



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

ALINE DIOGO MARINHO

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO TOTAL DA SERPENTE *Bothrops pauloensis*.

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

Fortaleza

2011

ALINE DIOGO MARINHO

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO TOTAL DA SERPENTE *Bothrops pauloensis*.

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Farmacêutico.

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

Fortaleza

2011

Marinho, Aline Diogo

Efeitos renais promovidos pelo veneno total da serpente *Bothrops pauloensis* / Aline Diogo Marinho. — Fortaleza, 2011.

68 f. : il. color; 30cm.

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

Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Ceará,
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.

1. *Bothrops pauloensis*, 2. Efeitos Renais, 3. Perfusão Renal.

I. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem.

ALINE DIOGO MARINHO

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO TOTAL DA SERPENTE *Bothrops pauloensis*.

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Farmacêutico.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Ms. Paulo César Pereira de Sousa

Instituto de Teologia Aplicada - INTA

Ms. Antonio Rafael Coelho Jorge

Universidade Federal do Ceará – UFC

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me apoiaram e fizeram o possível e impossível para que esse momento se realizasse.

À Deus, que me deu forças para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelas infinitas palavras de carinho e apoio durante a minha vida, pelas renúncias feitas no intuito de realizar meus objetivos e pela confiança em mim depositada.

À toda a minha família(avó, primos, cunhada), em especial meus irmãos e sobrinhos: Yana pela amizade, companheirismo e cumplicidade sempre presentes em nossa relação; Nara pelo apoio e força, mesmo estando longe, sempre presente nos momentos em que mais precisei; Fabrício pela preocupação e ensinamentos; Fabrício Júnior e Maria Isadora, por me fazerem esquecer de todos os problemas e me proporcionarem imensa felicidade pelo fato de existirem.

À minha tia Neuma por sempre me apoiar e estar presente nos momentos de felicidade e dificuldade.

À minha orientadora Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelas valiosas lições de vida, por me aceitar como orientanda durante todos esses anos no LAFAVET e por acreditar no meu crescimento acadêmico.

À Doutoranda Roberta Jeane Bezerra Jorge, por quem tenho profunda admiração, me ajudou durante todo o percurso acadêmico, assumiu um papel fundamental na concretização desse momento, agradeço por todo o apoio, amizade, confiança e paciência.

Às amigas Isabel Cristina Oliveira de Moraes e Dânya Bandeira Lima pela incondicional amizade e inúmeras histórias para contar.

À Renato Oliveira, pelos infinitos momentos de felicidade que tem me proporcionado e pela atenção a mim dedicada.

Aos meus colegas de laboratório(LAFAVET), Antônio Rafael, Paulo César, Daniel Freires, Rafael Ximenes, Antônio Neto, Natacha Queiroz, Marinetes, Marta.

À Maria Silvia Helena de França pela ajuda nos experimentos e companheirismo.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, pelas oportunidades e aprendizado enquanto estive no LCC.

À equipe que faz parte do LCC, em especial : Patrícia, Ramon, Alba e Ticina e aos IC's Thiala, Kamila, Gdaylon e Marcus Felipe.

À toda a equipe que faz parte da Farmácia Ambulatorial do HUWC.

Às residentes do transplante do HUWC, Bruna Cristina e Thalita, por reavivarem em mim a razão de servir ao próximo, tornando meu internato uma lição de vida.

Aos meus amigos da faculdade que me ajudaram durante todos esses anos e aos meus amigos fora da UFC que sempre estiveram presentes nessa e em várias etapas da minha vida.

“Eu tenho uma espécie de dever, dever de sonhar, de sonhar sempre, pois sendo mais do que um espectador de mim mesmo, eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso. E assim me construo a ouro e sedas, em salas supostas, invento palco, cenário para viver meu sonho entre luzes brandas e músicas invisíveis”.

Fernando Pessoa

RESUMO

Efeitos renais promovidos pelo veneno total da serpente *Bothrops pauloensis*. Aline Diogo Marinho e Helena Serra Azul Monteiro. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2011.

Envenenamentos por serpentes é um importante problema de saúde que acomete países tropicais. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos no país e a insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação grave dos envenenamentos por estas serpentes. Neste trabalho, foram investigados os efeitos renais do veneno total de *Bothrops pauloensis* (vBp) em sistema de rim isolado de rato e em cultura de células tubulares renais da linhagem MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Para perfusão de rim isolado foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250 e 300g, cujos rins foram excisados cirurgicamente e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6%p/v de albumina bovina previamente dialisada. Foram investigados os efeitos do vBp (10 µg/mL; n=6) sobre a Pressão de Perfusão (PP), Resistência Vascular Renal (RVR), Fluxo Urinário (FU), Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺), de Potássio (%TK⁺) e de Cloreto (%TCl⁻). Na cultura de células MDCK, o vBp foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas condições de estudo, apresentando citotoxicidade até a menor concentração testada, com IC₅₀=4,18µg/mL. No sistema de perfusão o vBp promoveu uma redução da PP e RVR aos 90 e 120 minutos e do RFG aos 60 minutos. O FU aumentou aos 120 minutos. O percentual total do transporte de sódio (%TNa) e cloreto (%TCl) e potássio(%TK) diminuíram aos 60, 90 e 120 minutos. A análise histológica dos rins perfundidos com vBp mostrou a presença de alterações morfológicas significativas, como acúmulo de proteínas nos espaços tubulares e glomerulares.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*; Efeitos Renais; Perfusão Renal.

ABSTRACT

Renal effects promoted by venom total of snake *Bothrops pauloensis*. Aline Diogo Marinho e Helena Serra Azul Monteiro. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2011.

Snake envenoming is an important health problem widespread in tropical countries. According to the Department of Health of Brazil, the genus *Bothrops* are the main involved in snakebites in the country and acute renal failure (ARF) is a serious complication of snake poisoning. This study was investigate the effects of the *Bothrops pauloensis* venom(vBp) in the renal perfusion system and in cultured renal tubular cells of the type MDCK(Mardin-Darby canine kidney). Isolated kidney from Wistar rats weinghing 250 to 300g. were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6%w/v of albumin serum albumin previously dialyzed. The effects of *Bothrops pauloensis* venom (10µg/mL) were studied on the Perfusion Pressure (PP), Renal Vascular Resistance (RVR), Urinary Flow (UF), Glomerular Filtration Rate (GFR), Percentage of Sodium (%TNa⁺), Potassium (%TK⁺) and Chloride (%TCl⁻) Tubular Transport. The treatment with vBp caused decrease in cell viability to the lowest concentration tested with an IC₅₀ of 4,18 µg/mL. *B. pauloensis* venom (10 µg/mL) reduction the PP and RVR at 90 and 120 min. The UF increased at 120 min. The GFR decreased at 60 min. It was also observed a decrease on percentual tubular transport of sodium (%TNa⁺) , of chloride (%TCl⁻) and potassium(%TK⁺) at 60, 90 and 120 min. Histological analysis of kidneys perfused with vBp showed the presence of significant morphological changes such as accumulation of proteins in tubular and glomerular spaces.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*; Renal Effects; Renal Perfusion.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1.	Aspectos gerais e epidemiológicos.....	11
1.2.	Gênero <i>Bothrops</i>	12
1.2.1	<i>Bothrops pauloensis</i>	13
1.3.	Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos.....	13
1.4.	Importância do estudo de venenos e toxinas.....	17
2.	JUSTIFICATIVA.....	18
3.	OBJETIVOS.....	20
3.1.	Objetivo Geral.....	20
3.2.	Objetivos Específicos.....	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	Obtenção do veneno.....	22
4.2	Ensaio biológicos.....	23
4.2.1	Perfusão de órgão isolado.....	23
4.2.2	Animais de experimentação.....	23
4.2.3	Sistema utilizado.....	23
4.2.4	Solução perfusora.....	27
4.2.5	Análises bioquímicas.....	29
4.2.6	Determinação dos parâmetros funcionais renais.....	30
4.2.7	Análise histopatológica.....	31
4.2.8	Grupos experimentais.....	31
4.3	Ensaio com cultura de células	32
4.3.1	Linhagem celular	32
4.3.2	Cultivo das células MDCK.....	32

4.3.3	Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	33
4.4	Aspectos éticos.....	35
5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Perfusão de rim isolado.....	37
5.2.	Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente <i>Bothrops pauloensis</i>	42
5.3.	Avaliação da atividade do veneno da serpente <i>Bothrops pauloensis</i> sobre células MDCK.....	45
5.3.1	Ensaio de viabilidade celular.....	45
6.	DISCUSSÃO.....	47
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1) Aspectos gerais e epidemiológicos

As serpentes pertencem à classe *Reptilia*, subclasse *lepdosauria*, ordem *squamata*, subordem *serpentes* (HICKMAM;ROBERTS e LARSON, 2004). A família *Elapidae* compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus*, com mais de 50 espécies. A família *Viperidae*, composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis*, *Crotalus* e *Lachesis*, representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois é responsável pela maioria e mais graves casos de acidentes ofídicos registrados nos países da América, inclusive no Brasil (AZEVEDO-MARQUES;CUPO e HERING, 2003).

Os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam. Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes, com cerca de 20.000 casos por ano (sendo as regiões centro-oeste e norte as de maior incidência de acidentes ofídicos por 100.000 habitantes), seguido do Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (CHIPPAUX, 1998;WARREL, 2004).

No Brasil, a região nordeste apresenta o menor índice de acidentes ofídicos: 7 acidentes por 100.000 habitantes (PINHO e PEREIRA, 2001). Porém, registrou-se a maior letalidade (0,81%) cerca do dobro da média nacional (0,45%)(LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009).

Os dados sobre acidentes por animais peçonhentos, no Brasil, são coletados através de sistemas de notificação como: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox/Fiocruz/MS), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde/MS e o Sistema de Informações sobre Mortalidade/MS(SIM). Apesar de todos esses sistemas, os dados epidemiológicos disponíveis não retratam a real magnitude do problema, provavelmente devido à subnotificação dos casos, tendo em vista, entre outros fatores, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde de muitos municípios brasileiros (LEMOS *et al.*, 2009).

