

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

**Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Crotalus
durissus collilineatus***

DANIELA NASCIMENTO AMORA

**Fortaleza-Ceará
2005**

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

**Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Crotalus
durissus collilineatus***

DANIELA NASCIMENTO AMORA

Dissertação apresentada à Coordenação de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

Orientadora
Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

**Fortaleza-Ceará
2005**

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

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial desta instituição.

Daniela Nascimento Amora

Data da Defesa: 12 de Janeiro de 2005

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão

À minha mãe

**“Curar a alma por meio dos sentidos,
e os sentidos por meio da alma”.**

Oscar Wilde

Agradecimentos

À Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro por ter me proporcionado a chance de crescer profissionalmente.

À Profa. Dra. Rita Maria Dantas Nogueira que é a responsável pela minha decisão de seguir carreira nas áreas de docência e de pesquisa e que é uma das pessoas que mais admiro, tanto no campo profissional quanto pessoal.

À Profa. Dra. Gisela Costa Camarão que será sempre para mim um exemplo de professora e de pesquisadora a ser seguido.

Ao Doutorando Paulo Sérgio Ferreira Barbosa, uma pessoa que sempre me ajudou nos experimentos e que me fez sentir integrada ao grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, uma pessoa com quem sempre pude contar.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes por sua indispensável ajuda.

À Profa. Dra. Marta Regina Magalhães, coordenadora do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás, por ter gentilmente cedido, parte do veneno utilizado nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Íris, Francisco, Fernando e Rose.

Às amigas Fernanda Carvalho Bezerra e Gracyene Maria Varela.

À amiga Karla Graziela Moreira que mesmo morando longe continua sendo uma pessoa muito importante na minha vida.

Ao colega farmacêutico Carlos Tiago Moura, por sua ajuda, em diversas ocasiões, desde da época da monitoria em Farmacologia até agora.

À mestranda Ticiane Meireles Sousa, uma pesquisadora nata, com quem sempre pude contar e que é um exemplo de competência em tudo que faz.

Às doutorandas e amigas Regilane e Karinne.

Aos colegas Renata Alves e René Duarte.

Aos colegas do Laboratório do IBIMED: Cleidiana, Daniel Freire, Diego, Franzé, João Paulo, Monique e Pedro.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Dor (LAFAD): Airton, Camila, Felipe, Juliana, Karinne, Marcelo, Régis e Ruth.

Às funcionárias do curso de Pós-graduação em Farmacologia Áurea e Sílvia.

Aos funcionários do Instituto de Biomedicina (IBIMED): Jociê, José e Kátia.

Ao Dr. Domingos Barreto pela ajuda indispensável ajuda na realização das análises bioquímicas.

À Sílvia Maria Silva França pela imprescindível ajuda nos experimentos.

Aos amigos Daniela, Fábio, Helano, Isabel, Isabeli, Mara, Marília, Milena, Mônica e Raquel.

À minha família.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro que me proporcionou condições ideais para a dedicação exclusiva ao curso de Mestrado.

ÍNDICE

Lista de Figuras	10
Lista de Abreviaturas	13
Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	17
2. Objetivos	39
3. Material e Métodos	41
3.1. Estudo da toxicidade aguda do veneno da serpente	
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	41
3.1.1. Animais	41
3.1.2. Material	41
3.1.3. Procedimento experimental	41
3.2. Perfusão de rim isolado de rato	42
3.2.1. Animais	42
3.2.2. Substâncias utilizadas	42
3.2.3. Preparo da solução perfusora	42
3.2.4. O sistema de perfusão de rim isolado de rato	43
3.2.5. Calibração do sistema de perfusão de rim isolado de rato	45
3.2.6. Técnica cirúrgica	47
3.2.7. Procedimento experimental	47
3.2.8. Análise histológica	49
3.2.9. Grupos experimentais	49
3.2.10. Cálculo dos parâmetros renais	50
3.2.11. Estatística	52

3.3. Aspectos éticos	52
4. Resultados	54
4.1. Estudo da toxicidade aguda do veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	54
4.2. Perfusão de rim isolado de rato	56
4.3. Análise histológica dos grupos da perfusão renal	70
5. Discussão	74
6. Conclusão	81
7. Referências Bibliográficas	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Fotografia da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	18
Figura 02	Esquema dos mecanismos que contribuem para o decréscimo do ritmo de filtração glomerular (RFG) na insuficiência renal aguda	23
Figura 03	Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato	45
Figura 04	Calibração do sistema. Velocidade da bomba <i>versus</i> pressão	46
Figura 05	Calibração do sistema. Velocidade da bomba <i>versus</i> medida do fluxômetro	47
Figura 06	Calibração do sistema. Velocidade da bomba <i>versus</i> fluxo na ponta da cânula	47
Figura 07	Fotografia da técnica cirúrgica do método de perfusão de rim isolado de rato	49
Figura 08	Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na dose de 3600 µg/kg, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.	56
Figura 09	Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na dose de 4800µg/kg, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.	57
Figura 10	Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na dose de 7200 µg/kg, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.	57
Figura 11	Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na pressão de perfusão (PP)	61
Figura 12	Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> na resistência vascular renal (RVR)	62

- Figura 13** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no fluxo urinário (FU) 63
- Figura 14** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no ritmo de filtração glomerular (RFG) 64
- Figura 15** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa⁺) 65
- Figura 16** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK⁺) 66
- Figura 17** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl⁻) 67
- Figura 18** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) 68
- Figura 19** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) 69
- Figura 20** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) 70
- Figura 21** Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (10µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no *clearance* osmótico (C_{osm}) 71
- Figura 22** Análise histológica dos rins do grupo controle 72

- Figura 23** Aspecto morfológico de rim perfundido com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço glomerular (seta menor) e a presença de degeneração hidrópico vacuolar das células tubulares (seta tracejada). 73
- Figura 24** Aspecto morfológico de rim perfundido rim perfundido com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (30µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo nos espaços glomerular (seta menor) e tubular (seta maior). 73
- Figura 25** Aspecto morfológico de rim perfundido com a fração crotoxina do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço tubular (setas). 74
- Figura 26** Análise histológica dos rins perfundidos com a fração fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço glomerular (setas). 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
CB	Subunidade B da crotoxina
CA	Subunidade A da crotoxina ou crotapotina
Cdc10	10µg de veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
Cdc30	30µg de veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTX	Crotoxina
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
FLA _{2c}	Fosfolipase A ₂ citosólica
FLA _{2s}	Fosfolipase A ₂ secretória
FLA ₂ -D49	Fosfolipase A ₂ com atividade hidrolítica
FLA ₂ -K49	Fosfolipase A ₂ sem atividade hidrolítica
FSR	Fluxo sanguíneo renal
FU	Fluxo urinário
H ⁺ -K ⁺ -ATPase	Bomba de prótons
IRA	Insuficiência renal aguda
kDa	Quilodaltons
K _f	Coefficiente de ultrafiltração
mL	Mililitro
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Bomba de sódio e potássio
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintetase
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGI ₂	Prostaglandina I2 ou prostaciclina
PGFs	Prostaglandinas F
PP	Pressão de perfusão
PTK	Proteína tirosina quinase
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RVR	Resistência vascular renal
Receptor A ₁	Receptor de adenosina tipo 1
20-HETE	Ácido 20-hidroxiieicosatetranoico
11,12-EET	Ácido 11,12-epoxieicosatrienoico
µg	Micrograma
%TNa ⁺	Percentual de transporte tubular total de sódio
%TK ⁺	Percentual de transporte tubular total de potássio
%TCI ⁻	Percentual de transporte tubular total de cloreto

RESUMO

Efeitos renais do veneno bruto e das frações da serpente *Crotalus durissus collilineatus*

Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará. Daniela Nascimento Amora, Dissertação de Mestrado em Farmacologia – UFC, 2005. Orientadora: Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

