a variação de biomas existentes (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001; SILVA & SPERANDIN, s/d).



**Figura 2.** Distribuição dos casos de acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero envolvido (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001; SILVA & SPERANDIN, s/d).

Os acidentes ofídicos representam, portanto, um sério problema de saúde pública, principalmente em países tropicais, o que engloba toda América Latina. Em países mais desenvolvidos como no Japão e Estados Unidos/Canadá, além de ocorrerem menos casos, há um baixo índice de mortalidade, que em percentual alcança índices menores que 1% para o Japão e 0,2% nos países da América do Norte (ACOSTA, *et al.*, 2000; HAVT, *et al.*, 2001; PINHO & PEREIRA, 2001; CHAVES *et al.*, 2005).

O ofidismo no Brasil merece grande atenção das autoridades sanitárias. A região que possui maior incidência de acidentes com serpentes é o Centro-Oeste (33 casos por 100.000 habitantes), seguido do pela região Norte (24 casos por 100.000 habitantes), Sul (16 casos por 100.000 habitantes), Sudeste (13 casos por 100.000 habitantes), deixando o Nordeste como o título de menor índice, com 7 acidentes por 100.000 habitantes. Mas tal fato pode esconder uma realidade preocupante, uma vez que o número reduzido de casos nessa última região pode ser consequência da subnotificação, dificuldade ao acesso aos serviços de saúde especializados por parte da população, além de um possível descaso por parte das autoridades públicas (PINHO & PEREIRA, 2001).

Dados que representam os acidentes ofídicos no estado do Ceará demonstram a epidemiologia do ofidismo e o seu panorama, onde o número de casos por ano varia de 61 a 387. Um fato comum que ocorre no Ceará é a maior prevalência de casos envolvendo o gênero *Bothrops*, cujos acidentes representam cerca de 88% do total, bem similar ao encontrado nacionalmente, no qual o gênero *Bothrops* responde por 90% do total de casos (FEITOSA *et al.*, 1997).

Representando o maior número de casos de ofidismo com serpentes peçonhentas em toda a América Latina, Brasil e Ceará (PINHO *et al.*, 2004), o gênero *Bothrops* é alvo de muitas pesquisas, principalmente em instituições brasileiras.

#### 1.4 O GÊNERO *Bothrops*

Dada a sua importância médica, recentemente vários estudos acumularam informações referentes à história natural de diversas espécies do gênero *Bothrops*. Esses estudos verificaram que ocorrem 30 espécies terrestres distribuídas do México à Argentina. Observaram-se que elas são capazes de viver em diversos *habitats*, desde densas florestas a campos abertos. Quando o gênero *Bothriopsis* foi considerado como sinônimo de *Bothrops*; esse último gênero passou a ter representantes primariamente terrestres, semiarboreais e totalmente arboreais, aumentando o número de espécies (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Em recente revisão taxonômica realizada no ano de 2008, são descritas por 36 espécies para gênero *Bothrops*, das quais 21 delas são encontradas em território brasileiro, o que corresponde a 58% do total (SILVA & RODRIGUES, 2008).

As principais espécies representantes do gênero são a *Bothrops jararaca* (jararaca), *B. alternatus* (urutu), *B. jararacussu* (jararacussu), *B. moogeni* (caiçara), *B. bilineatus* (jararaca verde), o complexo *B. neuwiedi* (jararaca de rabo branco), dentre outras (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001).

Recentemente o complexo da *B. neuwiedi* tem passado por uma série de reclassificações taxonômicas.

#### 1.5 O COMPLEXO *Bothrops neuwiedi*

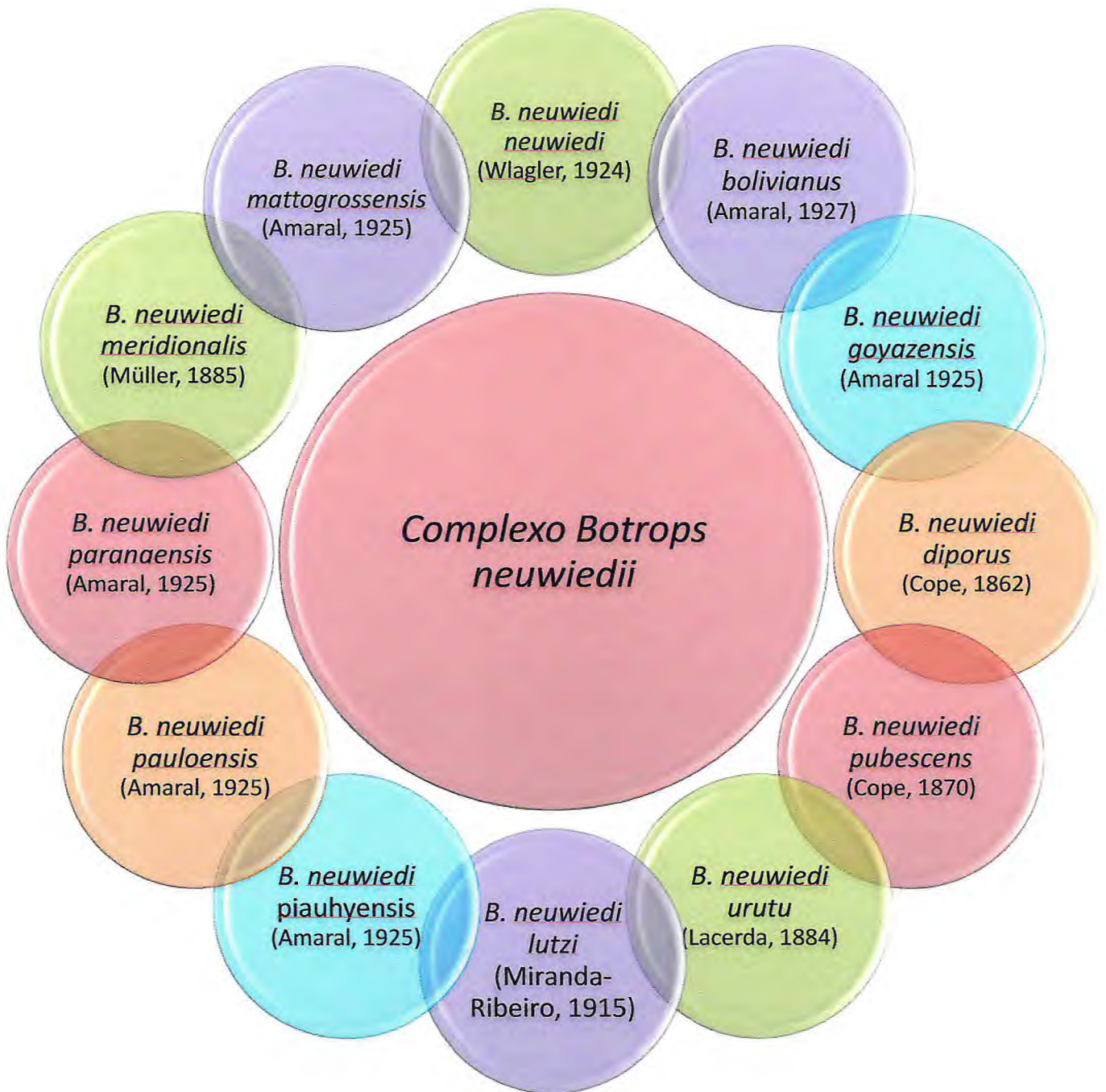
O complexo da *B. neuwiedi*, popularmente conhecido por diversos nomes, dentre eles jararaca de rabo branco, como já citado, jararaca pintada, jararaca boca de sapo, jararaca rabo de osso, além de tirapéia. Essas serpentes dificilmente ultrapassam os 90cm de comprimento, muito embora já se tenha encontrado serpentes desse complexo com 130cm ou 1,3m. Esses animais, como característica geral do grupo, são bastante agressivos, o que pode explicar o grande número de acidentes, além de estarem distribuídos em todo o território brasileiro, exceto em

algumas regiões do Norte (SILVA & SPERANDIN, s/d; CARREIRO *et al.*, s/d; SILVA & RODRIGUES 2008).

As *B. neuwiedi* ocorrem geralmente em regiões secas e semiáridas, usualmente nos locais rochosos das savanas, bem como em florestas tropicais, semitropicais e temperadas, havendo relatos de sua existência em países como a Bolívia, Peru, Argentina, Paraguai, Uruguai e no Brasil. Nesse último, as espécies pertencentes a esse complexo podem ser encontradas em estados como Rondônia, Maranhão, Piauí, Ceará, Mato Grosso, Goiás e em todos os estados do Sudeste e do Sul (VALLE & BRITES, 2008).

Os hábitos alimentares dessas serpentes são bastante diversificados, variando desde a ingestão de pequenos mamíferos, ovos de outras espécies, répteis, pássaros, anfíbios além de, em alguns casos, haver necrofagia. O ciclo reprodutivo desses animais é sazonal e bianual, com nascimento de ninhadas na estação chuvosa (dezembro/janeiro), verificando-se que o tamanho da prole varia de 4 a 15 filhotes (MONTEIRO *et al.*, 2006; VALLE & BRITES, 2008).

Nesse complexo havia 12 subespécies distribuídas ao longo da América do Sul, sendo descritas originalmente por Wagler (1984), no estado da Bahia – Brasil. Depois desse primeiro registro taxonômico, foram descritas várias subespécies que não levavam em consideração a variação geográfica. As considerações feitas para classificação eram baseadas apenas na coloração do corpo e nas marcas encontradas na cabeça das serpentes. O complexo *B. neuwiedi* possuía, então, 12 subespécies, como demonstrado na figura 3.



**Figura 3.** Subespécies que compunham o complexo *Bothrops neuwiedii* (SILVA & RODRIGUES, 2008).

A ortografia “*neuwiedii*” (com dois “i”) foi utilizada, no início, por Wagler, em 1830, entretanto foi revertido por Hoge, em 1966, para escrita inicialmente proposta pelo mesmo Wagler, em 1824. Embora tenha havido essa alteração em escrita, ela é irrelevante. Silva, no ano de 2000, revisou o complexo *B. neuwiedii* e publicou seus achados em um capítulo do livro de Campbell & Lamar (2004). Mesmo com

esse último trabalho, uma nova espécie descoberta ainda necessitava ser descrita. Para tal, o mesmo autor apresentou uma nova publicação que justifica o novo arranjo taxonômico, além de revelar as características de uma nova espécie (SILVA & RODRIGUES, 2008). A nova classificação considera, atualmente, a existência de 7 (sete) espécies oriundas do complexo *B. neuwiedi*, arranjadas da seguinte forma (figura 4):

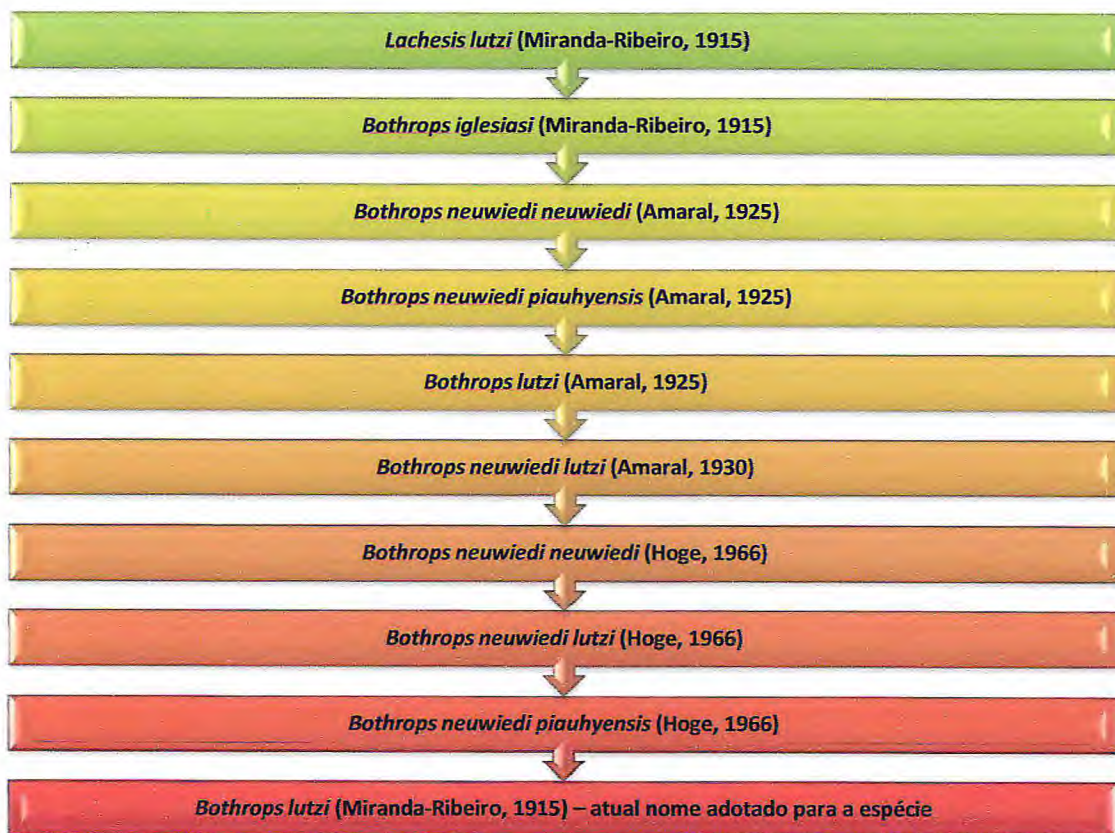
<i>B. neuwiedi</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi goyazensis</i>; <i>B. neuwiedi meridionalis</i>; <i>B. neuwiedi paranaensis</i>; <i>B. neuwiedi urutu</i>.</li></ul>
<i>B. diporus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi diporus</i>.</li></ul>
<i>B. mattogrossensis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi bolivianus</i>; <i>B. neuwiedi mattogrossensis</i>.</li></ul>
<i>B. pauloensis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi pauloensis</i>.</li></ul>
<i>B. pubescens</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi pubescens</i>.</li></ul>
<i>B. lutzi</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. neuwiedi neuwiedi</i>; <i>B. neuwiedi piauihyensis</i>; <i>B. neuwiedi lutzi</i>.</li></ul>
<i>B. marmoratus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nova espécie.</li></ul>

**Figura 4.** Reclassificação do complexo *Bothrops neuwiedi* (SILVA & RODRIGUES, 2008).

Desse modo, um complexo composto por 12 subespécies foi totalmente reorganizado, tendo a elevação de 5 subespécie ao nível de espécie, sendo que duas dessas passaram a englobar outras subespécies (*B. mattogrossensis* e *B. lutzi*); continuou a própria espécie nominal (*B. neuwiedi*), que herdou 4 subespécies; além de ter sido descrita uma nova espécie (*B. marmoratus*), fazendo um número final de 7 espécies (SILVA & RODRIGUES, 2008). É justamente uma dessas espécies que é estudada no presente trabalho, no caso, a *B. lutzi*.

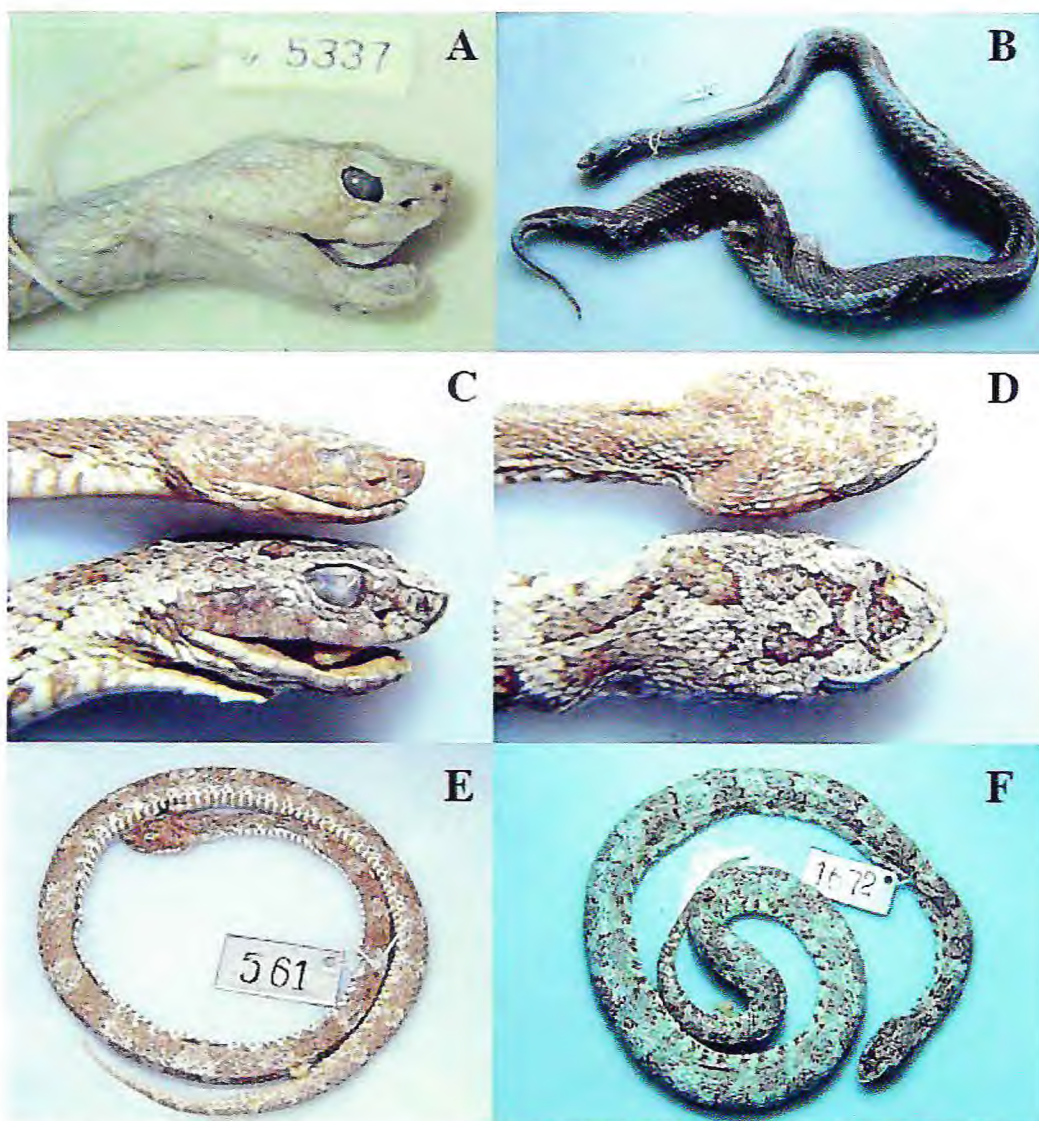
### 1.6 A *Bothrops luzi*: O SURGIMENTO DE UMA “NOVA ESPÉCIE”

Essa “nova espécie”, a *Bothrops lutzi*, derivada do complexo das *B. neuwiedi*, englobou a subespécie que lhe dá o nome principal, outras duas subespécies do mesmo complexo e uma espécie à parte. A evolução do nome da espécie de tal serpente pode ser descrita de acordo com o fluxograma da figura 5 (SILVA & RODRIGUES, 2008):



**Figura 5.** Fluxograma dos diferentes nomes da serpente *Bothrops lutzi* (SILVA & RODRIGUES, 2008).

A coloração da *B. lutzi* varia do creme ao cinza. A serpente possui manchas dorsolaterais na cor marrom, cinza ou pretas. Destaca-se que essas manchas não são bem definidas, possuindo bordas brancas. As imagens referentes a essa espécie podem ser vistas na figura 6.

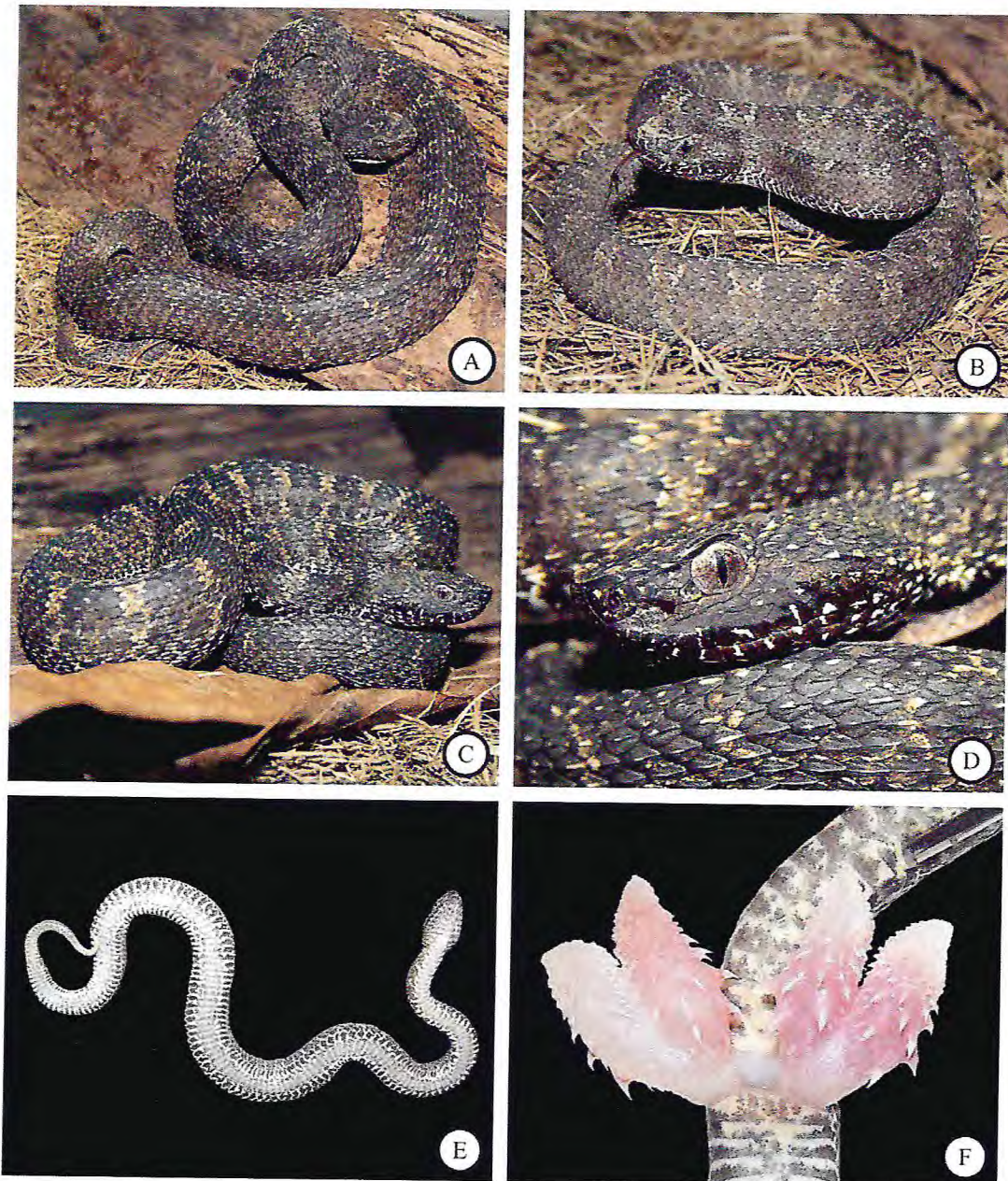


**Figura 6.** Fotografias da serpente *Bothrops lutzi*, retratando suas características morfológicas, onde as letras A, B, C, D E e F representam diferentes exemplares de coleções.

Fonte: SILVA & RODRIGUES, 2008



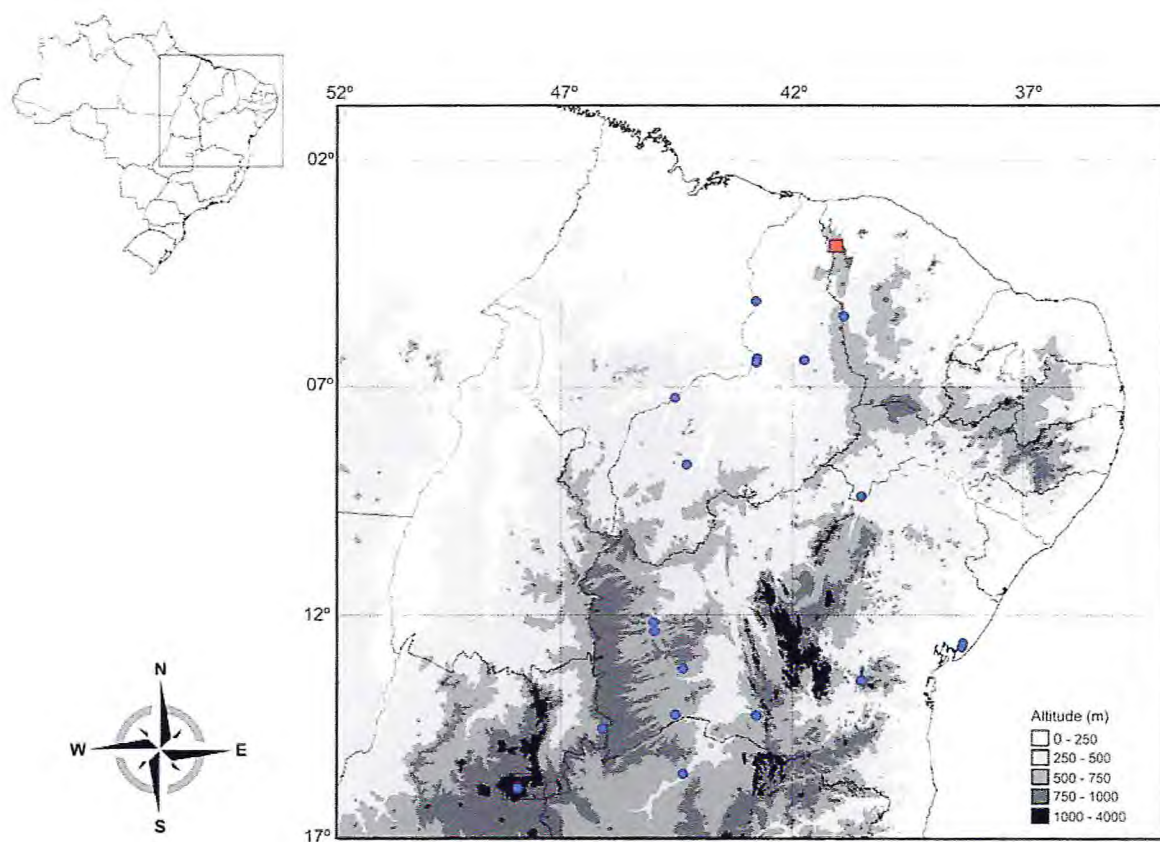
Podem ser verificados exemplares da *B. lutzi* registrados fotograficamente por Loebmann (2009), observando-se o perfil de cores sem variações do animal e suas características taxonômicas que permitem sua diferenciação (figura 7).



**Figura 7.** Exemplares de *Bothrops lutzi* encontradas por Loebmann (2009), demonstrando seus padrões de cores principais e alguns caracteres diagnósticos. A-C) Vista geral de fêmeas adultas com comprimento de 72,0; 45,2 e 59,0 centímetros, respectivamente; D) Detalhe da cabeça do animal; E) Padrão ventral de cor de uma fêmea juvenil (34 centímetros) e F) de um Hemipénis de um adulto do sexo masculino (52,8 centímetros).

Fonte: LOEBMANN, 2009.

Exemplares de *B. lutzi* foram observados somente no Brasil, com registro nos estados do Ceará, Piauí, Bahia, Pernambuco, Tocantins, Goiás e Minas Gerais (LIRA-DA-SILVA *et al.* 2003; SILVA, 2004; BORGES-NOJOSA & CASCON 2005; FREITAS & SILVA, 2007). Sua existência também foi reportada no estado de São Paulo (SILVA & RODRIGUES, 2008), além de haver sua criação e reprodução em cativeiro no estado do Ceará, como relatado por Brito (2005). A distribuição dos achados da *B. lutzi* pode ser visualizada na figura 8.



**Figura 8.** Mapa altimétrico retratando a distribuição geográfica e os locais de registro da serpente *Bothrops lutzi*; indicação das localidades de ocorrência conhecidas anteriormente (círculos azuis) e o registro na Chapada da Ibiapaba (quadrado vermelho).

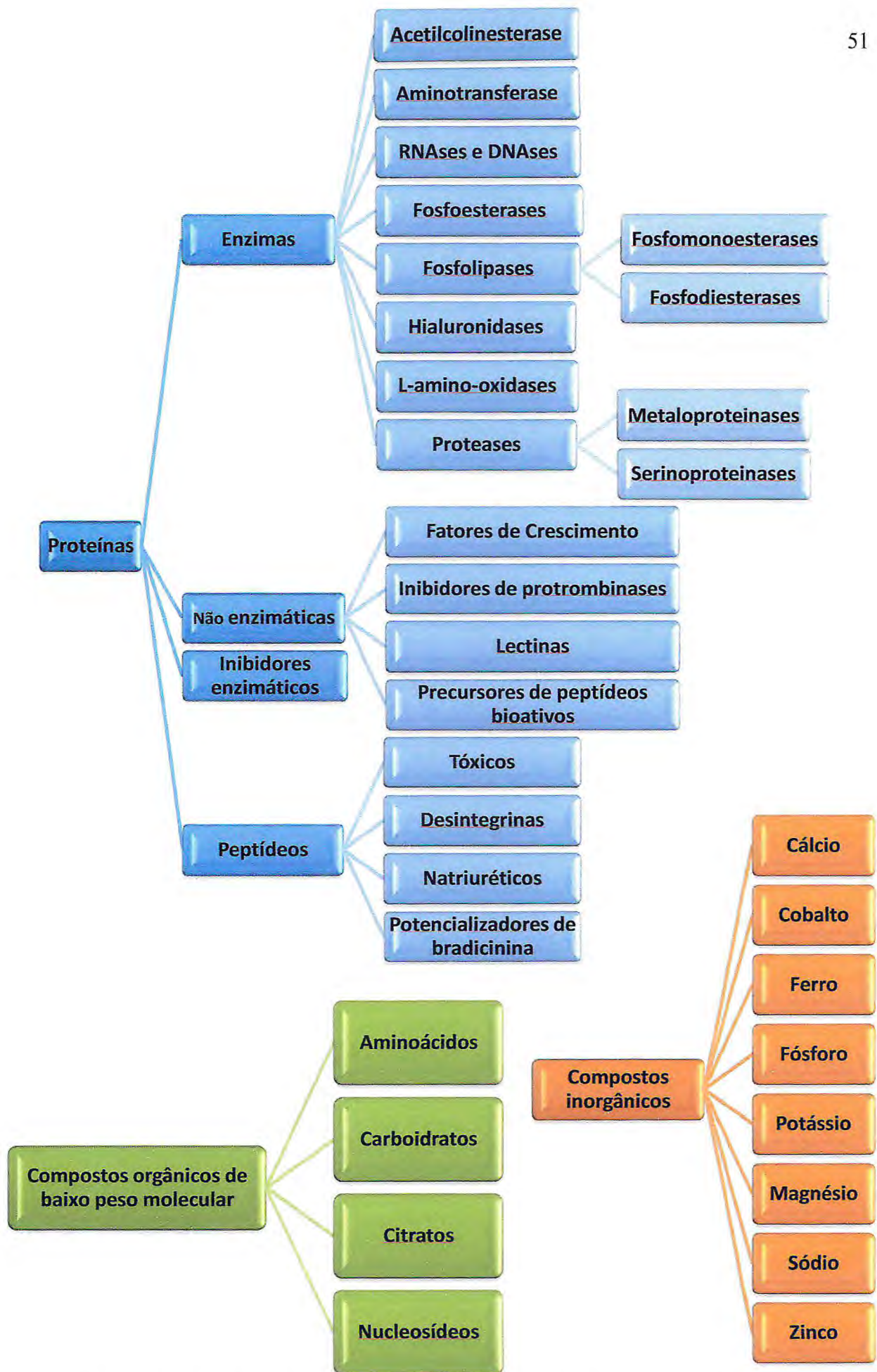
Fonte: LOEBMANN, 2009.

Destaca-se, ainda, que os exemplares presentes em cativeiro se encontram no Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Os primeiros achados no estado do Ceará foram realizados por Borges-Nojosa & Cascon (2005), no município de Brejo Santo, estado do Ceará, além de Loebmann (2009) ter documentado recentemente o registro de 5 exemplares, de fevereiro a novembro de 2007, na Chapada da Ibiapada, fronteira do Ceará com o Piauí.

Dados científicos que dizem respeito à descrição da espécie são raros. Em relação a possíveis acidentes e estudos de atividade biológica da peçonha dessa serpente é verificada uma maior escassez. Estudos biológicos com o veneno dessa serpente foram realizados em sistema de perfusão de rim isolado (SOUSA *et al.*, 2009b) e em anel de aorta de rato (SOUSA *et al.*, 2009a). Enquanto que outros estudos referentes aos efeitos biológicos da peçonha de *B. lutzi* são desconhecidos.

## **1.7 A COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS CLÍNICAS**

A composição da peçonha das serpentes pode ser influenciada por vários fatores. Dentre eles podem ser citados a alimentação do animal, a idade do mesmo, época do ano, tempo de jejum, tipo de presa, dentre outros. Além dessas discrepâncias mais relacionadas aos comportamentos e influência do tempo e do clima, observam-se variações entre gêneros e espécies, o que, obviamente, faz com que os venenos tenham as mais diversas composições e efeitos. Até mesmo dentro de uma mesma espécie pode haver esse tipo de variação (QUEIROZ, *et al.*, 2008). De um modo geral, os venenos de serpentes são compostos por três grupos de moléculas: Proteínas; compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos. Esses componentes são mais detalhados na figura 9 (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).



**Figura 9.** Principais componentes dos venenos de serpentes (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Muitos compostos têm sido isolados dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, tais como proteases (serinoproteinases e metaloproteinases), Fosfolipase A<sub>2</sub>, L-aminooxidase, 5'-nucleotidasas, hialuronidase e lectinas. Tais substâncias são responsáveis por mais de 90% do peso seco do veneno (QUEIROZ, *et al.*, 2008).

Estudos de proteômica e de espectroscopia de massa revelaram que 51,5% e 14,0% do total dos componentes protéicos do veneno da *Bothrops jararaca* são de metaloproteinases e de serinoproteinases, respectivamente. A atividade proteolítica dos venenos botrópicos tem sido correlacionada com a patogênese dos principais efeitos locais e sistêmicos (FOX *et al.*, 2006).

Até 1945, apenas os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais realizavam estudos relacionados aos acidentes ofídicos e com animais peçonhentos. Isso pode ser explicado pelo fato da localização do Instituto Butantan (São Paulo - 1900), Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro - 1919) e o Instituto Ezequiel Dias (Minas Gerais - 1907). Foram justamente esses estados que mais se desenvolveram e iniciaram as pesquisas relacionadas às características clínicas de acidentados com serpentes, incluindo os acidentes botrópicos (BOCHNER & STRUCHINER, 2003).