O Sistema Nacional de Notificação de Agravos notificou, em 2010, 29.635 casos de acidentes ofídicos, com uma incidência de 15,5/100.000 habitantes, tendo ocasionado 146 óbitos no país. As serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* respondem por 73,2% dos

casos notificados neste período, enquanto as do gênero *Crotalus* foram responsáveis por 10% dos acidentes (BRASIL, 2011).

No estado do Ceará o registro de casos é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia dos acidentes ofídicos. O levantamento mais recente foi realizado no período de 2001 a 2007, onde foram notificados 3877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas. Corroborando com o perfil nacional, o gênero *Bothrops* foi o responsável pelo maior número de casos, indivíduos do sexo masculino foi o mais acometido (74,2%), e a faixa etária com maior número de acidentes foi de 21 a 50 anos (ROCHA, 2008).

1.2) Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 23 espécies, pertencem à família Viperidae e são popularmente conhecidas como jararacas. Essas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (ALBUQUERQUE, 2004; MELGAVAREJO, 2003).

Considerando o paralelismo de *Bothrops*, recentemente, dados morfológicos e moleculares sugeriram a criação de uma nova espécie e reclassificação de algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Bothrops*, este gênero foi nomeado *Bothropoides* e contém 11 espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erytromelas*, *Bothropoides insulares*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides marmoratus*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*. Essa nova classificação é aceita e fornecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (FENWICK *et al.*, 2009).

1.2.1) *Bothrops pauloensis*

A serpente *Bothrops pauloensis* conhecida popularmente como jararaca-pintada, objeto deste estudo, é encontrada em todo território brasileiro, exceto na Bacia Amazônica, habita principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes

úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (TICLI, 2006).

O veneno da *B. pauloensis* contém uma variedade de enzimas que inclui proteinases com atividades hemorrágica, metaloproteinase fibrinolítica, fosfolipase A₂ (FLA₂), L-amino oxidases e uma variedade de peptídios potenciadores da bradicinina que podem contribuir para as ações biológicas dos venenos. (ABREU *et al.*, 2007).



Figura 1: *Bothrops pauloensis* (FONTE: Nogueira, 2003)

1.3) Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos (BON, 1997). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados. Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas, incluindo fosfolipase A₂ (FLA₂) relacionadas à produção de derivados do ácido aracdônico (SIX e DENNIS, 2000), as metaloproteinase, responsáveis pela proteólise das membranas basais dos vasos, as trombina símiles, que ativam fatores de coagulação, transformam o fibrinogênio em fibrina e induzem a agregação plaquetária (SANTOS *et al.*, 2000) e as L-aminoácido oxidases (LAAO) que

induzem ou inibem a agregação plaquetária, além de promover apoptose (DU e CLEMETSON, 2002).

Em um mesmo veneno são encontradas uma variedade de FLA₂ que podem exercer uma grande variedade de atividades farmacológicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (BORGES *et al.*, 2000). Todas são dependentes de cálcio para atuar e os resíduos da alça de ligação ao cálcio são particularmente conservados (MURAKAMI e ARNI, 2003).

As enzimas FLA₂ catalizam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (KOH *et al.*, 2006; KINI, 2003). Os ácidos graxos liberados podem atuar como segundos mensageiros ou podem estar envolvidos em outras reações, como o ácido aracdônico, que é responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (VARGAS *et al.*, 2010). As FLA₂ estão agrupadas em três famílias principais: (I) citosólicas (cFLA₂); (II) secretórias dependente de Ca⁺² (sFLA₂) e (III) intracelulares não dependentes de Ca⁺² (iFLA₂). Dentre as fosfolipases dos venenos são reconhecidas três tipos diferentes: as clássicas, com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), as quais apresentam atividade catalítica e variantes contendo lisina ou serina no carbono 49 (Lys49 e Ser49, respectivamente), sendo essas duas últimas enzimaticamente inativas. Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as FLA₂ desestabilizam os fosfolipídios das membranas celulares, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular (LOMONTE; ÂNGULO e CALDERÓN, 2003).

Outro componente protéico encontrado no veneno bothropico são as enzimas L-aminoácido oxidases (LAAOs). São flavoenzimas que catalizam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (PAIVA, 2011). O mecanismo de ação pelo qual a LAAO exerce seus efeitos ainda é incerto. Vários trabalhos descrevem amplos efeitos biológicos e farmacológicos, como: indução de apoptose (TORII *et al.*, 1997; DU e CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006; NAUMANN *et al.*, 2011), agregação plaquetária (LI *et al.*, 1994), indução de edema (TICLI, 2006), atividade bactericida (CISCOTTO *et al.*,

2009; TORRES *et al.*, 2010), leishmanicida (TOYAMA *et al.*, 2006; NAUMANN *et al.*, 2011).

As metaloproteinases, por sua vez, participam do remodelamento do tecido conectivo no processo de cicatrização das feridas dos seres humanos (MITCHELL, 2005). Nos venenos das serpentes, além de lesarem as células endoteliais, contribuindo para a hemorragia local e sistêmica (RUIZ DE TORRENTE *et al.*, 1999), facilitam a disseminação do veneno a partir do local de inoculação (ANAI *et al.*, 2002), onde contribuem para a mionecrose, a dermonecrose, a formação de bolhas e a inflamação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

A especificidade de substratos das metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) é muito semelhante ao das metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal da microvasculatura (TANJONI *et al.*, 2003), a qual, quando rompida, deixa extravasar sangue, constituindo o mecanismo fisiopatológico da hemorragia provocada pelas SVMPs (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Uma das SVMPs bem estudada, a jararhagina, isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, é um dos principais componentes responsáveis pela hemorragia. Além de degradar a matriz extracelular, também atua em proteínas plasmáticas da coagulação importantes para hemostasia (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

Sem atividade enzimática são observadas as neurotoxinas de atividade pré e pós sinápticas que afetam a função neuromuscular (HAWGOOD e SANTANA DE SÁ, 1979), as cardiotoxinas que atuam na membrana celular do músculo cardíaco e despolarizam de modo persistente a membrana das células excitáveis acarretando hemólise (REID, 1964) e as lectinas, que se ligam à glicoproteínas e interfere na formação do coágulo e na agregação plaquetária (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Dentre os componentes sem atividade enzimática há constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Os constituintes não orgânicos conhecidos são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH e TU, 1971). Alguns estudos sugerem que o cálcio, o manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON e FOX, 1994).

Pesquisas realizadas abordando a distribuição das peçonhas botrópicas nos órgãos de animais envenenados mostram que os rins são um importante alvo de acumulação do veneno, possivelmente devido ao seu papel na excreção de proteínas ofídicas. A acumulação do veneno no tecido renal pode causar danos morfológicos e funcionais que poderia interferir na eliminação do veneno (MELLO *et al.*, 2010).

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência de envenenamento ofídico, dentre elas: glomerulonefrite, arterite e necrose tubular, glomerulite e nefrite intersticial, necrose cortical e insuficiência renal (SITPRIJA, 2006). Foram descritas ainda: hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (SANO-MARTINS *et al.*, 2001).

A insuficiência renal aguda (IRA) é a principal causa de morte por acidentes com venenos ofídicos, ocorrendo secundariamente aos processos anteriormente descritos (AIRD, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1998), mesmo após o tratamento com soro antiofídico (SITPRIJA e CHAIYABUT, 1999).

A patogênese da IRA não está ainda completamente elucidada. No entanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008).

Os venenos ofídicos causam a nível glomerular uma proliferação do endotélio e células mesangiais, com deposição de fibrina e crescimento epitelial ocasional, sem provocar alterações na membrana basal. Três teorias foram propostas para explicar a patogênese da lesão glomerular: a presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente do processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001).

No modelo de perfusão de rim isolado foi demonstrado por Pirotzky *et al.* (1984), que o rim é capaz de produzir serotonina, histamina e PAF. Embora muitos desses fatores não estejam envolvidos diretamente no sistema de perfusão de rim, as células renais, sob efeito do veneno, podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, fração de complemento e fator de agregação plaquetária (BARRAVIERA; LOMONTE e TARKOWISKI, 1995).

Em estudos prévios, realizados por Martins *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2010; Sousa, 2010; Monteiro, 1990; Havt *et al.*, 2001; 2005; Barbosa *et al.*, 2002; Braga, 2006;

Morais, 2011; Norões, 2009, foi demonstrado que os venenos de diferentes *Bothrops* alteram os parâmetros de função renal em sistema de rim isolado (*B. erytromelas*, *B. marajoensis*, *B. lutzi*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. insularis*, *B. leucurus*, *B. atrox*, respectivamente).

1.4) Importância do estudo de venenos e toxinas

As pesquisas com venenos vêm atingindo grande progresso, tanto pela descoberta do seu emprego como ferramentas farmacológicas, como pelo potencial terapêutico ou até mesmo pela busca de terapias alternativas ao tratamento convencional. No quadro 1 pode-se destacar alguns medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais.

Quadro 1- Alguns exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais		
Fármaco	Uso terapêutico	Fonte
Eptifibatide (Integrilin ®)	Anticoagulante	Serpente <i>Sistrurus miliaris barbouri</i>
Echistatin	Anticoagulante	Serpente <i>Echis carinatus</i>
Captopril	Antihipertensivo	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>
Ranatensin	Antihipertensivo	Sapo do Gênero <i>Rana</i>
Ancrod (Viperinex™)	Anticoagulante para Acidente vascular cerebral isquêmico agudo	Serpente <i>Calloselasma rhodostoma</i>
Ziconotida (Prialt ®)	Tratamento da dor crônica	Molusco marinho <i>Conus magus</i>
Exenatida	Diabetes Melitus tipo 2	Réptil <i>Heloderma suspectus</i>

Quadro 1 : Adaptado de Beeton, Gutman e Chandy (2006).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A elucidação dos mecanismos envolvidos em efeitos locais e/ou sistêmicos, como a Insuficiência Renal Aguda (IRA) que permita a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização de respostas com vistas à interrupção da sequência de eventos celulares/moleculares que poderiam culminar em lesão.

Em virtude da ausência de estudos com veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em sistema de perfusão renal, pôde-se especular mecanismos de ação sobre os parâmetros funcionais renais através da comparação entre os resultados encontrados no presente trabalho, os achados dos efeitos renais de veneno de outras espécies, estudados por pesquisadores do grupo (LAFAVET) e informações presentes na literatura científica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

Avaliar os efeitos renais do veneno de *Bothrops pauloensis* em sistema de rim isolado de rato e células MDCK, visando obter resultados que possam subsidiar a elucidação de seus mecanismos de ação fisiopatológicos, bem como buscar a descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou substâncias de valor terapêutico.