A serpente *Crotalus durissus collilineatus* é encontrada na região do Cerrado e o acidente causado por esta espécie constitui um problema de saúde pública. A insuficiência renal aguda é a alteração sistêmica mais séria, apesar dos seus mecanismos não serem completamente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos biológicos produzidos pelo veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* e pelas frações crotoxina e fosfolipase A₂. Foi realizado o estudo da toxicidade aguda do veneno bruto de *C. d. collilineatus*, através da análise histológica de coração, cérebro, rins, pulmões e fígado de ratos tratados com doses crescente do veneno. Nesse estudo foi observada a presença de alterações hepáticas como microvacualização e esteatose, enquanto os demais órgãos apresentaram aspectos normais. Os efeitos renais foram avaliados através do método de perfusão de rim isolado de rato. O veneno bruto, usado na dose de 10µg, causou um aumento na pressão de perfusão (PP), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG), com efeito máximo aos 120min (PP: controle₁₂₀ 110,3±3,69; veneno₁₂₀126,8±10,2;FU: controle₁₂₀ 0,19±0,03; veneno₁₂₀0,23±0,06; RFG: controle₁₂₀ 0,79±0,07; veneno₁₂₀1,17±0,4). Essa dose não produziu alterações no transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e de cloreto (%TCl⁻). A dose mais elevada de veneno bruto (30µg) causou um decréscimo significativo, com efeito máximo, aos 120min, na PP (controle₁₂₀ 110,3±3,69; veneno₁₂₀96,7±8,1), na RVR (controle₁₂₀ 6,42±0,78; veneno₁₂₀4,8±0,56), no FU (controle₁₂₀ 0,19±0,03; veneno₁₂₀0,12±0,01) e no RFG (controle₁₂₀ 0,79±0,07; veneno₁₂₀0,53±0,09). Não ocorreram alterações no transporte tubular de eletrólitos. A fração crotoxina não produziu alterações no RFG (controle₁₂₀ 0,79±0,07; crotoxina₁₂₀ 0,31±0,10). Esta fração também reduziu os %TK⁺ (controle₁₂₀ 69,94±6,49; crotoxina₁₂₀ 33,28±4,78) e %TCl⁻ (controle₁₂₀ 79,53±2,67, crotoxina₁₂₀ 64,62±6,93). O grupo perfundido com FLA₂ apresentou um decréscimo no RFG (controle₁₂₀ 0,79±0,07; FLA₂ 120 0,52±0,07), enquanto a PP, a RVR, o FU e o %TNa⁺ permaneceram estáveis. Foram observadas reduções no %TK⁺ aos 120min (controle₁₂₀ 69,94±6,49; FLA₂120 56,26±6,81) e aos 60min, no %TCl⁻ (controle₆₀ 82,25±2,72; FLA₂60 75,04±4,26). Foi observada degeneração hidrópico vacuolar e a presença de material proteináceo nos túbulos renais, na análise histológica dos rins perfundidos tanto com veneno bruto quanto com as frações. Estes resultados indicam que o veneno de *Crotalus durissus collilineatus* causou alterações significativas nos parâmetros renais e nos aspectos morfológicos hepáticos.

Palavras-chave: *Crotalus*; veneno de serpente; crotoxina; rim; perfusão.

ABSTRACT

Renal Effects of *Crotalus durissus collilineatus* Crude Venom and Its Fractions

Department of Physiology and Pharmacology – Faculty of Medicine – Federal University of Ceara.

Daniela Nascimento Amora, Master's Dissertation – UFC, 2005.

Professor: Dr. Helena Serra Azul Monteiro.

Crotalus durissus collilineatus is a snake usually found in semideciduous forest, the Cerrado region and its bites constitutes an important health problem. The most serious systemic change and primary cause of death is acute renal failure although the mechanisms of the damaging effects are not totally understood. We investigated the biological effects promoted by *Crotalus durissus collilineatus* crude venom and its fractions crotoxin and phospholipase A₂. The toxic effects of *C d collilineatus* crude venom were evaluated by the histopathological analysis of organs such as heart, kidney, brain, lung and liver. Wistar rats were inoculated intraperitoneally with *C d collilineatus* crude venom. The liver showed steatosis and microvacuolation. The other organs showed normal morphological aspects. Renal effects were evaluated by the isolated perfused rat kidney method. The crude venom used at the lowest dose (10µg) increased perfusion pressure (PP), urinary flow (UF), and glomerular filtration rate (GFR), with maximal effect at 120min (PP: control₁₂₀ 110.3±3.69; venom₁₂₀ 126.8±10.2; UF: control₁₂₀ 0.19±0.03; venom₁₂₀ 0.23±0.06; GFR: control₁₂₀ 0.79±0.07; venom₁₂₀ 1.17±0.4). There was no effect on the percent of sodium tubular transport (%TNa⁺), the percent of potassium tubular transport (%TK⁺) and the percent of chloride tubular transport (%TCI⁻). The highest dose of the crude venom (30µg) caused a significantly decrease in PP (control₁₂₀ 110.3±3.69; venom₁₂₀ 96.7±8.1), RVR (control₁₂₀ 6.42±0.78; venom₁₂₀ 4.8±0.56), UF (control₁₂₀ 0.19±0.03; venom₁₂₀ 0.12±0.01) and GFR (control₁₂₀ 0.79±0.07; venom₁₂₀ 0.53±0.09). There was not effect on the percent of electrolytes tubular transport (%TNa⁺, %TK⁺ and %TCI⁻). Crotoxin (10µg) produced a decrease in GFR (control₁₂₀ 0.79±0.07; crotoxin₁₂₀ 0.31±0.10), while PP, RVR and UF remained stable. Crotoxin also reduced %TK⁺ (control₁₂₀ 69.94±6.49; crotoxin₁₂₀ 33.28±4.78) and %TCI⁻ (control₁₂₀ 79.53±2.67; crotoxin₁₂₀ 64.62±6.93) with maximal effect at 120min. Kidney perfused with phospholipase A₂ (PLA₂) showed a decrease in GFR (control₁₂₀ 0.79±0.07; PLA₂ 120 0.52±0.07) at 120min, whereas PP, RVR, UF and %TNa⁺ remained stable. PLA₂ also reduced %TK⁺ (control₁₂₀ 69.94±6.49; PLA₂ 120 56.26±6.81) and %TCI⁻ (control₆₀ 82.25±2.72; PLA₂ 60 75.04±4.26) at 60min. These results altogether indicate that *Crotalus durissus collilineatus* venom caused significative alterations in the renal parameters as well as hepatic damage.

Keywords: *Crotalus*; Snake venom; Crotoxin; Kidney; Perfusion.

Introdução

1. Introdução

Venenos são encontrados em várias espécies de seres vivos, de unicelulares a pássaros (Russel e Dart, 1991; Dumbacher *et al.*, 2000).

Animais peçonhentos são todos aqueles que produzem veneno e têm estruturas especializadas para injetá-lo. O veneno é produzido por glândulas específicas e tem a função de captura da presa e digestão do alimento e também de defesa contra agressores. No caso das serpentes, estas apresentam ainda um órgão sensorial importante que é a fosseta loreal – um sensor térmico muito desenvolvido – situado entre a narina e os olhos. Através desse sensor, a serpente pode localizar a sua presa em ambientes escuros apenas pela captação do calor (Nogueira e Sakate, 2004).

O animal não-peçonhento é aquele cujos tecidos, ou partes deles, são parcial ou totalmente tóxicos e que não possui mecanismo ou estrutura para a liberação de veneno (Russel e Dart, 1991).

Dentre as serpentes peçonhentas encontradas no Brasil e de interesse clínico, existem as pertencentes à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, com os gêneros *Bothrops* (conhecida popularmente como jararaca ou urutu), *Crotalus* (vulgarmente chamada de cascavel ou maracambóia) e *Lachesis* (também conhecida como surucucu); e as pertencentes à família *Elapidae* com subfamília *Elapinae* representada pela espécie *Micrurus* - conhecida como coral verdadeira ou boicorá (Nogueira e Sakate, 2004).

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* e classificadas nas subespécies *Crotalus durissus terrificus*, encontrada nas regiões sul oriental e meridional; *Crotalus durissus collilineatus* (Figura 1), distribuídas nas regiões secas do Centro-Oeste, em Minas Gerais e no norte de São Paulo; *Crotalus durissus cascavella*, encontrada nas áreas de caatinga da região Nordeste; *Crotalus durissus ruruima*,

observada na região Norte; e a *Crotalus durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó (Pinho e Pereira, 2001).