Com a catalogação dos dados dos primeiros Institutos que fazem registros clínicos, associados com as informações dos Centros de Atendimento Toxicológico de diversos estados, passou-se a compreender e descrever as principais complicações clínicas após acidentes com as serpentes do gênero *Bothrops*. Os pacientes apresentam, de um modo geral, dor local, necrose na área da picada, hipotensão, hemorragia, edema nas conjuntivas, equimose (extravasamento de sangue para os tecidos), efeitos no sistema nervoso como mialgia e paralisia, dor abdominal e falência renal (SITPRIJA, 2006; SANTORO *et al.*, 2008).

O veneno botrópico tem características proteolíticas, coagulantes e atividade hemorrágica, além de demonstrar ação nefrotóxica. Diferentes constituintes biologicamente ativos são relatados na composição da peçonha desse gênero e são responsáveis por ações específicas. Entretanto, diferentes toxinas juntas possuem sinergismo e induzem efeitos mais severos (PINHO *et al.*, 2008).

As manifestações locais tais como edema, bolhas e necrose são causadas pela ação proteolítica do veneno. As lesões resultantes das proteases, esterases, hialuronidases e fosfolipases liberam mediadores inflamatórios (AMARAL *et al.*, 2001). Outras toxinas são capazes de ativar, isoladamente ou simultaneamente o fator X e a protrombina (ações pró-coagulantes). O consumo desses elementos da cascata de coagulação acarreta desordens nas hemostasia. As ações hemorrágicas são atribuídas, ainda, à componentes do veneno conhecidos como metaloproteinases dependentes de zinco e hemorragininas, que além de possuírem atividade em capilares, são capazes, no caso dessa última, de inibir a agregação plaquetária (PINHO *et al.*, 2008; SANTORO *et al.*, 2008).

Mesmo que sejam descritos todos esses sintomas, um dos mais graves é a insuficiência renal aguda. A prevalência de tal sintomatologia após o acidente botrópico pode variar de 1,6 a 38,5% dos casos (PINHO *et al.*, 2008).

### 1.8 A INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA NOS ACIDENTES BOTRÓPICOS

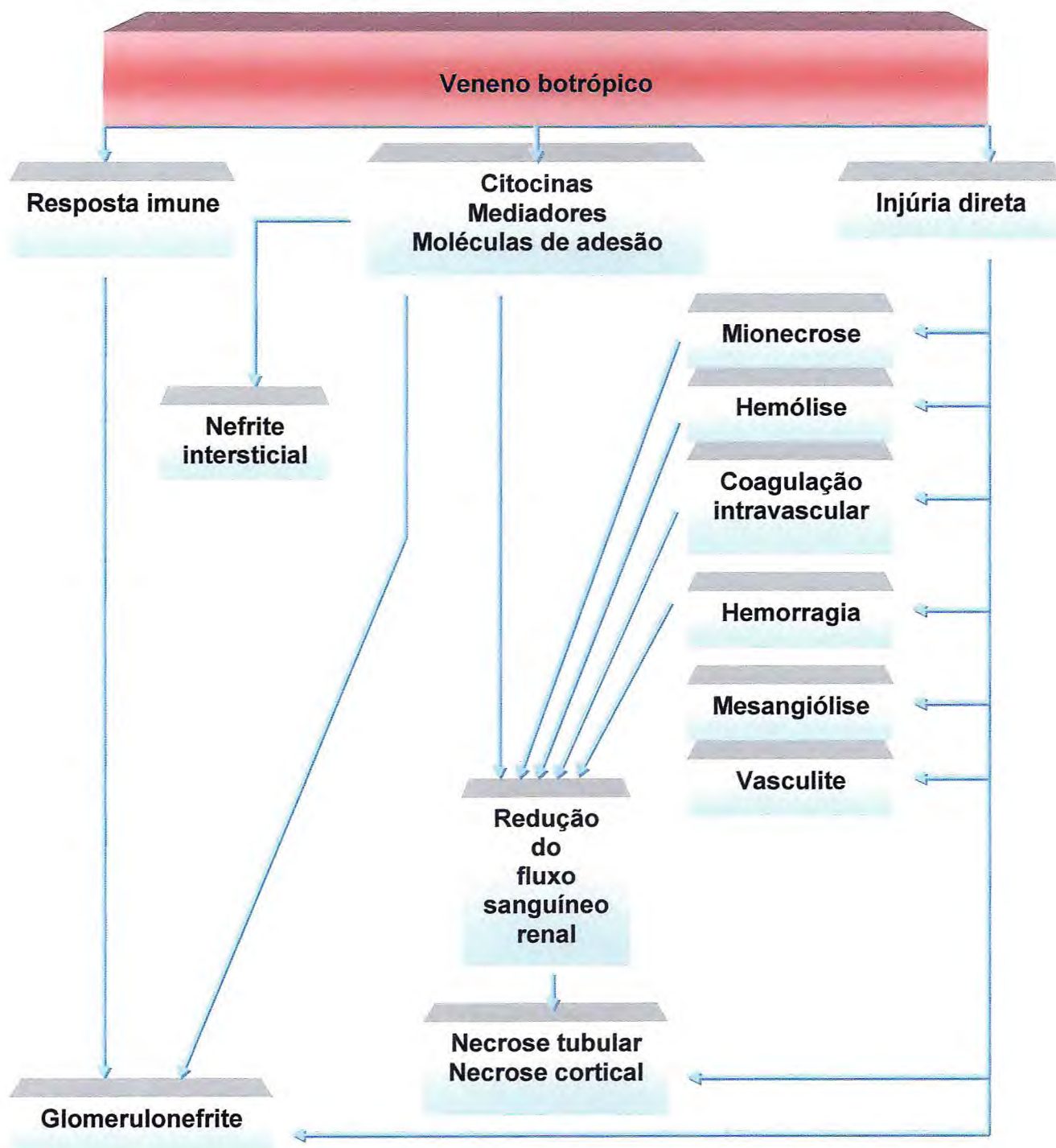
A prevalência de insuficiência renal após os acidentes botrópicos é bastante variável e na literatura podem ser verificados muitos índices percentuais que variam tanto em relação ao período no qual o estudo foi realizado, bem como pela técnica de diagnóstico empregada para a avaliação do caso (quadro 1 - PINHO *et al.*, 2008).

**Quadro 1.** Prevalência de insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico.

Autor	Ano	% IRA
Cupo <i>et al.</i>	1985	10,5
Pinto <i>et al.</i>	1987	1,6
Queiroz & Moritz	1989	6,0
Kouyouumdjian <i>et al.</i>	1990	6,0
Nishioka & Silveira	1992	5,0
Ribeiro & Jorge	1997	1,6
Rodrigues Acosta <i>et al.</i>	2000	1,6
Bucaretschi <i>et al.</i>	2001	1,4
Otero <i>et al.</i>	2002	38,5

Fonte: PINHO *et al.*, 2008.

O que se pode constatar com tais dados é que há comprometimento renal após acidentes botrópicos. Os mecanismos mais prováveis podem ser visualizados na figura 10 (SITPRIJA, 2006):



**Figura 10.** Fluxograma da patogênese da nefropatia após acidentes botrópicos (SITPRIJA, 2006).

A patogênese da lesão renal em acidentes botrópicos é complexa e como nos outros acidentes ofídicos há dois possíveis tipos de mecanismos de ação, que é a ação direta do veneno no rim e os efeitos inflamatórios resultante da liberação de várias citocinas e mediadores. As fosfolipases, componentes extremamente ativos, promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores. Metaloproteínases dependentes de zinco induzem a liberação inicial de Fator de necrose tumoral. Todos esses mediadores iniciam o desenvolvimento das complicações teciduais, incluindo a IRA (SITPRIJA, 2006).

Então, as principais patologias renais e suas correlações clínicas geradas após os acidentes botrópicos são resumidas no quadro 2 (SITPRIJA, 2006; PINHO *et al.*, 2008).

**Quadro 2.** Correlações clinicopatológicas renais após o envenenamento botrópico.

Patologia	Manifestação clínica renal
Mesangiólise	Função renal normal, achados urinários normais ou hematúria
Glomerulonefrite mesangial proliferativa	Função renal normal, achados urinários normais ou hematúria. Podem ocorrer casos de proteinúria branda ou grave com completa resolução do caso
Glomerulonefrite proliferativa difusa	Insuficiência renal leve, hematúria e proteinúria
Glomerulonefrite proliferativa extracapilar (usualmente associada com necrose tubular)	Insuficiência renal severa e hematúria com curso clínico prolongado
Vasculite (usualmente associada com necrose tubular)	Insuficiência renal severa e hematúria com curso clínico prolongado
Necrose tubular	Insuficiência renal aguda
Nefrite intersticial difusa aguda (usualmente associada com necrose tubular)	Insuficiência renal severa e hematúria com curso clínico prolongado
Necrose cortical	Insuficiência renal aguda severa com dano residual ou sem recuperação



Como se pode observar, muitas das complicações renais possuem correlações com alterações vasculares, cuja patogênese é vista a seguir.

### 1.9 AS COMPLICAÇÕES HEMODINÂMICAS

Os mecanismos nos quais os venenos ofídicos, e por conseqüência, o veneno botrópico, exercem alterações renais ainda são bastante obscuros. Em estudos realizados com camundongos, observaram-se que os venenos de *B. atrox* e o veneno de *B. jararaca* induziram o aumento sérico do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina -1 (IL-1), IL-6, IL-10 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), além de óxido nítrico (NO), substância vasoativa que promove um grande vasorelaxamento. Dessa maneira, além de haver uma regulação de uma resposta imune possivelmente exacerbada, há alterações hemodinâmicas consideráveis. Os mecanismos precursores para a liberação desses mediadores ainda são desconhecidos, muito embora se saiba que alguns componentes do veneno botrópico podem atuar diretamente em células endoteliais, macrófagos e leucócitos circulantes, estimulando a síntese e a liberação de citocinas (PETRICEVICH *et al.*, 2000; SANTORO *et al.*, 2008).

Uma das complicações comuns nos acidentes botrópicos é a hipotensão. Esse achado clínico é capaz de promover um estado de perfusão insuficiente para vários órgãos, incluindo o rim, podendo desencadear desde redução da pressão intraglomerular até mesmo falência cardíaca ou hipóxia cardíaca, que, por fim, pode culminar com um quadro de IRA (ABUELO, 1995).

Nas complicações hemodinâmicas após os acidentes botrópicos, não estão envolvidos apenas mecanismos pressóricos. Ressalta-se que algumas metaloproteinases podem induzir apoptose endotelial ou morte celular, o que seria suficiente para haver disfunção dos vasos e promover uma série de alterações no sistema circulatório, importantíssimo na manutenção da função renal (SITPRIJA, 2006).

Além da ação em tecidos vasculares, várias são as conseqüências dos compostos do veneno botrópico sobre elementos figurados do sangue. Dentre elas podem ser destacadas a trombocitopenia, o que promove hemorragias e acarreta problemas ou complicações hemodinâmicas. Além do consumo de elementos responsáveis pela hemostasia, há o consumo de proteínas que participam da cascata da coagulação como já foi descrito anteriormente, o que piora o caso hemorrágico (SANTORO *et al.*, 2008).

Todos esses achados associados podem acarretar uma insuficiência renal, como descrito por diversos autores. Novamente verifica-se o papel da hemodinâmica renal e sua fundamental importância para a manutenção da função renal em pacientes acidentados. Na grande maioria dos casos, os distúrbios pressóricos e hemostáticos (coagulação) podem ser utilizados para estimar o prognóstico de pacientes acidentados com serpentes do gênero *Bothrops* (ABUELO, 1995).

#### **1.10 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA PEÇONHA DE NOVAS ESPÉCIES**

O gênero *Bothrops* contribui com o maior número de espécies em nosso território, além de proporcionar o maior número de acidentes. Os estudos relacionados ao fracionamento de venenos de serpentes de todas as espécies, incluindo as novas, demonstram grande variedade qualitativa e quantitativa nos componentes das peçonhas botrópicas. Essa variedade pode ser intraespécies e interespecies. Fatores já descritos como a idade do animal, localização geográfica (critério para classificação taxonômica), clima, condições alimentares, procedimento de extração do veneno, ou a própria variedade genética individual do exemplar, podem significar grandes diferenças nas atividades biológicas encontradas. Outro fato relevante é a quantidade de veneno que atinge os tecidos, determinando o tipo de atividades, havendo padrões de resposta celulares completamente diferentes, dependendo das concentrações plasmáticas de peçonha ou da quantidade de veneno acumulado em determinado tecido e o tipo de célula afetado (AIRD, 1985).

São essas ponderações que são importantes para se verificar os efeitos biológicos de novas espécies como a *B. lutzi*, cujos estudos são escassos e podem contribuir sobremaneira para compreensão de mecanismos de acidentes botrópicos no rim e em estruturas vasculares, além de ser possível a identificação de características peculiares de seu envenenamento.

As informações obtidas podem contribuir para melhorar e embasar os protocolos terapêuticos, bem como para bioprospecção dos componentes do veneno, havendo a possibilidade de geração de ferramentas farmacológicas e um direcionamento para o fracionamento racional de peçonha dessa serpente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da serpente *Bothrops lutzi*, contribuindo para a melhoria de possíveis protocolos terapêuticos, além de propiciar uma caracterização e o fracionamento racional do veneno com a perspectiva de gerar novas ferramentas farmacológicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ⇒ Quantificar as proteínas presentes no veneno da serpente *B. lutzi*;
- ⇒ Verificar os efeitos induzidos pelo veneno da serpente *B. lutzi* em um sistema de perfusão de rim isolado de rato;
- ⇒ Observar possíveis alterações histológicas promovidas por essa peçonha em rins isolados de ratos;
- ⇒ Estudar as alterações induzidas pelo veneno de *B. lutzi* em cultura de células de epitélio de túbulos renais de cachorro (células MDCK), além da possível expressão de genes apoptóticos;
- ⇒ Estudar possíveis alterações vasculares em anel de aorta de rato utilizando diferentes concentrações da peçonha de *B. lutzi*;
- ⇒ Verificar possíveis alterações histológicas em de anéis de aorta expostos ao veneno de *B. lutzi*;
- ⇒ Descrever os efeitos vasculares promovidas da peçonha de *B. lutzi* em leito vascular mesentérico isolado de rato;
- ⇒ Estudar histologicamente os leitos vasculares perfundido com o veneno de *B. lutzi* para verificar possíveis alterações.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

Ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 250 e 300g foram usados nos experiemntos. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec<sup>®</sup>) e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, eles eram submetidos a jejum de 8 a 12 horas com água “*ad libitum*”.

#### **3.2 CÉLULAS MDCK**

As células MDCK foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo - USP) e todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Professora Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes.

#### **3.3 VENENO, FÁRMACOS, REAGENTES E SAIS UTILIZADOS**

O veneno de *Bothrops lutzii* (VBL) foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Diva Maria Borges Nojosa, Coordenadora do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Nesse local, as serpentes da espécie *B. lutzii* foram identificadas e catalogadas, bem como o veneno foi extraído. Os fármacos, reagentes e sais utilizados para a realização dos experimentos que serão descritos foram obtidos da empresa Sigma<sup>®</sup> (Saint Louis, MO - EUA).

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO VENENO PELO MÉTODO DE BRADFORD

Com a finalidade de se verificar a quantidade de proteínas por peso seco de veneno, uma vez que a peçonha de *Bothrops lutzi* ainda não foi caracterizada, *procedeu-se com o método de Bradford*. Este método espectrofotométrico baseia-se na incorporação proporcional do corante Coomassie às proteínas e foi descrito por Bradford (1976). A análise foi realizada por meio de um reagente já preparado e pronto para o uso - Bradford-Dye<sup>®</sup>, Bio-Rad<sup>®</sup> (Berkeley, CA - EUA), cuja metodologia seguida foi de acordo com as indicações do fabricante. Para isso, uma solução de venenos na concentração de 1µg/µL foi preparada e 100µL desta foram adicionados a 2,5mL de reagente de Bradford (em triplicata). Depois, a absorção da preparação foi lida em espectrofotômetro (Beckman<sup>®</sup> DU 640<sup>®</sup>) no comprimento de onda de 595nm. Com o auxílio de uma curva de calibração concentração vs. absorbância, construída com albumina bovina sérica, obteve-se as concentrações de proteína da amostra por 100µL.

### 3.5 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

#### 3.5.1 SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL

De forma a se verificar os efeitos do veneno de *Bothrops lutzi* em parâmetros renais, realizaram-se experimentos com rins de isolados ratos. A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a presente técnica de perfusão. Esse sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) e é composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à mesma temperatura (37 °C). Esse sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (em menor quantidade) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação adaptada ao próprio sistema, como demonstrado nas figuras 11 e 12.

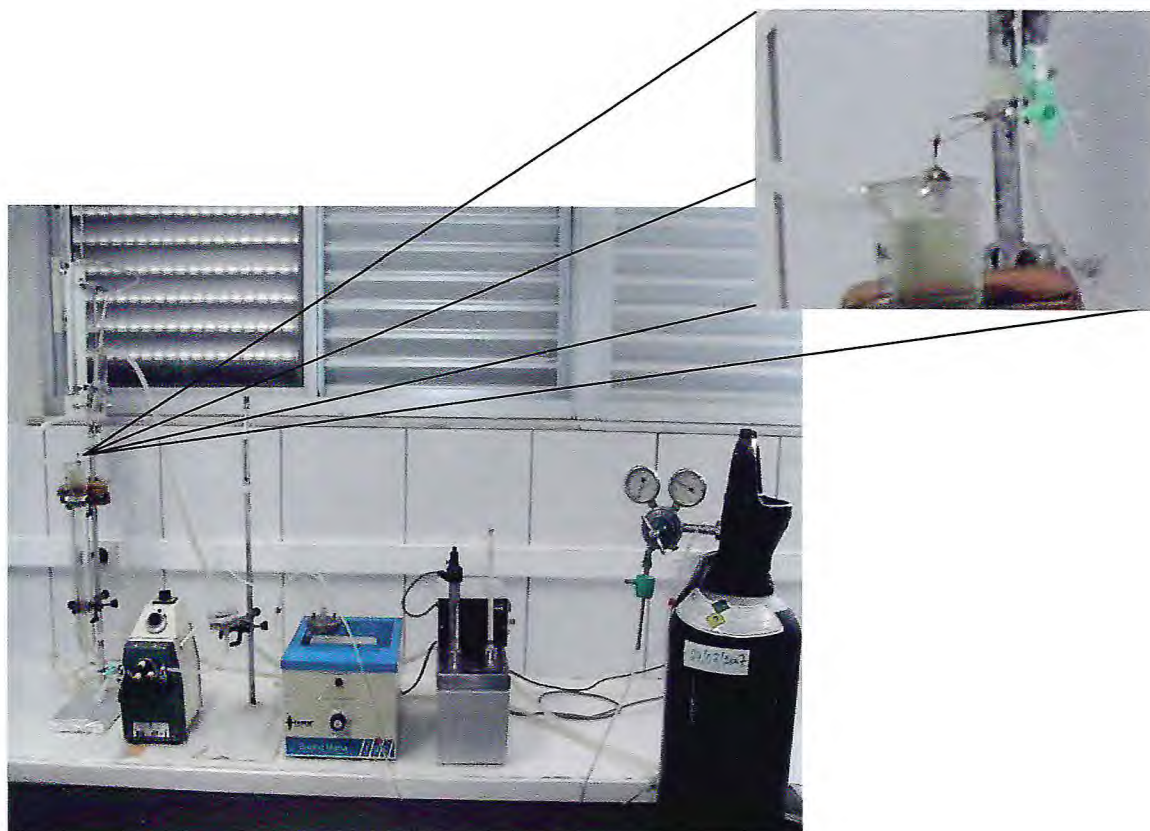
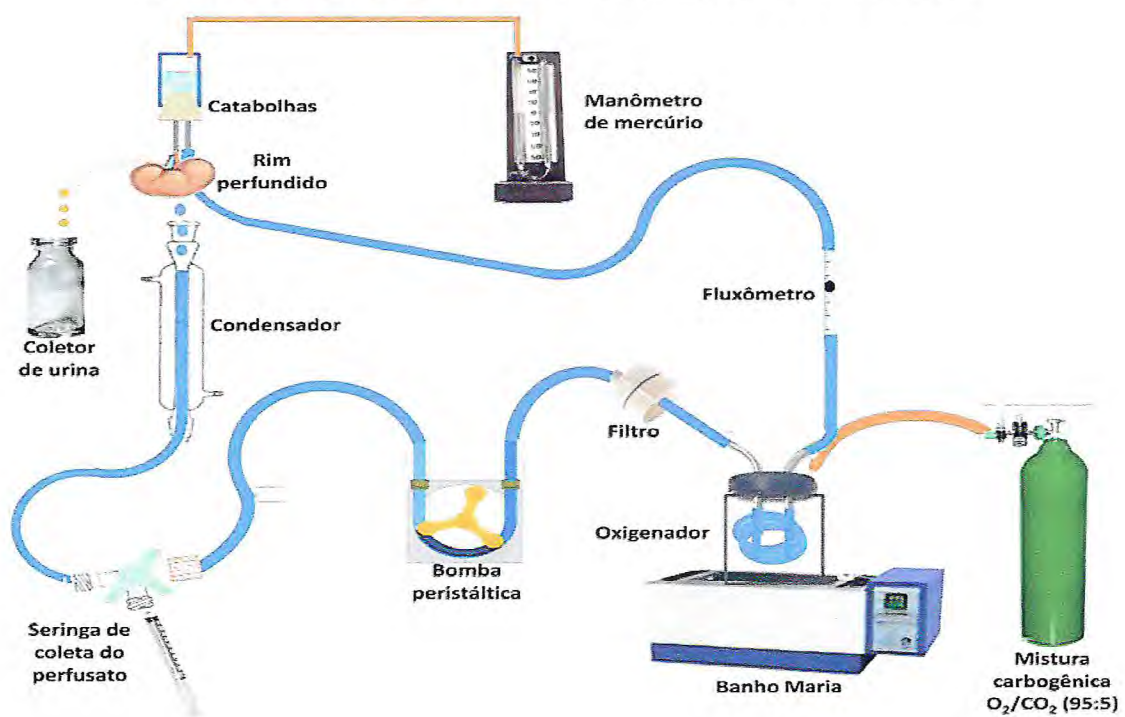


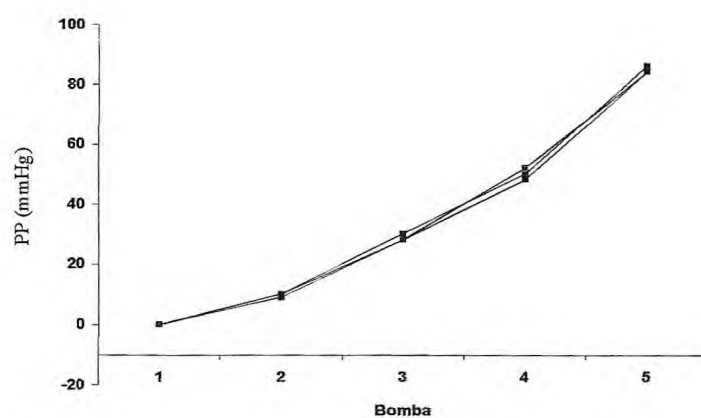
Figura 11. Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.



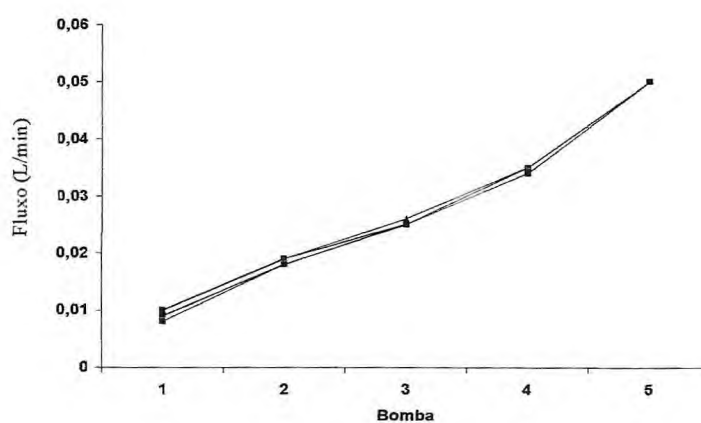
**Figura 12.** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

### 3.5.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

O sistema foi calibrado antes do início de cada experimento. Foram avaliados, em cada uma das bombas (de 1 a 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 13, 14 e 15.

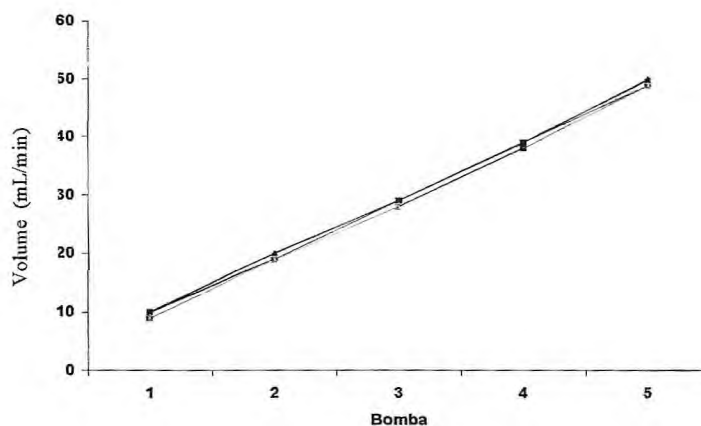


**Figura 13.** Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 14.** Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).





**Figura 15.** Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

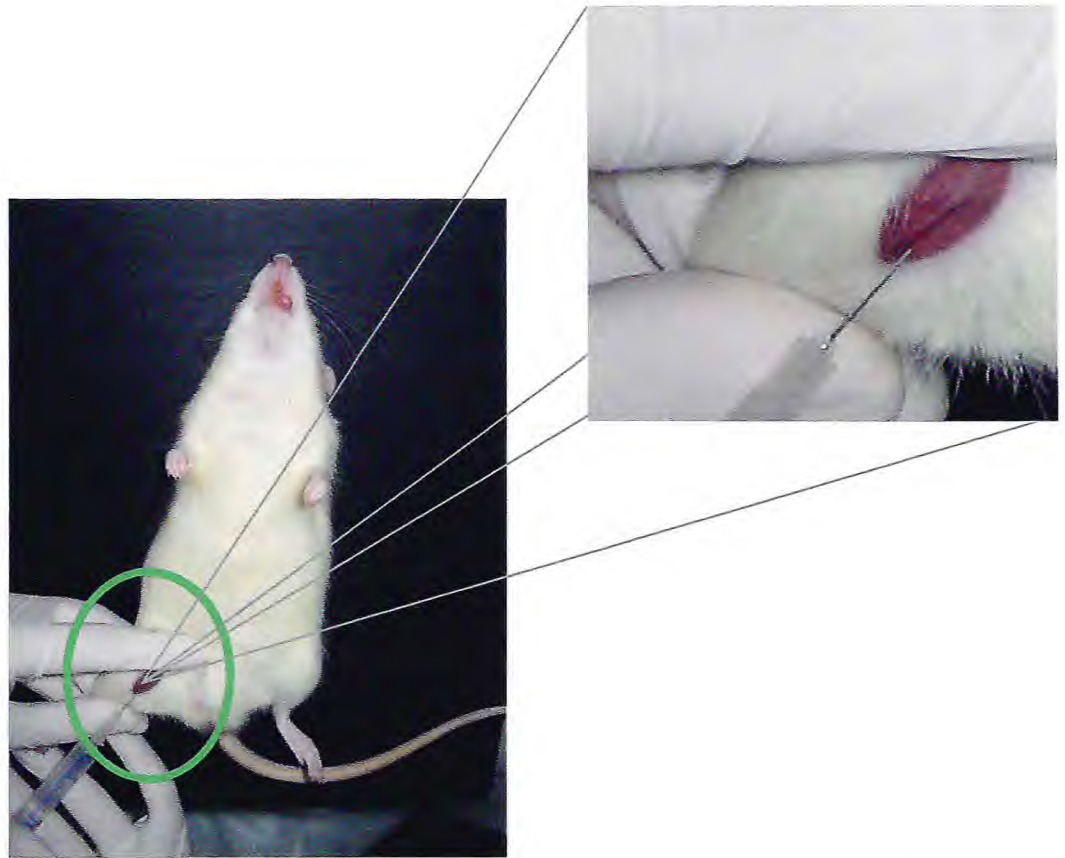
### 3.5.3 SOLUÇÃO PERFUSORA

A solução perfusora utilizada foi a de Krebs-Henseleit, contendo albumina bovina a 6% (p/v) e dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (HANSON & BALLARD, 1968).

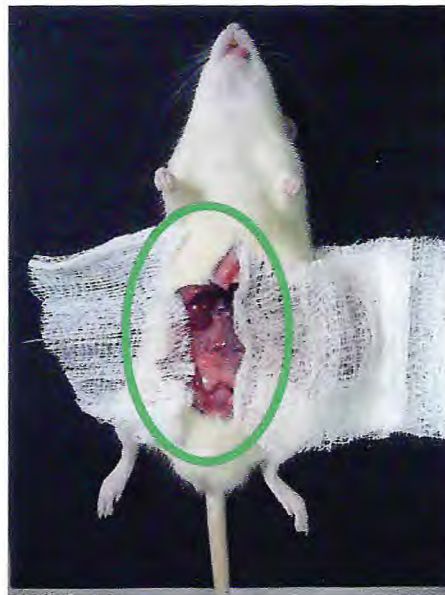
### 3.5.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais (n=6) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e o manitol (300mg/3mL – independentemente do peso) foi administrado (figura 16), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter (BOWMAN, 1970).

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas abdominais (figura 17).

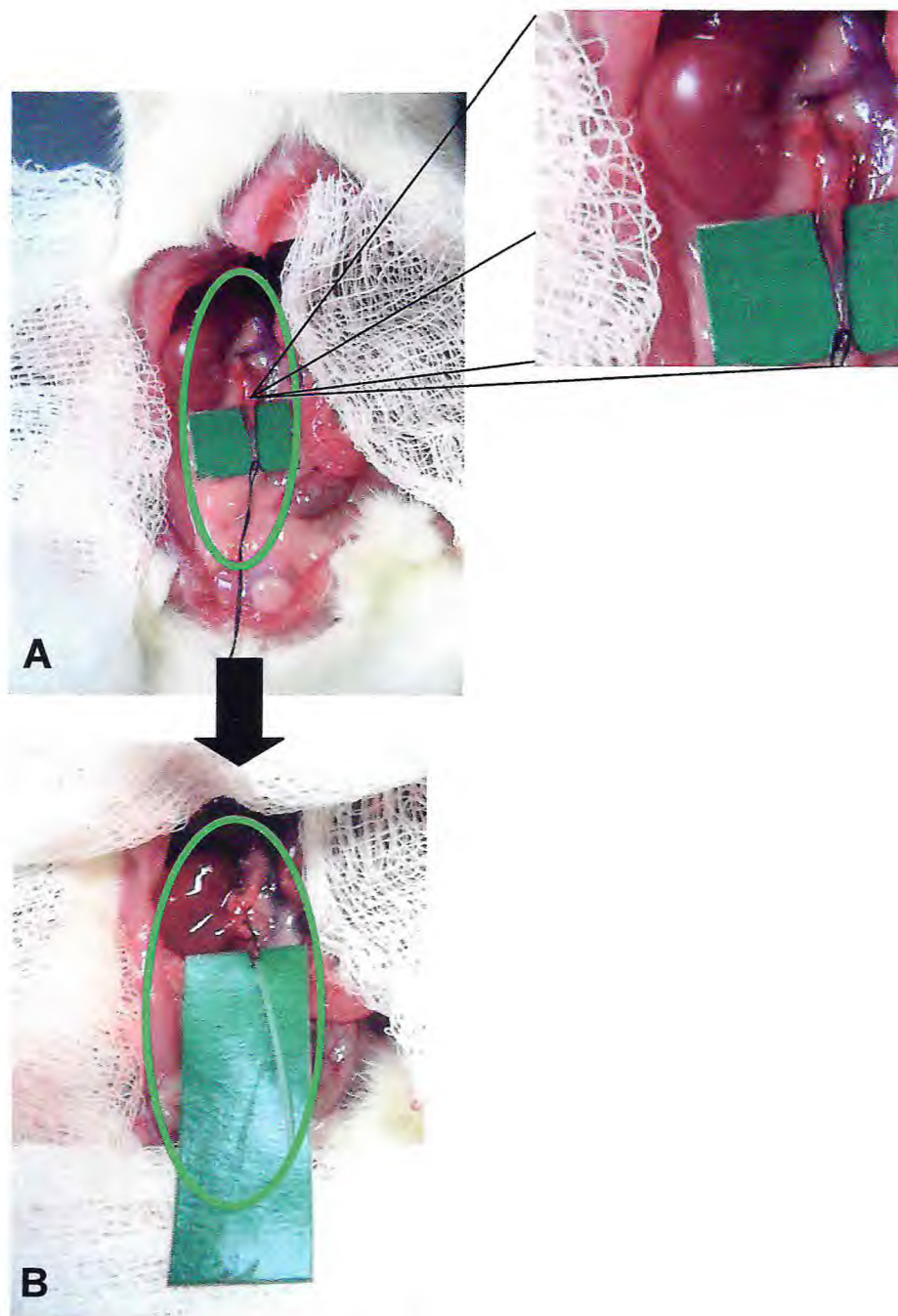


**Figura 16.** Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado.

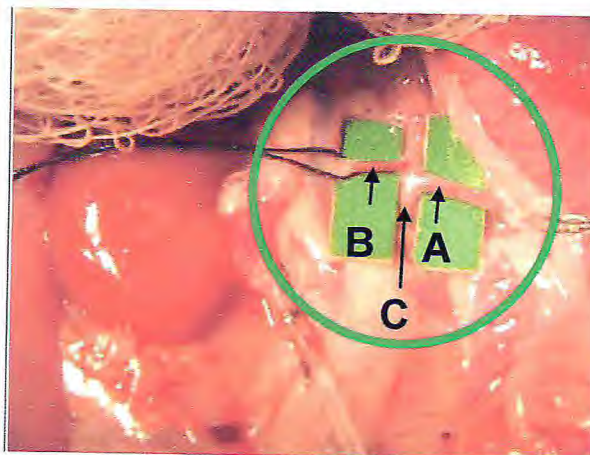


**Figura 17.** Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.

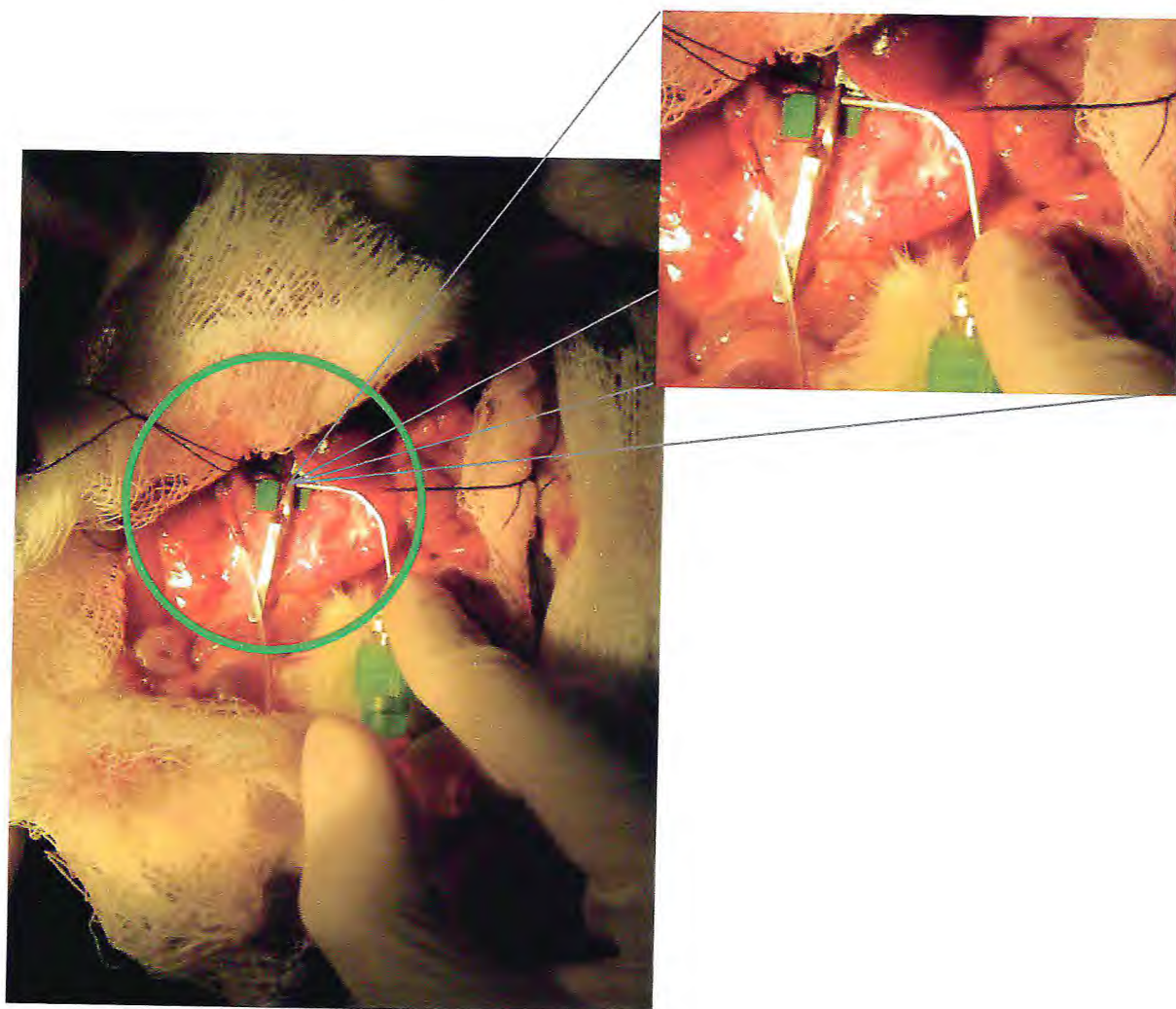
Com uma lupa (aumento de 7 vezes) o ureter foi identificado, dissecado e canulado – tubo de polietileno PE-30 (figura 18), bem como a artéria mesentérica superior, artéria renal (Figura 19) e a glândula supra-renal identificados. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Outra cânula metálica foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi realizada a fixação da cânula (figura 20).