3.2) Objetivos específicos

- Estudar os efeitos induzidos pelo veneno bruto de *Bothrops pauloensis* em rim isolado de rato;
- Estudar os efeitos renais do veneno total de *Bothrops pauloensis* em cultura de células tubulares renais (Madin-Darby Canine Kidney - MDCK).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1) Obtenção do veneno

O veneno da serpente *Bothrops pauloensis* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente.

4.2) Ensaios biológicos

4.2.1) Perfusão de órgão isolado

4.2.2) Animais de experimentação:

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, climatizados entre $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec[®]) e água “ad libitum”. Os mesmos foram mantidos em jejum cerca de 8 a 12 horas antes dos experimentos de perfusão renal apenas com água “ad libitum”.

4.2.3) Sistema utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37°C (Figura 2 e 3). Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.



Figura 2: Foto do sistema de perfusão de rim isolado.

Fonte: LAFAVET – UFC

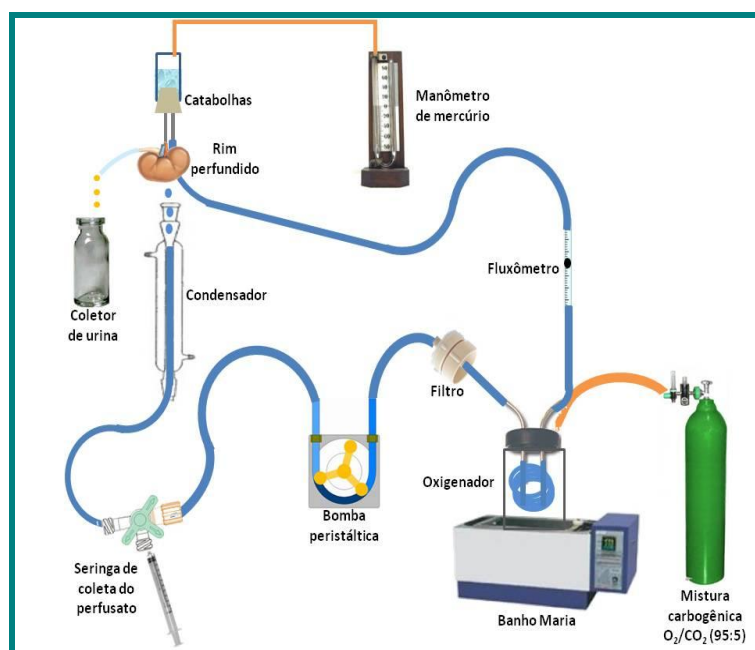


Figura 3: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

Fonte: LAFAVET – UFC

Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foi avaliado em cada uma das bombas (1,2,3,4 e 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/min) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As figuras 4, 5 e 6 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

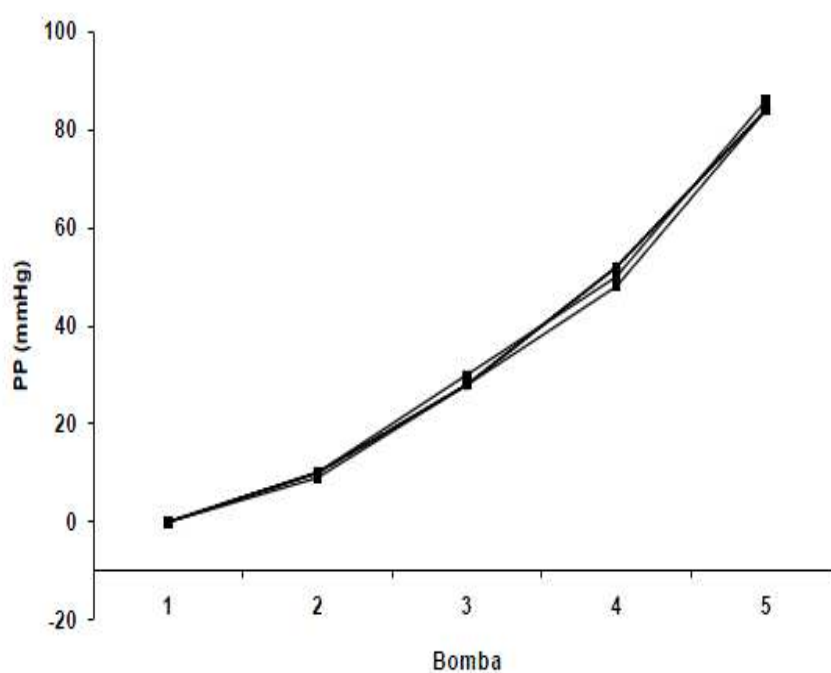


Figura 4: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

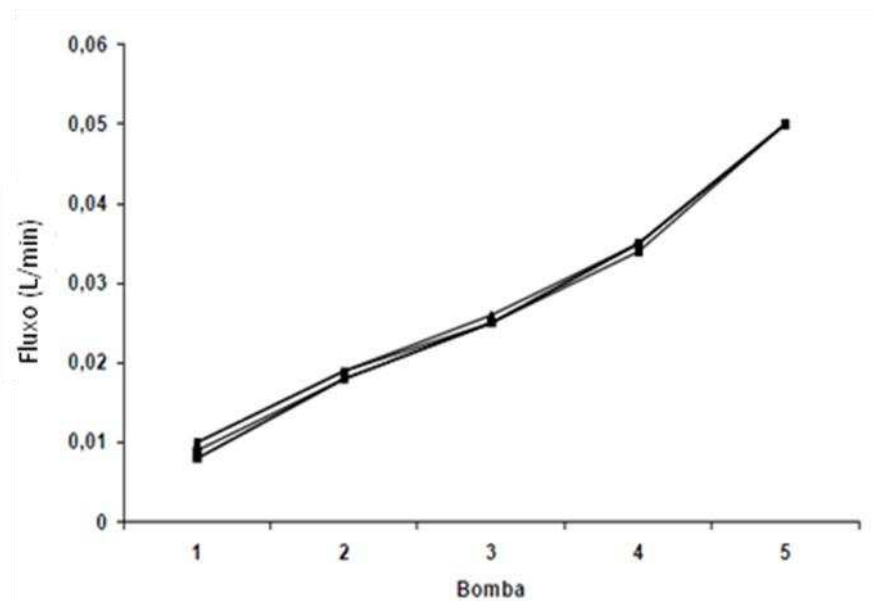


Figura 5: Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

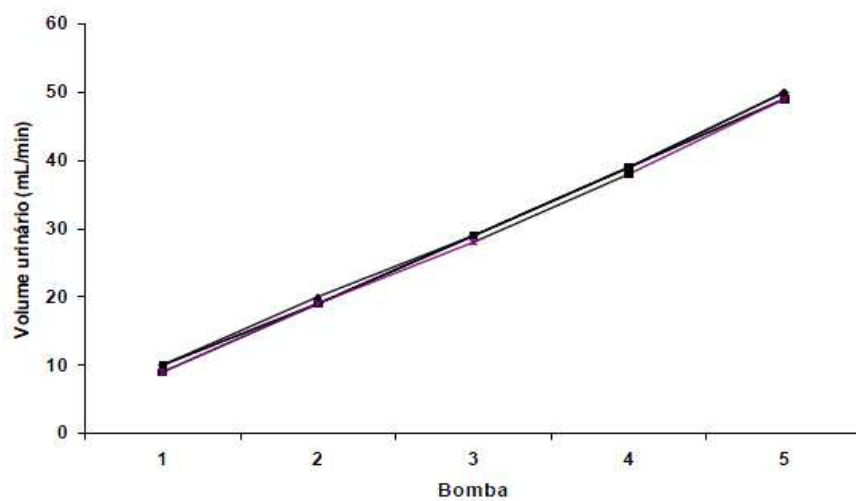


Figura 6: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

4.2.4) Solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH₂PO₄.H₂O = 3,2g; MgSO₄.7H₂O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO₃ = 4,2g; CaCl₂.2H₂O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK e LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

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

Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhnamann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30 (figura 7 A e B).

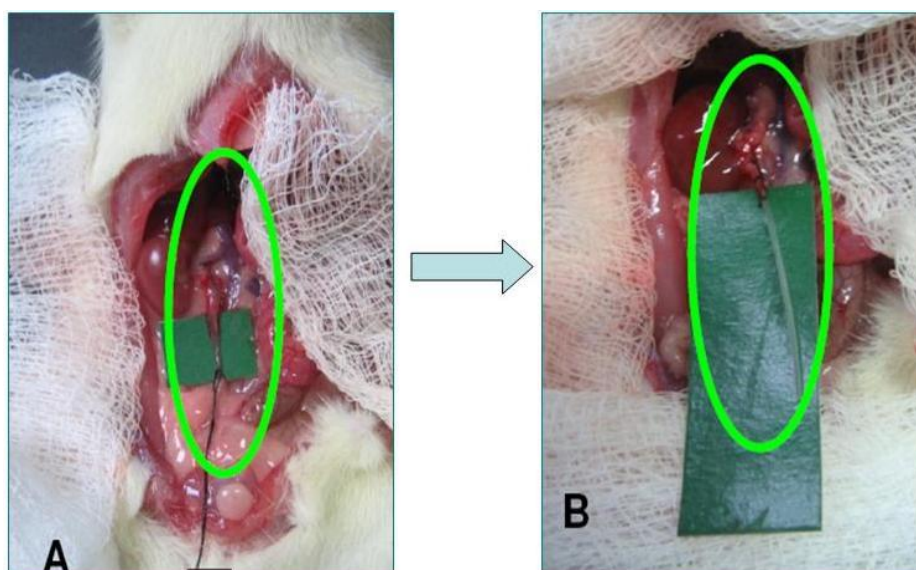


Figura 7: Identificação e dissecação do ureter (A) e ureter canulado (B).

A artéria renal foi isolada (figura 8A) e canulada (figura 8 B) através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 9).