Figura 1. Fotografia da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

Além das diferenças morfológicas e de comportamento dessas serpentes, observa-se uma distribuição geográfica particular para cada espécie. Assim, as crotálicas, por exemplo, são encontradas principalmente em regiões secas, pedregosas, arenosas, em encostas de morros, cerrados e raramente na faixa litorânea ou florestas úmidas (Nogueira e Sakate, 2004).

Vital Brazil foi o pesquisador responsável pelo primeiro levantamento do número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas no estado de São Paulo nos anos de 1897, 1899 e 1900 (Bochner e Struchiner, 2003). Segundo estes autores, nos últimos cem anos, o perfil da epidemiologia dos acidentes ofídicos manteve-se inalterado, com uma maior frequência de acidentes no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, e com o gênero *Bothrops* sendo o maior responsável por tais acidentes. No estado do Ceará, no período de 1992 a 1995, ocorreram cerca de 688 acidentes por serpentes peçonhentas, com uma média anual de 172 casos (Feitosa *et al.*, 1997).

A identificação do animal causador do acidente, principalmente através da avaliação dos sintomas da vítima, é um procedimento importante na medida em que possibilita a dispensa imediata de maioria dos pacientes picados por serpentes não peçonhentas e viabiliza o reconhecimento das espécies de importância médica em nível regional além de auxiliar na indicação do antiveneno a ser administrado (Pinho e Pereira, 2001). Há um caso de antiveneno preparado a partir da peçonha de cascavel do Nordeste do Brasil que não promoveu proteção em vítimas picadas em regiões do Sudeste e, portanto, confirmou a necessidade de produção local de antiveneno (Chippaux *et al.*, 1991).

A maioria dos venenos exerce seus efeitos em quase todas as células e tecidos; e suas propriedades farmacológicas são determinadas pela quantidade de um constituinte específico e biologicamente ativo que se acumula num sítio de reconhecimento onde é capaz de produzir injúria (Russel *et al.*, 1996). Além disso, em acidentes ofídicos ocorrem reações inflamatórias intensas com a liberação de muitos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, as citocinas, a bradicinina, as frações do complemento e o fator de agregação plaquetária (Barraviera *et al.*, 1995).

Vários trabalhos apontam uma possível implicação entre níveis elevados de interleucina 8 (IL-8), que são observados em pacientes picados por serpentes crotálicas, e reações sistêmicas como insuficiência respiratória e choque (Petricevich, 2004; Barraviera *et al.*, 1997). Petricevich (2004) sugere que o choque seria decorrente da ativação maciça de citocinas pró-inflamatórias nesses tipos de acidentes.

Os componentes dos venenos têm um conjunto de ações tanto sobre as presas quanto sobre as vítimas humanas (Chippaux *et al.*, 1991). Eles apresentam sua toxicidade em tempos variados e algumas diferenças nas manifestações clínicas são decorrentes não só das suas propriedades específicas, mas também das diferenças na velocidade de absorção e na habilidade de penetrar em membranas e tecidos (Chippaux *et al.*, 1991). Segundo Sanchez e colaboradores (1992), as amostras de veneno de *Crotalus durissus* têm maior atividade letal quando injetadas pela via intraperitoneal do que pela via intravenosa. Além disso, o conteúdo e a potência da peçonha em uma dada serpente variam de acordo com o tamanho, a idade, o hábito alimentar, o clima e a época do ano (Chippaux *et al.*, 1991).

O desenvolvimento de métodos experimentais para a identificação das diferentes atividades dos componentes de venenos de diversas espécies tem permitido a determinação do nível de variação destes, assim como a origem de tais variações (Chippaux *et al.*, 1991).

Além disso, testes detalhados de várias toxinas e de modificações sintéticas destas têm demonstrado que partes das moléculas são importantes para as suas atividades. Sabe-se, por exemplo, que algumas fosfolipases A₂, isoladas de serpentes da família *Viperidae*, são desprovidas de atividade catalítica, devido à substituição em resíduos críticos na alça de ligação de cálcio, particularmente na posição 49, onde um resíduo de ácido aspártico é substituído por lisina (Diaz *et al.*, 2001).

O tratamento do envenenamento pode variar de acordo com o tipo, a natureza e a severidade dos sintomas ou com os sinais específicos diretamente relacionados aos componentes tóxicos do veneno (Petricevich, 2004).

Portanto, através desses estudos, tem-se uma expansão do conhecimento da variabilidade intraespecífica, o que pode permitir um tratamento mais eficaz das vítimas de acidentes com animais peçonhentos de um modo geral (Chippaux *et al.*, 1991).

É possível fazer a distinção entre acidente botrópico, crotálico e laquétrico na maioria dos casos de pacientes picados, com base nos diferentes quadros clínicos apresentados.

Em envenenamentos por *Bothrops* ocorre intensa inflamação na região da picada, com grande destruição tecidual, alteração da coagulação sangüínea, o que facilita a ocorrência de sangramentos. No envenenamento por *Crotalus* e por *Micrurus* pode ocorrer paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente a musculatura facial (MS/FUNASA, 2001). As principais manifestações do acidente por serpentes laquétricas são dor e edema no local da picada, incoagulabilidade sangüínea, hipotensão arterial grave e bradicardia (França e Fan, 1992).

Ao estudar os óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo, Ribeiro e colaboradores (1998) mostraram a ocorrência de insuficiência respiratória em todos os acidentes crotálicos que levavam ao óbito, enquanto ocorreu em pouco mais da metade dos acidentes botrópicos. Os autores justificaram essa maior frequência no primeiro caso, como resultante da rabdomiólise generalizada, e principalmente, da paralisia flácida, com conseqüente insuficiência respiratória restritiva.

Nishioka e colaboradores (2000) propuseram a ausência de atividade citotóxica do veneno crotálico, como uma explicação plausível para a rara ocorrência de infecções locais nesses acidentes.

No acidente crotálico ocorre também miotoxicidade sistêmica, com intensa mioglobinúria e insuficiência renal aguda por necrose tubular aguda (Ribeiro *et al.*, 1998).

A capacidade dos rins de responderem às variações hemodinâmicas garante uma habilidade imprescindível para a manutenção da homeostasia corporal. A água e os eletrólitos são reabsorvidos a partir do filtrado glomerular, enquanto os excretas remanescentes - incluindo aqui toxicantes em potencial - permanecem na luz tubular (Hewitt *et al.*, 1991). Portanto, as células tubulares dos rins são particularmente vulneráveis às mais diversas injúrias devido a sua exposição desproporcional às substâncias circulantes e devido aos processos de transporte que produzem concentrações intracelulares dessas substâncias.

A insuficiência renal aguda (IRA) é caracterizada por um declínio abrupto do ritmo de filtração glomerular com resultante azotemia (Goldstein e Schnellmann, 1996). Nos últimos 50 anos, ocorreram avanços significativos no entendimento da patogênese da IRA nefrotóxica e da IRA isquêmica, principalmente através de modelos experimentais, no entanto, ocorreram poucas mudanças em termos de mortalidade (Schrier *et al.*, 2004).

Apesar da patogênese da IRA ser complexa, alguns mecanismos intrarenais (Figura 2) podem ser associados ao dano glomerular induzido quimicamente, como o aumento na resistência vascular renal e/ou o dano tubular, sendo estes dois últimos, os principais mecanismos envolvidos no decréscimo do ritmo de filtração glomerular induzido por substâncias nefrotóxicas (Goldstein e Schnellmann, 1996). Além disso, o dano vascular direto, causado por edema das células endoteliais e por estímulo da liberação de endotelina, pode também reduzir o fluxo sanguíneo (Goldstein e Schnellmann, 1996).