**Figura 18.** Identificação (A) e canulação (B) do ureter.

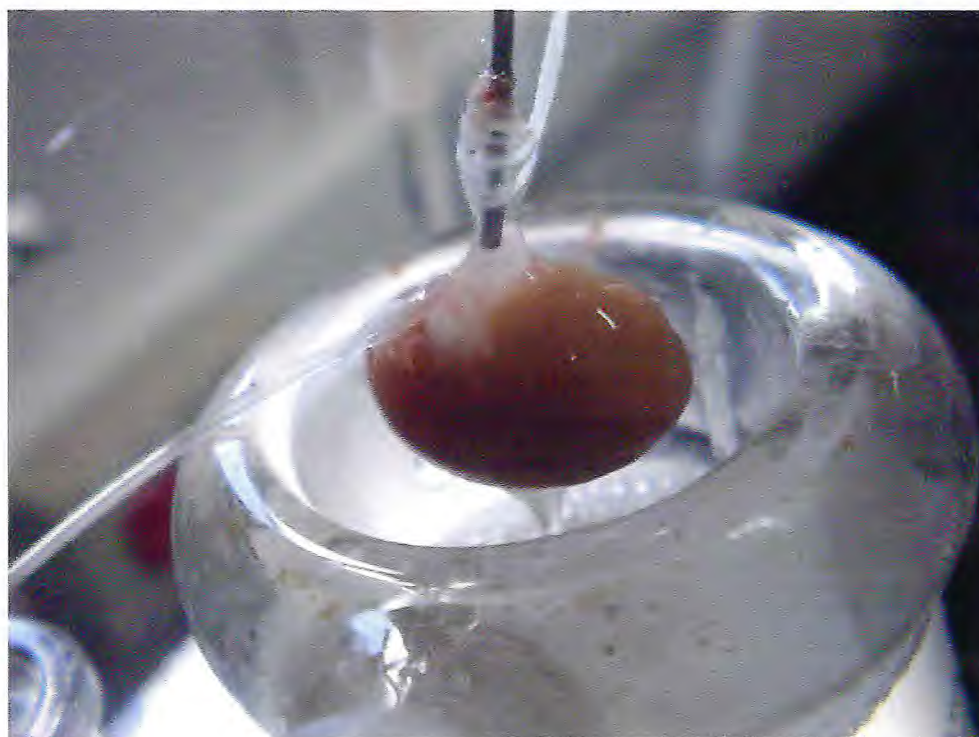


**Figura 19.** Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C).



**Figura 20.** Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim *in vivo*, evitando qualquer isquemia do órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 21).



**Figura 21.** Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.

### 3.5.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30min iniciais foram utilizados como controle interno para os experimentos com as três diferentes concentrações da peçonha da serpente *B. lutzi*. As concentrações utilizadas foram 0,1 $\mu$ g/mL, 1,0 $\mu$ g/mL e 10,0 $\mu$ g/mL. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min. Amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos. Depois, as

amostras foram congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, fundamentais para os cálculos dos parâmetros da função renal (Fonteles *et al.*, 1983).

### 3.5.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas determinações de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem 744 - Bayer<sup>®</sup> diagnóstica). Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, coordenado pela Professora Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foi medida utilizando um osmômetro (WESCOR<sup>®</sup>, modelo Vapro<sup>®</sup> 5520). Esses parâmetros foram determinados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

### 3.5.7 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS RENAIIS AVALIADOS

A figura 22 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais utilizados para obtenção dos valores e dos gráficos utilizados na tese. Os cálculos demonstrados foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

<b>FU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo urinário</b></li> <li>• <math>FU = (\text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo}) / 10</math></li> </ul>
<b>PP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PP (mmHg) = Pressão de perfusão</b></li> <li>• Leitura em manômetro</li> </ul>
<b>RFG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular</b></li> <li>• <math>RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in} \times FU)</math> sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato</li> </ul>
<b>FPR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo de perfusão renal</b></li> <li>• Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)</li> </ul>
<b>RVR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RVR (mmHg.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal</b></li> <li>• <math>RVR = PP \text{ (mmHg)} / FPR</math></li> </ul>
<b>FNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado</b></li> <li>• <math>FNa^+ = RFG \times PNa^+</math> (<math>PNa^+</math> = Concentração de sódio no perfusato)</li> </ul>
<b>ENa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado</b></li> <li>• <math>ENa^+ = FU \times UNa^+</math> (<math>UNa^+</math> = Concentração de sódio na urina)</li> </ul>
<b>TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado</b></li> <li>• <math>TNa^+ = FNa^+ - ENa^+</math></li> </ul>
<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte de sódio transportado</b></li> <li>• <math>\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>%TpNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TpNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte proximal de sódio</b></li> <li>• <math>\%TpNa^+ = TpNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>FK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio filtrado</b></li> <li>• <math>FK^+ = RFG \times PK^+</math> (<math>PK^+</math> = concentração de potássio no perfusato)</li> </ul>
<b>EK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio excretado</b></li> <li>• <math>EK^+ = FU \times UK^+</math> (<math>UK^+</math> = Concentração de potássio na urina)</li> </ul>
<b>TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio transportado</b></li> <li>• <math>TK^+ = FK^+ - EK^+</math></li> </ul>
<b>%TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TK<sup>+</sup> = Percentual de transporte de potássio</b></li> <li>• <math>\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>%TpK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TpK<sup>+</sup> = Percentual de transporte proximal de potássio</b></li> <li>• <math>\%TpK^+ = TpK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>FCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto filtrado</b></li> <li>• <math>FCl^- = RFG \times PCl^-</math> (<math>PCl^-</math> = Concentração de cloreto no perfusato)</li> </ul>
<b>ECl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ECl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto excretado</b></li> <li>• <math>ECl^- = FU \times UCl^-</math> (<math>UCl^-</math> = Concentração de cloreto na urina)</li> </ul>
<b>TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto transportado</b></li> <li>• <math>TCl^- = FCl^- - ECl^-</math></li> </ul>
<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>% TCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte de cloreto</b></li> <li>• <math>\% TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>
<b>%TpCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>% TpCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte proximal de cloreto</b></li> <li>• <math>\% TpCl^- = TpCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>
<b>C<sub>osm</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cosm (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Clearance osmótico</b></li> <li>• <math>[U_{osm} / P_{osm}] \times FU</math> (onde <math>U_{osm}</math> = Osmolaridade urinária e <math>P_{osm}</math> = Osmolaridade do perfusato)</li> </ul>

**Figura 22.** Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados (em azul).

Cada um desses parâmetros permite fazer inferência a diversos efeitos. A PP indica se a substância ou a peçonha na qual se está testando é capaz de modificar as forças que regem a perfusão renal. Em relação à RVR, esse parâmetro possibilita investigar se as alterações na PP estão relacionadas à contração ou relaxamento dos vasos que irrigam o tecido renal. O FU permite observar se o tecido renal está produzindo um volume de urina maior ou menor. Em relação ao RFG, verifica-se se a depuração ou *clearance* aumentou, através de marcadores como a inulina. O percentual de transporte tubular (total e proximal) permite com que se possam observar possíveis alterações tubulares em relação ao aumento ou redução da reabsorção/excreção de eletrólitos, verificando a manutenção da função tubular. O *clearance* osmótico, por sua vez, verifica como o rim está depurando substâncias osmoticamente ativas e se essas estão sendo eliminadas em maior ou menor quantidade na urina. Todos esses parâmetros da fisiologia renal, associados à análise histológica, permitem verificar possíveis mecanismos de manutenção/alteração da função renal.

### 3.5.8 ESTUDO HISTOLÓGICO RENAL

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e não perfundido (esquerdo) foram colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de microscopia de luz (NIKON<sup>®</sup>). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido – controle externo). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolt E3030<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).



### **3.6 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS**

#### **3.6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS MDCK (MADIN-DARBY CANINE KIDNEY)**

Para investigar se o veneno estudado possui citotoxicidade em células de túbulos renais, utilizaram-se culturas de células epiteliais de túbulos de cachoro (Madi-Darby Canine Kidney - MDCK). Essas células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm<sup>2</sup>), utilizando o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Olympus® CKX 41®) a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

#### **3.6.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE**

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan (produto colorido insolúvel em água), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar o percentual de células vivas. Assim, pode-se verificar a capacidade do veneno de destruir as células MDCK, uma vez que células viáveis são capazes de formar o formazan.

##### **3.6.2.1 ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)**

Para realização do ensaio com MTT, as células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal (SBF) por 24 horas para sincronizá-las na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) e ficaram em contato com esse reagente por aproximadamente 10min em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Depois de suspensas em meio de cultura com 10% de SFB, realizou-se centrifugação por 5min a 4.000rpm, re-suspensão e quantificação das células em

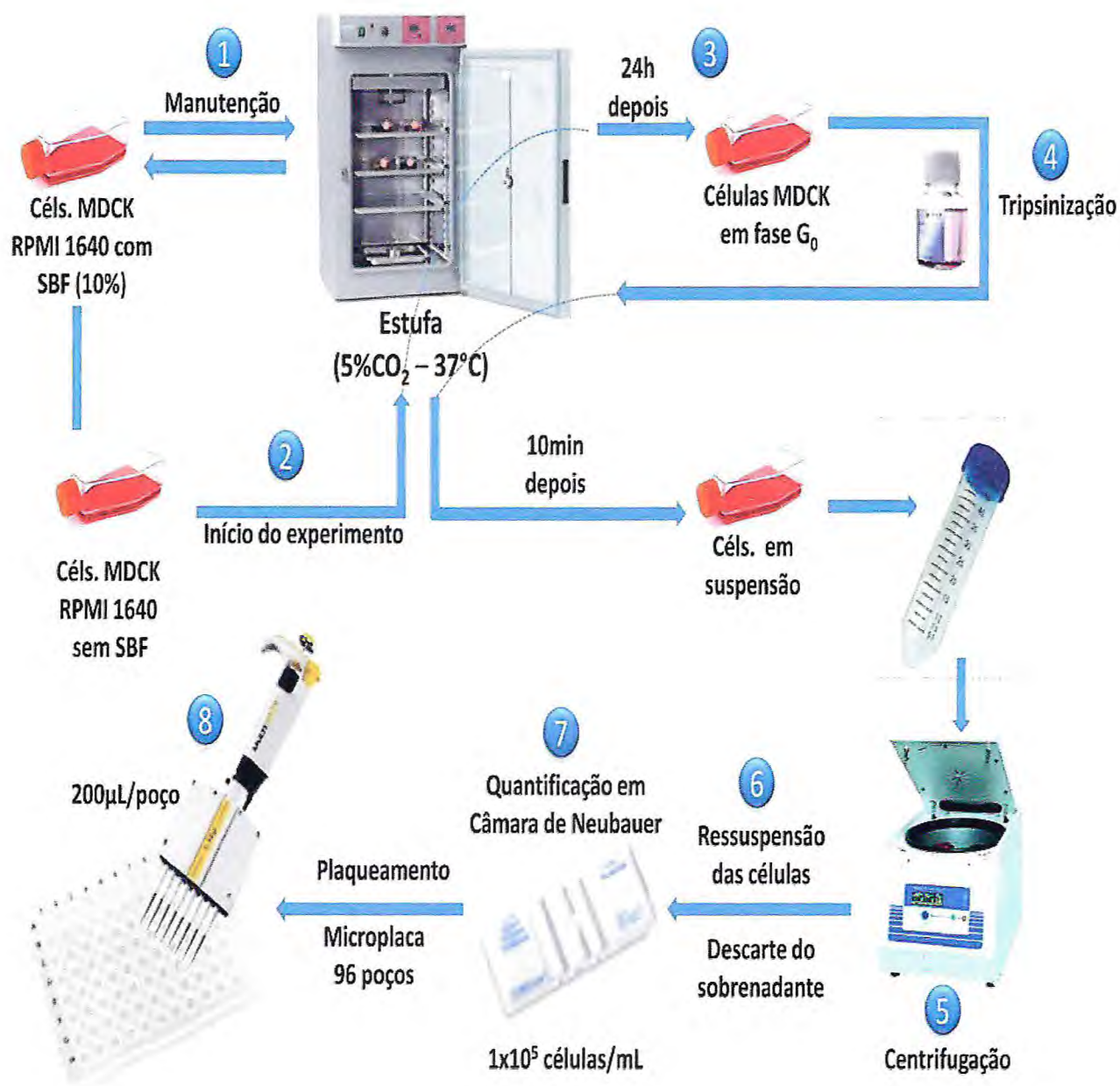
câmara de Neubauer, utilizando coloração com azul de trypan. Conhecido o número de células por mL, as mesmas foram transferidas (200µL -  $1 \times 10^5$  células/mL) para placas de 96 poços (figura 23). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionadas diferentes concentrações do veneno de *Bothrops lutzi* – 3,12; 6,25; 12,50; 25,00, 50,00 e 100,00µg/ML. Como controle negativo, foi utilizado tampão fosfato (PBS - *phosphate buffer solution*) estéril com pH 7,4.

Após nova incubação por 24 horas nas mesmas condições descritas, removeu-se 100µL do sobrenadante do meio de cultura, que foi armazenado em freezer a -70°C para determinação da enzima lactato desidrogenase (LDH), segundo indicações do fabricante (Labtest® - equipamento semi-automático Labquest®) - quando aumentada a atividade da enzima LDH, há indícios de extravasamento e lesão da membrana celular, permitindo verificar o tipo de dano que a célula sofreu (dano direto e/ou apoptose). Ao volume restante ainda presente na placa, adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. Novamente as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C por mais 17 horas. Após esse último procedimento, realizou-se a leitura da absorbância de cada poço da placa com comprimento de onda de 570nm em uma leitora de microplacas ASYS® Expert Plus® (figura 24).

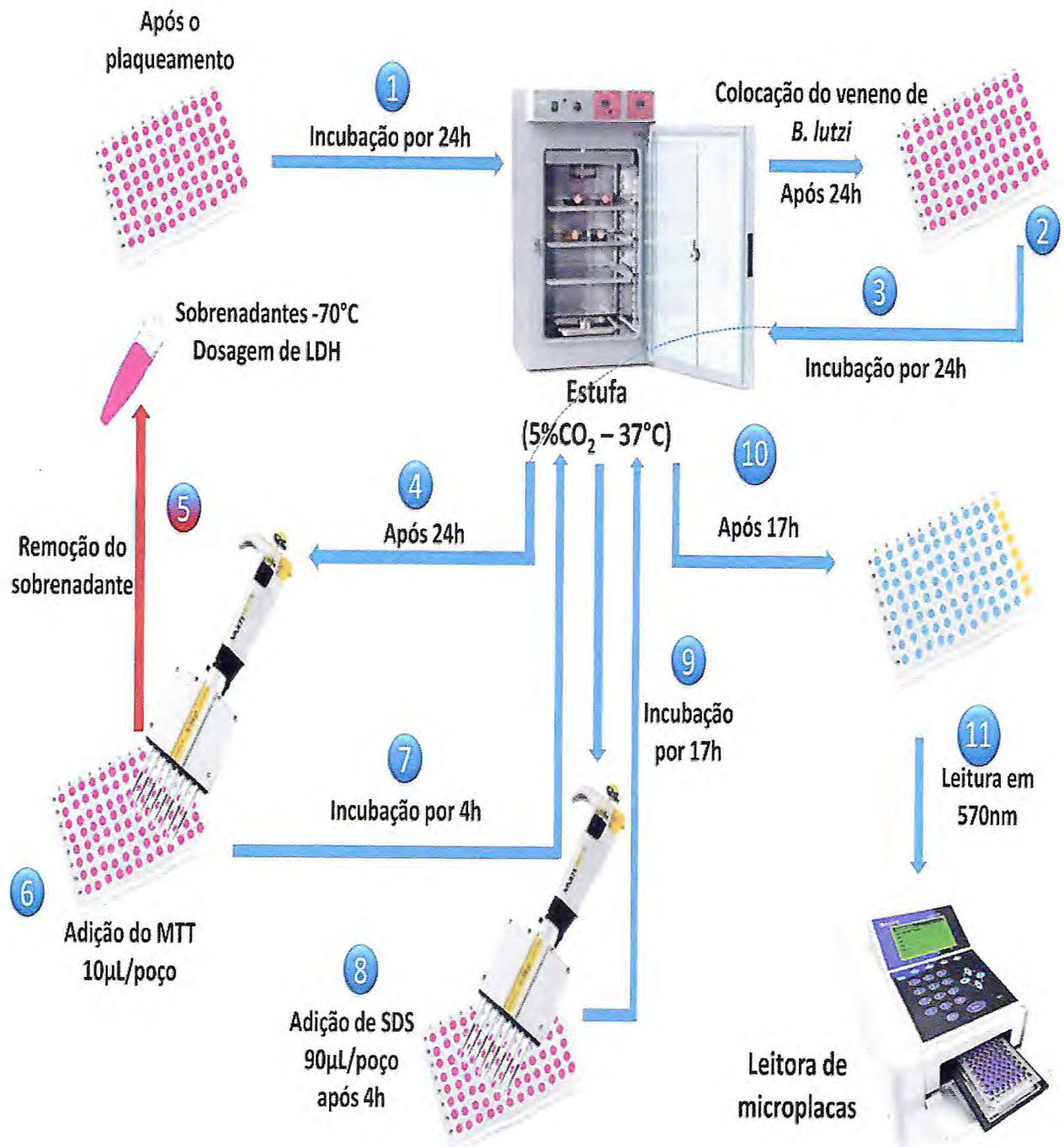
Foram realizados três experimentos independentes (n=3) e em triplicada para cada concentração. Controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas nesse grupo e nos demais grupos tratados com veneno (MOSMANN, 1983). Microfotografias foram realizadas para documentar os aspectos morfológicos celulares dos grupos estudados através do microscópio Olympus® CKX 41® com câmera digital acoplada (Evolet E330® Olympus®).

Para verificar o tempo necessário para que o veneno de *B. lutzi* necessitaria para induzir possíveis efeitos nas células MDCK, realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Nesse outro protocolo, utilizaram-se as concentrações 1,0;

10,0 e 100,0 $\mu$ g/mL e os tempos de exposição de 30min, 2h, 6h e 24h.



**Figura 23.** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).



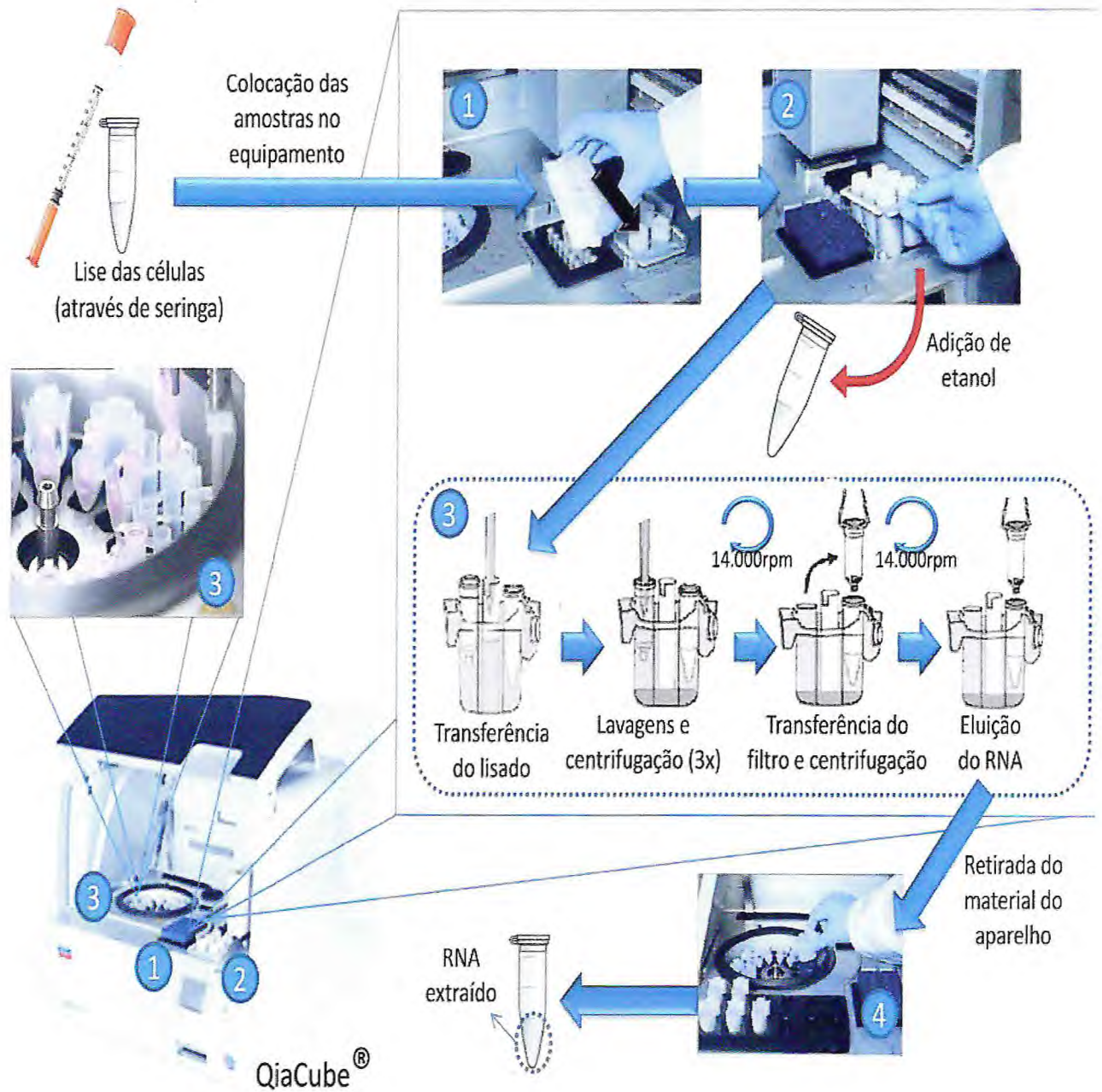
**Figura 24.** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).

### 3.6.3 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para observar a expressão de possíveis genes apoptóticos, foram realizados os ensaios com as células MDCK cultivadas em placas com 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL por poço. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, adicionou-se em cada poço o veneno da serpente *Bothrops lutzi* na concentração de 0,39µg/mL em sextuplicata. Decorridas 24 horas de uma nova incubação nas condições descritas anteriormente, as células foram deslocadas dos poços por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v), centrifugadas e o sobrenadante foi armazenado para posterior análise. Foram obtidos seis precipitados de células, os quais foram misturados para se obter apenas uma amostra de cada grupo estudado (VBL e controle). Foram realizados quatro experimentos independentes (n=4) para obtenção dos dados relativos à expressão de RNA.

#### 3.6.3.1 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL

Para isolar o RNA, adicionou-se ao precipitado de células o volume de 350µL do tampão de lise contendo β-mercaptoetanol. As células foram lisadas com o auxílio de uma seringa hipodérmica (13x4,5cm). Essa solução foi centrifugada a 14.000 xG por 3 minutos e o sobrenadante foi alocado em um tubo de ensaio plástico com capacidade para 2,0 ml, posteriormente colocado no equipamento QiaCube® (Qiagen®). A partir de então todo o isolamento foi realizado automaticamente, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante e programado no equipamento. A figura 25 demonstra as etapas realizadas para esse processo.



**Figura 25.** Esquema gráfico do isolamento de RNA total por automação no equipamento QiaCube® (Qiagen®).

### 3.6.3.2 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Com a finalidade de analisar a expressão gênica de alguns dos marcadores apoptóticos envolvidos nos efeitos causados pelo veneno da serpente

*Bothrops lutzi* nas células renais MDCK, com RNA total foi possível a obtenção de um DNA complementar (cDNA) através da reação de Transcriptase reversa. Para tanto, utilizou-se a enzima do kit SuperScript® III Reverse Transcriptase System® (Invitrogen®, CA - USA).

Uma quantidade de 10pg a 5µg de RNA total extraído (0,2µL) foi adicionado a um tubo de ensaio plástico contendo 1µL de *primer* oligo (dT)<sub>20</sub>® (50µM), 1µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (dNTP mix, 10mM); água miliQ foi adicionada para completar um volume de 10µL. Essa primeira mistura (reação A) foi aquecida à 65°C para a desnaturação do RNA e anelamento do primer oligo (dT)<sub>20</sub> com a cauda *polyA* do RNA mensageiro por 5 minutos. Imediatamente após este período, a reação foi resfriada em gelo por pelo menos 1 minuto (~4°C) e à solução foi adicionada uma segunda mistura (B) que continha: 2µL de tampão de síntese de cDNA (10X), 4µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2µL de DTT (DL-ditiotreitol - (0,1M), 1µL de uma solução RNaseOUT (40U/µL), e 1µL da enzima SuperScript™ III RT (200 unidades/µL). O tubo contendo as duas misturas (20µL) foi levado a um termociclador onde permaneceu inicialmente por 50 minutos, a uma temperatura de 50°C. Passado este período, a reação foi aquecida a uma temperatura de 85°C por 5 minutos e então resfriada imediatamente a uma temperatura de 4°C. Finalizando o processo, o cDNA (DNA complementar) sintetizado foi acrescido de 1µL de RNase H, incubando-se a mistura por 20 minutos a 37°C. O cDNA sintetizado foi mantido em freezer -20°C até a realização de sua amplificação pela técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) em tempo Real (qPCR).

### 3.6.3.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)

Analisou-se a expressão dos genes envolvidos com a apoptose CASP-3 (final da cascata apoptótica), CASP-8 (via extrínseca) e GAPDH (gene de referência) utilizando o equipamento iQ5 *Real Time PCR Detection System*® (Bio-Rad®). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de PCR. Através dessa técnica é possível a quantificação das amostras de cDNA na fase exponencial da cinética de

amplificação, período no qual a PCR pode ser quantificado, através da utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR *Green*, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores de DNA (*primers* -quadro 3) utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos genes obtidas no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Todas as reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas num volume total de 25  $\mu$ L contendo 12,5  $\mu$ L de iQ Supermix<sup>®</sup> (solução padrão de amplificação contendo tampão salino, uma mistura de desoxinucleotídeos, enzima amplificadora e corante SYBR *Green* onde todas estavam em concentrações otimizadas pelo fabricante), 200nM dos iniciadores e 2 $\mu$ L de cDNA das amostras. Amostras negativas foram também testadas, onde o cDNA era substituído por água mili-Q autoclavada. As condições da PCR foram empregadas da seguinte forma: um período de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos para as reações de amplificação dos genes testes descritos. Cada ciclo continha uma fase de desnaturação a 95°C por 20 segundos, uma fase de anelamento a 62°C por 20 segundos, e uma fase de extensão da cadeia de DNA a 72°C por 45 segundos. Ao final dos ciclos submetemos as amostras a uma extensão final na temperatura de 72°C por 3 minutos.

**Quadro 3.** Sequência dos iniciadores usados na reação da polimerase em cadeia em tempo Real (qPCR).

Genes	Sequência dos Iniciadores (5'-3') senso (F) e antisense (R)
CASP-3 (final da apoptose)	F – TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG R – TTCTGACAGGCCATGTCATCCTCA
CASP-8 (via extrínseca da apoptose)	F – ACAAGGGCATCATCTATGGCTCTGA R – CCAGTGAAGTAGAGGTCAGCTCAT
GAPDH (Gene de referência)	F – TCAAGCGATTTGGCCGTATTGG R – TGAAGGGGTCATTGATGGCG

Fonte: NCBI.

Com o intuito de analisar a especificidade das amplificações, ou seja, saber se os produtos formados eram específicos para os genes testados, foi realizada, após cada reação, uma curva de fusão (*Melting Curve*) onde a



temperatura da reação era acrescida em 1°C a cada 20 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento acima descrito e terminando a 95°C. Os dados obtidos pelo iQ5 Optical System Software® (Versão 2.0) foram baseados no valor do ciclo limiar ( $C_T$  – *Threshold cycle*), ou ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 vezes maior que a fluorescência basal. A avaliação da expressão gênica foi obtida utilizando o método matemático descrito por Pfaffl (2001).

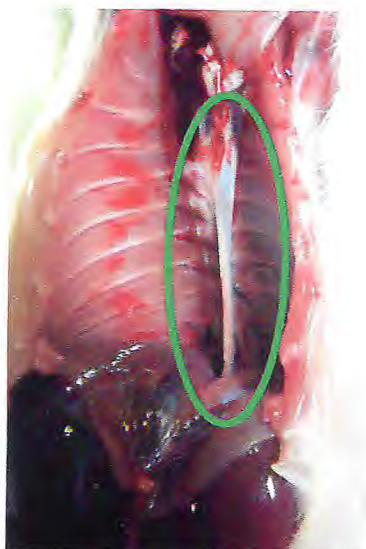
### 3.7 ANEL DE AORTA

#### 3.7.1 TÉCNICA CIRÚRGICA

A avaliação dos efeitos vasculares do veneno de *Bothrops lutzi* em vasos de condutância foi realizada através dos ensaios em anel de aorta isolado de ratos Wistar machos (n=4).

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Depois da realização de incisão no tórax do animal foram extirpados os pulmões e o coração para visualização do segmento torácico da aorta (figura 26).

Após o procedimento cirúrgico, o segmento da aorta torácica foi removido (figura 27) e cortado transversalmente em anéis cilíndricos (1mm x 5mm) que foram acoplados em peças triangulares de aço ligadas a um fio (figura 28). As preparações foram suspensas horizontalmente em cubas de volume de 5mL para órgãos isolados contendo solução de Tyrode modificada (figura 29) com a seguinte composição, em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5 (pH 7,4 - mantida a 37°C). Os tecidos foram mantidos em uma tensão basal de 1g na cuba com a solução devidamente aerada.