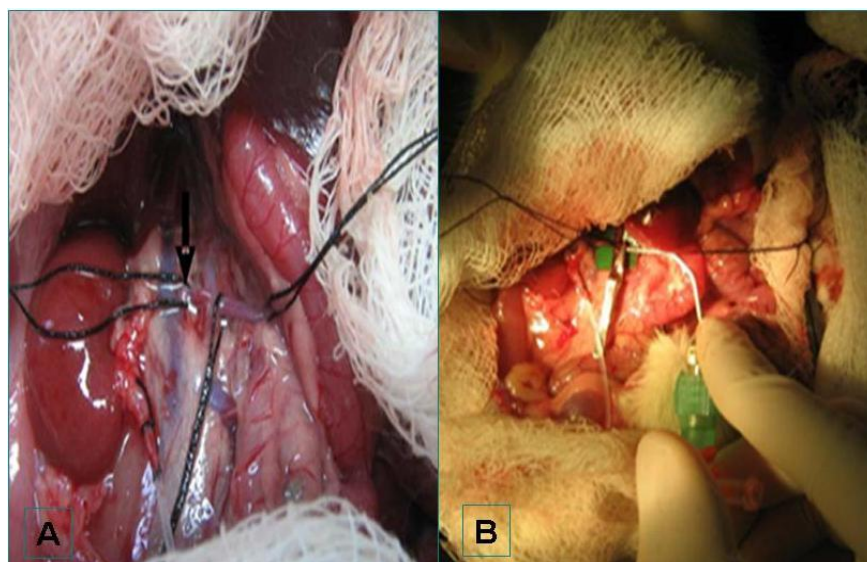


Figura 8: Etapas finais do procedimento cirúrgico para exérese renal. **A:** visualização da artéria renal; **B:** canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.



Figura 9: Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno. 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 120 min. Amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20°C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio ($\%T\text{Na}^{+}$), potássio ($\%T\text{K}^{+}$) e cloreto ($\%T\text{Cl}^{-}$).

4.2.5) Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer[®] diagnostica).

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme

Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – modelo 5520 ESCOR).

4.2.6) Determinação dos parâmetros funcionais renais

O quadro 2 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Parâmetros renais		Fórmula
1.	PP (mmHg)- Pressão de Perfusão	<u>Leitura em manômetro</u>
2.	FU (mL.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3.	RFG (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} / DOP _{in} x FU) sendo DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato.
4.	FPR (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
5.	RVR (mmHg/mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Resistência vascular renal.	RVR = PP (mmHg) / FPR
6.	FNa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio filtrado	FNa⁺ = RFG x PNa ⁺
7.	ENa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio excretado	ENa⁺ = FU x UNa ⁺
8.	TNa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) - Sódio transportado	TNa⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺
9.	%TNa⁺ - Percentual de sódio transportado	%TNa⁺ = TNa ⁺ x 100/ FNa ⁺
10.	FKa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio filtrado	FKa⁺ = RFG x PKa ⁺
11.	EK⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio excretado	EK⁺ = FU x UKa ⁺
12.	TK⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio transportado	TK⁺ = FK ⁺ - EK ⁺

13.	%TK⁺ - Percentual de potássio transportado	%TK⁺ = TK⁺ x 100/ FK⁺
14.	TCI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto transportado	TCI⁻ = FCI⁻ - ECI⁻
15.	%TCI⁻ - Percentual de cloreto transportado	%TCI⁻ = TCI⁻ x 100/ FCI⁻
16.	FCI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto filtrado	FCI⁻ = RFG x PCI⁻
17.	ECI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto excretado	ECI⁻ = FU x UCI⁻

Quadro 2 : Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.

4.2.7) Análise histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5μm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon).

4.2.8) Grupos experimentais

O estudo do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* sobre a função renal foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

- Grupo controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (n = 6);
- Grupo tratado com o veneno da serpente *Bothrops pauloensis* na concentração de 10μg/mL (n = 6).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão dos cinco experimentos. Diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) com significância de 5%.

4.3) Ensaios com cultura de células

4.3.1) Linhagem celular

As células utilizadas foram células tubulares epiteliais renais MDCK (*Madin-Darby Kanine Kidney*) obtidas no departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo- USP.

4.3.2) Cultivo das células MDCK

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER e DAWSON, 1992).

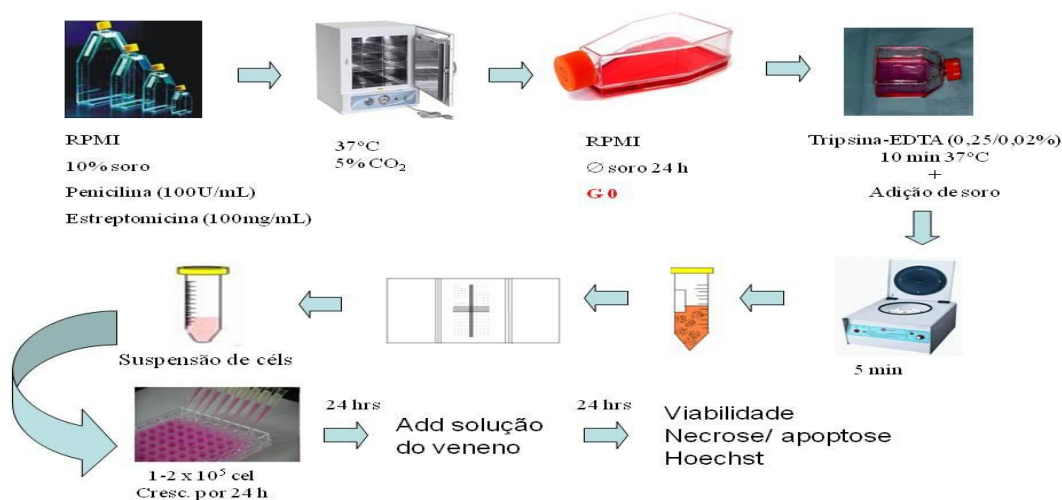


Figura 10: Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK.

4.3.3) Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

Ensaio com MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomiais. Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância. A intensidade da coloração do produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH *et al.*, 2005).

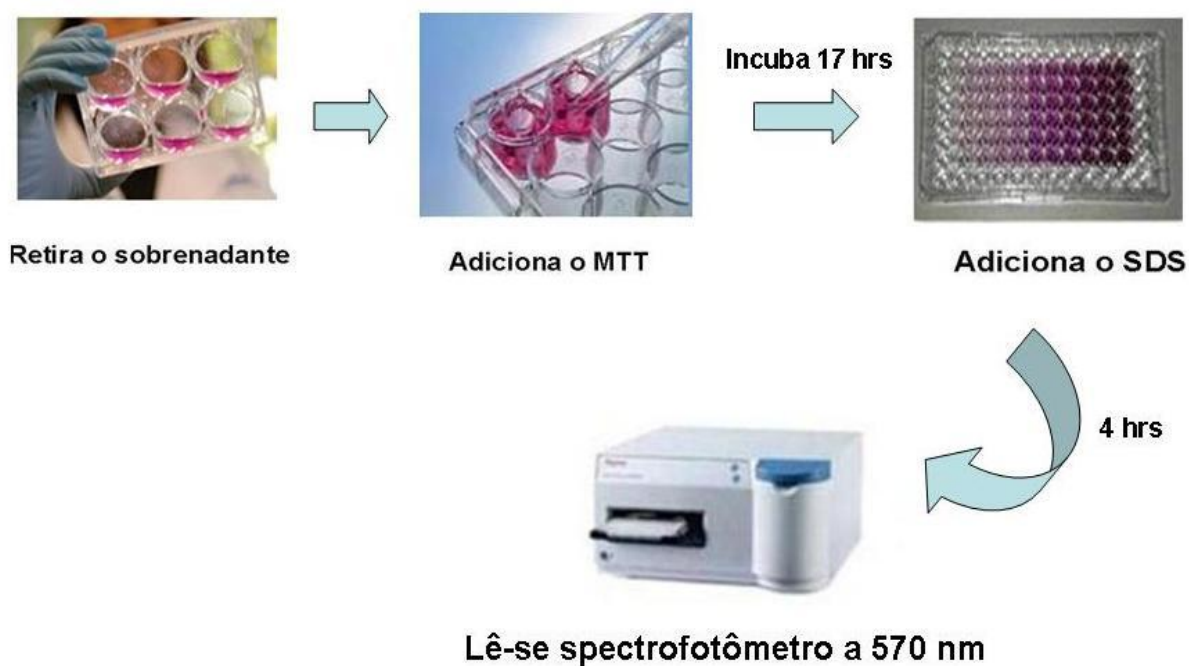


Figura 11: Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação celular.

Protocolo experimental

As células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas para sincronizá-las entre as fases G₀ e G₁ do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10 min em estufa de CO₂ a 37°C, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram plaqueadas a 1x10⁵ céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL). Após 24 horas do tratamento com a substância-teste, foi removido 100µL do sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO₂ 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 formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C e após 17 horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm .

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

Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração do veneno. Foi determinada a CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. A probabilidade de p<0,05 foi considerada significativamente diferente.

4.4) Aspectos éticos

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo 79/08).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1) Perfusão de rim isolado

O veneno da serpente *Bothrops pauloensis* foi administrado ao sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos após o início dos experimentos. Os 30 minutos iniciais foram considerados como controle interno de cada experimento. Os grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit.

Após aplicação do veneno da *Bothrops pauloensis* na dose de 10 µg/mL foram observadas intensas alterações na fisiologia renal. Com relação aos parâmetros vasculares, verificamos queda na pressão de perfusão (PP) e da resistência vascular renal (RVR) aos 90 e 120 minutos (Tabela 1; Figuras 12 e 13, respectivamente). O fluxo urinário (FU) aumentou aos 120 minutos e o ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentou uma redução transitória, diminuindo aos 60 minutos (Tabela 2, Figuras 14 e 15, respectivamente). O percentual de transporte tubular de sódio (%TNA), cloreto(%TCl) e potássio(%TK) diminuíram aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 3, Figuras 16, 17 e 18, respectivamente).

Tabela 1: Parâmetros vasculares da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops pauloensis* (10µg/mL).