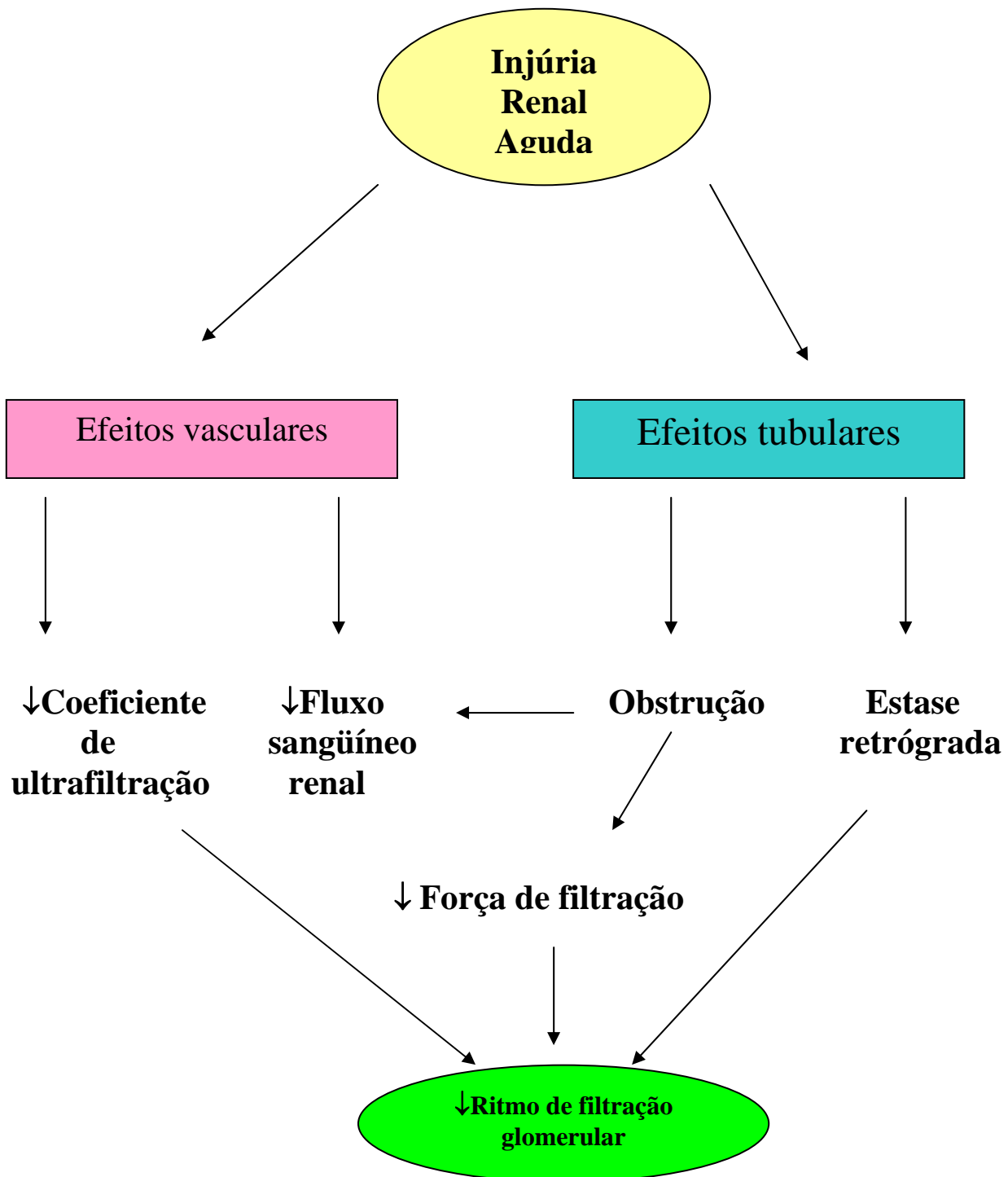


Figura 2. Esquema dos mecanismos que contribuem para o decréscimo do ritmo de filtração glomerular (RFG) na insuficiência renal aguda. K_f , coeficiente de ultrafiltração; FSR, fluxo sanguíneo renal [Modificado de Brezis M, *et al.*, (1993): p.129-152.]

A injúria ao epitélio tubular é uma alteração geralmente observada IRA. Sabe-se que a injúria primária da célula tubular resulta, de forma característica, da isquemia, da injúria tóxica ou de ambas (Racusen e Nast, 1999). A injúria celular resulta em rompimento do epitélio e perturbação da sua capacidade de reabsorção e pode levar à obstrução do lúmen tubular (Racusen e Nast, 1999).

Alterações tubulares, como o desprendimento de células tubulares, a perda da borda em escova, a presença de células edemaciadas, de cilindros hialinos e de massas protéicas amorfas no lúmen dos túbulos, são sinais comuns de injúria e disfunção renais, particularmente, de necrose tubular aguda (Cruz-Höfling *et al.*, 2001).

A formação de cilindros decorre, geralmente, da exfoliação celular e do acúmulo de células intactas e de fragmentos celulares que podem ser vistos no sedimento urinário (Racusen e Nast, 1999). Células necróticas podem ser vistas também *in situ*, ao longo do epitélio tubular ou no lúmen tubular, mas geralmente a necrose celular total não é proeminente. A apoptose das células tubulares após injúria também é observada (Racusen e Nast, 1999).

As alterações renais induzidas por venenos ofídicos foram estudadas por diversos pesquisadores.

Monteiro e Fonteles (1999), estudando o veneno de *Bothrops jararaca* em rim isolado de rato, observaram que ele diminuía o fluxo urinário, a pressão de perfusão, o ritmo de filtração glomerular e o transporte tubular de sódio e de potássio. Havt e colaboradores (2001) demonstraram que o veneno de *Bothrops jararacussu* diminuía a pressão de perfusão, a resistência vascular renal e o transporte de sódio e de potássio, produzia um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário, nos últimos 30 minutos de cada experimento. O veneno de *Bothrops moojeni* apresentou efeitos semelhantes aos de *Bothrops jararacussu* em estudo também realizado em rim isolado de rato (Barbosa *et al.*, 2002).

Esse mesmo grupo de pesquisa, ao investigar os efeitos renais do veneno de *Bothrops jararaca*, demonstrou que o fator de agregação plaquetária tem participação na mediação da necrose tubular induzida pelo veneno (Monteiro e Fonteles, 1999).

Martins e colaboradores (1998) mostraram que as alterações renais induzidas pelo veneno de *Crotalus durissus cascavella* eram resultantes do efeito direto deste sobre o rim isolado de rato, e que a dexametasona era capaz de bloquear todas as alterações renais induzidas nesse modelo.

Num estudo sobre os efeitos renais do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi observado que este produziu um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário, mas de forma contrária ao ocorrido com o veneno de *Crotalus durissus cascavella*, produziu um decréscimo na pressão de perfusão (Martins *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 2001).

Os efeitos desses venenos poderiam ser decorrentes da modulação da síntese e liberação intrarenal de mediadores vasoativos como óxido nítrico, prostanóides, endotelina e adenosina (Kuan *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2002; Ruschitzka *et al.*, 1998; Schrier *et al.*, 2004).

Ao estudar a participação dos macrófagos no efeito do veneno *Crotalus durissus cascavella*, Martins e colaboradores (2003) demonstraram que o sobrenadante estimulado pelo veneno causou um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário assim como um decréscimo no transporte de sódio. Segundo os autores, isso sugere que o veneno induz a liberação de mediadores inflamatórios que então promoveriam a nefrotoxicidade.

Os macrófagos podem diminuir o ritmo de filtração glomerular de néfron isolado, ao produzir tromboxano A₂ (TXA₂) que atua através da contração das células mesangiais, com conseqüente diminuição da área de superfície disponível para a filtração (Hewitt *et al.*, 1991). Além do tromboxano, os

macrófagos produzem prostaciclina, preferencialmente pela via da COX-2 (Ueno *et al.*, 2001).

Esses estudos mostraram também que a fosfolipase A₂ e as prostaglandinas têm uma participação crucial na mediação dos efeitos hemodinâmicos induzidos pelo veneno de cascavel.