**Figura 26.** Visualização do segmento torácico da aorta.



**Figura 27.** Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado.

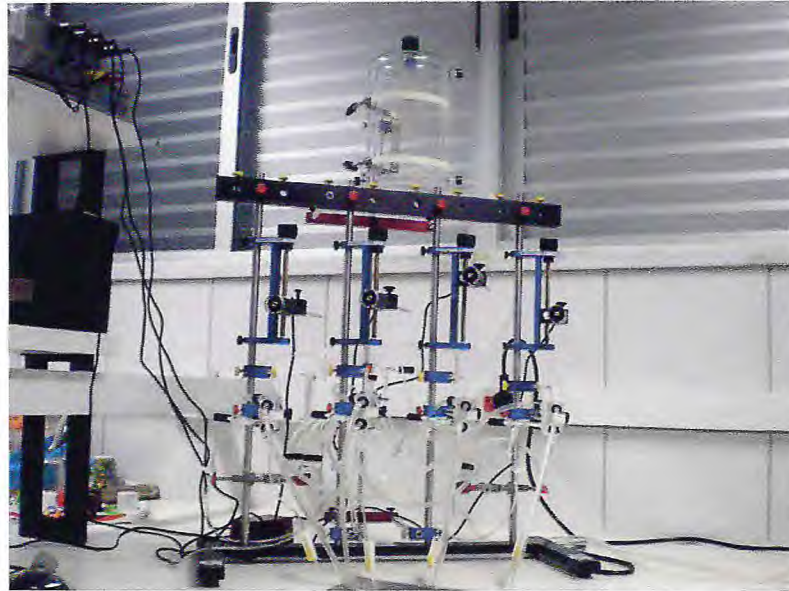


**Figura 28.** Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares.



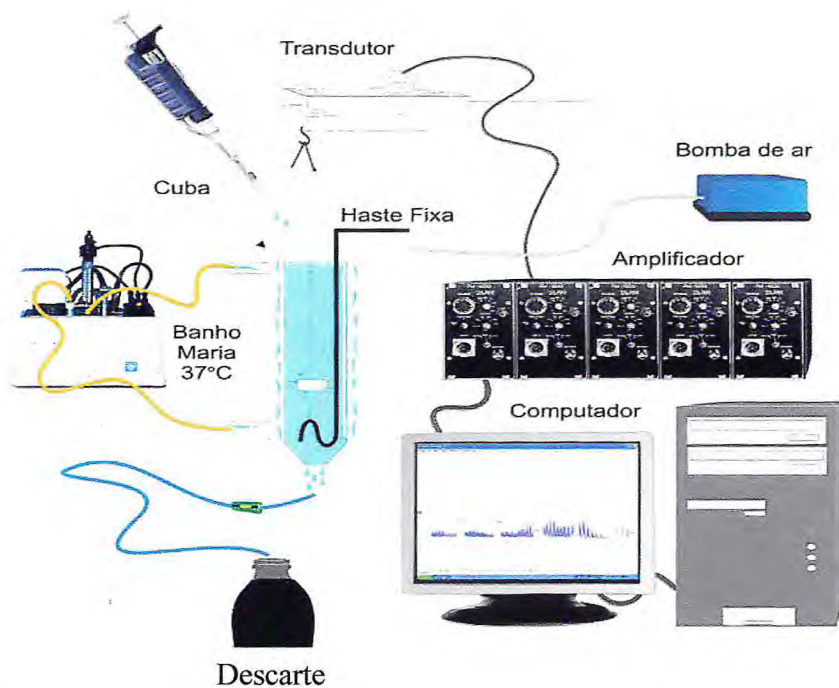
**Figura 29.** Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada.

As contrações foram registradas isometricamente por transdutores de força, conectados a um sistema de aquisição de dados (Dataq® PM-1000, EUA, figuras 30 e 31).



**Figura 30.** Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato.

*Fonte:* Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso



**Figura 31.** Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso. (Figura elaborada por David Matthews Jucá).

Após período de estabilização do tecido no sistema (aproximadamente 60 minutos), contrações foram induzidas por adição de potássio 60mM em três curvas adotadas como controle (teste da viabilidade do tecido).

### **3.7.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

Foram realizados 3 protocolos experimentais, e suas variações, nos quais foram utilizadas múltiplas concentrações de veneno de *Bothrops lutzi*. Esses protocolos são descritos a seguir.

#### **3.7.2.1 EXPOSIÇÃO AO VENENO SEM PRÉ-CONTRAÇÃO**

De forma a se avaliar a ação vascular, realizou-se este protocolo. Após o período de estabilização do tecido e da verificação da viabilidade do mesmo, com a adição de potássio na cuba, foram gradualmente adicionadas diferentes concentrações do veneno estudado (1,0; 10,0 e 20,0µg/mL), havendo o contato com a peçonha por 20min. Durante o experimento, as contrações referentes ao tecido foram registradas digitalmente.

#### **3.7.2.2 EXPOSIÇÃO AO VENENO COM PRÉ-CONTRAÇÃO**

Para observar se o veneno de *B. lutzi* era capaz potencializar ou reverter os efeitos do agonista fenilefrina, realizou-se o presente protocolo. Após o período de estabilização do tecido e da verificação da viabilidade do mesmo com a adição de potássio na cuba, foi adicionada fenilefrina na concentração de 1µM para induzir uma contração do vaso. No platô da contração da fenilefrina (Fen), foram adicionadas concentrações cumulativas da peçonha de *B. lutzi* (0,1-30,0µg/mL). Foram testados, ainda, diferentes tempos de exposição ao veneno (5 e 20 minutos, bem como a preparação com e sem endotélio, através da adição de acetilcolina (Ach).

### 3.7.2.3 CONTRAÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO

Por fim, para avaliar se o veneno de *B. lutzi* era capaz de deslocar uma curva de concentração-efeito da fenilefrina, foi realizado o protocolo descrito a seguir. Após o período de estabilização do tecido e da verificação da viabilidade do mesmo, com a adição de potássio na cuba (60mM), realizou-se a adição fenilefrina em diferentes concentrações para traçar o perfil de contração do órgão com esse fármaco (curva concentração-resposta). Posteriormente, a preparação foi exposta ao VBL por 20min. Passado esse período, foi novamente adicionada fenilefrina, obtendo-se uma nova curva, para ser observado o comportamento da preparação. Para se mensurar o possível efeito da peçonha, foram calculadas a  $CE_{50}$  (concentração necessária para se observar 50% dos efeitos da fenilefrina, no caso) e o  $E_{MAX}$  (efeito máximo) desse mesmo fármaco.

### 3.7.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DOS ANEIS DE AORTA

Ao final de cada experimento, os segmentos de anel de aorta submetidos aos protocolos experimentais descritos foram colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

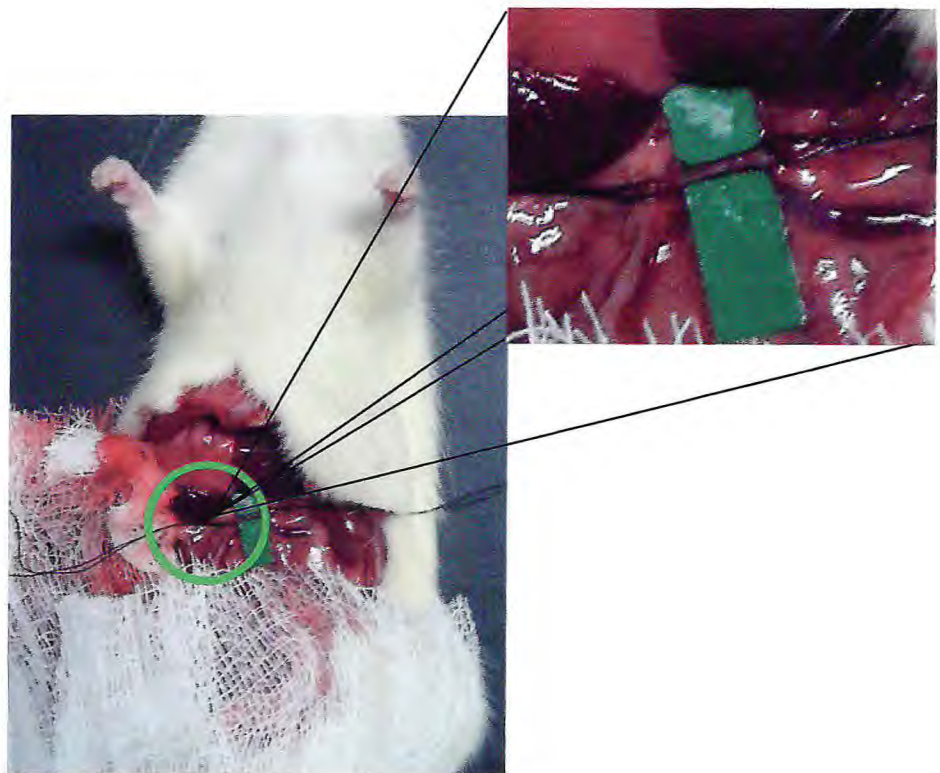
Após isso, os anéis de aorta foram desidratados e diafanizados e, em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolet E330<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).

### 3.8 LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

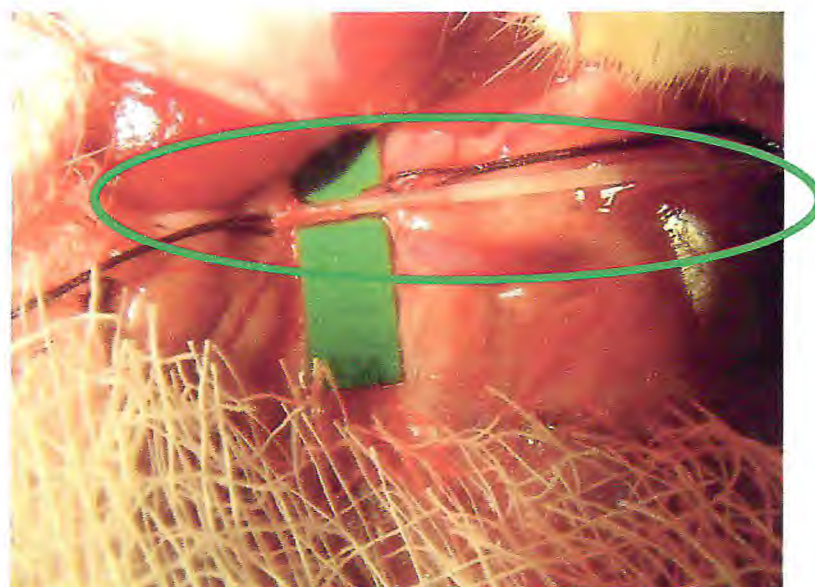
De forma a se verificar a ação do veneno de *B. lutzi* em vasos de resistência, realizou-se a perfusão do leito vascular mesentérico de acordo com a descrição de McGregor (1965). Ratos Wistar machos (n=4), pesando entre 250-300g foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Depois de aberto o abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi isolada (figura 32) e canulada (figura 33)

com um tubo de polietileno (PE-20). O intestino foi separado do leito mesentérico (Figura 34) nas extremidades intestinais (duodeno e ceco). O mesentério isolado (figura 35) foi, então, perfundido em sistema aberto (figuras 36 e 37) com solução de Krebs contendo: 114,0mM de NaCl; 4,96mM de KCl; 1,24mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 24,99mM de  $\text{NaHCO}_3$ ; 2,10mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; e 3,60mM de glicose.

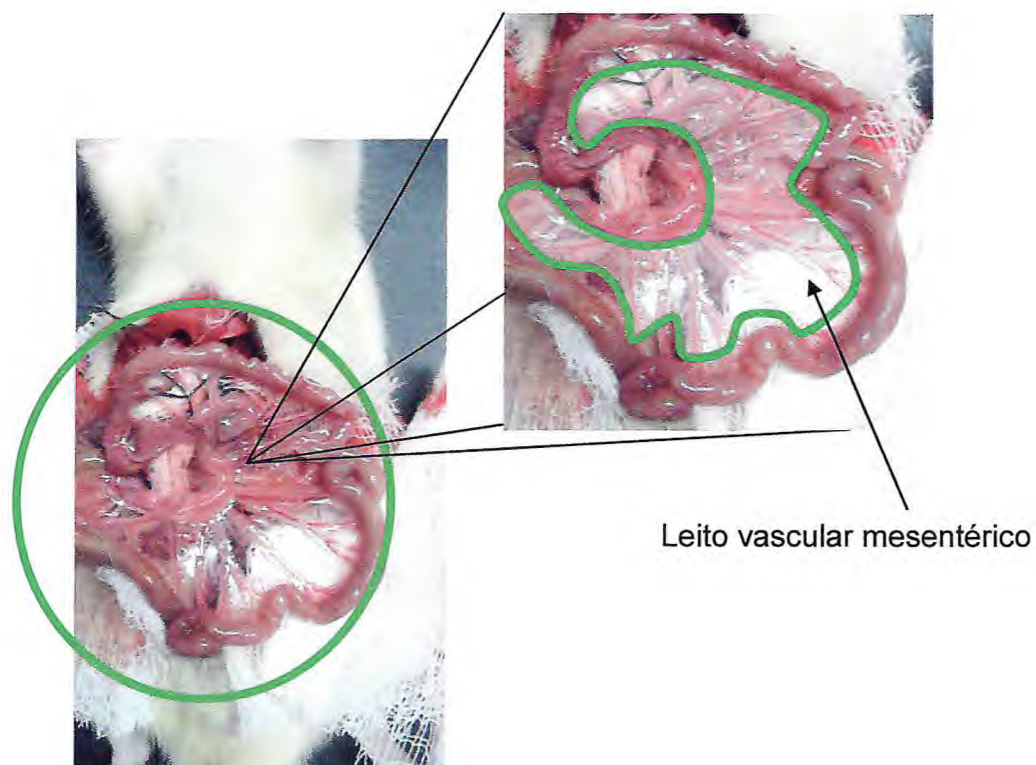
A solução foi mantida a 37°C e o leito foi perfundido a uma pressão basal de 40mm/Hg, enquanto a mesma foi mensurada pela média das pressões de perfusão através de um transdutor de pressão Edwards® conectado ao sistema perfusor. A captação dos dados foi realizada digitalmente (frequência de amostragem de 1Hz) por um equipamento periférico (Aisha 4®) da empresa Kananda®. As variações na pressão de perfusão foram continuamente registradas por um transdutor e interfaciadas pelo *software* da Windaq®. Para verificar a atividade do veneno, a peçonha foi infundida na preparação a um fluxo de 0,1mL por minuto, bem como a viabilidade da pressão foi averiguada com fenilefrina 6µM nessa mesma taxa de infusão.



**Figura 32.** Isolamento da artéria mesentérica superior.

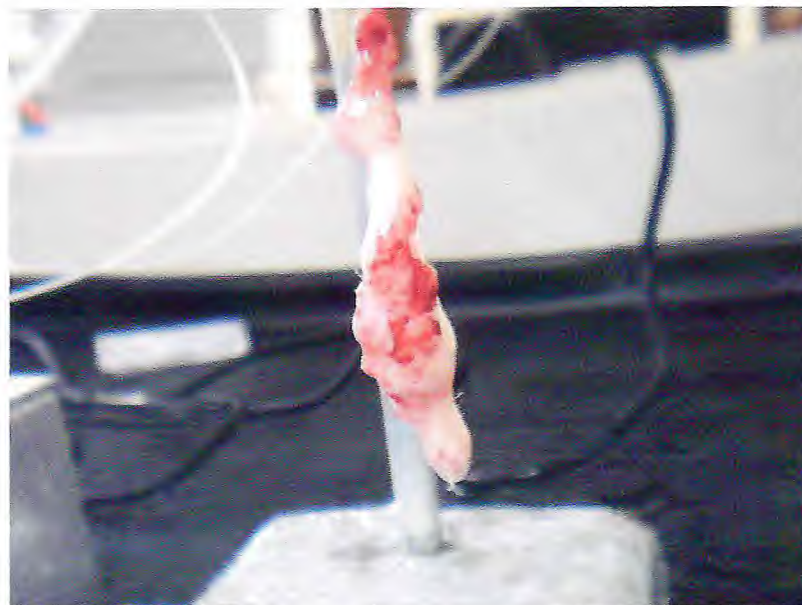


**Figura 33.** Canulação da artéria mesentérica superior.

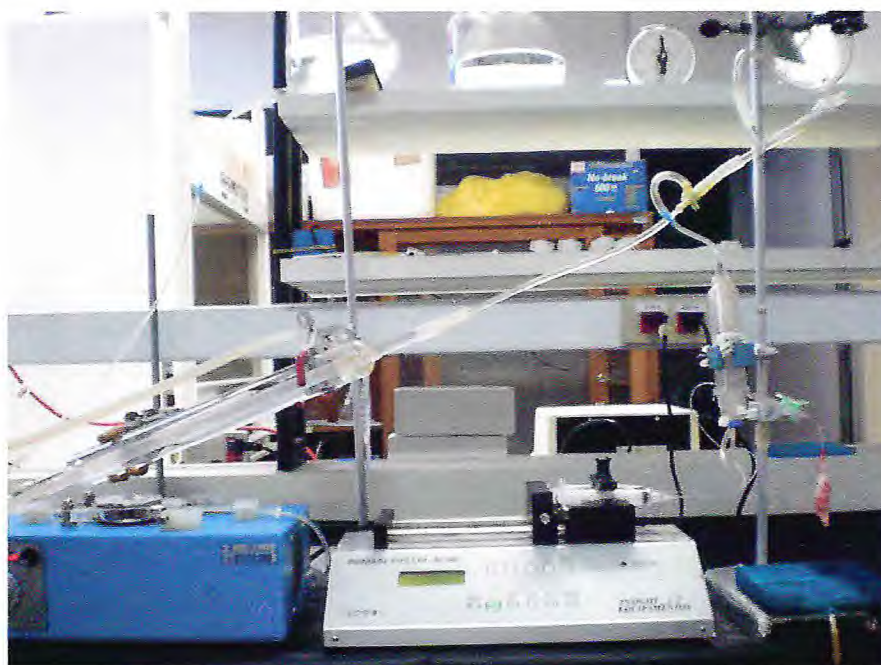


**Figura 34.** Leito vascular mesentérico ainda ligado ao intestino do animal.





**Figura 35.** Leito vascular mesentérico isolado e acoplado ao sistema.



**Figura 36.** Foto do sistema de leito vascular mesentérico isolado de rato.

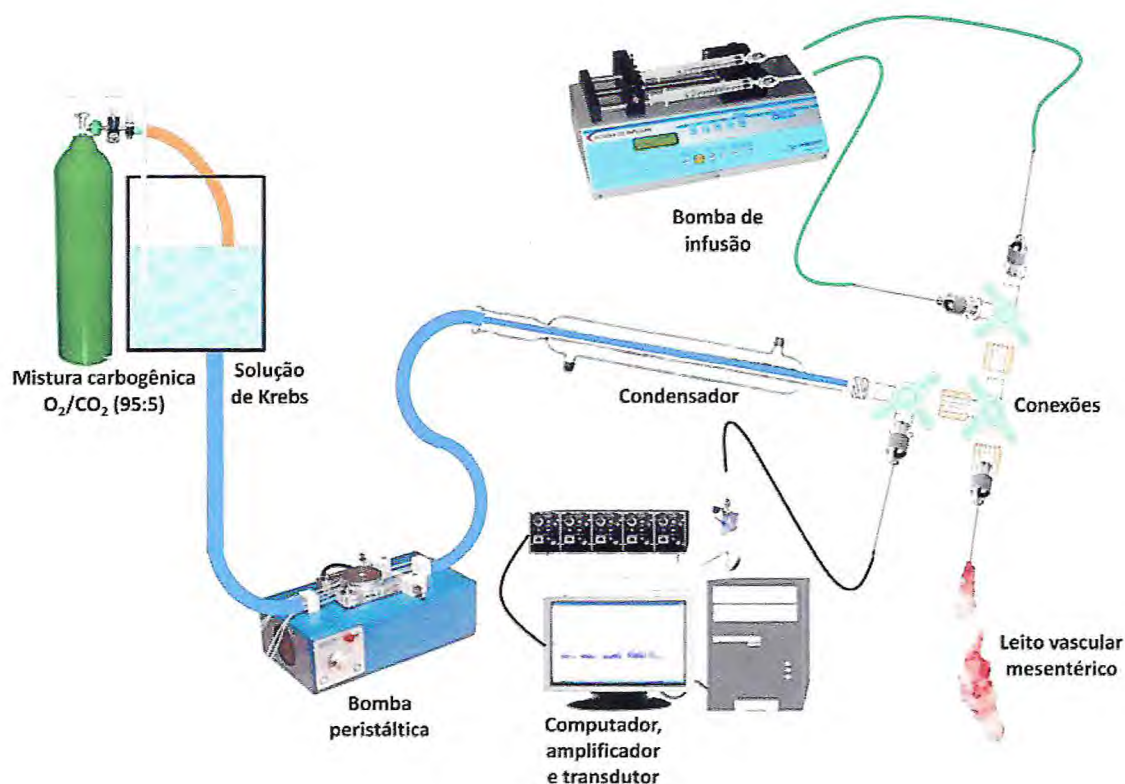


Figura 37. Esquema do sistema de leito vascular mesentérico isolado de rato.

### 3.8.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

No leito vascular mesentérico isolado de rato foram utilizados dois protocolos, nos quais foram utilizadas diferentes concentrações da peçonha de *Bothrops lutzi* (3,0; 10,0 ou 30,0µg/mL). Os protocolos utilizados nessa preparação são descritos a seguir.

#### 3.8.1.1 INFUSÃO DE VENENO ISOLADAMENTE

Para avaliar possíveis efeitos contráteis ou relaxantes, utilizou-se uma infusão somente com o veneno, verificando-se a viabilidade da preparação ao final do experimento. Passados os vinte minutos iniciais de adaptação do tecido às novas condições e mantida a pressão de 40mmHg, a infusão da peçonha de *Bohtrops lutzi* era iniciada e perdurava por 20min a uma taxa de 0,1mL por minuto. Transcorrido o período de infusão de veneno, era iniciada a infusão de fenilefrina 6µM (0,1mL/min) por mais 20min para verificar a viabilidade do tecido após a infusão com a peçonha.

### 3.8.1.2 INFUSÃO DE VENENO CONCOMITANTEMENTE COM FENILEFRINA

Da mesma forma como realizado para o anel de aorta, para verificar se o veneno de *B. lutzi* era capaz de potencializar ou reverter a ação da fenilefrina (agonista), realizou-se o protocolo descrito a seguir. Passados os vinte minutos iniciais de adaptação do tecido as novas condições e mantida a pressão de 40mmHg era iniciada a infusão de fenilefrina 6 $\mu$ M (0,1mL/min) por 20 minutos, para provar a viabilidade do órgão. Depois desse período a infusão de fenilefrina era mantida juntamente com a infusão do veneno de *Bothrops lutzi* em diferentes concentrações (3,0; 10,0 ou 30,0 $\mu$ g/mL) para avaliar o perfil de constrição dos vasos da preparação nessas condições.

### 3.8.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

Ao final de cada experimento, o leito vascular perfundido foi colocado em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Após isso, o material foi submetido à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortado em uma espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON<sup>®</sup>). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolt E330<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média e a diferenças estatísticas entre os grupos estudados verificada pelo teste *t* de Student (pareado e não pareado) e análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ou Holm-Sidak (múltipla comparação entre os grupos). A análise estatística foi realizada utilizando-se os *softwares* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>, Sigma Plot 11<sup>®</sup> e GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

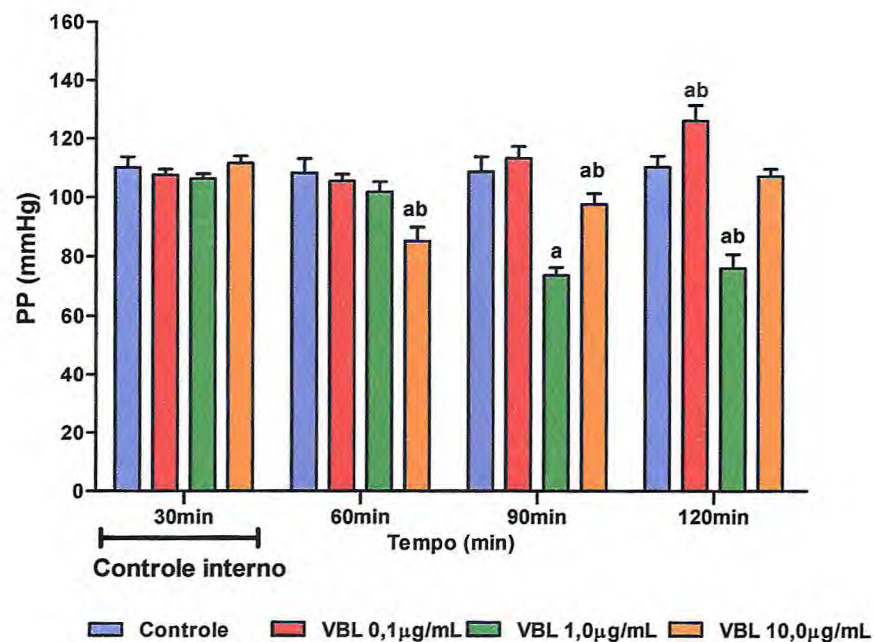
### **3.10 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os procedimentos adotados para a realização dos protocolos experimentais descritos estavam de acordo com os preceitos éticos adotados pela comunidade científica nacional e internacional. Os protocolos experimentais também foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará com o número 68/08.

## 4 RESULTADOS

### 4.1.1 PERFUSÃO RENAL

De acordo com os experimentos realizados, o VBL apresentou 87% de proteínas em sua composição. Nas técnicas de perfusão, verificou-se que a função renal é afetada em todos os parâmetros estudados em pelo menos uma das concentrações testadas. Em termos de pressão de perfusão (PP), observou-se que houve aumento significativo desse parâmetro aos 120min com a menor concentração (0,1 $\mu$ g/mL). Na concentração de 1,0 $\mu$ g/mL, a PP foi reduzida significativamente aos 90 e 120min. Na maior concentração (10,0 $\mu$ g/mL), essa redução ocorreu aos 60 e 90min, retornando a valores próximos ao do controle aos 120 min (figura 38 e tabela 1).



**Figura 38.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) na pressão de perfusão renal (PP). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 $\mu$ g/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

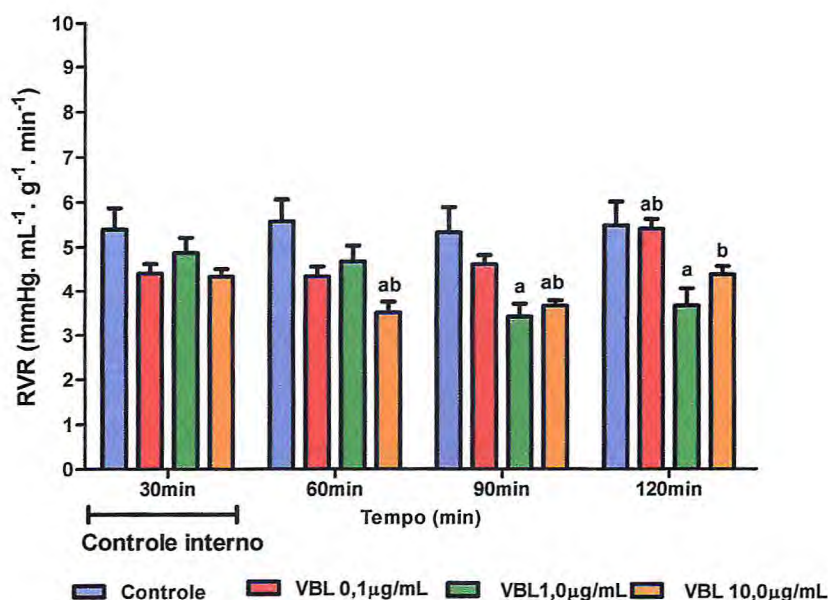
**Tabela 1.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	110,10	3,68	107,58	1,94	106,30	1,74	111,54	2,54
60	108,27	4,88	105,50	2,35	101,80 <sup>a</sup>	3,39	85,21 <sup>ab</sup>	4,65
90	108,69	5,08	113,25	4,09	73,55 <sup>ab</sup>	2,79	97,68 <sup>ab</sup>	3,67
120	110,28	3,69	125,92 <sup>ab</sup>	5,40	75,96	4,83	107,12	2,53

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

A resistência vascular renal (RVR) também se mostrou aumentada aos 120min quando o rim foi perfundido com VBL na concentração de 0,1µg/mL, não havendo alterações nos tempos anteriores. Enquanto que na concentração de 1,0µg/mL, o VBL foi capaz de reduzir significativamente a RVR nos tempos de 90 e 120min, sendo que essa redução já pode ser observada aos 60min. O VBL, na concentração de 10,0µg/mL promoveu uma redução significativa desse parâmetro aos 60, 90 e 120min, sendo que aos 60 e 90min essa redução foi tanto em relação ao controle interno do experimento e ao grupo controle externo, enquanto que aos 120min essa redução foi somente em relação ao grupo controle.

Essas alterações podem ser observadas na figura 39 e na tabela 2, apresentadas a seguir.



**Figura 39.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) na resistência vascular renal (RVR). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

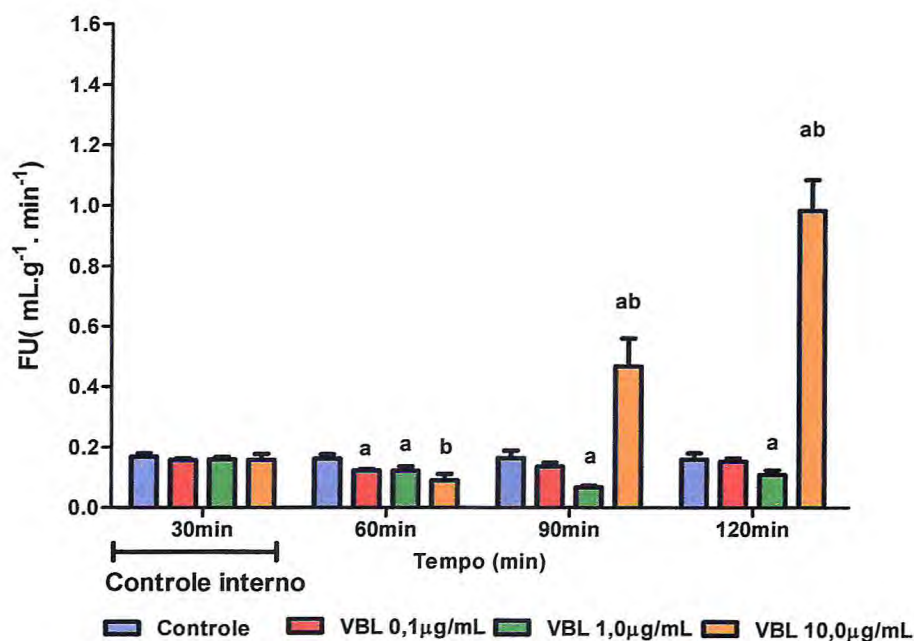
**Tabela 2.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL e 10,0 µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1 µg/mL		VBL 1,0 µg/mL		VBL 10,0 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	4,40	0,22	4,87	0,34	4,32	0,18
60	5,57	0,49	4,32	0,23	4,67	0,36	3,49 <sup>ab</sup>	0,25
90	5,32	0,57	4,60	0,21	3,39 <sup>a</sup>	0,30	3,64 <sup>ab</sup>	0,13
120	5,48	0,53	5,40 <sup>ab</sup>	0,22	3,64 <sup>a</sup>	0,40	4,36 <sup>b</sup>	0,19

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg. mL<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

O fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), também foram alterados pelo VBL. O FU foi reduzido aos 60min pelas três concentrações estudadas, sendo que na concentração de 10,0 µg/mL essa redução foi em relação

ao grupo controle e nas duas concentrações menores foi em relação ao controle interno. Aos 90min, a redução significativa permaneceu somente na concentração de 1,0 $\mu$ g/mL, enquanto que houve um aumento desse fluxo aos 90 e 120min na concentração de 10,0 $\mu$ g/mL em relação ao controle interno e grupo controle (figura 40 e tabela 3). Assim como ocorreu no FU aos 60 minutos, verificou-se que o RFG decresceu nesse período; as concentrações de 0,1 $\mu$ g/mL e 1,0 $\mu$ g/mL promoveram reduções tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle. Aos 90min, a redução do RFG perdurou para as concentrações de 0,1 $\mu$ g/mL e 1,0 $\mu$ g/mL (em relação ao controle interno), enquanto que na concentração de 10,0 $\mu$ g/mL promoveu aumento desse parâmetro tanto em relação ao controle interno e grupo controle. Esse último perfil de alteração permaneceu aos 120min para o RFG (figura 41 e tabela 4).



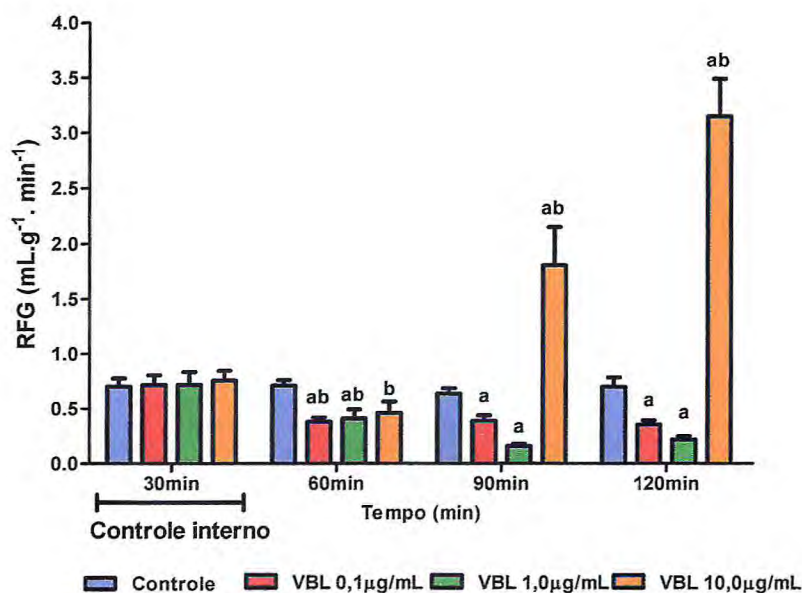
**Figura 40.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no fluxo urinário (FU). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 $\mu$ g/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1 $\mu$ g/mL, 1,0 $\mu$ g/mL e 10,0 $\mu$ g/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1 $\mu$ g/mL		VBL 1,0 $\mu$ g/mL		VBL 10,0 $\mu$ g/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,168	0,011	0,117	0,0059	0,123	0,012	0,158	0,019
60	0,161	0,015	0,123	0,0047	0,122 <sup>a</sup>	0,014	0,090 <sup>b</sup>	0,022
90	0,164	0,024	0,136	0,0131	0,067 <sup>a</sup>	0,006	0,466 <sup>ab</sup>	0,093
120	0,160	0,020	0,153 <sup>a</sup>	0,0110	0,109 <sup>a</sup>	0,015	0,981 <sup>ab</sup>	0,103

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 $\mu$ g/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 41.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0 $\mu$ g/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

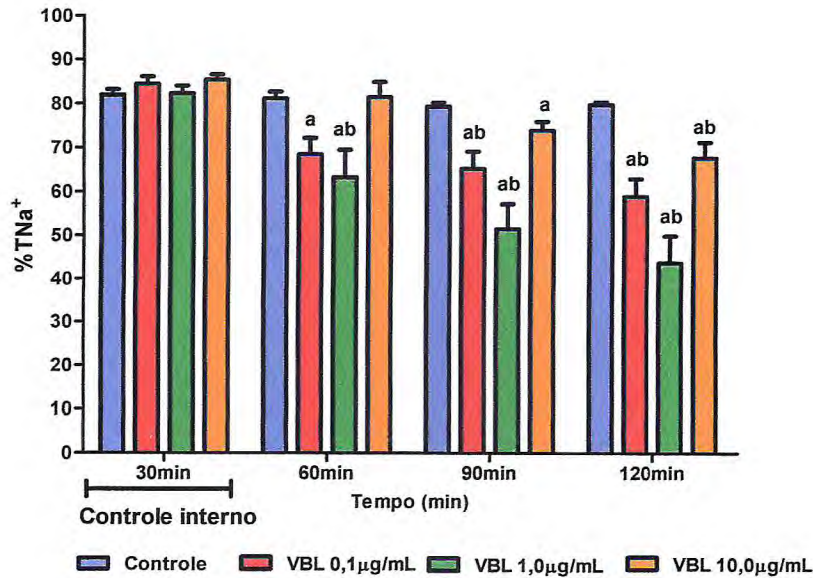
**Tabela 4.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,716	0,088	0,716	0,1170	0,754	0,089
60	0,707	0,051	0,376 <sup>ab</sup>	0,041	0,408 <sup>ab</sup>	0,0810	0,457 <sup>b</sup>	0,105
90	0,633	0,051	0,385 <sup>a</sup>	0,051	0,157 <sup>a</sup>	0,0218	1,804 <sup>ab</sup>	0,347
120	0,697	0,084	0,350 <sup>a</sup>	0,039	0,215 <sup>a</sup>	0,0312	3,152 <sup>ab</sup>	0,342

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Os transportes de eletrólitos também foram bastante alterados. Independentemente da concentração da peçonha, houve alteração em pelo menos dois dos três períodos nos quais o rim foi perfundido com o VBL.