Tempo	PP (mmHg)		RVR (mmHg.mL/g/min.)	
	Controle	VBp	Controle	VBp
30	110.10 ± 3.68	96.23± 4.44	5.94± 0.38	4.72± 0.60
60	108.27± 4.88	80.45± 9.05	5.75± 0.44	4.07± 0.69
90	108.69 ± 5.08	60.28± 7.94 ^{*#}	5.79± 0.50	3.06± 0.55 ^{*#}
120	110.28 ± 3.69	58.81± 9.54 ^{*#}	5.75± 0.40	3.16± 0.68 ^{*#}

Os dados são expressos em (média $\pm$ E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$ (controle interno) e $p < 0,05^\#$ (controle externo).

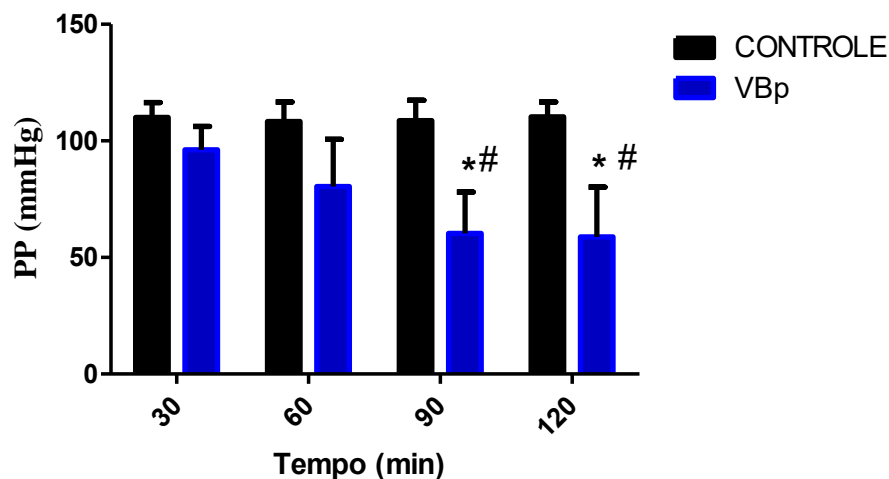


Figura 12: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* na pressão de perfusão em rim isolado de rato, na concentração de $10\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em (média $\pm$ E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$ (controle interno) e $p < 0,05^\#$ (controle externo).

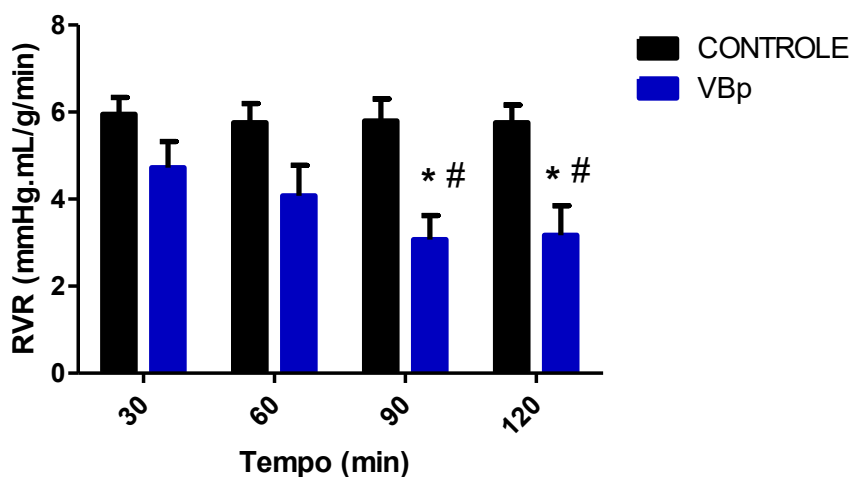


Figura 13: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* ($10\mu\text{g/mL}$) na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos em (média $\pm$ E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$ (controle interno) e $p < 0,05^\#$ (controle externo).

Tabela 2: Parâmetros funcionais da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops pauloensis* (10µg/mL).

Tempo	FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		RFG (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
	Controle	VBp	Controle	VBp
30	0.13 ± 0,00	0.14 ± 0,01	0.70 ± 0,07	0.57 ± 0,05
60	0.15 ± 0,01	0.13 ± 0,01	0.70 ± 0,05	0.32 ± 0,04*
90	0.16 ± 0,02	0.18 ± 0,03	0.63 ± 0,05	0.41 ± 0,09
120	0.16 ± 0,02	0.34 ± 0,05*	0.69 ± 0,08	0.98 ± 0,24

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando p<0,05*(controle interno) e p<0,05[#](controle externo).

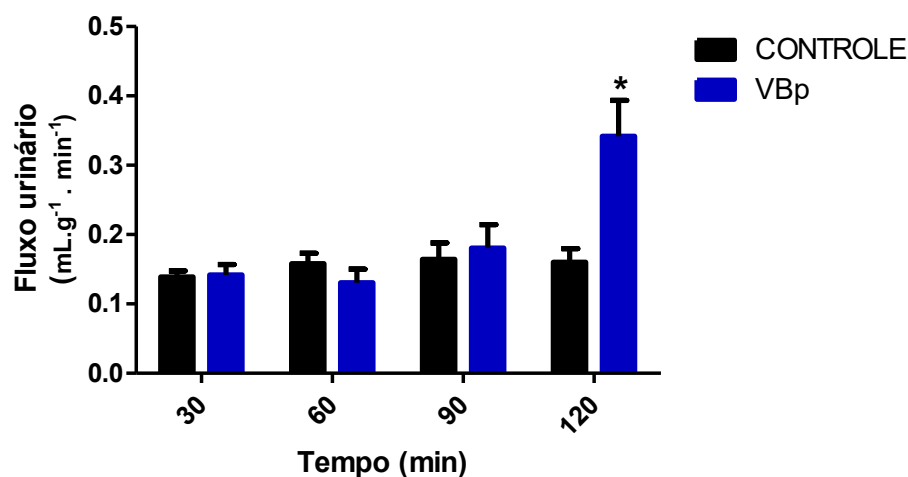


Figura 14: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (10µg/mL) no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando p<0,05*.

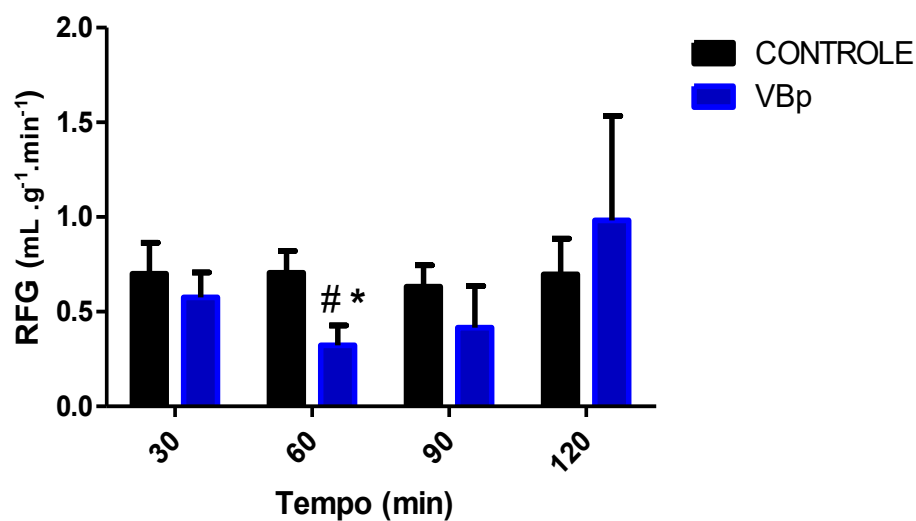


Figura 15: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (10µg/mL) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$

Tabela 3: Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio, cloreto e potássio da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops pauloensis* (10µg/mL).

Tempo	% TNa^+		% TCI^-		% TK^+	
	Controle	VBp	Controle	VBp	Controle	VBp
30	81.94 ± 1.24	80.48 ± 1.51	80.90 ± 0.34	79.54 ± 1.47	69.13 ± 1.47	65.09 ± 3.71
60	81.11 ± 1.25	64.48 ± 2.63 [*]	82.25 ± 1.08	63.46 ± 2.58 [*]	69.03 ± 1.47	50.17 ± 3.83 [*]
90	79.26 ± 0.90	55.56 ± 4.70 [*]	80.65 ± 0.89	55.31 ± 4.70 [*]	71.84 ± 1.47	50.51 ± 4.72 [*]
120	79.76 ± 0.56	62.32 ± 2.98 [*]	79.53 ± 0.80	62.33 ± 2.98 [*]	69.94 ± 1.47	57.55 ± 2.98 [*]

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$.

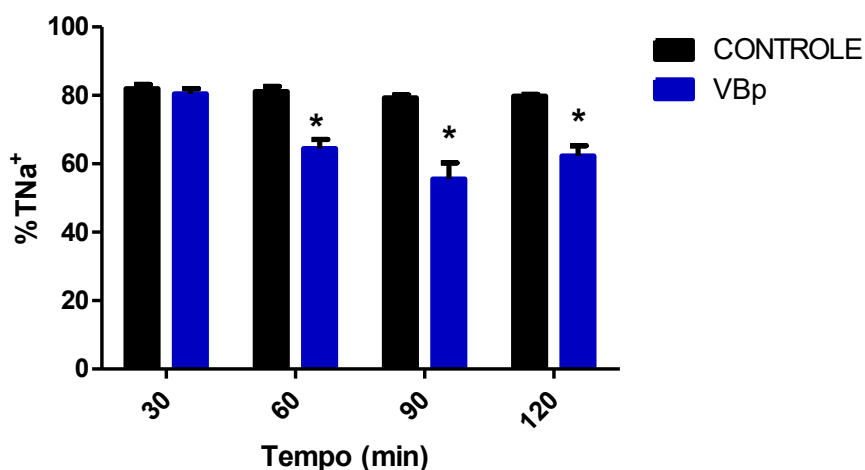


Figura 16: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (10µg/mL) no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa⁺). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$.