O veneno da serpente crotálica da América do Sul é composto principalmente de toxinas (convulxina, crotamina, crotoxina e giroxina), enzimas (5-nucleotidase, fosfodiesterase, trombina-símile, L-amino-oxidase, calicreína tecidual e NAD-hidrolase) e peptídios (Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Quanto à participação individual dos componentes de veneno, foi demonstrado que a crotoxina, a principal toxina, causa alterações nos glomérulos e na vasculatura renal; que a giroxina diminui a reabsorção tubular e que a convulxina não produz alterações significativas (Martins *et al.*, 2002).

O veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* possui um efeito duplo sobre a função dos macrófagos, ao inibir o espriamento e a fagocitose e ao estimular a produção de peróxido de hidrogênio, a atividade antimicrobiana e o metabolismo de glicose e de glutamina dessas células (Petricevich, 2004).

A crotoxina, no entanto, mesmo inibindo a capacidade de espriamento e de fagocitose dos macrófagos, não é capaz de estimular a produção de peróxido de hidrogênio (Sampaio *et al.*, 2003). Segundo estes autores, isso sugere que esses efeitos são derivados de outro (s) componente (s) do veneno bruto.

Cardoso e colaboradores (2001) demonstraram ainda que a administração de crotoxina em camundongos induz um aumento nos níveis de interleucina-10, uma citocina que inibe a função dos leucócitos.

A crotoxina foi isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por Slotta e Frankel-Conrat em 1938 e, posteriormente, do veneno da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* por Lennon e Kaiser em 1990. Ela é uma neurotoxina pré-sináptica potente, que age na junção neuromuscular produzindo

bloqueio neuromuscular e paralisia flácida progressiva de intensidade variada e que também induz injúria seletiva severa na musculatura esquelética (Bucarechi *et al.*, 2002).

A crotoxina é formada por duas subunidades – a subunidade básica (CB) e a subunidade ácida (CA ou crotapotina). A primeira é hidrofóbica e apresenta intensa atividade fosfolipásica, além de apresentar forte tendência a formar oligômeros e a ligar-se de forma não específica às membranas, quando não complexada com a subunidade ácida (Bon *et al.*, 1979; Jeng *et al.*, 1978; Križaj *et al.*, 1996; Radvanyi e Bon, 1982). A crotapotina é um polipeptídeo desprovido de atividade tóxica ou enzimática (Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Apesar da crotoxina apresentar um perfil eletroforético semelhante nas subespécies *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, existem diferenças em suas atividades, talvez relacionadas à existência de isoformas dessa proteína (Rangel-Santos *et al.*, 2004).

As fosfolipases A₂ (FLA₂) catalisam a hidrólise da ligação éster da posição *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana produzindo ácidos graxos e lisofosfolipídios (Chacur *et al.*, 2003). Elas estão entre os componentes de venenos mais estudados (Valentin e Lambeau, 2000). A abundância e sua fácil purificação são algumas das razões apontadas para o interesse nesse componente (Valentin e Lambeau, 2000).

Existem vários tipos de FLA₂ que são classificadas de acordo com sua localização nas células e com suas estruturas primárias (Forte-Dias *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000).

Existem as FLA₂ citosólicas (FLA_{2c}) e as secretórias (FLA_{2s}); sendo as primeiras intracelulares e de alto peso molecular (31-110kDa), enquanto as segundas são extracelulares e de baixo peso molecular (14-18kDa) (Forte-Dias *et al.* 1999). Até o ano de 2001, cerca de 199 fosfolipases A₂ secretórias foram

identificadas e classificadas de acordo com suas estruturas primárias (Dunn e Broady, 2001).

Além de serem encontradas em venenos de serpentes, as FLA₂ secretórias ocorrem em uma grande variedade de fluidos biológicos como secreções pancreáticas, exsudatos inflamatórios e venenos de artrópodes e de moluscos (Chacur *et al.*, 2003).

As FLA₂ são divididas nos grupos I, II e III de acordo com sua estrutura proteica primária. As do grupo I são encontradas tanto no pâncreas de mamíferos quanto em venenos de serpente das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*; as do segundo grupo são encontradas nos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*; e o grupo III é composto pela FLA₂ isoladas de venenos de abelha (*Apis mellifera*) e de lagartos (Landucci *et al.*, 2000). Pesquisas recentes relataram a existência de FLA₂ do grupo III em coração, fígado, rins e músculo esquelético humanos (Dunn e Broady, 2001).

Receptores de fosfolipase A₂ têm sido encontrados em várias espécies. Eles são classificados em receptores do tipo neuronal (tipo-N) - que são altamente expressos no tecido cerebral - e do tipo muscular (tipo-M) que foi identificado pela primeira vez em músculo esquelético de coelhos (Dunn e Broady, 2001).

A existência de uma proteína solúvel - identificada no surfactante pulmonar humano - com estrutura semelhante à do receptor do tipo-M e de uma variante transcrita no rim humano sugerem que uma forma solúvel desse receptor é expressa em tecido humano (Dunn e Broady, 2001). Além disso, o receptor do tipo-M é encontrado em grandes quantidades no fígado e coração (Valentin e Lambeau, 2000).

Foram encontrados também receptores semelhantes aos do tipo-N em órgãos como pulmões, fígado, coração e rins, o que sugere a existência de uma

diversidade de receptores do tipo neuronal em diferentes tecidos (Valentin e Lambeau, 2000).

Inibidores de FLA₂ de venenos, com estrutura semelhante ao receptor do tipo-M, têm sido identificados como complexos solúveis no plasma de serpentes da família *Viperidae* (Dunn e Broady, 2001).

Os inibidores endógenos de FLA₂ são encontrados tanto em tecidos de mamíferos quanto de serpentes (Dunn e Broady, 2001). Foi identificado, por exemplo, um inibidor de FLA₂ (CNF-fator neutralizante da *Crotalus*) na fração globulina- α_1 do plasma de serpentes crotálicas da América do Sul (Forte-Dias *et al.*, 1994).

Inúmeras atividades inflamatórias têm sido descritas para as fosfolipases A₂ de venenos como indução de edema, recrutamento de células inflamatórias, desgranulação de mastócitos entre outras (Chacur *et al.*, 2003).

A identificação de uma miríade de proteínas de ligação às fosfolipases A₂ secretórias (FLA_{2s}), com diferentes estruturas, sugere que FLA_{2s} distintas também funcionam com ligantes específicos (Valentin e Lambeau, 2000). Os autores relacionam ainda essa descoberta ao fato de que a trombina e as proteases relacionadas a esta, terem sido inicialmente consideradas como enzimas proteolíticas, mas que agora são reconhecidas por agirem também como ligantes, através de receptores acoplados à proteína G (Valentin e Lambeau, 2000).

A convulxina, uma proteína de alto peso molecular, foi isolada por Franceschi em 1981. Ela induz convulsões e distúrbios respiratório e circulatório em camundongos, gatos, cães e cobaias; e causa agregação plaquetária *in vitro* em várias espécies de mamíferos (Sano-Martins *et al.*, 2001). Apesar da trombocitopenia não ter sido relatada nos envenenamentos por *Crotalus durissus terrificus*, Franceschi e colaboradores (1980,1981) mostraram a convulxina induz trombocitopenia *in vivo* e *in vitro*. Eles mostraram também

que ela é o agente estimulante específico para plaquetas do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Segundo Hawgood (1982), o veneno de *Crotalus durissus collilineatus* contém quantidades apreciáveis de convulxina.

A giroxina é um peptídeo trombina-símile com atividades amidásica, esterásica e fibrinolítica (Camilo *apud* Martins *et al.*, 2002). Ela induz rotações no corpo do animal no eixo longitudinal quando injetada por via intravenosa (Sano-Martins *et al.*, 2001).

A crotamina é um componente do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* que pertence à família de proteínas miotóxicas que possui toxicidade leve (Nicastro *et al.*, 2003). Além de modificar especificamente os canais de sódio-voltagem dependentes, tem sido sugerido que a crotamina também exibe atividades analgésica e mionecrótica (Nicastro *et al.*, 2003). Ela é uma miotoxina que quando injetada pela via intramuscular tem a capacidade de induzir a contração da musculatura esquelética e conseqüente necrose (Mebs e Ownby, 1990).