Para o percentual de transporte de Na<sup>+</sup> (%TNa<sup>+</sup>), a concentração de 0,1 µg/mL reduziu significativamente esse parâmetro nos três tempos (60, 90 e 120min), embora que aos 60min essa alteração seja somente em relação ao controle interno. A concentração de 1,0µg/mL reduziu o transporte de sódio nos três tempos, tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle. Já na concentração de 10,0µg/mL, houve alterações em 90min em relação ao controle interno, enquanto que aos 120min a redução desse parâmetro foi em relação a ambos os controles (interno e grupo controle). Essas alterações podem ser visualizadas na figura 42 e na tabela 5. As alterações no percentual de transporte de K<sup>+</sup> (%TK<sup>+</sup>) e no percentual de transporte de Cl<sup>-</sup> (%TCl<sup>-</sup>), bem como de percentual de transporte proximal de Na<sup>+</sup> (%TpNa<sup>+</sup>), percentual de transporte proximal de K<sup>+</sup> (%TpK<sup>+</sup>) e no percentual de transporte proximal de Cl<sup>-</sup> (%TpCl<sup>-</sup>) foram muito parecidas com as observadas no parâmetro %TNa<sup>+</sup>, assim como demonstrado nas figuras 43, 44, 45, 46, 47 e 48, além das tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

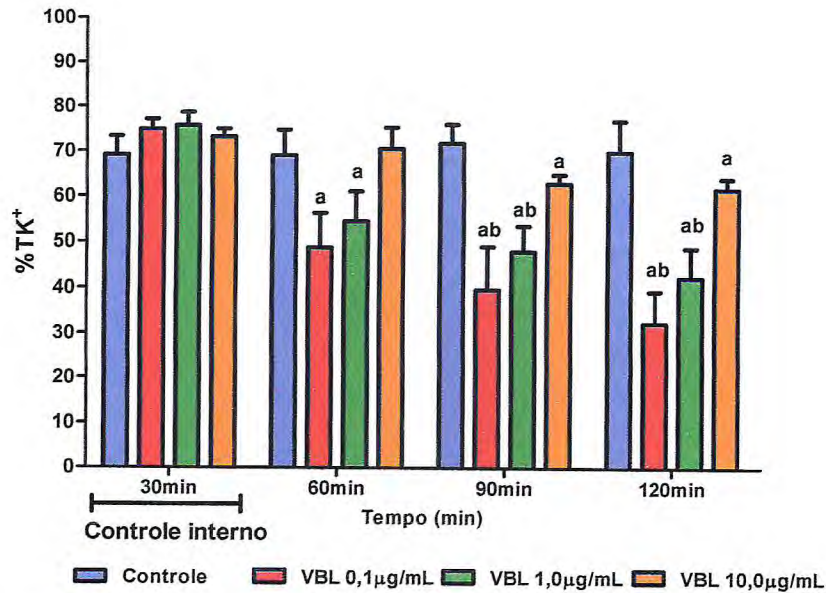


**Figura 42.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 5.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	84,43	1,69	82,30	1,70	85,41	1,17
60	81,11	1,52	68,42 <sup>a</sup>	3,75	63,22 <sup>ab</sup>	6,26	81,43	3,41
90	79,26	0,90	65,17 <sup>ab</sup>	3,95	51,57 <sup>ab</sup>	5,71	73,85 <sup>a</sup>	2,07
120	79,76	0,56	59,03 <sup>ab</sup>	3,95	43,73 <sup>ab</sup>	6,29	67,64 <sup>ab</sup>	3,60

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

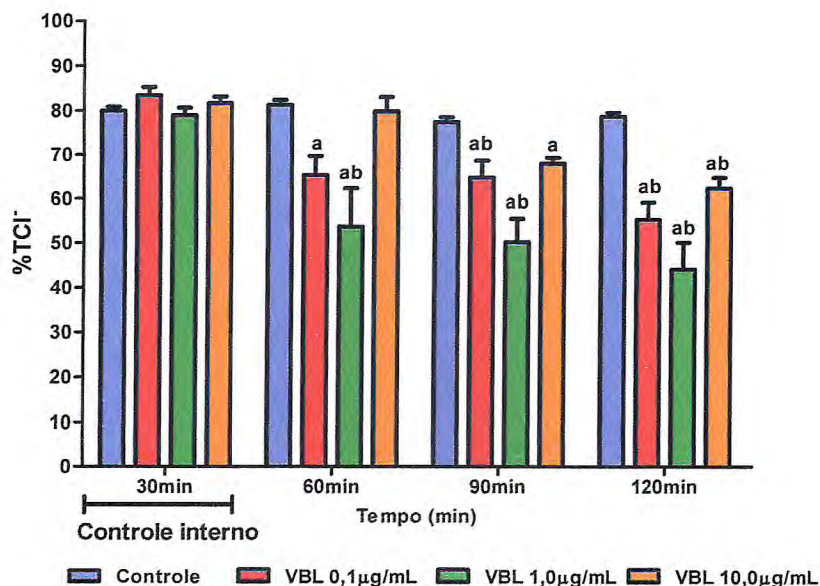


**Figura 43.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 6.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	69,13	4,14	74,93	2,19	75,64	3,01	73,17	1,80
60	69,04	5,68	48,75 <sup>a</sup>	7,66	54,56 <sup>ab</sup>	6,56	70,54	4,75
90	71,84	4,21	39,59 <sup>ab</sup>	9,53	48,00 <sup>ab</sup>	5,66	62,97 <sup>a</sup>	1,97
120	69,94	6,86	32,18 <sup>ab</sup>	7,12	42,32 <sup>ab</sup>	6,54	61,84 <sup>a</sup>	2,26

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

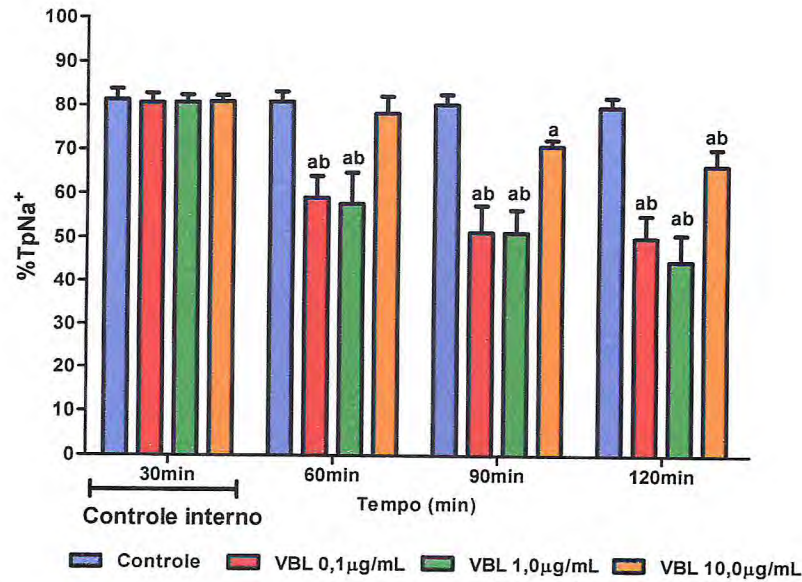


**Figura 44.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte de cloreto (%TCI). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 7.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCI) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	0,98	83,37	1,93	78,91	1,76	81,65	1,46
60	81,25	1,06	65,32 <sup>a</sup>	4,38	53,66 <sup>ab</sup>	8,68	79,76	3,20
90	77,32	1,12	64,82 <sup>ab</sup>	3,86	50,28 <sup>ab</sup>	5,25	67,99 <sup>a</sup>	1,37
120	78,53	0,89	55,39 <sup>ab</sup>	3,82	44,15 <sup>ab</sup>	6,12	62,30 <sup>ab</sup>	2,50

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

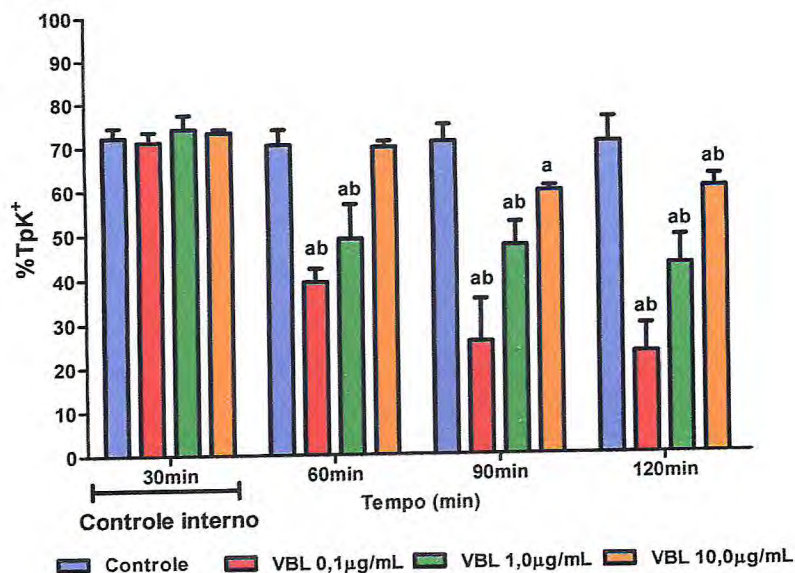


**Figura 45.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte proximal de sódio (%TpNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 8.** Valores de percentual de transporte proximal de sódio (%TpNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	81,30	2,47	80,59	2,19	80,73	1,670	80,89	1,43
60	80,76	2,39	58,98 <sup>ab</sup>	4,89	57,63 <sup>ab</sup>	7,050	78,07	3,97
90	80,11	2,34	51,18 <sup>ab</sup>	6,09	51,06 <sup>ab</sup>	5,215	70,64 <sup>a</sup>	1,45
120	79,45	2,24	49,82 <sup>ab</sup>	5,18	44,47 <sup>ab</sup>	6,118	66,19 <sup>ab</sup>	3,82

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

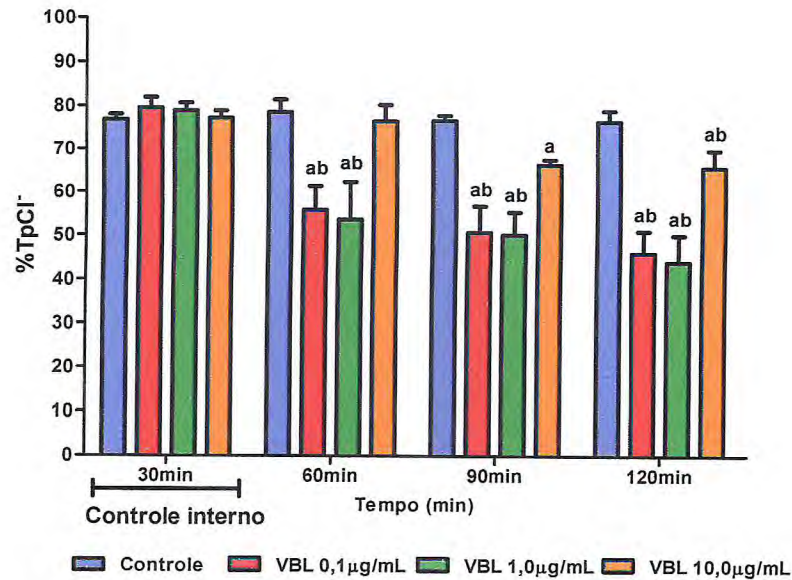


**Figura 46.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte proximal de potássio (%TpK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 9.** Valores de percentual de transporte proximal de potássio (%TpK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	72,11	2,31	71,10	2,34	74,08	3,24	73,24	0,84
60	70,32	3,51	39,30 <sup>ab</sup>	3,06	49,00 <sup>ab</sup>	7,81	69,67	1,43
90	70,98	3,88	25,60 <sup>ab</sup>	9,68	47,49 <sup>ab</sup>	5,18	59,76 <sup>a</sup>	1,10
120	70,71	5,67	22,97 <sup>ab</sup>	6,52	43,05 <sup>ab</sup>	6,41	60,40 <sup>a</sup>	2,69

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 47.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%TpCl). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 10.** Valores de percentual de transporte proximal de cloreto (%TpCl) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

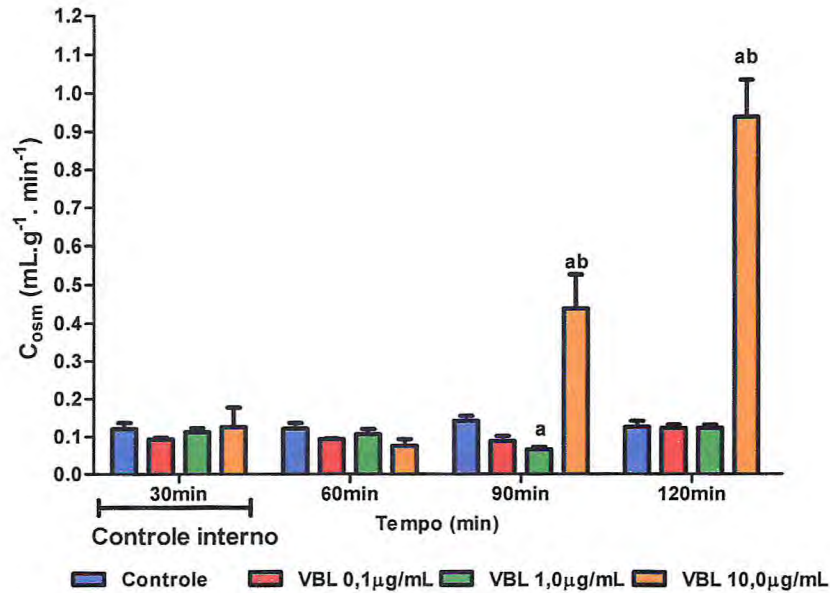
Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	76,81	1,25	79,53	2,42	78,90	1,76	77,14	1,72
60	78,49	2,90	55,88 <sup>ab</sup>	5,56	53,66 <sup>ab</sup>	8,70	76,40	3,81
90	76,58	1,20	50,83 <sup>ab</sup>	6,06	50,28 <sup>ab</sup>	5,24	66,44 <sup>a</sup>	1,20
120	76,36	2,47	46,19 <sup>ab</sup>	5,03	44,15 <sup>ab</sup>	6,12	65,86 <sup>ab</sup>	3,92

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Para verificar a capacidade de depuração do rim isolado em nível de moléculas osmoticamente ativas, realizou-se o cálculo do clearance osmótico ( $C_{osm}$ ). A concentração de 0,1µg/mL não promoveu alterações significativas nesse parâmetro, enquanto que na concentração de 1,0µg/mL (90min), em relação ao



controle interno, houve redução desse parâmetro. A concentração de 10,0µg/mL alterou o parâmetro avaliado aos 90 e 120min, tanto em relação ao grupo controle como ao controle interno (figura 48 e tabela 11).



**Figura 48.** Efeitos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) no clearance osmótico ( $C_{osc}$ ). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

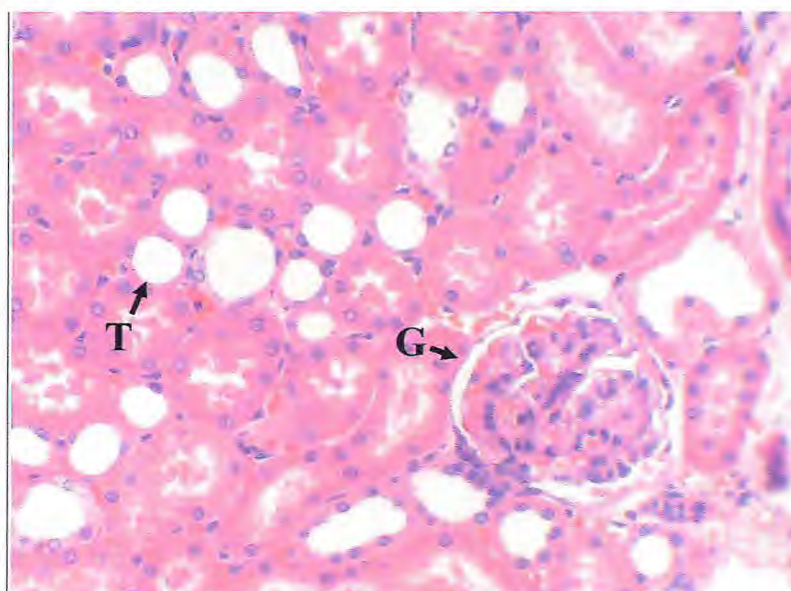
**Tabela 11.** Valores de clearance osmótico ( $C_{osc}$ ) nos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VBL 0,1µg/mL		VBL 1,0µg/mL		VBL 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,120	0,017	0,093	0,005	0,112	0,011	0,125	0,051
60	0,121	0,015	0,093	0,003	0,106	0,014	0,075	0,018
90	0,142	0,013	0,087	0,014	0,066 <sup>a</sup>	0,006	0,438 <sup>ab</sup>	0,088
120	0,125	0,016	0,122	0,009	0,122	0,009	0,939 <sup>ab</sup>	0,098

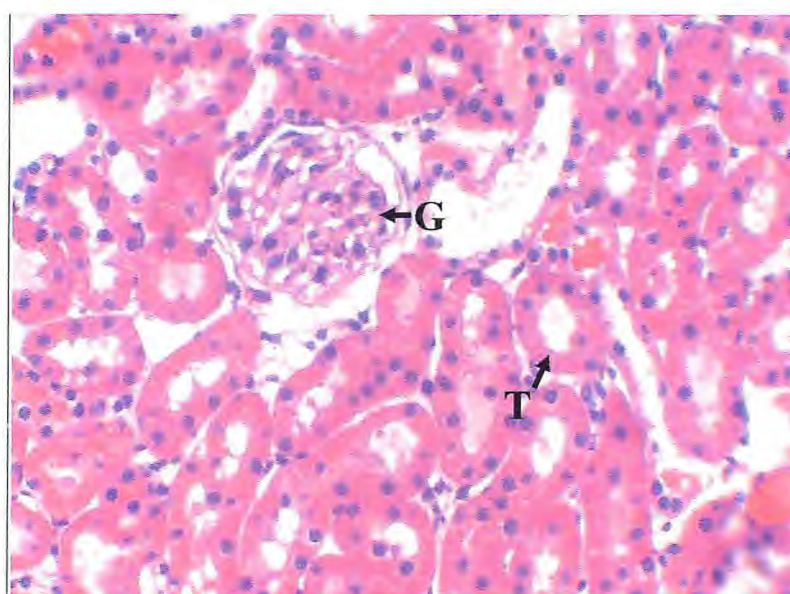
Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (0,1; 1,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em  $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

#### 4.1.2 HISTOLOGIA DOS RINS PERFUNDIDOS

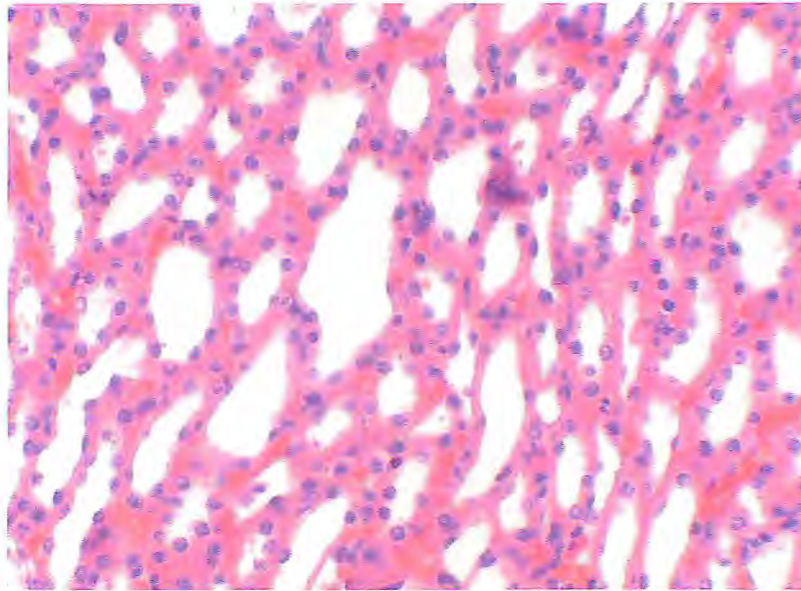
As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstício), assim como os rins do grupo controle perfundidos somente com solução de Krebs. (figuras 49, 50, 51 e 52).



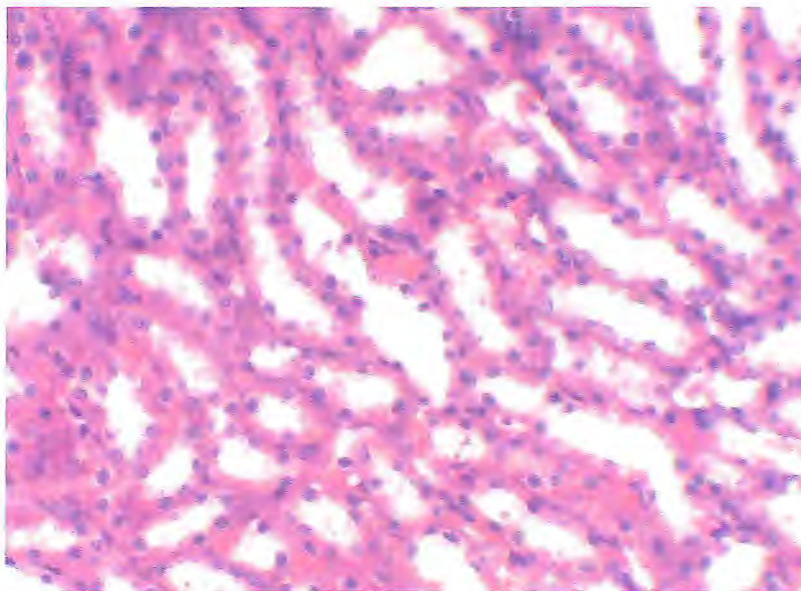
**Figura 49.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 50.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

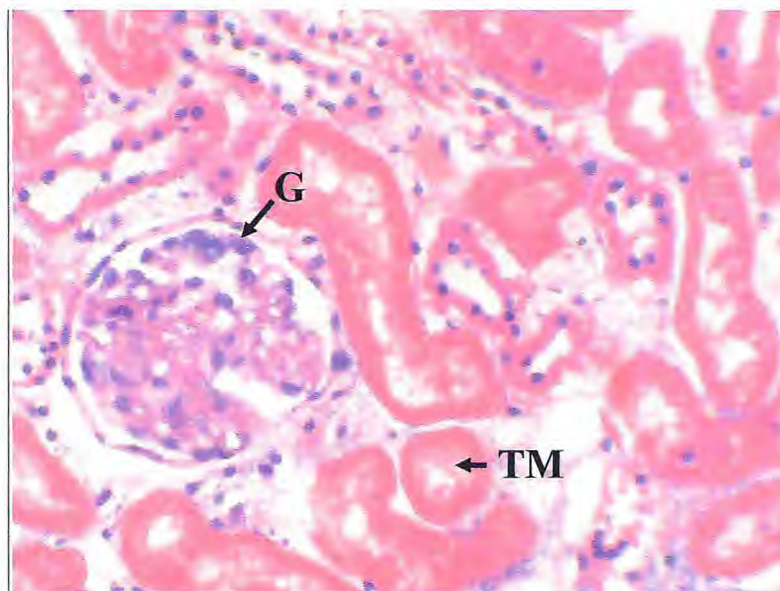


**Figura 51.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

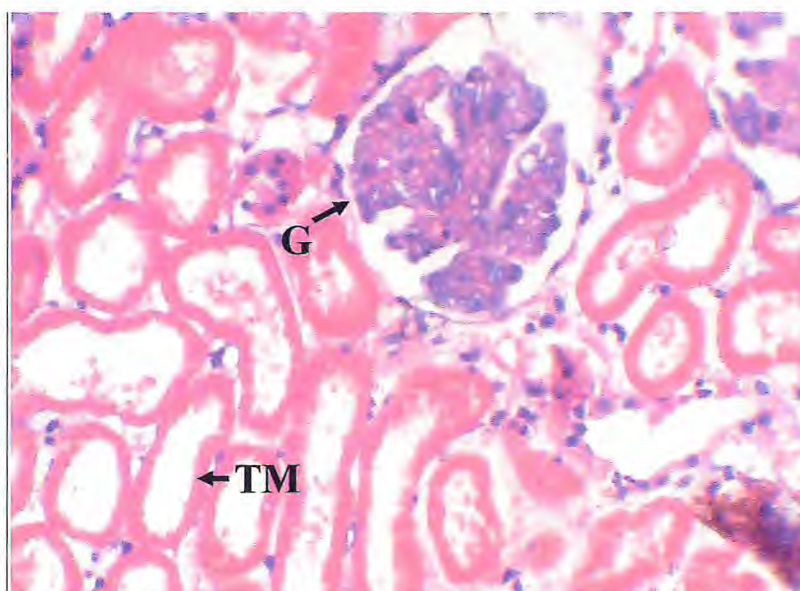


**Figura 52.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

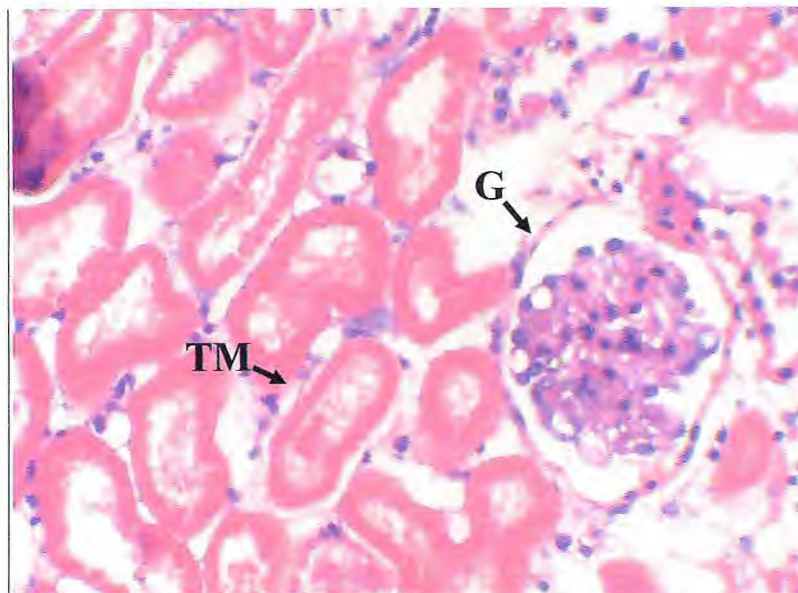
Nos túbulos renais apresentados nas figuras 56, 57, 58, 59, 60 e 61, observa-se indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de apoptose/dano direto às células tubulares em todas as concentrações de VBL estudadas. As outras estruturas como glomérulos, vasos e interstício permaneceram íntegras à microscopia ótica.



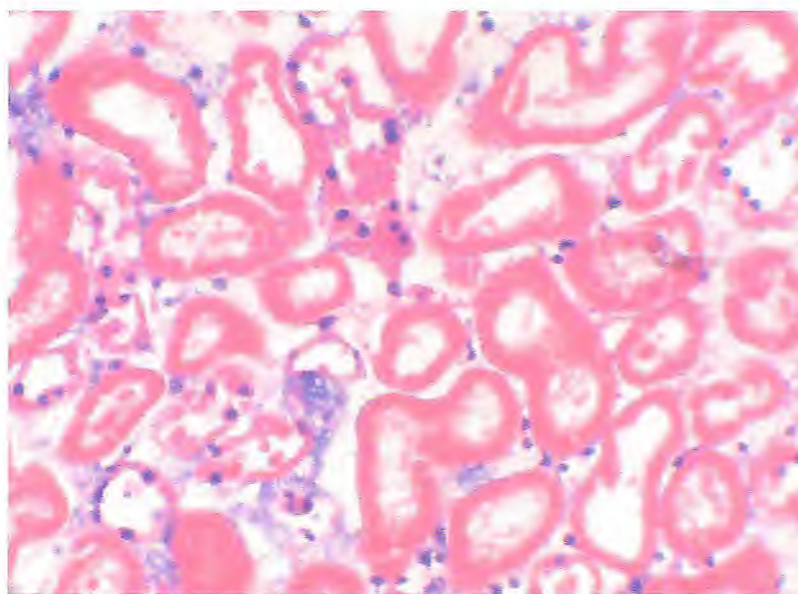
**Figura 56.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (0,1 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



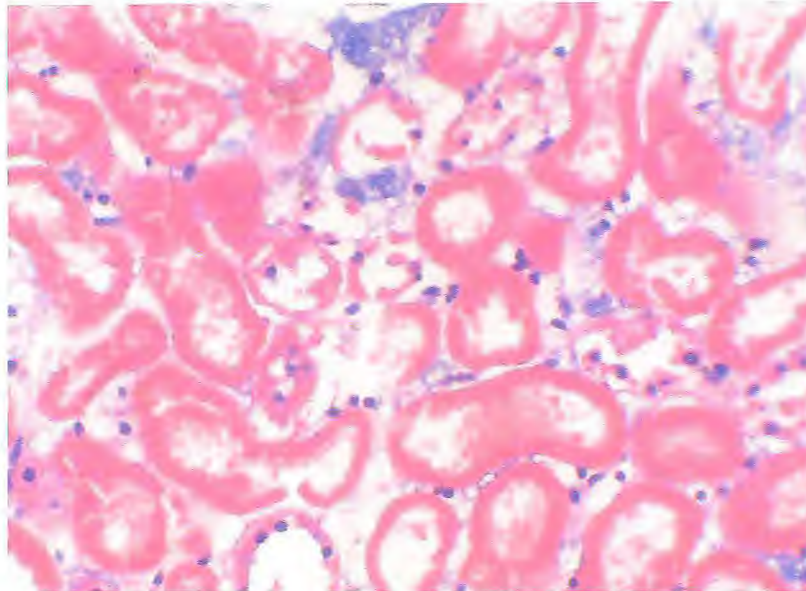
**Figura 57.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (1,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



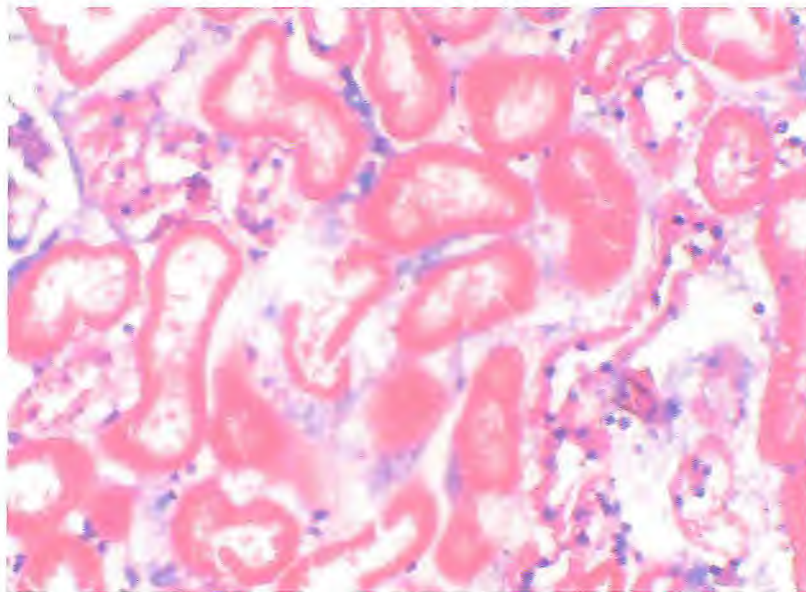
**Figura 58.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (10,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 59.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (0,1 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 60.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (1,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

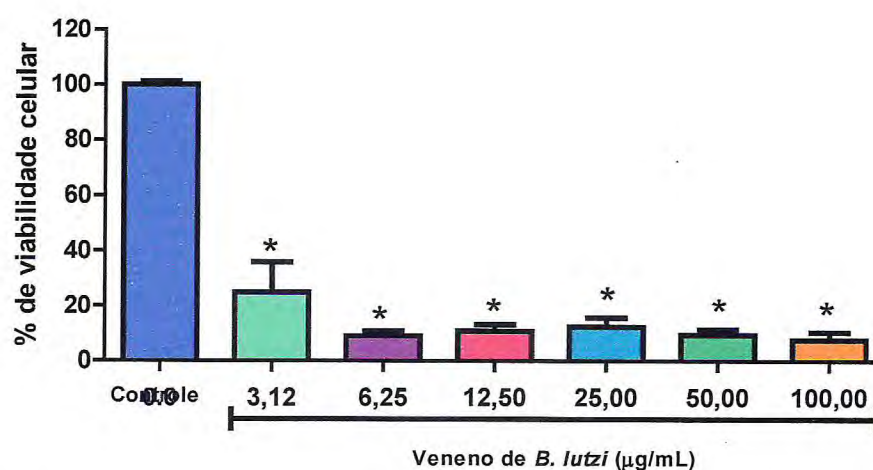


**Figura 61.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Bothrops lutzi* (10,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

## 4.2 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS

### 4.2.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE

Os experimentos realizados com as células MDCK revelaram que o veneno de *B. lutzi* é extremamente citotóxico, apresentando diminuição significativa da viabilidade celular na menor concentração testada (3,12µg/mL). Para essa concentração, as absorbâncias obtidas demonstraram que apenas 25,91% das células permaneciam capazes de produzir formazan. Nas outras concentrações de veneno estudadas, a viabilidade celular ficou por volta de 10,00%, alcançando os níveis mais baixos de viabilidade (7,66%) com a maior concentração estudada (100,0 µg/mL). Esses resultados podem ser visualizados na figura 62 e na tabela 11. As fotomicrografias das células MDCK também permitem demonstrar a morte celular induzida pelo veneno de *B. lutzi*. Na figura 63 podem ser visualizadas células pertencentes ao grupo controle negativo, enquanto que na figura 64 verifica-se o padrão de morte celular induzido pelo veneno testado.