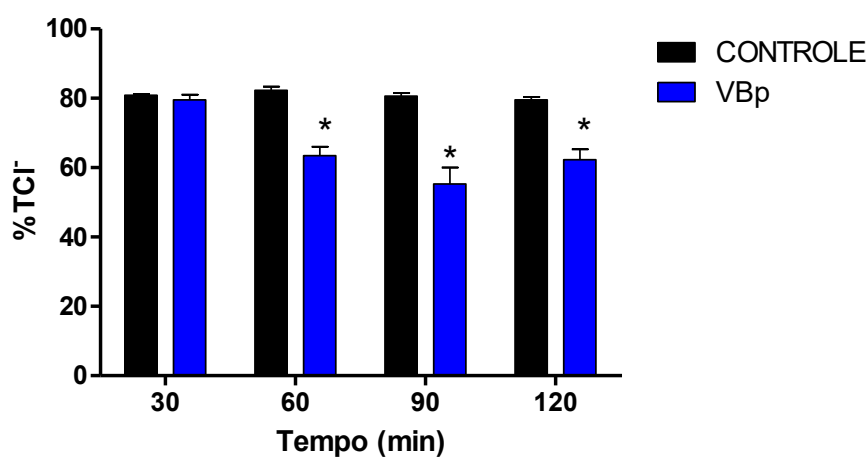


Figura 17: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (10µg/mL) no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl⁻). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando $p < 0,05^*$.

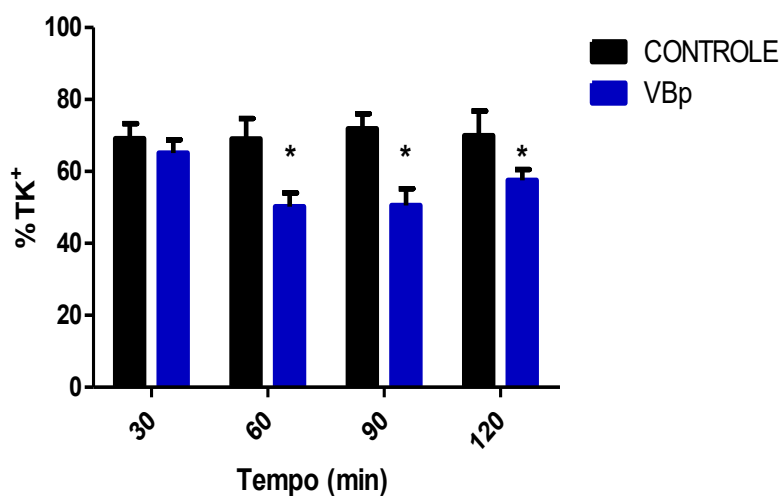


Figura 18: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* (10µg/mL) no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK⁺). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando p<0,05*.

5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente *Bothrops pauloensis*.

A Figura 19 mostra um corte histológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit mostrando que não há alterações provocadas pelo veículo. As lâminas analisadas demonstraram que glomérulos, túbulos, vasos e interstícios normais. Os rins esquerdos serviram como grupo controle não apresentando também qualquer alteração em glomérulos, túbulos, vasos e interstício.

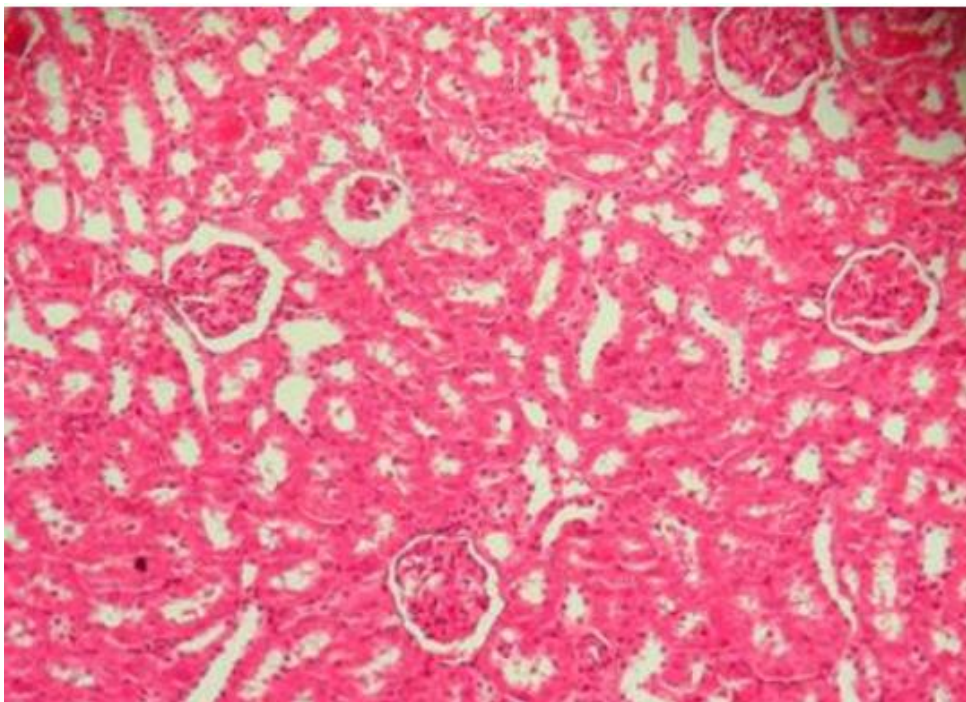


Figura 19: Corte histopatológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada por 120 min (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 100X).

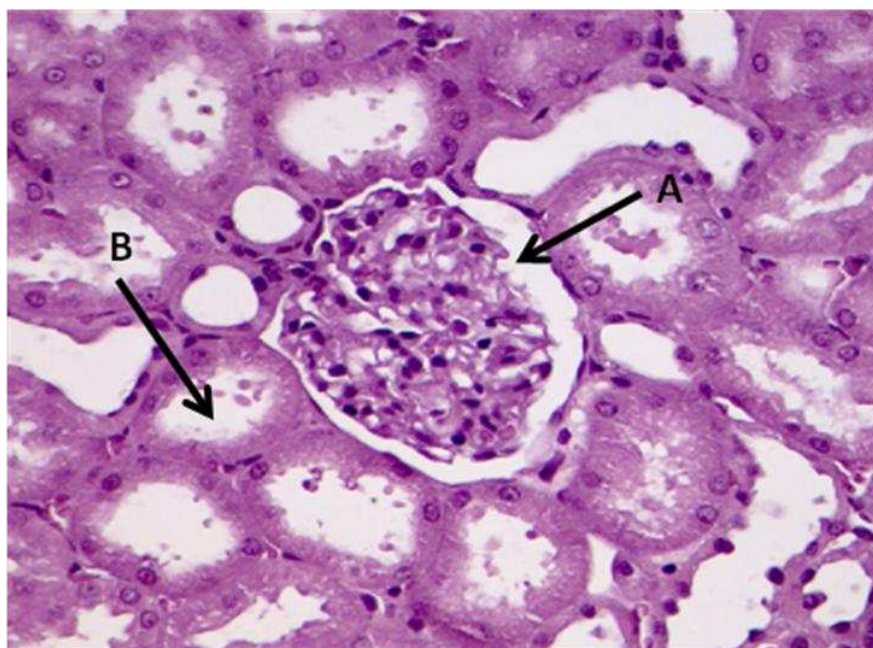


Figura 20: Corte histológico de rim esquerdo não perfundido. Em A) Glomérulo e em B) Túbulos renais (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 400X).

Na análise histológica dos rins perfundidos com o veneno de *B. pauloensis* na dose de 10µg/mL, observamos deposição proteinácea no espaço glomerular e tubular (setas) (Figura 21). Presença de núcleos tubulares picnóticos (Figura 22). Interstícios e vasos normais (Figura 22).

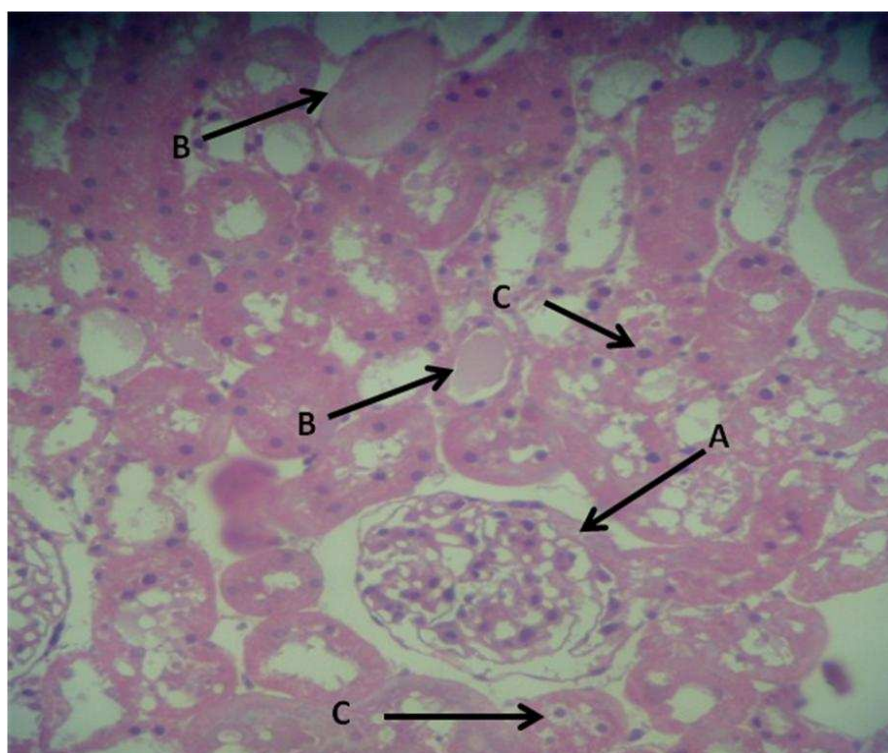


Figura 21: Corte histológico de rim perfundido com veneno total de *Bothrops pauloensis* na dose de 10µg/mL (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 400X). Observou-se deposição de moderado material proteináceo no espaço glomerular (A) e tubular (B), além de vacuolização das células tubulares (C).