Apesar das inúmeras investigações sobre as ações farmacológicas e fisiopatológicas da crotamina, o mecanismo de ação exato pelo qual ela causa contração e degeneração das células dos músculos esqueléticos não é claro (Mebs e Ownby, 1990). O consenso sobre o mecanismo de ação das miotoxinas, como a crotamina, é que a membrana plasmática é o principal local de ação. Evidências de danos iniciais da membrana plasmática vêm da observação direta de membranas rompidas assim como, de observações que mostram um aumento nos níveis de cálcio intracelular, indicando uma mudança na permeabilidade da membrana para esse íon (Mebs e Ownby, 1990). Entretanto, não há consenso sobre a necessidade ou não de atividade hidrolítica dessas fosfolipases A_2 para suas ações nas células musculares esqueléticas (Mebs e Ownby, 1990).

A enzima do tipo trombina é responsável pela ação coagulante do veneno, causando hipofibrinogenemia ou consumo completo de fibrinogênio, o que

causa incoagulabilidade parcial ou total do sangue (Sano-Martins *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002).

Mesmo com os avanços no entendimento da patogênese da insuficiência renal aguda produzida por substâncias nefrotóxicas, não houve uma melhora significativa em termos de diminuição da mortalidade (Schrier *et al.*, 2004). O entendimento da fisiopatologia da injúria renal induzida por substância nefrotóxica tem implicações para as terapias em potencial e para as medidas preventivas (Schnellmann e Kelly, 1999).

A ciclooxigenase (COX), também conhecida por prostaglandina H sintetase, é uma enzima que limita a velocidade do catabolismo do ácido araquidônico às várias prostaglandinas bioativas (Yang, 2003). Existem as isoformas COX-1 e COX-2 que são as formas constitutiva e induzível, respectivamente (Yang, 2003). A primeira é utilizada, principalmente, na biossíntese imediata de prostaglandinas, o que ocorre dentro de alguns minutos após o estímulo por mobilizadores de cálcio (Ueno *et al.*, 2001). A segunda um produto gênico de resposta imediata nas células inflamatórias e imunes (Foegh e Ramwell, 2001).

O mecanismo de ação envolve das prostaglandinas envolve a ativação de receptores celulares resultando na iniciação subsequente de cascatas sinalizadoras envolvendo proteínas G e AMP cíclico (Cummings *et al.*, 2000).

Sabe-se que em várias condições fisiológicas e fisiopatológicas, como o excesso no consumo de sais, a privação de água, entre outros, a estimulação renal da COX-2 é restrita à medula renal, apesar do mecanismo da indução da COX-2 nesse local não ser completamente elucidado (Yang, 2003).

Tanto a medula renal quanto o córtex renal sintetizam prostaglandinas, porém a capacidade de síntese da medula é significativamente maior (Foegh e Ramwell, 2001). Algumas delas, particularmente PGE₂ e PGI₂, causam

vasodilatação no rim e aumentam a liberação de renina (Kramer *et al.*, 1985; Foegh e Ramwell, 2001).

A PGE₂, um modulador importante da hemodinâmica renal, exerce efeitos diuréticos e natriuréticos (Schneider *et al.*, 2004). Em coelhos, as células renais capazes de produzir PGE₂ em quantidades significativas incluem: mácula densa, ductos coletores medulares e corticais e células intersticiais medulares, enquanto que os túbulos proximais produzem pouca PGE₂ (Schneider *et al.*, 2004).

A PGE₁, a PGE₂ e a PGI₂ aumentam a excreção de água e de sódio (Foegh e Ramwell, 2001). A PGI₂ é preferencialmente produzida em macrófagos via COX-2, sendo esta enzima a maior fonte de PGI sistêmica produzida em humanos normais (Ueno *et al.*, 2001).

Segundo Ganong (1996), no intestino, as PGEs e PGFs estimulam o movimento de água e de eletrólitos para dentro do lúmen intestinal. Tais efeitos podem responder pela diarreia aquosa que acompanha a administração oral dessas substâncias. De forma oposta, a PGI₂ não induz diarreia, e ainda impede que outras prostaglandinas a induzam (Ganong, 1996).

Ainda em relação à produção e ao metabolismo das prostaglandinas, sabe-se que a ciclooxigenase está localizada principalmente na medula renal, enquanto a enzima inativadora - prostaglandina desidrogenase - está localizada principalmente no córtex (Bowman e Rand, 1980). As células endoteliais contêm, primariamente, prostaciclina sintetase (Bowman e Rand, 1980; Foegh e Ramwell, 2001). No caso específico da PGE₂, sua biossíntese envolve múltiplas etapas enzimáticas e requer a ação seqüencial da fosfolipase A₂, das ciclooxigenases e das PGE₂ sintetases (Schneider *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm mostrado que a produção de prostaglandinas regula hemodinâmica renal (Deng *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 2001; Yang, 2003). Sabe-se, por exemplo, que no ducto coletor, uma região crítica para a regulação hormonal da excreção de água e de eletrólitos, a manutenção da integridade

estrutural e funcional da medula renal é controlada, em parte, pelas prostaglandinas (Yang, 2003).

Outras substâncias, como o óxido nítrico, podem também preservar a vasodilatação renal e impedir um decréscimo excessivo no ritmo de filtração glomerular, apesar de que o papel exato do óxido nítrico nos rins não está estabelecido (Stolte *et al.*, 1979; Ogungbade *et al.*, 2003).

O papel desempenhado por leucotrienos e produtos do citocromo P450 em rins humanos continua especulativo. Recentemente, foi constatado que o 5,6-epóxido é um poderoso vasodilatador em experimentos realizados em animais, e que os radicais livres atuam em fosfolipídios que contêm ácido araquidônico, produzindo uma 8-epi-PGF_{2α} cujas propriedades poderosas se assemelham às do tromboxano (Hondegheem e Roden, 2001).

A bradicinina é peptídeo vasoativo potente gerado tanto no plasma quanto na parede vascular (Pompermayer *et al.*, 2002). Ela pode promover aumento no ritmo de filtração glomerular, ao estimular a liberação de óxido nítrico a partir do endotélio renal (Koeppen e Stanton, 1997). Além disso, ela causa natriurese ao inibir a reabsorção no ducto coletor. Sua ação sobre a perfusão renal parece ser limitada pela presença de peptidases renais que causariam o término da ação desse mediador (Pompermayer *et al.*, 2002).

O interesse no estudo das ações da bradicinina intensificou-se em 1949, quando Rocha e Silva e colaboradores relataram que a tripsina e certos venenos de serpentes agiam na globulina plasmática para produzir uma substância que diminuía a pressão sanguínea e causava contração de desenvolvimento lento no intestino. Por causa dessa resposta lenta, eles denominaram essa substância de bradicinina (Brown e Roberts II, 2001). Em 1970, Ferreira e colaboradores isolaram um fator que potencializava a bradicinina, a partir do veneno de serpente *Bothrops jararaca* (Brown e Roberts II, 2001).

Pompermayer e colaboradores (2002) demonstraram que a liberação de óxido nítrico, o metabolismo de ácido araquidônico via monooxigenases dependentes do citocromo P450 e a ativação de canais de potássio dependentes de cálcio estão envolvidos na vasodilatação induzida pela bradicinina no rim isolado de rato. Além disso, tem sido relatado que o efeito vasodilatador da bradicinina é dependente das prostaglandinas no rim de cães e de radicais livres derivados do oxigênio em artéria cerebral em ratos (Pompermayer *et al.*, 2002).

A adenosina é um nucleosídeo que ocorre naturalmente em todo o organismo. Estima-se que a sua meia-vida seja de 10 segundos. Seu mecanismo de ação envolve um aumento na concentração de potássio e inibição do influxo de cálcio induzido pelo AMP_c (Hondegem e Roden, 2001). A adenosina é produzida dentro dos rins onde causa várias mudanças funcionais como diminuição do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular, inibição da liberação de renina pelas células justaglomerulares, aumento no cálcio intracelular nas células do ducto coletor de coelhos, entre outras (Takeda *et al.*, 1993). Ela promove vasoconstrição da arteríola aferente, daí a diminuição do fluxo sanguíneo renal e no ritmo de filtração glomerular (Koeppen e Stanton, 1997).