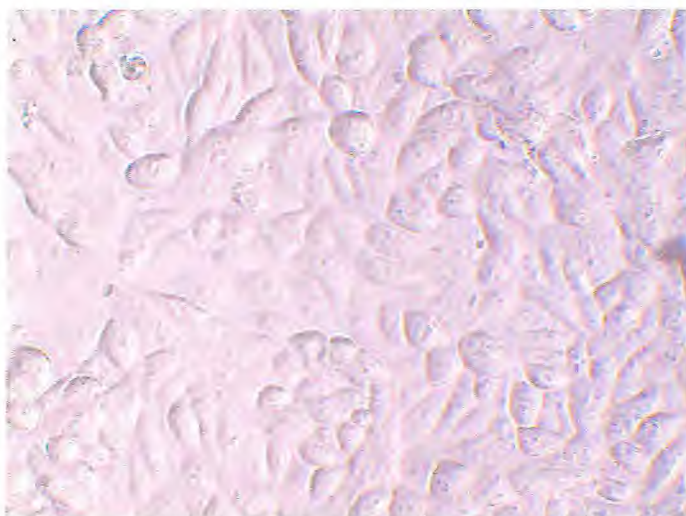


**Figura 62.** Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

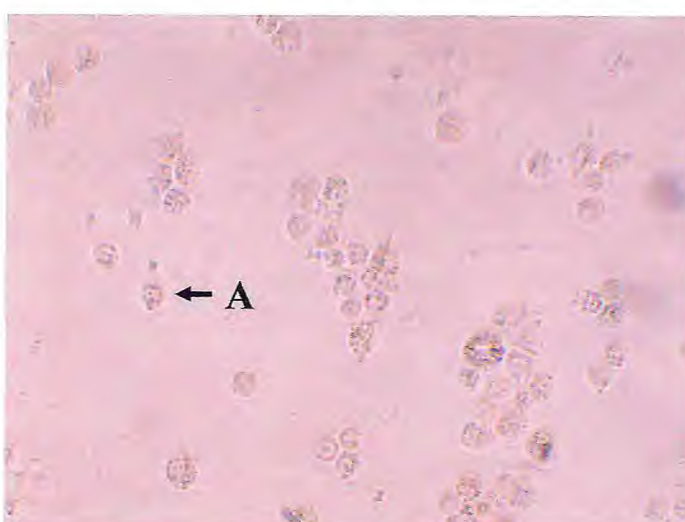
**Tabela 12.** Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00  $\mu\text{g/mL}$ ).

Grupos experimentais													
Controle		VBL 3,12 $\mu\text{g/mL}$		VBL 6,25 $\mu\text{g/mL}$		VBL 12,50 $\mu\text{g/mL}$		VBL 25,00 $\mu\text{g/mL}$		VBL 50,00 $\mu\text{g/mL}$		VBL 100,00 $\mu\text{g/mL}$	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,00	1,16	24,91*	11,01	8,95*	1,84	10,79*	2,41	22,31*	3,41	9,48*	1,99	7,66*	2,86

Os resultados dos experimentos (n=3 – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), em % de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle negativo (ANOVA – Tukey).



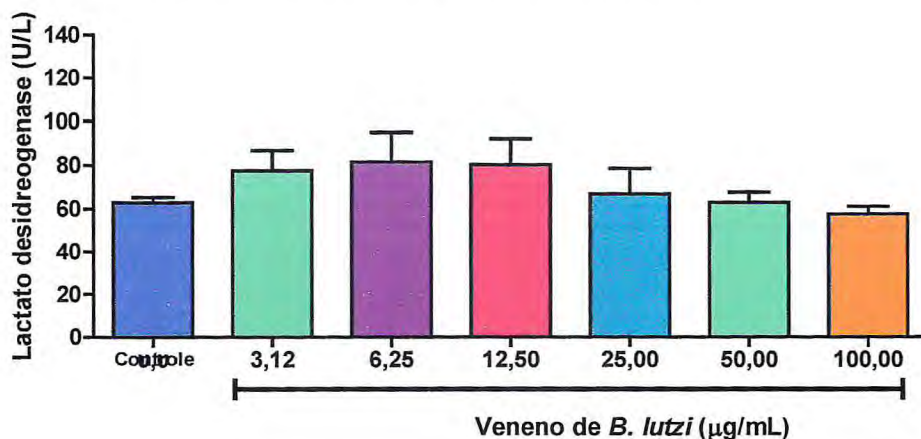
**Figura 63.** Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).



**Figura 64.** Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno de *Bpithrops lutzi*, demonstrando o padrão de morte celular observado, onde A representa as células expostas ao VBL (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).



Ainda nesse experimento, realizou-se o armazenamento do sobrenadante para se dosar a enzima lactato-desidrogenase (LDH) presente nessas amostras. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença nos níveis dessa enzima entre o grupo controle negativo e os grupos expostos ao veneno de *B. lutzi*. Esses resultados podem ser visualizados na figura 65 e na tabela 13.



**Figura 65.** Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de U/L (unidades por litro). “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

**Tabela 13.** Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de (3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,00 µg/mL).

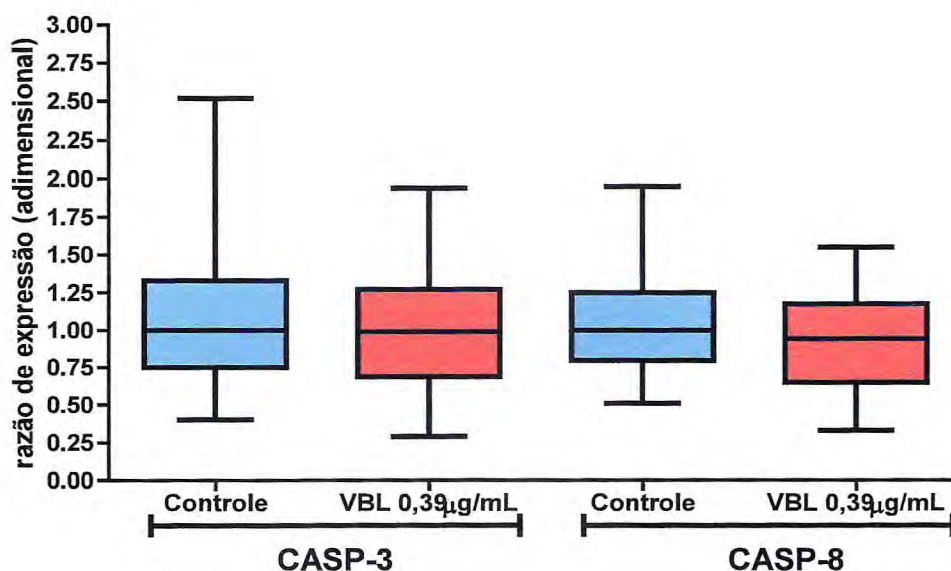
Grupos experimentais													
Controle		VBL 3,12µg/mL		VBL 6,25µg/mL		VBL 12,50µg/mL		VBL 25,00µg/mL		VBL 50,00µg/mL		VBL 100,00µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
62,78	2,66	77,49	9,36	81,49	13,55	80,16	12,02	66,81	11,65	62,78	4,80	57,44	3,53

Os resultados dos experimentos ( $n=3$  – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) e em U/L (ANOVA – Tukey).

#### 4.2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

De acordo com os ensaios de expressão gênica, verificou-se que o veneno não é capaz de induzir a expressão de genes pró-apoptóticos (CASP-3 e CASP-8) nas células MDCK quando essas são expostas à concentração de 0,39µg/mL.

Isso foi verificado, uma vez que não houve diferença entre as razões de expressão desses genes. Para CASP-3, o resultado obtido foi de  $1,09 \pm 0,08$  para o grupo controle vs.  $1,01 \pm 0,08$  para o grupo tratado com VBL  $0,39 \mu\text{g/mL}$ . Enquanto que para o CASP-8, os valores foram de  $1,04 \pm 0,05$  para o controle vs.  $0,93 \pm 0,06$  VBL  $0,39 \mu\text{g/mL}$  (figura 66 e tabela 14).



**Figura 66.** Razão de expressão dos genes CASP-3 e CASP-8 em células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* ( $0,39 \mu\text{g/mL}$ ) por 24h, nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=4$  – amostras em sextuplicata – teste  $t$  não pareado).

**Tabela 14.** Valores da razão de expressão dos genes CASP-3 e CASP-8 em células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* ( $0,39 \mu\text{g/mL}$ ) por 24h.

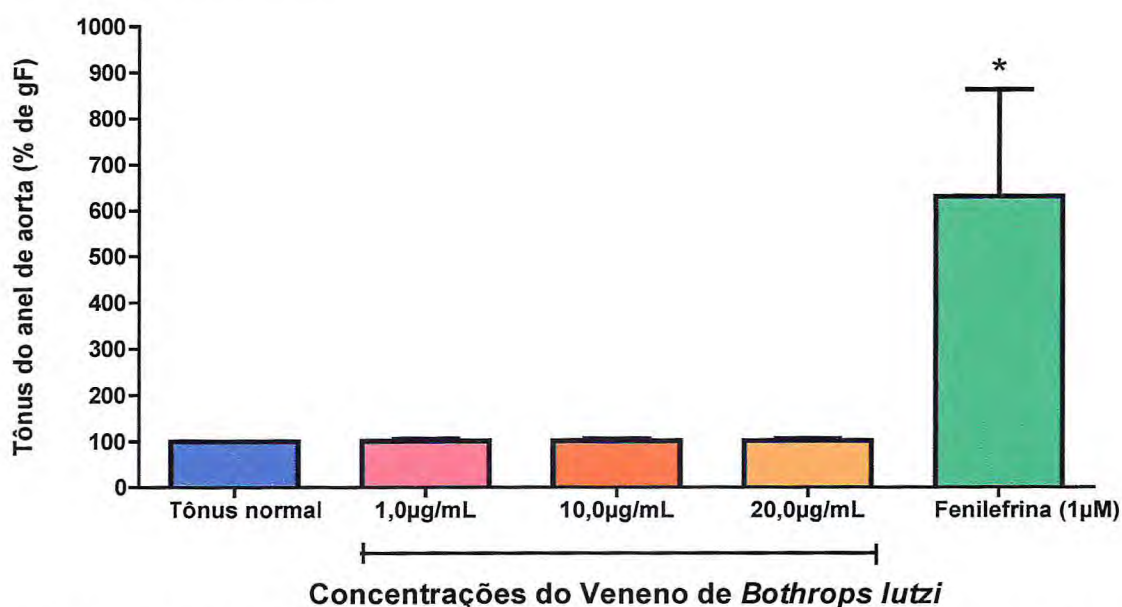
CASP-3				CASP-8			
Controle		VBL $0,39 \mu\text{g/mL}$		Controle		VBL $0,39 \mu\text{g/mL}$	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
1,09	0,08	1,01	0,08	1,04	0,05	0,93	0,06

Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) ( $n=4$  – amostras em sextuplicata – teste  $t$  pareado).

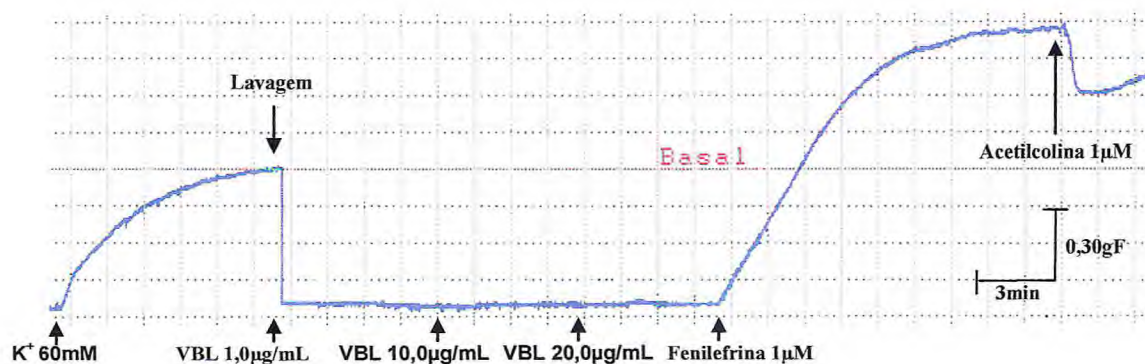
### 4.3 ANEL DE AORTA

#### 4.3.1 EXPOSIÇÃO AO VENENO SEM PRÉ-CONTRAÇÃO

Utilizando-se a preparação de anel de aorta sem a pré-contracção com fenilefrina, verificou-se que em nenhuma das concentrações testadas do veneno de *Bothrops lutzi* promoveu alterações na tensão do tecido. Outro fato relevante é que a preparação continuou respondendo, na forma de contracção, a um agonista, no caso a fenilefrina, apresentando um aumento na tensão do anel de aorta após contato com o fármaco anteriormente citado. Essa tensão aumentou de forma significativa tanto em relação ao período considerado como de tensão normal como em relação aos períodos nos quais houve exposição ao VBL. Esses resultados podem ser verificados nas figuras 67 e 68, bem como os resultados numéricos podem ser observados na tabela 15.



**Figura 67.** Tônus do anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) e fenilefrina (1µM), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual do tônus normal do anel de aorta. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao tônus normal (n=4 - ANOVA – Tukey).



**Figura 68.** Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) e fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

**Tabela 15.** Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de  $0,1\mu\text{g/mL}$ ,  $1,0\mu\text{g/mL}$  e  $10,0\mu\text{g/mL}$ .

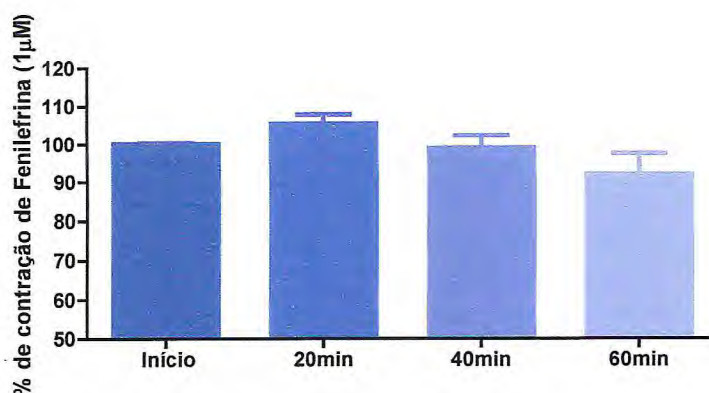
Grupos experimentais										
Tônus normal		VBL $0,1\mu\text{g/mL}$		VBL $1,0\mu\text{g/mL}$		VBL $10,0\mu\text{g/mL}$		Fenilefrina $1\mu\text{M}$		
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	
100,00	0,00	101,42	3,94	101,37	4,03	101,56	4,05	630,405*	232,08	

Os resultados dos experimentos ( $n=4$ ) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %. “\*” representa  $p<0,05$  em relação ao tônus normal (ANOVA – Tukey).

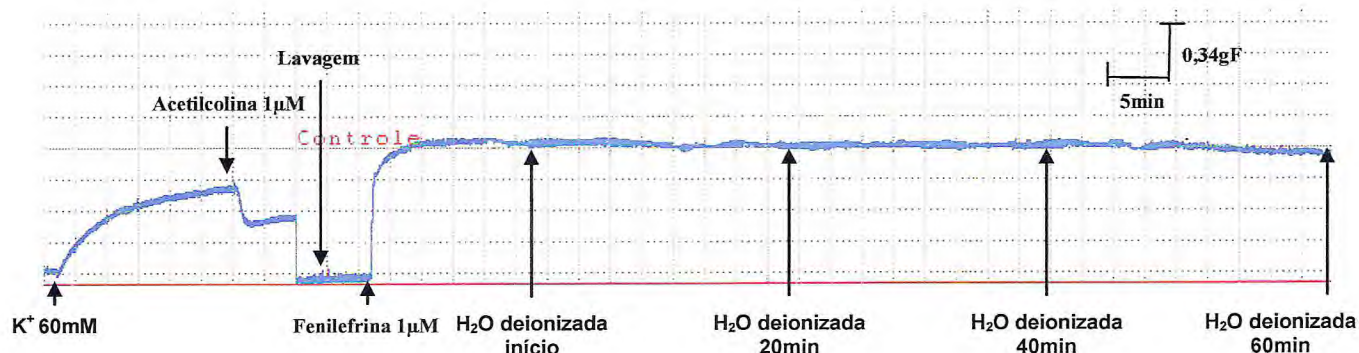
#### 4.3.2 EXPOSIÇÃO AO VENENO COM PRÉ-CONTRAÇÃO

##### 4.3.2.1 EXPOSIÇÃO À CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS DE VENENO

Antes de iniciar o protocolo, realizaram-se experimentos para demonstrar que o tecido estudado (anel de aorta) permanecia contraído por pelo menos 1 hora na presença de fenilefrina, sem haver diferença estatística nos tempos analisados (20, 40 e 60min). Esses resultados podem ser demonstrados nas figuras 69 e 70, bem como na tabela 16.



**Figura 69.** Comportamento do anel de aorta isolado de rato exposto à fenilefrina (1µM) por 60min, nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração de fenilefrina (n=4 - ANOVA – Tukey).



**Figura 70.** Traçado obtido nos experimentos com fenilefrina (1µM), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

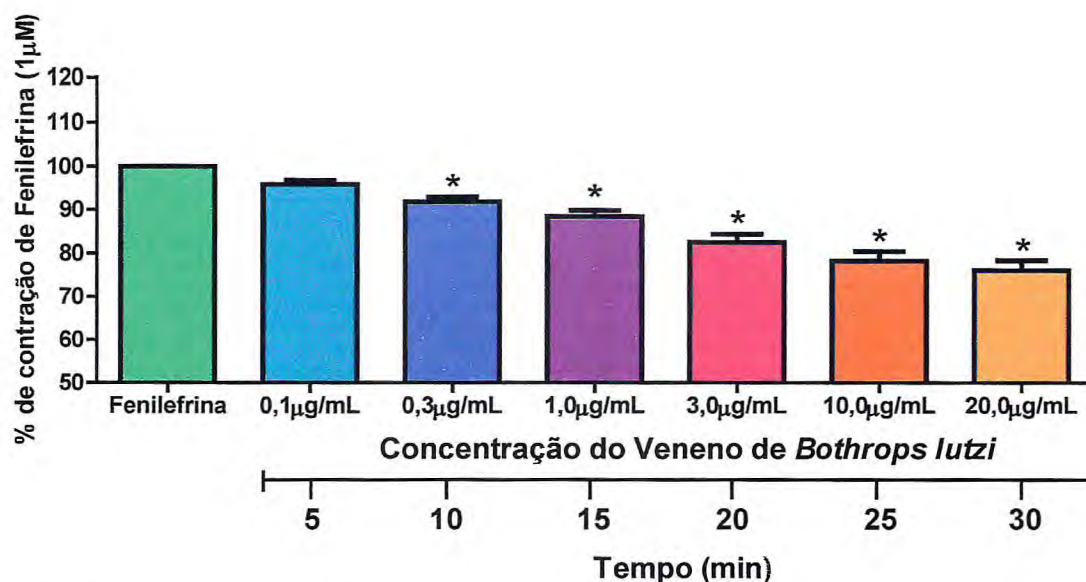
**Tabela 16.** Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato exposto à fenilefrina (1µM) em diferentes tempos (20, 40 e 60min).

Fenilefrina 1µM							
Início		20min		40min		60min	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,20	0,20	105,5	2,52	99,11	3,25	92,21	12,00

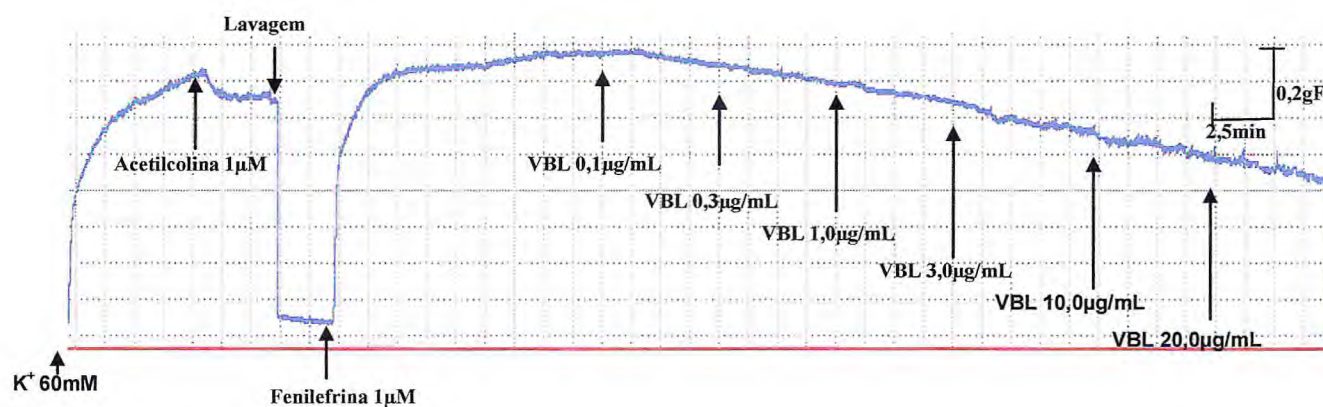
Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em % (ANOVA – Tukey).

Posteriormente a realização desse experimento, iniciou-se os estudos com de as múltiplas concentrações de VBL (0,1-30,0µg/mL) em anel de aorta pré-contraído com fenilefrina. Os resultados obtidos demonstraram que o anel de aorta iniciou um

relaxamento com a concentração de 0,3 $\mu$ g/mL até 30 $\mu$ g/mL, observando-se, nesse último, um relaxamento de aproximadamente 24%; tal efeito foi estatisticamente significativo desde a segunda concentração testada até a máxima, de acordo com a realização de ANOVA com pós-teste de Tukey. Esses resultados são demonstrados nas figuras 71 e 72 e na tabela 17.



**Figura 71.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) em anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M, nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração de fenilefrina. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação à contração máxima com a fenilefrina 1 $\mu$ M (n=4 - ANOVA – Tukey).



**Figura 72.** Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) em diferentes concentrações (0,1-30,0  $\mu$ g/mL), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

**Tabela 17.** Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato pré-contraindo com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 0,1-10,0 $\mu$ g/mL.

Grupos experimentais													
Fenilefrina 1 $\mu$ M		VBL 0,1 $\mu$ g/mL		VBL 0,3 $\mu$ g/mL		VBL 1,0 $\mu$ g/mL		VBL 3,0 $\mu$ g/mL		VBL 10,0 $\mu$ g/mL		VBL 30,0 $\mu$ g/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,00	0,00	95,86	0,98	91,80*	1,10	88,41*	1,41	82,51*	1,89	78,29*	2,20	76,11*	2,28

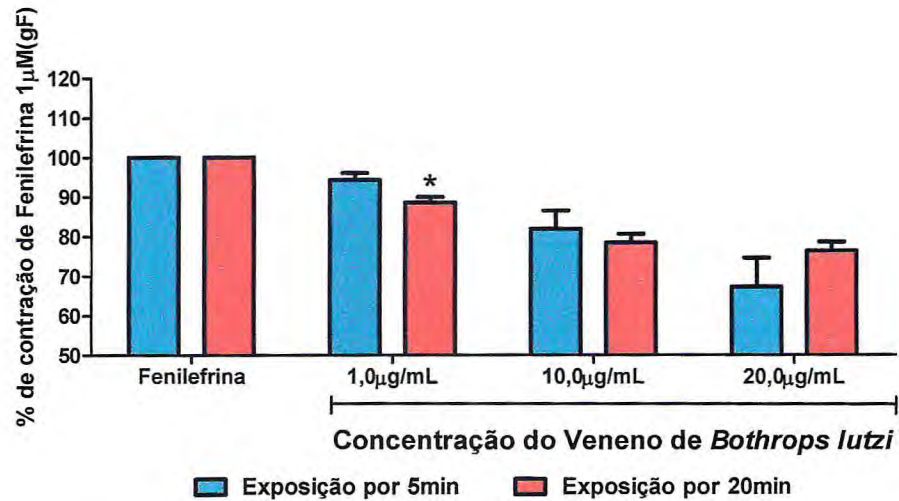
Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em % de contração de fenilefrina. “\*” representa p<0,05 em relação a contração máxima de fenilefrina 1 $\mu$ M (ANOVA – Tukey).

Para verificar se esse relaxamento era independente do tempo de exposição, submeteram-se os tecidos ao contato com VBL por 5 ou 20min, utilizando-se 3 concentrações da peçonha estudada.

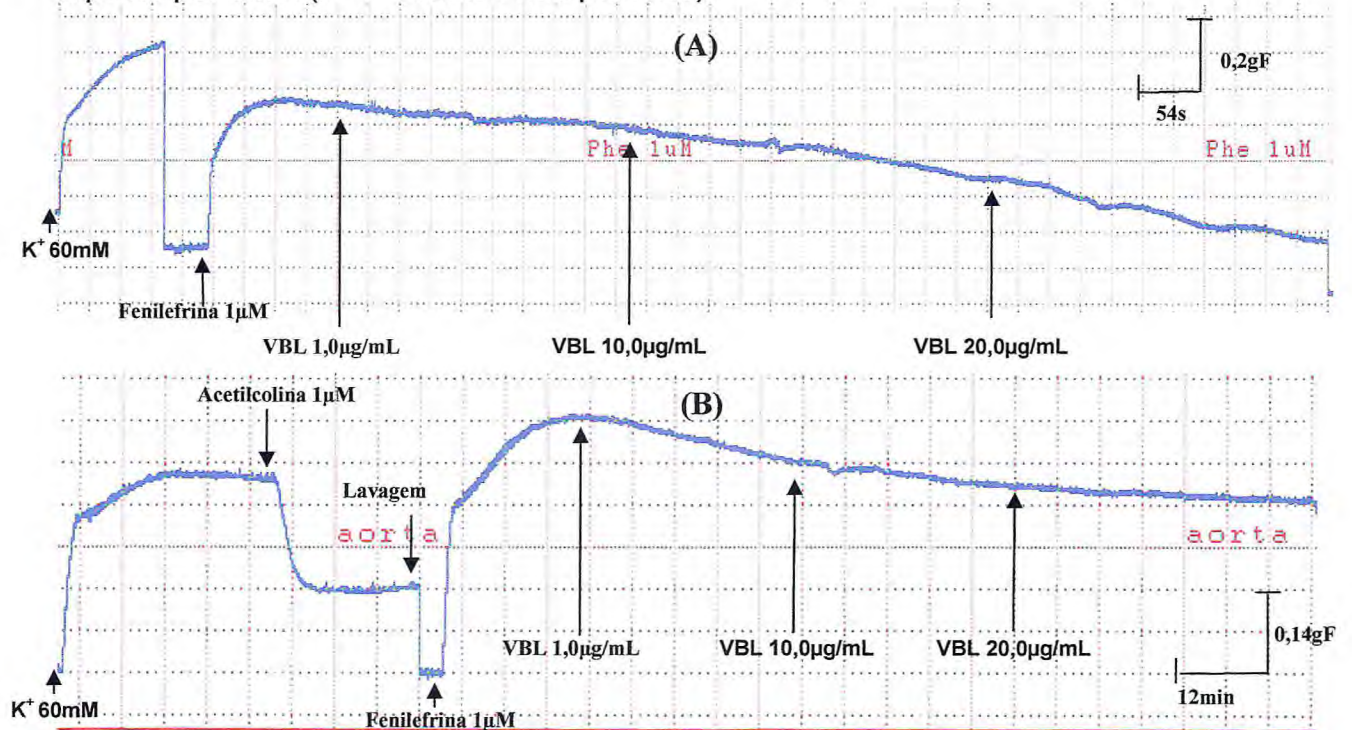
#### 4.3.2.2 EXPOSIÇÃO AO VENENO POR 5min e 20min

Quando o anel de aorta isolado de rato pré-contraindo com fenilefrina foi exposto ao VBL nas concentrações de 1,0; 10,0 e 20,0 $\mu$ g/mL por diferentes intervalos de tempo (5 e 20min), verificou-se que o relaxamento encontrado na concentração de 1,0 $\mu$ g/mL foi significativamente maior com a exposição de 20min em relação a exposição por 5min. Nas outras duas concentrações estudadas não se verificou diferença estatística entre os tempos de exposição.

Esses resultados podem ser observados nas figuras 73 e 74, bem como na tabela 18.



**Figura 73.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) por 5 e 20 minutos em anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina  $1\mu\text{M}$ , nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração de fenilefrina. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo exposto por 5min ( $n=4$  – Teste t não pareado).



**Figura 74.** Traçado representativo obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina  $1\mu\text{M}$  exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL; 1,0-20,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por diferentes períodos de tempo (5 (A) e 20min (B)), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min ou s) e a tensão do tecido em grama-força (gF).



**Tabela 18.** Valores do tónus do anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina 1 $\mu$ M exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de 1,0 $\mu$ g/mL, 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL em diferentes tempos de exposição.

Tempo de exposição (min)	Grupos estudados							
	Fenilefrina 1 $\mu$ M		VBL 1,0 $\mu$ g/mL		VBL 10,0 $\mu$ g/mL		VBL 20,0 $\mu$ g/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
5	100,00	0,00	94,20	1,73	81,74	4,56	67,01	7,32
20	100,00	0,00	88,41*	1,41	78,29	2,20	76,11	2,28

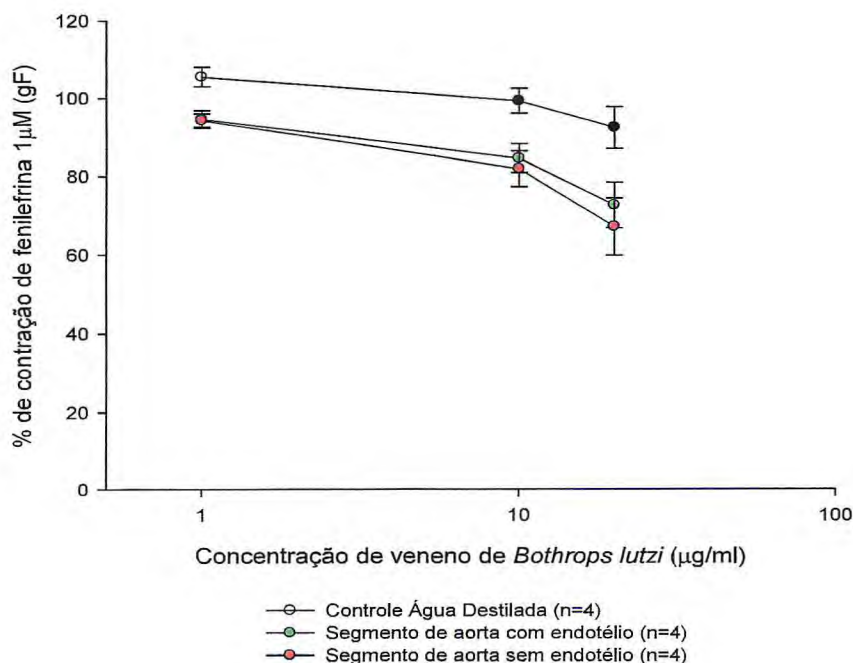
Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em % de contração de fenilefrina. “\*” representa p<0,05 em a contração máxima com fenilefrina 1 $\mu$ M (teste t pareado).

#### 4.3.2.3 EXPOSIÇÃO DO ANEL DE AORTA COM E SEM ENDOTÉLIO AO VENENO

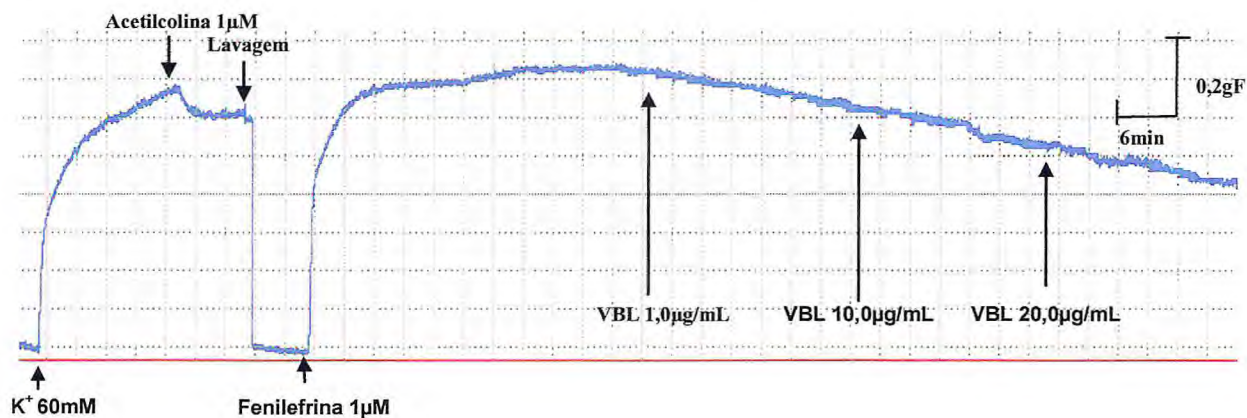
Para avaliar participação do endotélio nesse processo de relaxamento, realizou-se o protocolo de exposição de 20min em anéis de aorta isolados de rato pré-contraídos com fenilefrina 1 $\mu$ M, sendo que um grupo possuía endotélio e em outro grupo experimental o mesmo foi retirado mecanicamente. As concentrações de VBL utilizadas nessa variação de protocolo foram 1,0; 10 e 20,0 $\mu$ g/mL.

Os resultados desse experimento demonstraram que não houve diferença entre os dois grupos testados, sendo que a ausência de endotélio foi comprovada com a colocação de acetilcolina 1 $\mu$ M (Ach) na cuba onde o tecido estava alocado.