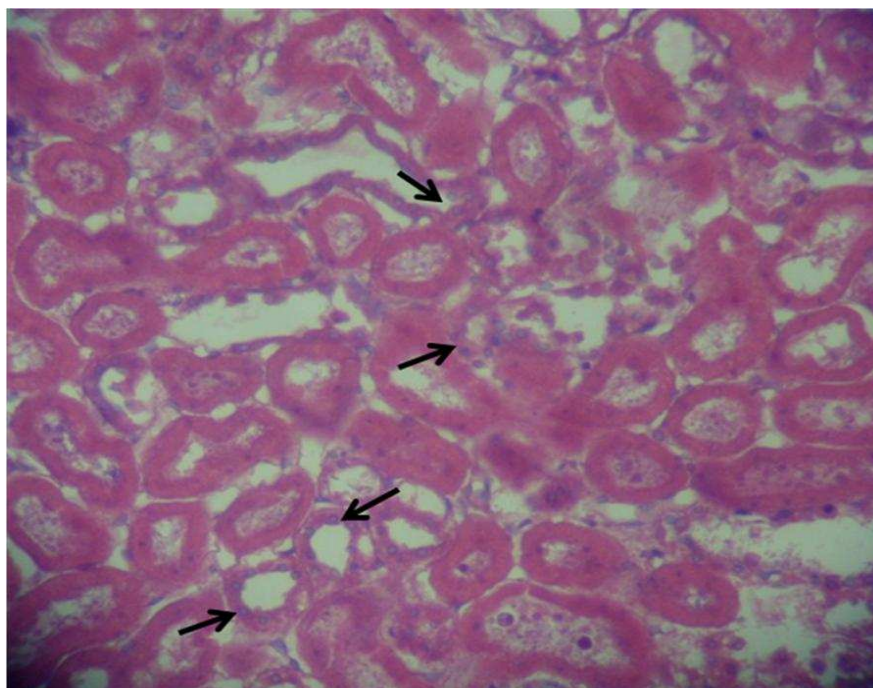


Figura 22. Corte histológico de rim perfundido com veneno total de *Bothrops pauloensis* na dose de 10 μ g/mL (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 400X). Evidenciou-se a presença de núcleos tubulares picnóticos (setas).

5.3) Avaliação da atividade do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* sobre células MDCK.

5.3.1 Ensaio de viabilidade celular.

A citotoxicidade do veneno da *Bothrops pauloensis* (vBp) foi avaliado em células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (100; 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 μ g/mL). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que o veneno reduziu significativamente a viabilidade das células MDCK em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle, apresentando citotoxicidade até 3,12 μ g/mL (CI₅₀=4,18 μ g/mL). A figura 23 representa a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

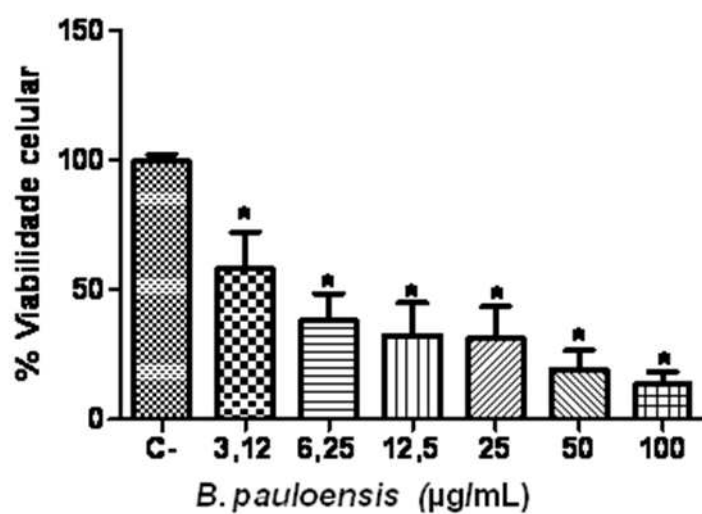


Figura 23: Efeito do Veneno Bruto de *Bothrops pauloensis* em diferentes concentrações sobre as células MDCK. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Considerando $p < 0,05^*$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A insuficiência renal aguda é a complicação sistêmica mais severa após um acidente botrópico. Além de bastante grave, pode levar o paciente à óbito (BOER-LIMA *et al.*, 2002). Outra complicação comum que tem sido bastante reportada em acidentes ofídicos por serpentes deste gênero é a hipotensão, um efeito sistêmico capaz de produzir um estado de perfusão insuficiente para vários órgãos (ABUELO, 1995).

No sistema de perfusão renal na concentração de 10µg/mL o vBp causou diminuição da pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR) aos 90 e 120 minutos e do ritmo de filtração glomerular (RFG) aos 60 minutos. Ocorreu um acréscimo significativo no fluxo urinário (FU) aos 120 minutos. O percentual total do transporte de sódio (%TNa), cloreto (%TCl) e potássio(%TK) diminuíram aos 60, 90 e 120 minutos.

Como se pode observar no Quadro 2 os efeitos de venenos de serpentes botrópicas e /ou frações purificadas em modelo de rim isolado mostra que, apesar de serem estudados venenos de um mesmo gênero, existem diferenças nas alterações dos parâmetros funcionais renais quanto a significância e tempo que ocorrem.

Ainda de acordo com o Quadro 2, resultados semelhantes às alterações dos parâmetros funcionais renais do nosso estudo são encontrados no trabalho realizado por Martins *et al.* (2005), avaliando os efeitos renais do veneno total de *Bothrops erythromelas*. De maneira geral os demais estudos não mostram aumento do fluxo urinário como encontrado com o vBp.

Por estes resultados, 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 a quantidade de veneno inoculado no indivíduo, gerando uma série de sinais e sintomas bastante diversificado 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).

Quadro 2: Estudos com veneno total de espécies do gênero *Bothrops* em perfusão de Rim isolado.

Espécie botropica	PP	RVR	FU	RFG	%TNa ⁺	%TCI ⁻	%TK ⁻	Referência
<i>B. erythromelas</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 90 minutos.	(MARTINS et al., 2005).
<i>B. marajoensis</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Não alterou.	(EVANGELISTA et al., 2010).
<i>B. lutzi</i>	Redução aos 60 e 90 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(SOUSA, 2010).
<i>B. jararaca</i>	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Dados não apresentados.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	(MONTEIRO, 1990).
<i>B. jararacussu</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	(HAVT et al., 2001).
<i>B. pirajai</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(HAVT et al., 2005).
<i>B. moojeni</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(BARBOSA et al., 2002).
<i>B. insularis</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Não alterou.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	(BRAGA, 2006)
<i>B. leucurus</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos	Redução aos 60 e 90 minutos	Redução aos 90 minutos	Redução aos 60 e 90 minutos	Não alterou.	(MORAIS, 2011).
<i>B. atrox</i>	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Não alterou.	(NORÕES, 2009).

Os venenos botrópicos apresentam vários peptídeos que intensificam a resposta à bradicinina, esses peptídeos já foram isolados do veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwidi* e *Bothrops jararacussu* (FERREIRA *et al* 1970, 1992, 1998). A bradicinina participa fisiologicamente da regulação da pressão sanguínea e da função renal. Trata-se de uma potente substância vasodilatadora que atua através da ativação de receptores B2, estimulando a liberação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MOUREAU *et al.*, 2005). Guimarães *et al.*, 1986 demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal em rim isolado de rato.

O córtex renal normal produz grande quantidade de PGE2 e PGI2 e pouca quantidade de TXA2. PGE2 e PGI2 têm ação vasodilatadora no rim. Estes prostanoídes seriam responsáveis por influenciar o fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e liberação de renina (OSBORN *et al.*, 1984). Infusões intrarenal de prostaglandinas aumentaram o fluxo sanguíneo renal e produziram efeito natriurético, inibindo a reabsorção tubular de sódio e na alça ascendente de Henle reduziram o transporte tubular de cloro (SIMMONS *et al.*, 2004).

Em relação ao supracitado, os peptídeos potenciadores da bradicinina, juntamente com a liberação dos mediadores inflamatórios com ação vasodilatadora, poderiam estar envolvidos na redução da pressão de perfusão observados nesse estudo.

Os efeitos renais no envenenamento ofídico podem ser decorrentes de coagulação intravascular disseminada, ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica do veneno ou a espasmos dos vasos sanguíneos decorrentes da liberação de substâncias vasoativas (CHAIYABUTR; SITPRIJA, 1999; CALGAROTTO *et al.*, 2008). Vários autores concordam que a ação proteolítica dos venenos botrópicos tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ e LOMONTE, 1995), induzindo liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas (CHAVES *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que o veneno de *Bothrops pauloensis* apresenta uma intensa atividade proteolítica (OLIVEIRA *et al.*, 2009), podendo desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. Isso poderia também ocasionar a perda da função de transporte das células epiteliais renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos como sódio e cloreto observados nesse estudo.

Em relação as alterações histológicas dos rins perfundidos com o veneno de *B. pauloensis* na dose de 10µg/mL, observamos deposição proteinácea no espaço glomerular e

tubular, vacuolização das células tubulares, presença de núcleos tubulares picnóticos, interstícios e vasos normais, com alteração na arquitetura renal

De acordo com Vieira (2001), após a lesão renal inicial, o rim desenvolve uma resposta molecular que determinará o destino da célula. Pelo menos, quatro destinos celulares são identificados na IRA: as células podem apresentar necrose; morrer por apoptose; podem se dividir ou comportam-se de modo indiferente ao estresse.

A necrose tubular aguda tem sido relatada como a lesão mais frequentemente encontrada em cortes histológicos renais após acidente ofídico envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* (BURDMANN, VIEIRA JR e VIDAL, 2003). No entanto, ainda não foi elucidado o mecanismo de morte celular renal promovido por um envenenamento botrópico.

Estudos com veneno bruto de *Bothrops insularis* demonstrou alterações histológicas renais compatíveis com efeito citotóxico direto (DA CRUZ HOFLING *et al.*, 2001). Estudos com o veneno da serpente *Bothrops lutzi* também indicam lesões diretas/ou indiretas aos túbulos renais, podendo haver íntima relação dessas lesões com o desencadeamento de uma possível insuficiência renal aguda (SOUSA, 2011).

Realizou-se também o estudo do efeito do vBp em diferentes concentrações diante de células tubulares renais MDCK, que trata-se de uma linhagem de células com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO, SUEUR e CRUZ-HÖFLING, 2002). Neste ensaio observamos uma redução significativa da viabilidade celular, em todas as concentrações estudadas. Resultado que corrobora com outros dados descritos na literatura. Nascimento *et al.*, (2007) avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus* em células MDCK, e também verificaram redução da viabilidade celular. Collares buzato *et al.*, (2002), ao estudarem a citotoxicidade do veneno de *Bothrops moojeni*, também observaram que a peçonha induziu citotoxicidade nas células MDCK. O veneno de *Bothrops leucurus* exerceu um efeito bastante citotóxico em cultura de células MDCK (MORAIS, 2011).