Os efeitos fisiológicos da adenosina endógena são mediados, principalmente, pela ativação de dois subtipos de receptores ligados à membrana, um receptor A₁ de alta afinidade e que requer concentrações nanomolares do ligante para ativação; e um receptor A₂ de baixa afinidade que requer concentrações micromolares (Balakrishnan *et al.*, 1993).

Estudos *in vitro* sugerem que a adenosina pode também induzir contração das células mesangiais em cultura, um efeito que é bloqueado por antagonistas seletivos do receptor A₁ e reproduzido por agonistas seletivos deste receptor (Balakrishnan *et al.*, 1993).

Uma parte das ações da adenosina – mediada através do receptor A_1 – é acoplada com ativação da fosfolipase C, resultando no aumento de inositol - 1,4,5 - trifosfato e diacilglicerol (Takeda *et al.*, 1993). Os autores comentam também que em glândula retal de tubarão, a adenosina endógena inibe o transporte de cloreto estimulado por hormônio através da diminuição do AMP_c e de outros mecanismos.

O óxido nítrico (NO) tem um papel importante na regulação da hemodinâmica renal, na filtração glomerular, no transporte tubular e na secreção de renina (Beltowski *et al.*, 2003). O óxido nítrico produzido pelas células tubulares e/ou vasculares adjacentes regula o transporte tubular de forma autócrina/parácrina (Beltowski *et al.*, 2003). Segundo Ogungbade e colaboradores (2003), o óxido nítrico inibe a atividade epoxigenase e a inibição da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) endógena revela um sistema vasoconstritor renal operando através do metabolismo da epoxigenase dependente do citocromo P450, que contribui para a hemodinâmica e os efeitos excretórios renais que são decorrentes da supressão da NOS.

Beltowski e colaboradores (2003) demonstraram que o doador de NO, nitroprussiato de sódio - administrado através da infusão local - diminui a atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase da medula renal, enquanto não tem efeito na enzima cortical.

Já enzima H^+K^+ -ATPase, que é encontrada na membrana apical das células tubulares e está envolvida na reabsorção de potássio e na acificação da urina, é inibida por produtos do metabolismo do ácido araquidônico via citocromo P450, como o ácido 20- hidroxieicosatetraenóico (20-HETE) e o ácido 11,12-epoxieicosatrienóico (11,12-EET). Estes metabólitos também inibem a atividade da Na^+K^+ -ATPase medular, sendo a Na^+K^+ -ATPase mais sensível ao 20-HETE do que a H^+K^+ -ATPase (Beltowski *et al.*, 2003).

A relação entre estrutura e função das fosfolipases A_2 (FLA₂) é importante para o entendimento dos determinantes estereoquímicos que estão envolvidos na expressão das atividades miotóxica, neurotóxica, cardiotoxica, anticoagulante, convulsivante, hipotensiva e edematogênica (Murakami e Arni, 2003).

Várias abordagens têm sido utilizadas para delinear a (s) região (ões) crítica (s) para a expressão dessas atividades, especialmente em relação à neurotoxicidade e à miotoxicidade (Murakami e Arni, 2003). Essas abordagens são baseadas em seqüência homóloga, distribuição de cargas, perfis hidropáticos, modificação química, síntese peptídica e estudos sobre a estrutura (Murakami e Arni, 2003).

Muitos estudos têm mostrado que FLA₂ secretórias de venenos de serpentes e de abelhas são responsáveis por injúria celular (Cummings *et al.*, 2000).

O mecanismo catalítico das FLA₂s tem sido elucidado baseando-se nas análises estruturais das enzimas das classes I, II e III no estado nativo e no estado de transição complexado com análogos (Murakami e Arni, 2003).

As FLA₂ secretórias da classe II podem ser subdivididas ainda em, pelo menos, duas subclasses: análogos de FLA₂-D49 e de FLA₂-K49 (Murakami e Arni, 2003). As primeiras hidrolisam fosfolipídios naturais, isto é, são cataliticamente ativas; enquanto as últimas não hidrolisam (Murakami e Arni, 2003).

Vários canais de potássio têm sido identificados através das técnicas de *patch-clamp* e de clonagem molecular no rim (Wang, 2004). Estudos recentes apontam a participação da proteína tirosina quinase (PTK), da quinase induzida por soro e por glicocorticóide e da quinase sem lisina na regulação da secreção de potássio no ducto coletor cortical (Wang, 2004).

Um dos subtipos de PKC é ativado por ácido araquidônico, de modo que a ativação da PKC também pode ocorrer com agonistas que ativam essa enzima (Rang *et al.*, 2001).

Grandes avanços nas pesquisas com toxinas e enzimas ofídicas desenvolveram-se nos últimos trinta anos como advento das análises da estrutura bioquímica, principalmente dos venenos elapídicos, em consequência de sua maior letalidade. Contudo, novas descobertas do fracionamento e estudo de toxinas geraram grande interesse para o estudo com a família *Viperidae*. A pesquisa com o veneno bruto da *Crotalus durissus collilineatus* e suas frações poderá abrir novas perspectivas na descoberta de novas ferramentas farmacológicas e substâncias que ajudarão no tratamento e prevenção de várias doenças.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo geral

Estudar o veneno bruto e suas frações obtidas da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na perspectiva de elucidação do mecanismo de ação renal e descoberta de novas ferramentas farmacológicas e de substâncias para utilização na terapêutica clínica.

Objetivos específicos

- 1- Estudar a toxicidade aguda do veneno bruto da *Crotalus durissus collilineatus*.
- 2- Estudar o veneno bruto da *Crotalus durissus collilineatus* em rim isolado de rato.
- 3- Avaliar as alterações renais causadas pelas frações do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

Materiais e Métodos

3.1. Estudo da toxicidade aguda do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*

3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 260 e 300g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum 24 horas antes do experimento com água *ad libitum*.

3.1.2. Material

O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* foi gentilmente cedido pela Dra. Marta R. Magalhães da Universidade Católica de Goiás e fracionado e purificado pelo Dr. Marcus H. Toyama da UNESP/UNICAMP.

O veneno bruto utilizado no teste da toxicidade aguda foi diluído em solução salina a 0,9%.

3.1.3. Procedimento experimental

Os ratos inoculados com veneno (50) foram divididos em grupos de 10 animais, sendo administradas, pela via intraperitoneal, as seguintes doses: 1200, 2400, 3600, 4800 e 7200 μ g/kg de peso corpóreo. Cinco animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e necropsiados 24 horas após a administração do veneno. Os rins, fígado, coração, cérebro e pulmões foram fixados em uma solução de formaldeído a 10% e submetidos à coloração hematoxilina-eosina para análise através de microscopia óptica. Os resultados foram submetidos à análise qualitativa através da observação da presença e localização das lesões ou alterações encontradas. Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia-BIOPSE, e analisadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo Prof. Dalgimar Beserra Menezes.

3.2. Perfusão de rim isolado de rato

3.2.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 260 e 300g, provenientes do biotério do Instituto de Biomedicina (IBIMED) e do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum 24 horas antes de cada experimento com água *ad libitum*.

3.2.2. Substâncias utilizadas

Foi utilizado o veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* foi gentilmente cedido pela Dra. Marta R. Magalhães da Universidade Católica de Goiás e fracionado e purificado pelo Dr. Marcus H. Toyama da UNESP/UNICAMP.

Foram utilizadas na preparação da solução perfusora as seguintes substâncias: NaHCO₃ (Synth), NaH₂PO₄.H₂O (Synth), NaCl (Synth), MgSO₄.7H₂O (Reagen), uréia (Reagen), KCl (Merck), glicose (Squibb), penicilina G potássica cristalina (Squibb), fração V de albumina bovina (SIGMA) e inulina (SIGMA).

No procedimento cirúrgico foram utilizados pentobarbital sódico (SIGMA) a 3% , manitol (Reagen) e heparina (Cristálida).