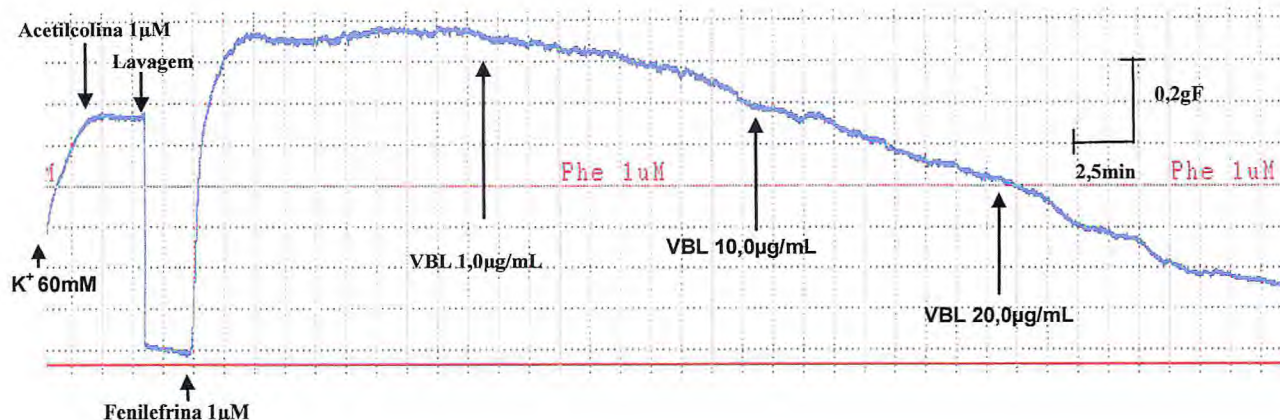
Esses resultados podem ser verificados nas figuras 75, 76 e 77 e na tabela 19.



**Figura 75.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) em anel de aorta isolado de rato com e sem endotélio pré-contraído com fenilefrina 1µM, nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração de fenilefrina. (n=4 – Teste t não pareado).



**Figura 76.** Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato com e sem endotélio pré-contraído com fenilefrina 1µM exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL; 1,0-20,0 µg/mL) no tecido com endotélio (comprovado pela exposição à acetilcolina (Ach -1µM), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).



**Figura 77.** Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato com e sem endotélio pré-contraído com fenilefrina  $1\mu\text{M}$  exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL;  $1,0\text{-}20,0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) no tecido sem endotélio (comprovado pela exposição à acetilcolina (Ach -  $1\mu\text{M}$ ), demonstrando a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

**Tabela 19.** Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato pré-contraído com fenilefrina  $1\mu\text{M}$  exposto ao veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) nas concentrações de  $1,0\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $10,0\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $20,0\mu\text{g}/\text{mL}$  em tecido com e sem endotélio.

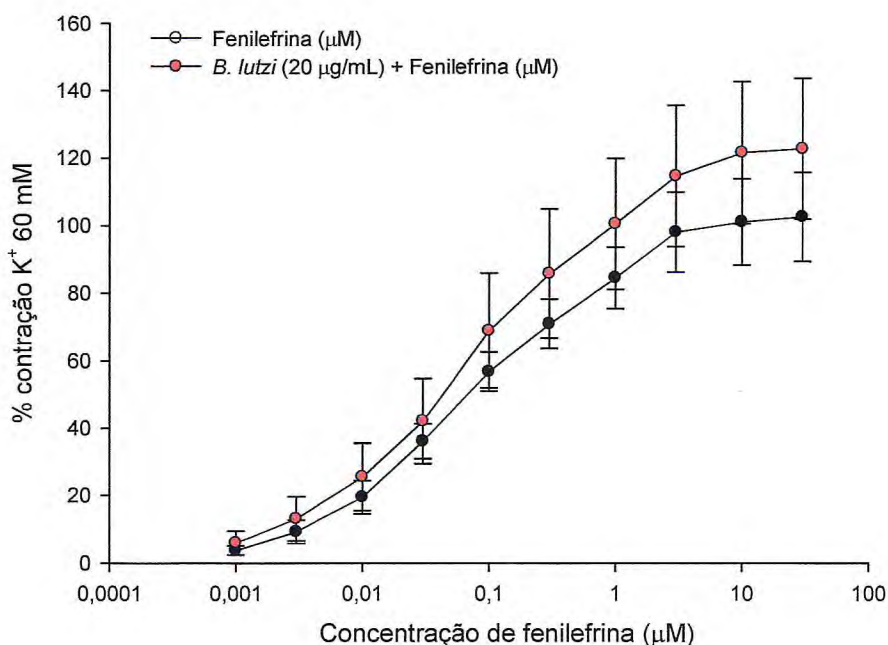
Anel de aorta	Concentrações estudadas							
	Fenilefrina $1\mu\text{M}$		VBL $1,0\mu\text{g}/\text{mL}$		VBL $10,0\mu\text{g}/\text{mL}$		VBL $20,0\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Com endotélio	100,00	0,00	94,40	2,29	84,41	3,65	72,49	5,85
Sem endotélio	100,00	0,00	94,20	1,72	81,74	4,58	67,01	7,33

Os resultados dos experimentos ( $n=4$ ) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em % de contração de fenilefrina. “\*” representa  $p<0,05$  em a contração máxima com fenilefrina  $1\mu\text{M}$  (teste t não pareado).

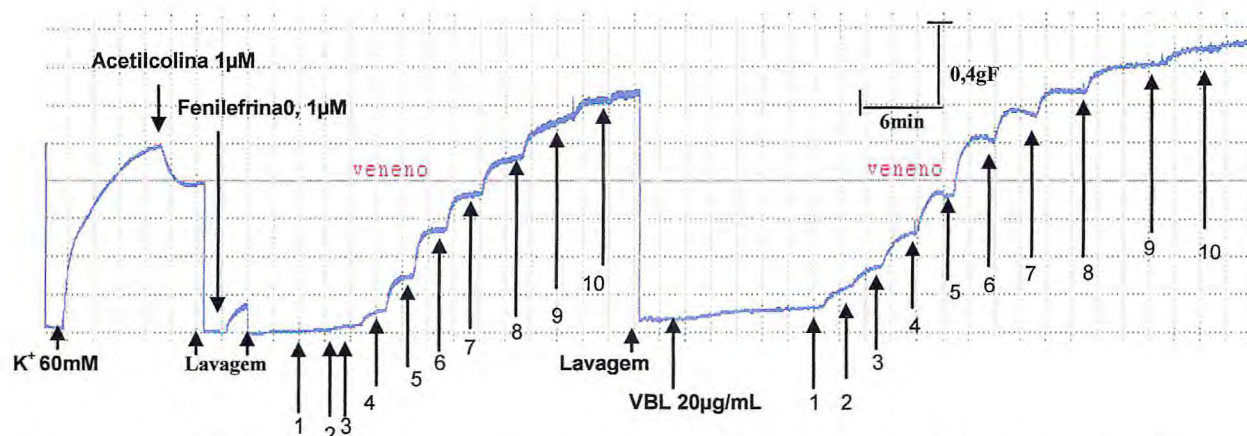
### 4.3.3 EFEITO DO VENENO DE *Bothrops lutzi* NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO DE FENILEFRINA

Para avaliar se o veneno de *Bothrops lutzi* (VBL) era capaz de inibir a resposta contrátil do anel de aorta ao agonista (fenilefrina 1 $\mu$ M), realizou-se um protocolo no qual era construída uma curva concentração-resposta antes e depois da exposição do anel de aorta ao VBL na concentração de 20 $\mu$ g/mL.

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da  $CE_{50}$  e  $E_{max}$ . Dessa forma, constatou-se que o veneno não foi capaz de deslocar significativamente a curva de fenilefrina, como demonstrado nas figuras 78, 79, 80 e 81 e nas tabelas 20, 21 e 22.



**Figura 78.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL) na curva concentração-efeito de fenilefrina (0,001-30 $\mu$ M) em anel de aorta isolado de rato com endotélio, nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração de potássio 60mM ( $K^+$ ).

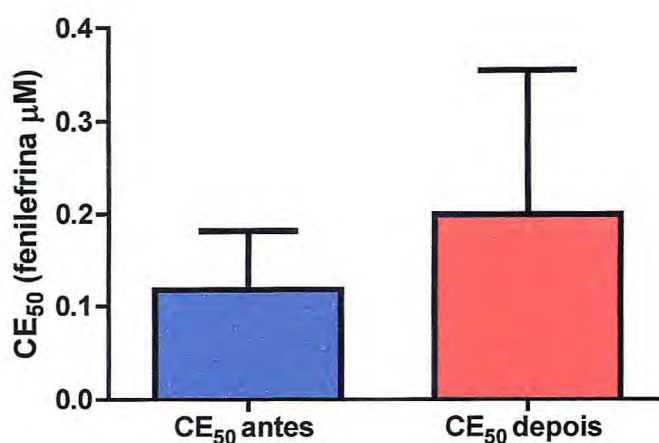


**Figura 79.** Traçado obtido nos experimentos com anel de aorta isolado de rato com endotélio na curva concentração-efeito de fenilefrina antes e com a presença do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL; 20,0µg/mL). Os números de 1 a 10 correspondem, de maneira consecutiva e crescente, às concentrações de fenilefrina de 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30µM. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

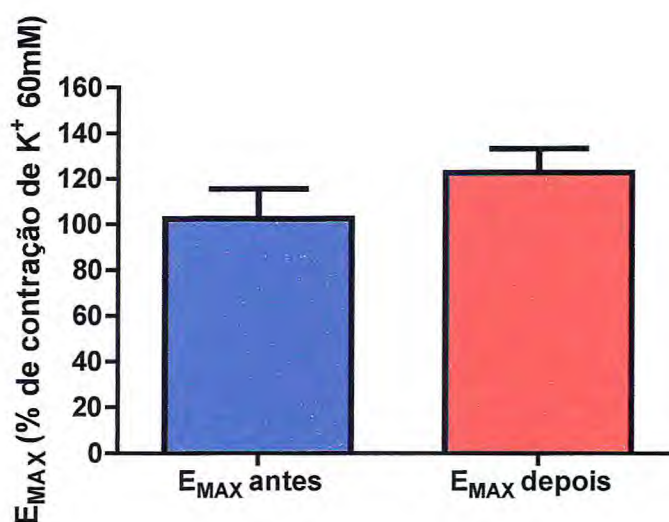
**Tabela 20.** Valores da força de contração do anel de aorta isolado de rato com endotélio em diferentes concentrações antes e depois da exposição ao veneno de *Bothrops lutzi* (VBL - 20µg/mL) nas concentrações de 0,001µg/mL- 30µM.

Concentração de fenilefrina (µM)	Curva antes do VBL (% de contração de K <sup>+</sup> 60nM)		Curva depois do VBL (% de contração de K <sup>+</sup> 60nM)	
	Média	EPM	Média	EPM
0,001	3,82	1,34	6,03	3,50
0,003	9,32	3,44	13,11	6,55
0,01	19,51	4,96	25,52	10,03
0,03	36,14	5,19	42,11	12,69
0,1	56,83	5,78	68,88	16,94
0,3	70,95	7,27	85,76	19,07
1	84,51	9,11	100,43	19,33
3	98,00	11,80	114,53	20,81
10	100,99	12,72	121,47	20,96
30	102,45	13,09	122,56	20,74

Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em % de contração de potássio 60mM (K<sup>+</sup>).



**Figura 80.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL – 20,0µg/mL) em anel de aorta isolado de rato com endotélio sobre a concentração necessária para obtenção de 50% do efeito da fenilefrina (CE<sub>50</sub>). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração potássio 60mM (n=4 – teste *t* pareado).



**Figura 81.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL – 20,0µg/mL) em anel de aorta isolado de rato com endotélio sobre o efeito máximo da fenilefrina (E<sub>MAX</sub>). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração potássio 60mM (K<sup>+</sup>) (n=4 – teste *t* pareado).

**Tabela 21.** Valores da concentração necessária para obtenção de 50% do efeito da fenilefrina ( $CE_{50}$ ) em anel de aorta com e sem endotélio antes e depois da exposição ao veneno de *Bothrops lutzi* (VBL – 20,0 $\mu$ g/mL).

$CE_{50}$ antes do VBL		$CE_{50}$ depois do VBL	
Média	EPM	Média	EPM
0,117	0,06	0,199	0,154

Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de concentração de fenilefrina em  $\mu$ M (n=4 – teste *t* pareado).

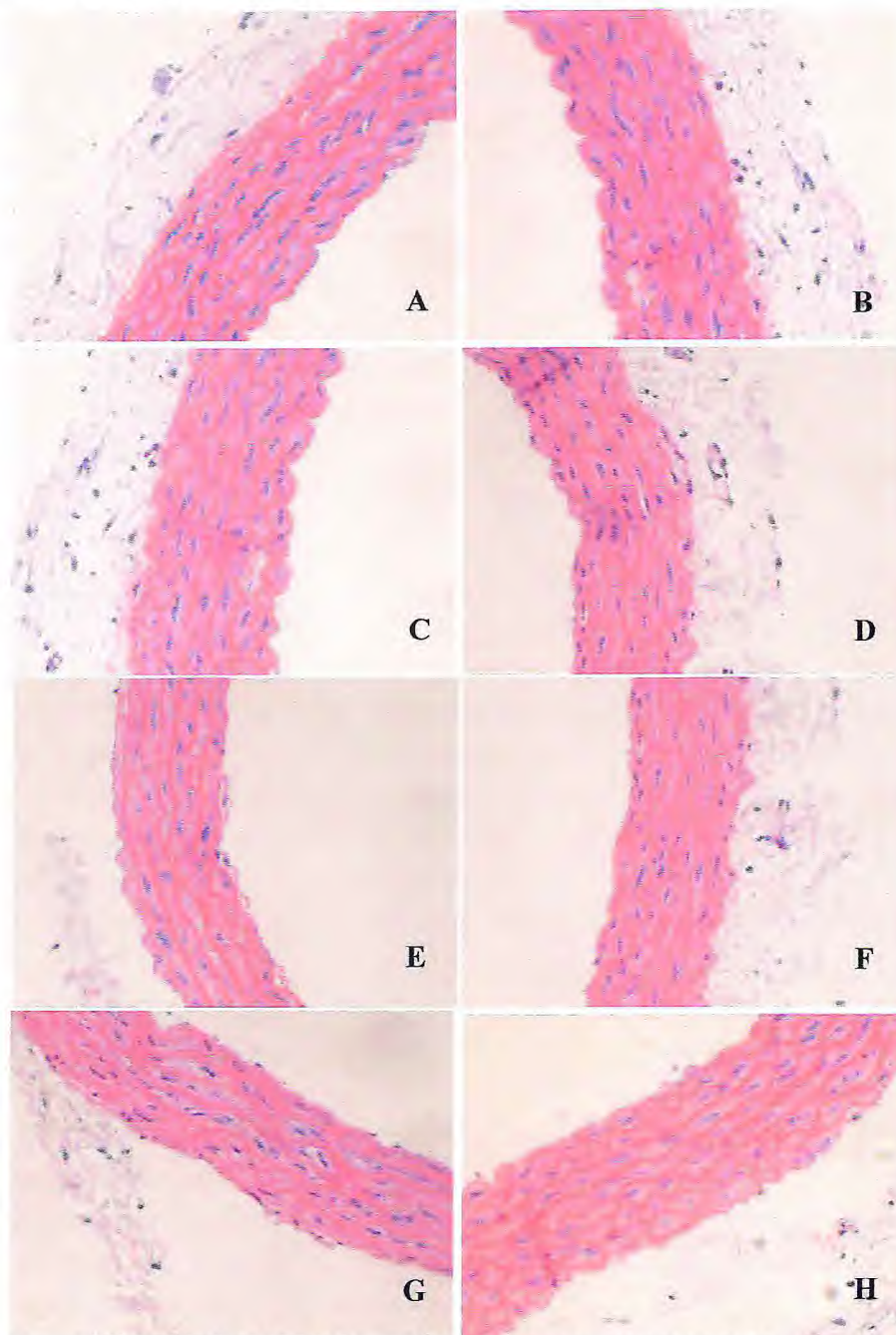
**Tabela 22.** Valores do efeito máximo da fenilefrina ( $E_{MAX}$ ) antes e depois da exposição ao veneno de *Bothrops lutzi* (VBL).

$E_{MAX}$ antes do VBL		$E_{MAX}$ depois do VBL	
Média	EPM	Média	EPM
102,45	13,09	122,56	10,77

Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de contração potássio 60mM (n=4 – teste *t* pareado).

#### 4.4 HISTOLOGIA DOS ANÉIS DE AORTA

Em nenhum dos protocolos observaram-se alterações histológicas no anel de aorta, seja nos grupos controle ou nos grupos expostos ao veneno de *Bothrops lutzi*; independentemente da concentração de VBL estudada (figura 82).



**Figura 82.** Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado. Onde “A” representa o grupo controle, “B” o grupo controle submetido à contração com fenilefrina, “C” o grupo pré-contraído com fenilefrina e exposto à concentrações cumulativas de veneno *Bothrops lutzi* (VBL), “D” exposição ao VBL por 5min, “E” exposição ao VBL por 20min, “F” exposição ao VBL com endotélio, “G” exposição ao VBL sem endotélio e “H” exposição ao VBL e concentrações cumulativas à fenilefrina (n=4 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

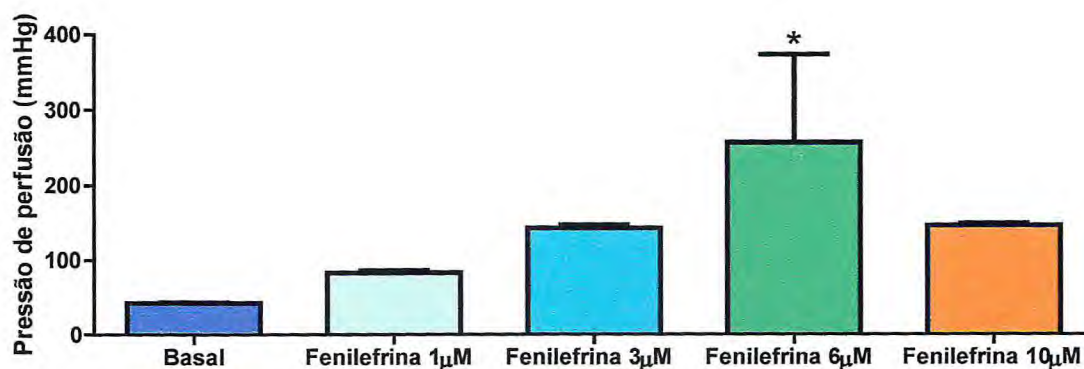


## 4.5 LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

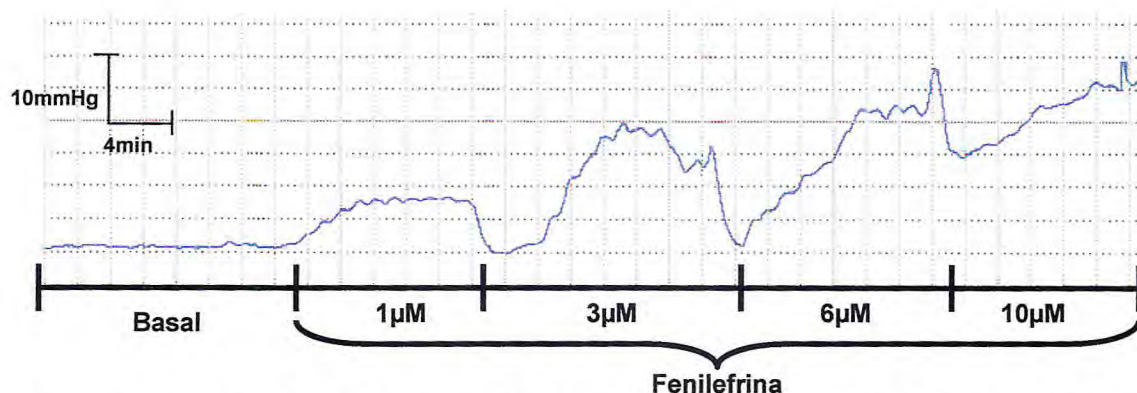
### 4.5.1 INFUSÃO DE VENENO EM LEITO SEM CONTRAÇÃO

Verificando-se o efeito encontrado no anel de aorta, testaram-se três concentrações de VBL em leito vascular mesentérico, cuja composição tecidual é diferente da do anel de aorta. Como realizado com o anel de aorta, procedeu-se com a realização de grupos controle, dentre eles, experimentos para determinar qual a concentração de fenilefrina se trabalharia no leito vascular mesentérico. Essa determinação foi realizada infundindo-se esse fármaco na preparação em diferentes concentrações.

Os resultados demonstraram que das concentrações de fenilefrina estudadas, a de  $6\mu\text{M}$ , apresentou o melhor perfil de contração para os estudos com o VBL. Os resultados desse teste podem ser visualizados na figuras 83 e 84 e na tabela 23.



**Figura 83.** Efeito de diferentes concentrações de fenilefrina ( $1-10\mu\text{M}$ ) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico. Os resultados da pressão de perfusão foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetro de mercúrio (mmHg) e “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao período basal ( $n=4$  – ANOVA - Tukey).



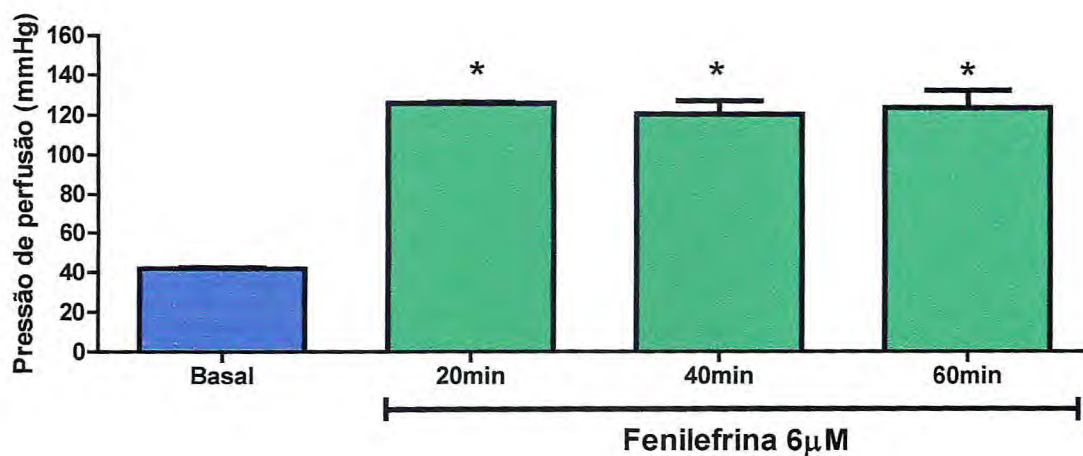
**Figura 84.** Traçado do efeito de diferentes concentrações de fenilefrina (1-10 $\mu$ M) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

**Tabela 23.** Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações de fenilefrina (1-10 $\mu$ M).

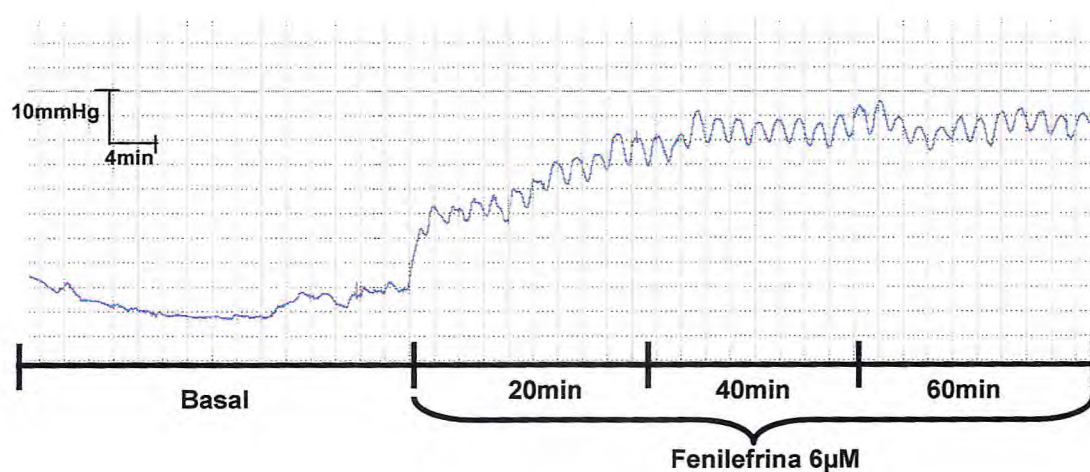
Período	Pressão de perfusão (mmHg)	
	Média	EPM
Basal	42,5	0,63
Fenilefrina 1 $\mu$ M	83,31	2,90
Fenilefrina 3 $\mu$ M	142,8	3,88
Fenilefrina 6 $\mu$ M	256,8	116,70
Fenilefrina 10 $\mu$ M	146,1	3,06

Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) (n=4 – ANOVA - Tukey).

Realizou-se, também, a exposição do tecido à fenilefrina 6 $\mu$ M por 60min para verificar se a contração do tecido perduraria por esse período. Os resultados obtidos são demonstrados nas figuras 85 e 86 e na tabela 24.



**Figura 85.** Efeito da fenilefrina ( $6\mu\text{M}$ ) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico aos 20, 40 e 60min de infusão de fenilefrina. Os resultados da pressão de perfusão foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetro de mercúrio (mmHg) e “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao período basal ( $n=4$  – ANOVA - Tukey).



**Figura 86.** Traçado do efeito da fenilefrina ( $6\mu\text{M}$ ) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico aos 20, 40 e 60min de infusão. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

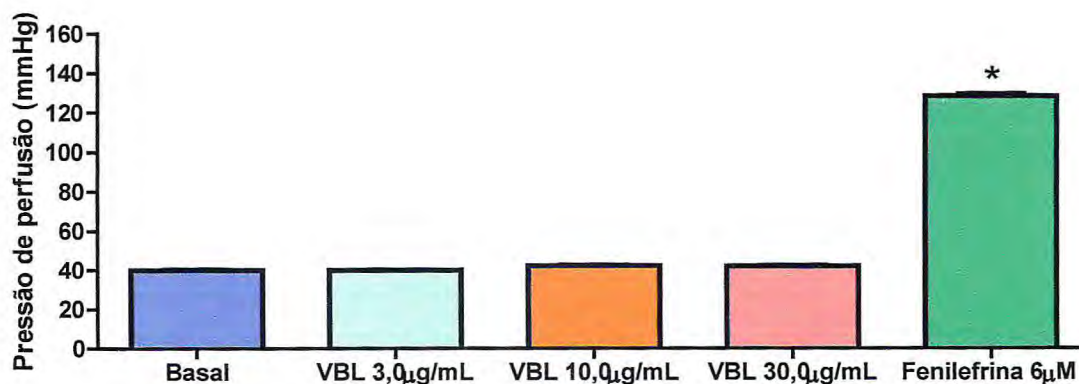
**Tabela 24.** Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para fenilefrina ( $6\mu\text{M}$ ) aos 20, 40 e 60 minutos.

Período	Pressão de perfusão (mmHg)	
	Média	EPM
Basal	42,00	0,74
20min	126,3	0,45
40min	121,00	6,70
60min	124,50	8,64

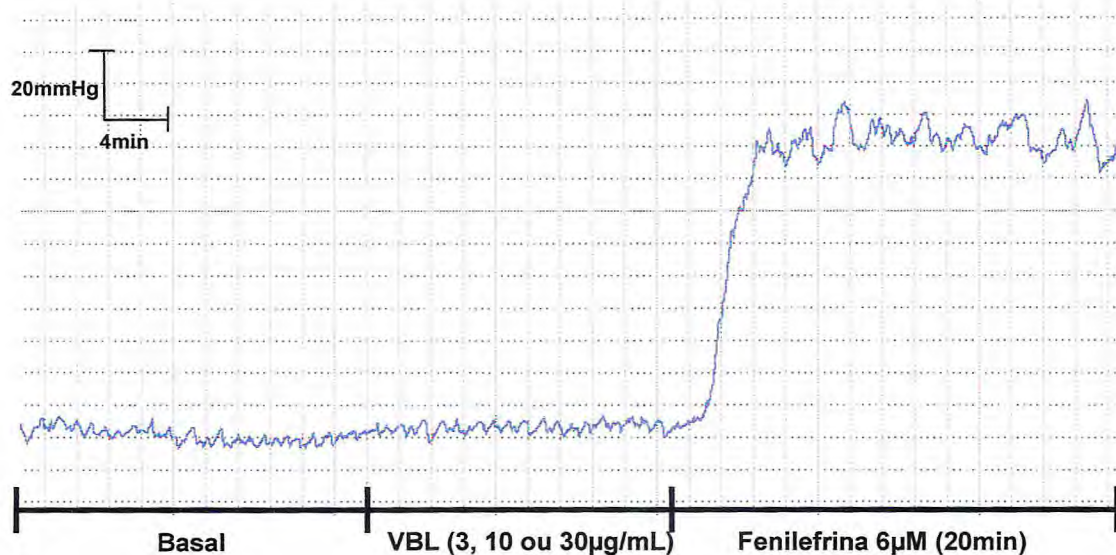
Os resultados dos experimentos ( $n=4$ ) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetros de mercúrio (mmHg) ( $n=4$  – ANOVA - Tukey).

Depois dos testes com os controles, realizou-se o protocolo proposto para os testes de VBL infundido isoladamente em leito vascular mesentérico.

Nesse protocolo não se verificou alterações na pressão de perfusão do tecido durante o tempo do experimento, como verificado nas figuras 87 e 88 e na tabela 25.



**Figura 87.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico, com posterior infusão de fenilefrina  $6\mu\text{M}$  para provar a viabilidade do órgão. Os resultados da pressão de perfusão foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetro de mercúrio (mmHg) e “\*” representa  $p<0,05$  em relação ao período basal ( $n=4$  – ANOVA - Tukey).



**Figura 88.** Traçado do efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico, com posterior infusão de fenilefrina 6 $\mu\text{M}$ . Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gf).

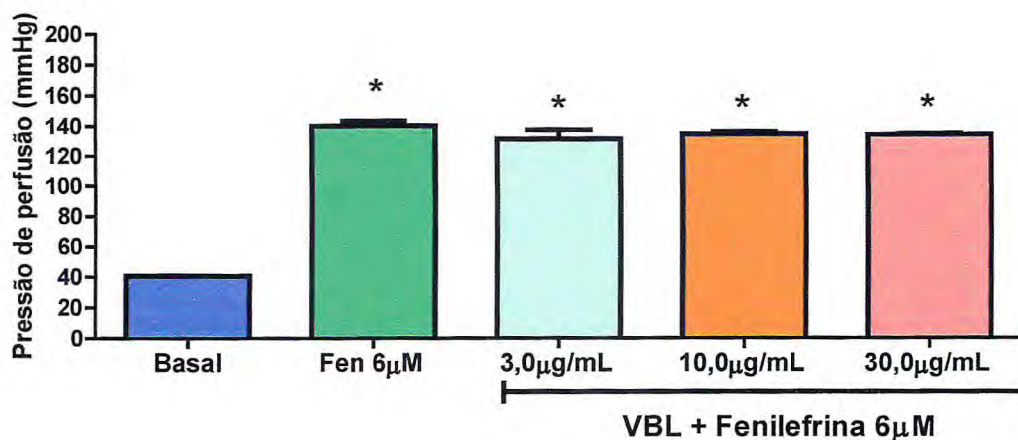
**Tabela 25.** Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações VBL (3,0; 10,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ ).

Período	Pressão de perfusão (mmHg)	
	Média	EPM
Basal	40,00	0,22
3,0 $\mu\text{g/mL}$	40,13	0,22
10,0 $\mu\text{g/mL}$	42,19	0,27
30,0 $\mu\text{g/mL}$	41,88	1,18

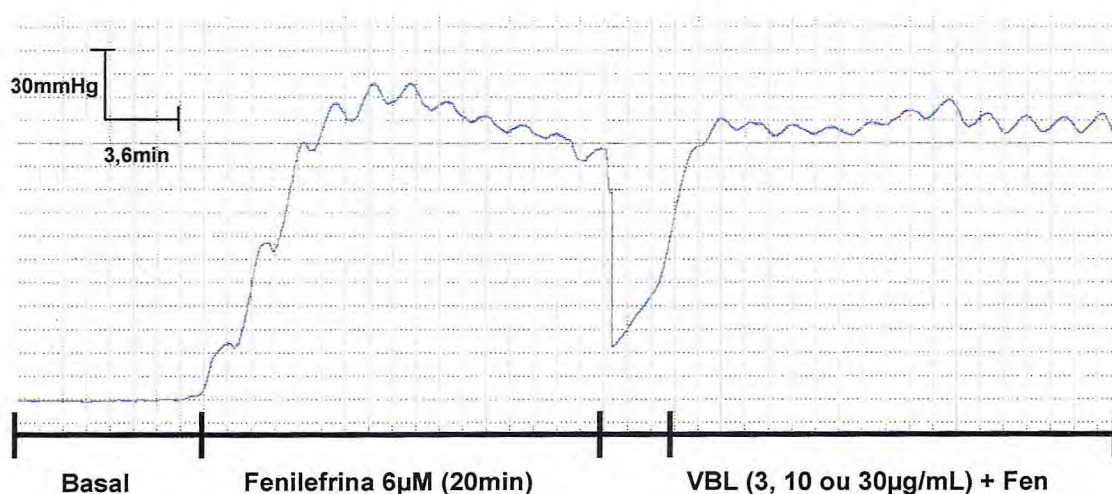
Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetros de mercúrio (mmHg) (n=4 – ANOVA - Tukey).

#### 4.5.2 INFUSÃO DE VENENO CONCOMITANTEMENTE COM FENILEFRINA

Não se observou, também, efeitos do veneno de *Bothrops lutzi* (VBL) na pressão de perfusão em leito vascular mesentérico isolado de rato quando o mesmo foi infundido concomitantemente com fenilefrina 6 $\mu\text{M}$ . Os resultados referentes a esse protocolo são demonstrados nas figuras 89 e 90 e na tabela 26.



**Figura 89.** Efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em infusão concomitante com fenilefrina 6µM. Os resultados da pressão de perfusão foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetro de mercúrio (mmHg) e “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao período basal ( $n=4$  – ANOVA - Tukey).



**Figura 90.** Traçado do efeito do veneno da serpente *Bothrops lutzi* (VBL - 3,0; 10,0 e 30,0 µg/mL) na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em infusão concomitante com fenilefrina 6µM. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a tensão do tecido em grama-força (gF).