O veneno de *Bothrops pauloensis*, de acordo com o isolado até o momento, tem mostrado uma variedade de fosfolipases, principalmente miotóxicas: BnSP-6 e BnSP-7 (PLA₂ miotóxica Lys49), Bp-PLA₂ (PLA₂ ácida miotóxica Asp49), BnpTX-I e BnpTX-II (PLA₂ básicas miotóxicas Asp49) e Bp-12 (PLA₂ Lys49), além de outras frações como Bp-LAAO (LAAO), BpSP-I (serinoprotease trombina-like) e neuwiedase (metaloprotease) (JORGE, 2011). Como não realizamos estudos com frações isoladas, e sim com veneno total,

não podemos atribuir as variações nos parâmetros renais observadas nos experimentos a um componente específico.

De acordo com nossos achados, os efeitos do vBp no sistema de perfusão renal e nas células tubulares renais isoladas sugere uma atividade nefrotóxica. Em vista dos efeitos renais encontrados, sugere-se a investigação, após o fracionamento do veneno, de peptídios que possam ser capazes de promover esse tipo de alteração isoladamente, sem alterações deletérias, para que dessa forma possam ser descobertas possíveis ferramentas farmacológicas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O veneno de *Bothrops pauloensis* na dose de 10µg/mL alterou os parâmetros funcionais renais com redução da PP, RVR, aumento do FU, redução transitória do RFG.
- Reduziu os transporte tubulares percentuais de sódio, cloreto e potássio.
- Análise histopatológica evidenciou: alterações na arquitetura renal, exceto em espaço intersticial e vascular.
- O vBp foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas condições de estudo em células MDCK.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A.; DAL BELO, C. A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, C. R. B.; HYSLOP, S.; FURTADO, M. F. D.; SIMIONI, L. R. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 148, p. 142-149, 2007.
- ABUELO, G. J. Diagnostic vascular causes of renal failure. **Annals of internal Medicine** v.123, n.8, p.601-614, 1995.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon.**, v.40, n.4, p.335-393, 2002.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- ANAI, K.; SUGIKI, M., YOSHIDA, E., MURUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v.40, n.1, p.63-68, 2002.
- ANDE, R. S. ; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. de.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. v.40, n°10, p.1427-35, 2002.
- BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWISKI, A. A Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops spp.* and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**. v.1, p.11-22, 1995.

- BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p.403-414, 2006.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. R.; CRUZ-HOFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli change in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.67, n.2, p. 217-222, 2002.
- BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) Snakes a natural history. **New York: Sterling Publishing Co.**, p.194-209, 1997.
- BORGES, M. H., SOARES, A .M., RODRIGUES, V. M., ANDRILAO-ESCARSO, S. H., DINIZ, H., HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIERREZ, J. M., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2000.
- BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno de *Bothrops insularis* e de frações isoladas.** 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Relatórios Gerenciais. **Acidentes por animais peçonhentos:** notificação por tipo de serpente segundo ano. 2011. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539>. Acesso em 30 de agosto de 2011.
- BURDMANN, E. A.; VIEIRA, J. R.; VIDAL, E. C. Nefropatia tóxica e tubulointersticial. In: RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios eletrolíticos.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. p. 472-474.
- BUTLER, M. e DAWSON, M. **Cell culture labfax**, 1st edition. Academic Press, Oxford, p.247, 1992.
- CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2008.

- CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. **J. Nat. Toxins** v. 20, n. 5, p. 574-577. 1999.
- CHAVE, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERRES, J. M. Role of TNF - α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p.171-178, 2005.
- CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin World Health Organization**, v. 5, n. 76, p. 515-524, 1998.
- CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E.A.F. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, 53, 330–340, 2009.
- COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103–121, 1977.
- COLLARES-BUZATO, C.B.; LE SUEUR, L.P.; CRUZ- HOFLING. M.A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, p. 124–132, 2002.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ÁBREU, A. C. F. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis*(jararaca ilhêa) venom and phospholipase A2-containing fraction. **Histology and Histopathology**, v.16, p.185-195, 2001).
- DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake(bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2(Lm TX-I) in cultured cells. **Toxicon**. v.49, p.678-692, 2007).
- DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.. Loxosceles venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, n.1, p.151-156, 2008.
- DU, X.Y. e CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.
- EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A; NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.;

- TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1061-1070, 2010.
- FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.
- FERREIRA, L.A.; GALLE, A.; RAID, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; RABERMEUL, G. Isolation : analysis and properties of three bradykinin- potentiating peptides (BPP-II, BPP- III, and BPP-V, from *Bothrops neuwied* venom. **J Protein chem**, v. 17, p. 285-289, 1998.
- FERREIRA, L.A.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M.B.C.; PREZOTO, B.C.; ANDREONI, A.S.S.; ZERNIK, R.; HABERMEHL, C. A new bradykinin- potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 30, p. 33-40, 1992.
- FERREIRA, S.H.; BARTELD, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n.13, p. 2583- 2595, 1970.
- FONTELES, M. C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.
- FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci**, v. 33, n. 5, p. 431-436, 1983.
- FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2, p. 191-197, 1998.
- FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmacol**, v.20, p.1549-1556, 1971.
- GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**. v.48, n.1, p.44-54, 2006.

- GUIMARÃES, J.A.; VIEIRA, M.A.R.; CAMARGO, M.J.F.; MAACK, T. Renal vasoconstrictive effect of kinnins mediated by B1- kinnin receptores. **Eur. J. Pharmacol** , v. 130, p. 177 -185, 1986.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- 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.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.1, p.130-41, 2005.
- HAVT, F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF. **Toxicon**, v.39, n.12, p.1841-1846, 2001.
- HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A₂ at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v.4, p.293-306, 1979.
- HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-344, 2005.
- HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, p. 540-541, 846p.
- JORGE, R.J.B. **Inibição dos efeitos locais do veneno de *Bothrops pauloensis* por alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae)**. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- KAMIGUT, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; XUXEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, n.6, p. 1996.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.

- KOH, D.C.I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v.63, p.3030-3041, 2006.
- LEMOS J.C.; ALMEIDA T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA A.A.; SIMOES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos noticiados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev Bras Epidemiol**; v. 12, p. 50-59, 2009.
- LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349-1358, 1994.
- LIRA-DA-SILVA, M.R.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 21-25, 2009.
- LOMONTE B, ANGULO Y., CALDERON L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, n.8, p. 885-901, 2003.
- 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** v.147, p424-433, 2008.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v1477, p146-156, 2000.
- MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.
- MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO H. D.; FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STARUCH, M. A.; FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N, CALILELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; SILVA A. J. M.; COSTA, P. R. R. Ability of a

synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.

MITCHELL, R. N. Hemodynamic disorders thromboembolic disease, and shock. In KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins and Cotran Pathologic basis of disease**. 7th ed Philadelphia: Saunders, 2005. 1525p. cap. 4, p.119-144.

MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Subunit dissociation, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin like protein from snake venom. **Biochemistry**, v.42, n.2, p.509-515, 2003.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da Ciclooxigenase no rim perfundido de rato**. 1990. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, 1990.

MORAIS, I. C. O. **Estudo dos efeitos renais e mecanismos de morte celular induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus***. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.

MOUREAU, M.E.; GARBACHI, N.; MOLINARO, G. ; BROWN, N.J. ; MARCEAU, F. ; ADAM. A. The kalikrein- Kinin system : Current and future pharmacological targets. **Jounarl of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MURAKAMI, M. T. and ARNI, R. K. A.A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A2s. **Toxicon**. v.42, p903-913, 2003.

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSCOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol**, v. 85, p. 591–605 , 2007.

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSCOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol**, v. 85, p. 591–605 , 2007.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F.

F, EBLE, J. A, SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NOGUEIRA, C. **Call Photos**, 2003. Disponível em: http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0803+0687. Acesso em 30 de agosto de 2011.

NORÕES, T. B. S. **Efeitos renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops atrox* e a produção do óxido nítrico**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; HAMAGUCHI A, D. E ALCÂNTARA, T. M; CLISSA P. B; RODRIGUES V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.

OSBORN, J. L.; KOPP, U. C.; THAMES, M. D.; DIBONA, G. F. Interactions among renal nerves, prostaglandins, and renal arterial pressure in the regulation of renin release. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 706-713, 1984.

PINHO, F. M. O. e PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.47, n.1, p. 24-49, 2001.

PINHO, F. M. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v.22, n.3, p.162-168, 2000).

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

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 brasilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p.842-851, 2008.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v.44, p1-17, 2004.

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

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES-DE-CAMPOS, V. A. F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no

estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.44, n.4, p.312-318, 1998.

ROCHA, I.C.A. **Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.

RUIZ DE TORRENTE, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK, S.; KOSCIONCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas Del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **APPTLA**, v.49, p.117-183, 1999.

SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CASTRO, S. C. B.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **J. Q. Med.**, v.95, p.551-559, 2011.

SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBES Lett.**, v.477, p.199-202, 2000.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T., Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, Sept. 2004.

SITIPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nefrology** v.11, p. 442-448, 2006.

SITIPRIJA, V.; CHAIYABUR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins.**, v.8, p.271-277, 1999.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, n1-2, p.1-19, 2000.

SOUSA, D. F. **Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi***. 2010. 151 f. Dissertação (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v.42, n.7, p.801-808, 2003.

TICLI, F.K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L- aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação de sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida.** Tese de doutorado em toxicologia. Universidade de São Paulo, 2006.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosisinducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 9539–9542, 1997.

TORRES, A. F. C.; COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795–804, 2010.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. de O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Plenum Press**, p37-62, 1996.

VARGAS, F. F. R.; SOTO, L. A. P.; SOUZA, D. M.; MARAGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 66–74, 2010.

WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1995.

WARREL D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds) The venomous reptiles of the Western Hemisphere. **Cornell University Press**, New York, p.709-715, 2004.