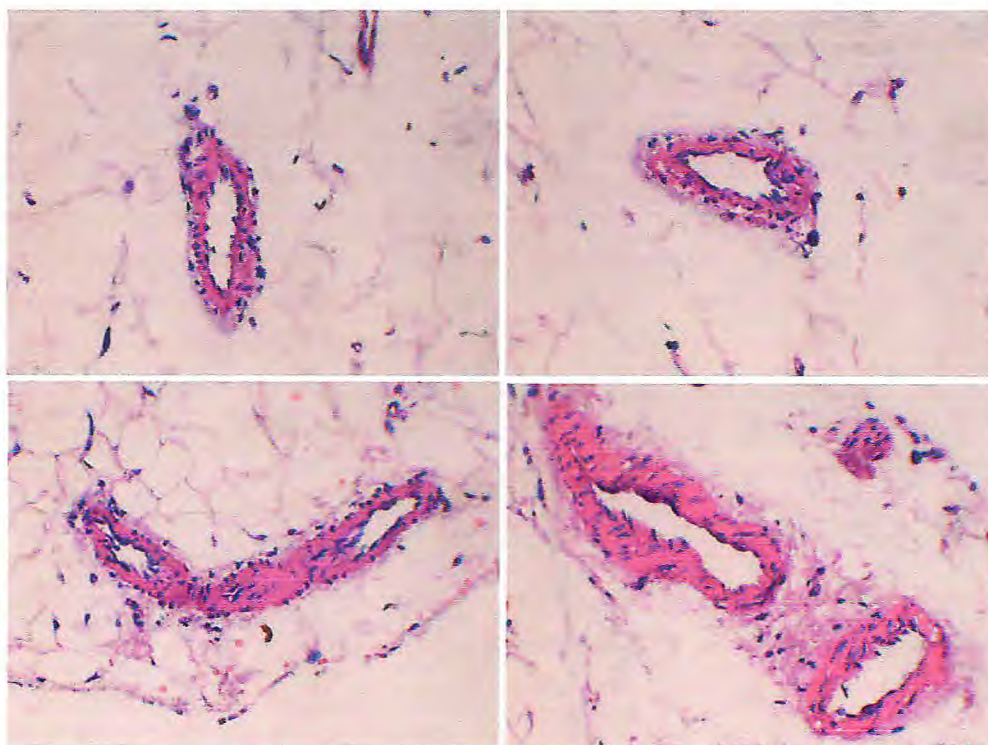
**Tabela 26.** Valores da pressão de perfusão do leito vascular mesentérico para diferentes concentrações VBL (3,0; 10,0 e 30,0 $\mu$ g/mL) em infusão concomitante com fenilefrina 6 $\mu$ M.

Período	Pressão de perfusão (mmHg)	
	Média	EPM
Basal	40,56	0,32
Fenilefrina 6 $\mu$ M	140,10	3,06
3,0 $\mu$ g/mL	131,10	5,87
10,0 $\mu$ g/mL	134,30	1,43
30,0 $\mu$ g/mL	133,8	0,46

Os resultados dos experimentos (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em milímetros de mercúrio (mmHg) (n=4 – ANOVA - Tukey).

#### 4.5.3 HISTOLOGIA DO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

Em nenhum dos grupos estudados foram visualizadas alterações histológicas nas estruturas vasculares do leito vascular mesentérico, como verificado na figura 91.



**Figura 91.** Fotomicrografia dos leitos vasculares mesentéricos representativos de cada grupo estudado. Onde “A” representa o grupo controle, “B” o grupo controle submetido somente com fenilefrina em diferentes concentrações, “C” exposição ao somente ao veneno *Bothrops lutzi* e “D” o grupo pré-contraído com fenilefrina e exposto à concentrações cumulativas de VBL, (n=4 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A complicação sistêmica mais severa após um acidente botrópico é a insuficiência renal aguda (IRA). Além de bastante grave, esse quadro é muito comum nos casos em que o paciente evolui ao óbito (BOER-LIMA *et al.*, 2002).

Dada a grande prevalência de acidentes com o gênero *Bothrops* na América Latina e no Brasil, verifica-se a importância de estudos que tentam demonstrar evidências desse tipo de complicações, bem como seus possíveis mecanismos fisiopatológicos.

Nos estudos de ciência básica em toxicologia, procura-se entender as principais alterações promovidas por venenos para se minimizar possíveis complicações clínicas. No Brasil, ocorrem cerca de 20.000 casos e 90% desses são atribuídos ao gênero *Bothrops* (ROCHA *et al.*, 2008), o que corresponde a 18 mil acidentes botrópicos por ano. A evolução para o quadro de IRA varia de 1,1 a 38% (PINHO *et al.*, 2008); considerando-se a média de 5% de prevalência de insuficiência renal aguda, pode-se observar que cerca de 900 a 1.000 pacientes desenvolvem essa complicação renal, tendo, então, menores chances de sobreviver ao acidente ofídico, uma vez que até 20% dos casos que evoluem para IRA são fatais (SITPRIJA, 2006).

Assim, além da insuficiência renal aguda ser uma complicação clínica importante, a extensão territorial do Brasil, bem como a grande variedade de serpentes encontradas nesse território pertencentes ao gênero *Bothrops* acabam sendo um grande problema de saúde pública, dada a alta prevalência de acidentes com essas serpentes. Tal fato dificulta a elaboração de protocolos de tratamento e monitorização dos pacientes vítimas de acidentes botrópicos, uma vez que há diversos estudos que afirmam categoricamente que há variação na composição das peçonhas das serpentes e de suas atividades biológicas entre as diversas espécies de *Bothrops* encontradas no Brasil (RODRIGUES, *et al.*, 1998).



Os fatores que influenciam na composição e, conseqüentemente, na atividade biológica do veneno são a localização geográfica do animal, alimentação, idade, gênero e espécie (ROCHA & FURTADO, 2005).

Com tamanha variação de efeitos biológicos e nos constituintes da peçonha, destaca-se, também, que a composição do soro antibotrópico produzido para o tratamento de envenenamentos com serpentes do gênero *Bothrops* tem em sua composição um *pool* de venenos das serpentes *B. alternatus* (12,5%), *B. jararca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). Como só se leva em consideração essas 5 espécies, ele pode se mostrar ineficiente no caso de envenenamentos por outras serpentes que não as que compõem o *pool* descrito. Esse fato reforça a necessidade de estudos de atividades biológicas das diversas espécies do gênero *Bothrops* encontradas em nosso território, para que sejam identificados os casos em que a soroterapia é ineficiente e para que se possam tomar medidas e protocolos de tratamento adequados (QUEIROZ, *et al.*, 2008).

Já que há variabilidade dos sinais e sintomas dependendo da espécie, o estudo de peçonhas de serpentes, até então não conhecidas e estudadas, é fundamental para se compreender as possíveis complicações que possam vir a ocorrer no caso de acidentes com essas serpentes.

Os estudos com a peçonha de *Bothrops lutzi* não são exceção a essa regra. Mesmo sendo verificado que os acidentes botrópicos podem causar alterações que culminam com a insuficiência renal aguda, não se conhecia, até, então, quais poderiam ser as alterações renais induzidas por tal veneno, mesmo que tal espécie tenha sido descrita desde 1915 por Miranda-Ribeiro (SILVA & RODRIGUES, 2008).

Os achados da perfusão renal corroboram com vários dados descritos na literatura. Como já é bastante difundido, os venenos botrópicos são caracterizados por promoverem hipotensão em diversos casos de acidentes envolvendo as serpentes desse gênero.

Na perfusão renal, verificou-se que a peçonha de *B. lutzi* induz alterações similares às encontradas por Monteiro & Fonteles (1999), Havt *et al.* (2001), Barbosa

*et al.* (2002) e Havt *et al.* (2005), com *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. pirajai*, respectivamente, que também se descreveram redução na pressão de perfusão em rim isolado de rato.

Foi demonstrado por Havt *et al.* (2005), utilizando íleo de cobaia, que os efeitos observados não foram devido a possíveis potencializadores de bradicinina presentes na composição do veneno total de *Bothrops pirajai*.

Por não se ter um fracionamento do veneno de *Bothrops lutzi*, não se pode afirmar que a redução da PP renal observada nos experimentos realizados pode ser devido a um componente específico. Mesmo com essa limitação, mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina -1 (IL-1), IL-6, IL-10 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) podem estar envolvidos nesse processo de diminuição da PP, uma vez que peçonhas geralmente induzem a liberação dessas substâncias, como reportado por Petricevich *et al.* (2000). Pode haver, ainda, compostos que exerçam ação direta no tecido renal.

Esses mediadores inflamatórios, com potencial relaxante, podem ter contribuído para a redução da resistência vascular renal encontrada nas concentrações de 1,0 e 10,0 $\mu$ g/mL de veneno de *B. lutzi*. Essa redução também foi observada por todos aqueles autores citados anteriormente e que realizaram estudos com outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*.

Assim como a maioria dos resultados vasculares, os dados de fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG) são muito similares a estudos anteriores em sistema de rim isolado com as bótrops. Os resultados dos estudos de Barbosa *et al.* (2002) e Havt *et al.* (2005) apresentaram elevação desses dois parâmetros aos 120min de experimento. Com o VBL isso também ocorreu, embora os valores encontrados para a concentração de 10,0 $\mu$ g/mL (mesma concentração utilizada pelos dois autores citados anteriormente) seja, numericamente, pelo menos o dobro dos resultados encontrados nos estudos com a *B. moojeni* e a *B. pirajai*.

Com o VBL na concentração de 0,1 $\mu$ g/mL, a RVR e a PP renal aumentaram aos 120 minutos. O comportamento inesperado quando os resultados são

comparados com as outras duas concentrações maiores estudadas. Essas promoveram diminuição da RVR, reforçam as afirmações de que os efeitos biológicos dos venenos variam de acordo com diversos fatores, dentre eles a concentração da peçonha em determinado tecido, que pode ser correlacionada com a quantidade de veneno inoculado no indivíduo, gerando uma série de sinais e sintomas que são bastante diversificados e às vezes contraditórios (QUEIROZ, *et al.*, 2008).

Essas variações de atividade podem ser explicadas, ainda, pela diferença de concentração de determinados componentes que atuam em sinergismo. Em concentrações maiores, alguns componentes do veneno podem aumentar ou inibir a ação de outros, promovendo efeitos extremamente contraditórios ou opostos (MARQUES-PORTO, *et al.*, 2008).

Observando-se os valores encontrados para as alterações promovidas nos percentuais de transporte de eletrólitos, verifica-se a atividade deletéria e destrutiva do veneno de *B. lutzi* às estruturas renais, mais especificamente aos túbulos renais.

A literatura é enfática ao destacar que os venenos botrópicos são extremamente lesivos aos túbulos renais, uma vez que são capazes de induzir à necrose desses. Tal mecanismo é fundamental para o desenvolvimento da insuficiência renal aguda (SITPRIJA, 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que os venenos botrópicos são hábeis em promover danos diretos nos túbulos, promovendo intensa peroxidação lipídica (CASTRO *et al.*, 2004).

Todas as concentrações de VBL estudadas diminuíram o percentual de transporte de eletrólitos, seja o percentual de transporte total ou proximal. Esse fato reforça a atuação da peçonha da *B. lutzi* em túbulos renais, provavelmente promovendo ou induzindo a morte das células que compõem tal estrutura.

Poderia se atribuir que os efeitos apoptótico/dano direto em nível tubular encontrados no presente estudo pudessem ser consequência da hipoperfusão promovida pelo veneno. Dessa forma, a causa da hipoperfusão seria devido à diminuição da PP e da RVR, mas essa hipótese não é comprovada pelo fato do

veneno apresentar apoptose/dano direto tubular na concentração de 0,1µg/mL. Nessa última, em nenhum dos tempos houve pressão menor que 80mmHg (pressão que caracteriza hipoperfusão renal) (GUYTON & HALL, 2006). Mesmo assim, observou-se redução do percentual de transporte de eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) em todos os tempos estudados com a perfusão renal; apontando possíveis ações diretas do VBL nos túbulos.

Novamente é demonstrado a elevada capacidade deletéria do VBL às células dos túbulos renais. Em outros estudos de perfusão renal com serpentes do gênero *Bothrops*, e as frações fosfolipásicas desses venenos, não demonstrou-se diminuição de todos os parâmetros de transporte de eletrólitos como os observados com a peçonha da *B. lutzi*, sendo a atividade dessa última bastante exacerbada (MONTEIRO & FONTELES, 1999; HAVT, *et al.*, 2001; BARBOSA, *et al.*, 2002; HAVT, *et al.*, 2005; BRAGA, *et al.*, 2008).

As alterações nos túbulos renais aparentam ser tão severas que, na maior concentração estudada, ao se avaliar o *clearance* osmótico, que é a capacidade de depuração renal em relação às moléculas osmoticamente ativas, observa-se um aumento de 4 vezes desse parâmetro em relação ao período de 90min e de 9 vezes aos 120min. Quando comparado aos controles, esse aumento pode ser devido a disfunção tubular promovida pela possível apoptose/dano celular direto, não permitindo a reabsorção de sódio, molécula com grande capacidade de carrear moléculas de água, sendo osmoticamente ativa e levando a um aumento do parâmetro anteriormente citado, bem como do FU e do RFG nos mesmos períodos.

As análises histológicas realizadas com os rins perfundidos demonstram que as células dos túbulos renais, de um modo geral, nas três concentrações estudadas, se apresentavam com núcleos picnóticos ou anucleadas. Esses achados histológicos são sugestivos de apoptose/dano celular direto às células tubulares. Há essas duas possibilidades uma vez que os experimentos são realizados com uma solução perfusora que não possui células em sua composição, ficando impossível haver a visualização de infiltrados inflamatórios, indicativos de necrose e que diferencia esse processo de morte celular apoptótica.

Os ensaios realizados com células MDCK reforçam a ação extremamente deletéria do veneno em células tubulares. Com esses experimentos, observou-se que pequenas concentrações do veneno (3,12µg/mL) são capazes de destruir mais que 75% das células presentes na placa. As determinações da atividade da enzima LDH demonstram que o veneno aparentemente poderia ter produzido apoptose, haja vista que os níveis de LDH encontrados foram estatisticamente iguais ao do controle. Entretanto, tal fato não foi confirmado pelas técnicas de amplificação gênica com a concentração de 0,39 µg/mL, cujas observações permitiram verificar que genes que participam da cascata de apoptose como CASP-3 e CASP-8 não tiveram sua expressão aumentada.

É importante ressaltar, então, que a atividade apoptótica não pode ser descartada, entretanto pode-se atribuir a atividade do veneno principalmente ao dano celular direto. Uma possível explicação para não elevação do LDH nas culturas de MDCK, mesmo com a baixa viabilidade, pode ser pela destruição dessa enzima por proteases presentes no VBL. Como a medição realizada é da atividade enzimática, pequenos danos na estrutura protéica da enzima podem acarretar redução da sua capacidade metabólica. Técnicas de determinação da massa da enzima poderiam, então, ser uma alternativa, entretanto, as mesmas são extremamente caras e necessitam de padronização adequada.

Em relação às outras estruturas renais, não se verificou alterações nos interstícios, nos vasos e nos glomérulos. As ausências de achados glomerulares discordam de pesquisas realizadas por autores como Boer-Lima (2002), que observou alterações glomerulares ao realizar estudos com o veneno da serpente *Bothrops moojeni*.

Essa divergência pode ser devido a variabilidade dos componentes dos venenos estudados, uma vez que ela pode ser interespecífica, além do modelo experimental utilizado pelo autor supracitado ser *in vivo*, enquanto que o modelo utilizado para os estudos dos efeitos renais de *B. lutzi* foram *in vitro*.

A diferença de protocolos experimentais é relevante, uma vez que se atribui ao depósito de proteínas como a hemoglobina, a mioglobina e a fibrina, nas

estruturas glomerulares, para o desenvolvimento de um quadro de glomerulonefrite e alterações funcionais e morfológicas dessas estruturas (CASTRO *et al.*, 2004; SITPRIJA, 2006).

Ressaltando-se, novamente, que na solução perfusora não há células nem outras proteínas, exceto albumina bovina. Isso pode ter contribuído para a não observação de possíveis degenerações glomerulares e de células mesangiais. Caso houvesse a presença desses fatores, dependendo da ação do veneno, poderia ter ocorrido possível mesangiólise, alterações vasculares renais, bem como alterações glomerulares.

Mais estudos necessitam ser realizados para descartar ou não a hipótese de que o VBL pode possuir atividade deletéria direta em nível glomerular, principalmente com ensaios envolvendo cultura de células mesangiais e endoteliais.

De um modo geral, o veneno de *B. lutzi* se mostrou capaz de promover alterações da PP e da RVR dos rins perfundidos. Essa diminuição pressória, em um primeiro momento, pode acarretar uma diminuição do FU e do RFG, além de poder contribuir para lesões devido à redução da pressão de perfusão renal (hipoperfusão). Entretanto, com o passar do tempo, o FU e, conseqüentemente, por ser uma função do FU, o RFG também se eleva. Essa elevação é acompanhada da perda da função de transporte tubular, que apresenta queda significativa nas três concentrações estudadas, demonstrando uma injúria em nível tubular comprovada pela histologia. É justamente essa perda de função tubular que acarreta à perda de moléculas osmoticamente ativas como o sódio e o aumento de parâmetros como demonstrado com o *clearance* osmótico.

Os achados descritos anteriormente indicam que o VBL é capaz de induzir lesões diretas e/ou indiretas aos túbulos renais, podendo haver íntima relação dessas lesões com o desencadeamento de uma possível insuficiência renal aguda após acidentes com a serpente *B. lutzi*.

O fato de se ter observado alterações vasculares com esse veneno (*B. lutzi*), levou à estudos com anel de aorta que comprovaram a participação vascular no mecanismo de diminuição da pressão de perfusão e da resistência vascular renal.

Estudos de Mora (2008) demonstram que os venenos botrópicos são capazes de promoverem uma série de processos inflamatórios que culminam com alterações hemodinâmicas. Essas alterações envolvem desde mecanismos imunológicos bem como mecanismos de deposição protéica oriundos da ação proteolítica dos componentes dos venenos botrópicos (ROCHA, 2005).

A ação proteolítica promove destruição de estruturas teciduais, induzindo a liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas (CHAVES *et al.*, 2005).

O processo inflamatório desencadeado gera outras reações no organismo que culminam com a produção de edema e de infiltrado celular nos tecidos. A perda de líquido dos vasos sanguíneos para os compartimentos corpóreos com edema contribuem para uma hipovolemia, que promove hipotensão e pode gerar isquemia em alguns tecidos nobres, dentre os quais o rim. O dano causado pela isquemia pode ser irreversível promover uma exacerbação do processo inflamatório e conseqüentemente a diminuição da pressão arterial. Além dos efeitos do veneno na diminuição da pressão arterial por ação indireta, seus componentes ainda exercem atividade nas células endoteliais, o que pode acarretar uma complicação hemodinâmica do paciente por disfunção dos vasos sanguíneos (MORA *et al*, 2008).

Castro (2004) demonstrou um caráter hemodinâmico no processo patogênico das complicações renais que culminam com a insuficiência renal aguda, muito embora não possa ser atribuído somente a esses mecanismos o quadro de IRA, como foi verificado com o VBL.

De acordo com os achados obtidos com a perfusão renal, como a diminuição da pressão de perfusão renal, bem como da resistência vascular renal, partiu-se para investigação em anéis de aorta isolados de rato para comprovar se os efeitos citados anteriormente são de origem vascular.

Como se pôde observar, não houve alterações nos tecidos sem contração. Como o tecido isolado não possui inervação, não se podia observar relaxamento do mesmo, a não ser que houvesse uma degradação das células musculares lisas, como sugerido por Mora (2008) e que não foram observadas através da análise histológica realizada no presente trabalho. Já que não houve a perda do tônus normal do tecido, constata-se que nos experimentos realizados não se observou esse tipo de ação deletéria sobre a musculatura lisa do vaso.

Já em anel de aorta pré-contraído, pôde-se observar que o VBL foi capaz de induzir um relaxamento do tecido, independentemente da presença de endotélio, entretanto o VBL foi incapaz de deslocar a curva concentração-efeito da fenilefrina, fato constatado com o  $CE_{50}$  e  $E_{max}$ . Esse tipo de comportamento exhibe que o veneno provavelmente não compete pelo mesmo sítio de ação do fármaco em questão, entretanto exerce efeitos relaxantes por outros mecanismos.

Esse achado corrobora com os resultados encontrados em rim isolado de rato, no qual se verificou uma redução da pressão de perfusão renal devido a um possível relaxamento dos vasos que irrigam tal tecido.

Os achados vasculares observados em anel de aorta não foram constatados em leito vascular mesentérico isolado de rato. Tal fato pode ser explicado pela diferença de constituição histológica entre os dois tecidos, além das diferenças funcionais, havendo, dessa maneira, uma diferença de resposta entre as duas preparações após exposição ao veneno de *Bothrops lutzi* nas concentrações estudadas.

Desse modo, observou-se que as principais complicações renais promovidas pelo veneno de *B. lutzi* e seus possíveis mecanismos vasculares envolvidos, ressaltando-se a importância do estudo de venenos originários de serpentes pouco estudadas. Com base nos estudos realizados pode-se compreender melhor as variações interespecíficas existentes entre as peçonhas (RODRIGUES, *et al.*, 1998).



Dados os efeitos vasculares encontrados, sugere-se a investigação, após o fracionamento do veneno, de peptídeos que possam ser capazes de promover esse tipo de alteração isoladamente, sem ações deletérias, para que dessa forma possam ser descobertas possíveis ferramentas farmacológicas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As alterações renais promovidas pelo veneno de *Bothrops lutzi* ocorrem em todos os parâmetros renais estudados em pelo menos uma das concentrações avaliadas.
- As principais estruturas renais afetadas pela peçonha da serpente *B. lutzi* são em nível de túbulos renais, provavelmente por ação direta e indireta do veneno nessas estruturas.
- Os resultados sugerem não ser apoptóticos nas condições testadas.
- Além da possibilidade de dano direto às estruturas renais, a diminuição da pressão de perfusão renal colabora para um aumento dos danos aos tecidos renais, uma vez que *in vivo e in vitro* isso pode representar hipóxia e isquemia, gerando injúria tecidual.
- A redução da pressão de perfusão renal demonstrou ter um caráter vascular, uma vez que a diminuição desse parâmetro é acompanhada da diminuição da resistência vascular renal, além de que em outros protocolos experimentais verificou-se relaxamento de vasos como a aorta.
- A atividade vascular do veneno também aparentemente depende do tipo de vaso no qual a toxina age, uma vez que não se verificou alterações do veneno em leito vascular mesentérico, provavelmente por diferença de constituição desse vaso para a aorta.
- O envenenamento por *Bothrops lutzi* parece ter um prognóstico ruim em relação a outras espécies, uma vez que a peçonha dessa serpente apresentou alterações bem mais acentuadas que outras estudadas no sistema de perfusão de rim isolado de rato.

- O presente trabalho proporciona um direcionamento para o fracionamento do veneno na busca dos componentes que tenham atividade vasorrelaxante que possam ser utilizadas como ferramentas farmacológicas.
- O fracionamento também se torna importante para elucidação de quais componentes são mais deletérios aos tecidos renais, mais especificamente aos túbulos renais, proporcionando uma terapêutica que propicie um melhor prognóstico bem como uma monitorização mais adequada dos pacientes acidentados, diminuindo as complicações das vítimas de acidentes com a serpente *B. lutzi*.

## 7 CONCLUSÃO

O veneno de *Bothrops lutzi* demonstrou ser extremamente nefrotóxico, apresentando possíveis efeitos deletérios diretos e/ou indiretos nos túbulos renais como demonstrados pelos parâmetros renais estudados, histologia do tecido renal e reforçados pelos ensaios com células MDCK, que nas condições testadas aparentemente são apenas através de dano celular direto.

Além disso, sua atividade vasorelaxante, associada com seu efeito direto sobre os túbulos renais podem ser as características do envenenamento promovido pela serpente *Bothrops lutzi*. Tais manifestações, quando associadas, podem ser responsáveis por uma possível IRA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUELO, G. J. Diagnosing vascular causes of renal failure. **Annals of internal Medicine** 123(8): 601-614, 1995;

ACOSTA, A. R., UZCATEGUI, W., AZUAJE, R., AGUILAR, I, GIRÓN, M. E. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* em Venezuela. **Rev. Cubana. Med. Trop.** 52(2): 90-94, 2000;

AIRD, S. D. A quantitative assessment of variation oin venom constituents within and between three nominal rattlersnake subspecies. **Toxicon** 23: 1000-1004, 19858;

AMARAL, C. F., BUCARETCHI F., ARAÚJO, F. A. A., CARDOSO, J. L. C., CAMPOS, J. A., AZEVEDO-MARQUES, M.M. Brasil. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília. Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde, 2001;

ANDRADE-FILHO, A., CAMPOLINA, D., DIAS, M. B. Ofidismo. **Toxicologia na Prática Clínica**. Folium Comunicação, Belo Horizonte, p.229-241, 2001.

ARAÚJO, M. **Ofidismo**, 2003 Disponível em: <http://www.lava.med.br/livro>. Acesso em: 23 abr. 2009;

BARBOSA, P. S. F., HAVT, A. FACÓ, P. E. G., SOUSA, T. M., BESERRA, I. S. A. M., FONTELES M. C., TOYAMA, M. H., MORANGONI, S., NOVELLO, J. C., MONTEIRO, H. S. A. renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its mais myotoxins. **Toxicon** 40: 1427-1435, 2002;

BIOLOGIA E SAÚDE. **Guia do estudante**. Editora Abril. Disponível em: <[http://guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia\\_4333039.shtm](http://guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia_4333039.shtm)>. Acesso em: 26 abr. 2009;

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cad. Saúde Pública** 19 (1): 7-16, 2003;

BOER-LIMA, P. A., GONTIJO, J. R, CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bothrops moojeni* sanke venom-induced renal gomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 67(2): 217-222, 2002;

BOSCHERO, A. C., CARNEIRO, E. M., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. A new C-type animal lectin isolated from *bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37: 130-141, 2005;

BORGES-NOJOSA, D. M. & CASCON, P. Herpetofauna da Área Reserva da Serra das Almas, Ceará; p. 243-258 *In*: Araújo, F. S., Rodal, M. J. N. and M. R. V. Barbosa (ed.), **Análise das Variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2005;

BOWMAN, R. H. Gluconeogenesis in the perfused rat kidney. **J. Biol. Chem.** **245**, 1604-1612, 1970;

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254, 1946

BRAGA, M. D. M., MARTINS, A. M. C., ALVES, C. D., MENEZES, D. B., MARTINS, R. D., BARBOSA, P. S. F., OLIVEIRA, I. M. S., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., DIZ-FILHO, E. B. S., FAGUNDES, F. H. R., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. Purification and renal effects of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon** **51**: 181-190, 2008;

BRITO, L. B. M. ; MESQUITA, P. C. M. D. ; BORGES-NOJOSA, D. M. . Registro de Nascimento em Cativeiro de duas espécies de serpentes do Gênero *Bothrops* (Serpentes: Viperidae). **XXIV Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa da UFC**, 2005;

BUTLER, M. & DAWSON, M. **Cell culture labfax**, 1<sup>st</sup> edition . Academic Press, Oxford, p. 247, 1992;

CAMPBELL, J. A. & Lamar, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca. Cornell University Press, 2004;

CARREIRO, R. S., COGO, J. C., PRIANTI-JR, A. C. G. Estudo da miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*: análise quantitativa de fibras lesadas. **IX Encontro latino americano de iniciação científica e V Encontro latino americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, s/d;

CASTRO, I. Study of toxicity of crotalic and botropic species in afidic accidents, with an emphasis in renal toxicity. **O mundo da saúde** **30(4)**:644-653, 2006;

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

CHAVES, F., TEIXEIRA, C. F. P., GUTIÉRRES, J. .M. Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon** **45**: 171-178, 2005;

FEITOSA, R. F. G., MELO, I. M. L. A., MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará – Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30(4): 295-301, 1997;

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.** 24: 163-169, 1965;

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

FOX, J. W., MA, L., NELSON, K. SHERMAN, N. E., SERRANO, S. M. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon** 47: 700-714, 2006;

FREITAS, M. A. & SILVA, T. F. S. A Herpetofauna das Caatingas e áreas de altitude do Nordeste Brasileiro. Pelotas. União **Sul-Americana de estudos da Biodiversidade**. p. 388, 2007;

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Helth. **Cad. Saúde Públ.** 11: 495-500, 1995;

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Fisiologia renal. **Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica**. Ed. Elsevier. 11<sup>a</sup>ed., 2006;

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

HAVT, A., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF blockers. **Toxicon** 39: 1841-1846, 2001;

HAVT, A., TOYAMA, M. H., DO NASCIMENTO, N.R., TOYAMA, D.O., NOBRE, A. C., MARTINS, A. M., BARBOSA, P.S., NOVELLO, J. C., BOSCHERO, A. C., CARNEIRO, E.M., FONTELES, M. C. and MONTEIRO, H. S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in isolated kidney. **Int J Biochem Cell Biol.** 37(1):130-41, 2005;

HAVT, A., TOYAMA, M. H., NASCIMENTO, R. R. F., TOYAMA, D. O., NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F., NOVELLO, J. C., JORGE, A. R. C., ALVES, R. S., NORÕES, T.B.S., SOUSA, D. F., XIMENES, R.M., OLIVEIRA, I. M.S., SILVA NETO, A. G., ARAUJO LIMA, A. L. G. C., NOJOSA, D. M. B., MONTEIRO, H. S. A. Estudo dos efeitos biológicos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* em rim isolado de rato. **40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2008;

LEWIS, B. J. & GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews – Drug discovery.** 2: 790-802, 2003;

LIRA-DA-SILVA, R. M., MISE, Y. F., PUORTO, G. and SILVA, V. X. Geographic distribution. *Bothrops neuwiedi lutzii* (Neuwiedi's Lancehead): Bahia. **Herpetological Review** 34(4): 386, 2003;

LOEBMANN, D. Reptilia, Squamata, Serpentes, Viperidae, *Bothrops lutzii*: distribution extension, geographic distribution map. **Check List** 5(3): 373–375, 2009;

MARQUES-PORTO, R., LEBRUM, I., PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in *Bothrops jararaca* venom: **The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor**. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 147: 424-433, 2008;

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W.N.; EKNOYAN, G.. Renal effects of Lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, 80(3): 445-461, 1978;

McGREGOR, D.D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol.** 177: 21-30., 1965;

MEBS, D. Snake venom composition and evolution of viperidae. **Kaupia Darmstadt** 8: 145-148, 1999.

MONTEIRO, C., MONTGOMERY, C. E., SPINA, F., SAWAYA, R. J., MERTINS, M. Feeding, reproduction and morphology of *bothrops matogrossensis* (Serpentes Viperida, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology** 40(3): 408-413, 2006;

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

MORA, J., MORA, R., LOMONTE, B., GUTIÉRRES, J. M. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. **Neglected Tropical Diseases** 2 (10): 1-10, 2008;

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65:55-63, 1983;

PETRICEVICH, V. L., TEIXEIRA, C. F. P., TAMBOURGI, D. V., GUTIÉRRES, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon** 38: 1253-1266, 2000;

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29(9):2002-2007 2001;



- PINHO, F. M. O. & PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil** 47(1): 24-49, 2001;
- PINHO, F. M. O., OLIVEIRA, E. S., FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Ass. Med. Brasil** 50(1): 93-96, 2004;
- PINHO, F. M. O., YU, L., BURDMANN, E. A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology** 28: 354-362, 2008;
- QUEIROZ, G. P., PESSOA, L. A., PORTARO, F. C. V., Furtado, M. F. D., TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon** 52: 842-851, 2008;
- RAMOS, O. H. P. & SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.C**, 142/3-4: 328-346, 2006.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. e FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.
- RENORBIO. Conheça um pouco mais sobre a biotecnologia. **Biotecnologia**, 2009a. Disponível em: <[http://www.renorbio.org.br/rnb\\_pub/ctl/ctl.php?act=pub.bio\\_pgn](http://www.renorbio.org.br/rnb_pub/ctl/ctl.php?act=pub.bio_pgn)>. Acesso em: 26 abr. 2009;
- RENORBIO. Núcleo de pós-graduação. **Áreas de concentração**, 2009b. Disponível em: <[http://www.renorbio.org.br/rnb\\_pub/ctl/ctl.php?act=pub.npg\\_ars](http://www.renorbio.org.br/rnb_pub/ctl/ctl.php?act=pub.npg_ars)> Acesso em: 26 abr. 2009;
- ROCHA E SILVA M., BERALDO, W. T. AND ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.** 156(2):261-73, 1949;
- ROCHA, M. L., VALANÇA, R. C., MAIS, M. B. S., GUARNIERI, M.C., ARAUJO, I. C., ARAUJO, D. A. M. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with <sup>131</sup>I in mice. **Toxicon** 52: 526-529, 2008;
- ROCHA, M. T., FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Dumeril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia** 22(2): 383-393, 2005;
- RODRIGUES, V. M, SOARES, A. M., MANCIN, A. C., FONTES, M R. M., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 121: 215-222, 1998;

SANTORO, M. L., SANO-MARTINS, I. S., FAN, H. W., CARDOSO J. L. C., THEAKSTON, R. D. G., BIASG, D. A. W. Haematological evaluation of patients bitten by the jarara, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 51: 1440-1448, 2008;

SILVA, C. S. & SPERANDIN, B. R. Efeito das toxinas da serpente do gênero *Bothrops*. Revisão bibliográfica. **IX Encontro atino americano de iniciação científica e V Encontro latino americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, s/d;

SILVA, V. X. The *Bothrops neuwiedi* complex; p. 410-422 In: J. A. Campbell and W. W. Lamar (ed.), **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca. Cornell University Press, 2004;

SILVA, V. X. & RODRIGUES M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa* 7(1): 45-90, 2008;

SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO. Espécies de serpentes do Brasil. **Get ID – Serpentes**. Disponível em: <[HTTP://get-id.com.br/Animais/Serpentes/Especies.aspx](http://get-id.com.br/Animais/Serpentes/Especies.aspx)>. Acesso em: 04 dez. 2008;

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. *Nephrology* 11: 442-448, 2006.

SOARES, A. M. Toxinologia e Biossegurança. **Aplicações Biotecnológicas de Toxinas Naturais e Modelos Sintéticos**. 2005. Disponível em: <<http://sistemas.usp.br:8080/fenixweb/fexDisciplina?sgldis=6045824>>. Acesso em: 19 fev. 2007;

SOUSA, D. F., BRITO, T. S., BATISTA-LIMA, F. J., JORGE, A. R. C., FERREIRA, J. M., CHAGAS, J. F., PRACIANO, T. P., NORÕES, T. B., XIMENES, R. M., ALVES, C. D., BORGES-NOJOSA, D. M., MAGALHÃES, P. J. C., MONTEIRO, H. S. A. Bothrops lutzi venom promotes relaxation on isolated rat aorta. **XVI World Congress of the International Society on Toxinology**, 2009a;

SOUSA, D. F., JORGE, A. R. C., CHAGAS, J. F., PRACIANO, T. P., FERREIRA, J. M., NORÕES, T. B., SOUSA, P. C. P., XIMENES, R. M., ALVES, C. D., ALVES, R. S., QUEIROZ, M. G. R., MENEZES, D. B., BORGES-NOJOSA, D. M., HAVT, A., MONTEIRO, H. S. A. Study in vitro of renal effects of Bothrops lutzi venom. **XVI World Congress of the International Society on Toxinology**, 2009b;

VALLE, A. L. & BRITES, M. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloesnsis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Zoociências* 10 (2): 155-161, 2008;

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