3.2.3. Preparo da solução perfusora

O meio de perfusão consistia na solução de Krebs-Henseleit modificada contendo na sua composição (em mmol/L): 147 de Na⁺, 5 de K⁺, 2,5 de Ca²⁺, 2 de Mg²⁺, 110 de Cl⁻, 2,5 HCO₃⁻, 2,5 de SO₄²⁻ e 2,5 de PO₄²⁻; 6g de albumina bovina (BSA fração V) da Sigma Chemical Co.; 0,075g de uréia (Reagen), 0,075g de inulina (SIGMA), 0,15g de glicose (Squibb) e penicilina G potássica

cristalina (Squibb). A solução perfusora foi equilibrada com uma mistura de oxigênio e gás carbônico durante a perfusão (95%O₂/5%CO₂). A solução perfusora foi dialisada por 48 horas antes do experimento para a retirada de várias substâncias contaminantes, como citrato, piruvato, lactato.

3.2.4.O sistema de perfusão de rim isolado

Em nossos experimentos foi utilizado o sistema de perfusão de rim isolado de rato. Os rins isolados permitem o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas (Nizet, 1975). Nos últimos 40 anos, essa técnica tem sido utilizada para investigar os aspectos da fisiologia, farmacologia e farmacocinética renais (Wang *et al.*, 2004).

O sistema utilizado é constituído dos seguintes componentes:

- ❖ **Banho-maria** – manutenção de uma temperatura constante do pulmão tipo silástico entre 36 e 37 °C.
- ❖ **Bomba aquecedora com termostato** – manutenção de uma temperatura constante no sistema entre 36 e 37 °C.
- ❖ **Bomba de perfusão Watson** – bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema.
- ❖ **Catabolhas** – evita a entrada de bolhas nos rins (embolia).
- ❖ **Coletor de urina** – frasco que coleta a urina. É trocado a cada 10 minutos.
- ❖ **Condensador** – mantém a solução aquecida na temperatura de 37 °C durante todo o experimento.
- ❖ **Filtro Millipore 5 µm** – filtração da solução perfusora.
- ❖ **Fluxômetro** – medida do fluxo de perfusão (mL/hora).
- ❖ **Manômetro de mercúrio** – medida da pressão de perfusão (mmHg).
- ❖ **Pulmão tipo silástico** – promoção das trocas gasosas (95% O₂ e 5% CO₂).

❖ **Seringa coletora** – seringa coletora de perfusato. A coleta é realizada a cada 10 minutos.

O sistema de perfusão de rim isolado está esquematizado na figura 3.

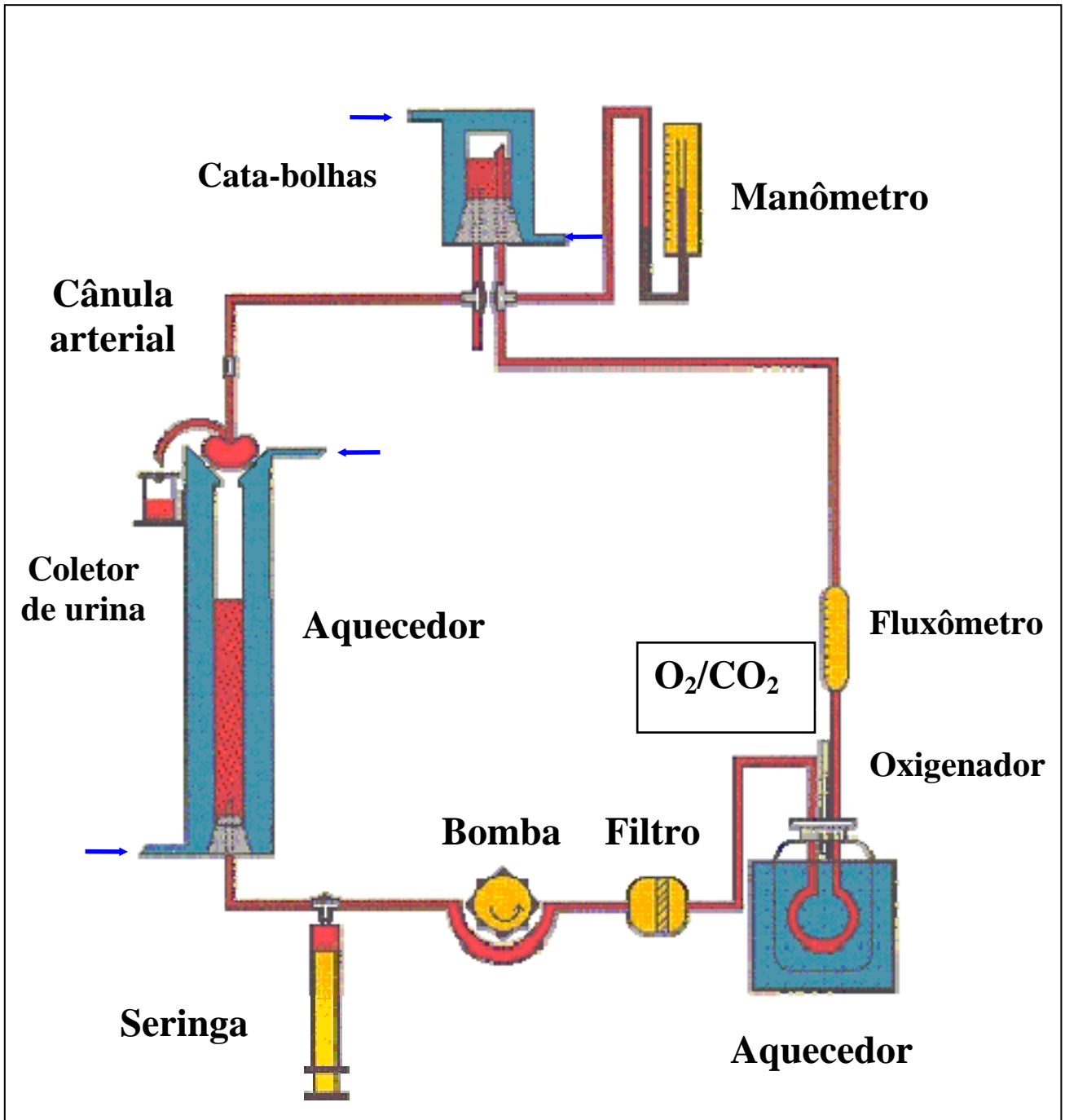


Figura 3 – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato.

3.2.5. Calibração do sistema de perfusão de rim isolado de rato

A calibração foi realizada na presença de solução de cloreto de sódio a 0,9% em temperatura de 37°C. Foram observados a pressão de perfusão, a medida do fluxômetro e o volume de salina para cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5). O fluxo de salina foi colhido em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 3 minutos. As figuras 4, 5 e 6 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

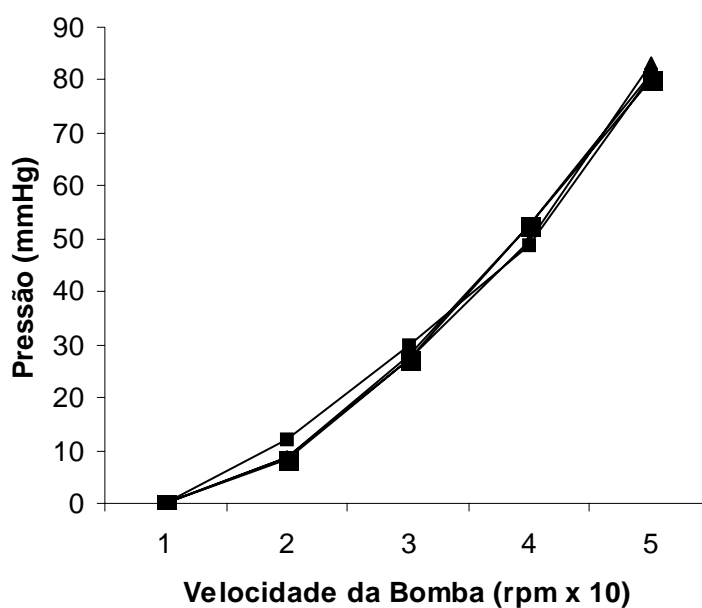


Figura 4. Calibração do sistema. Velocidade da bomba *versus* pressão.

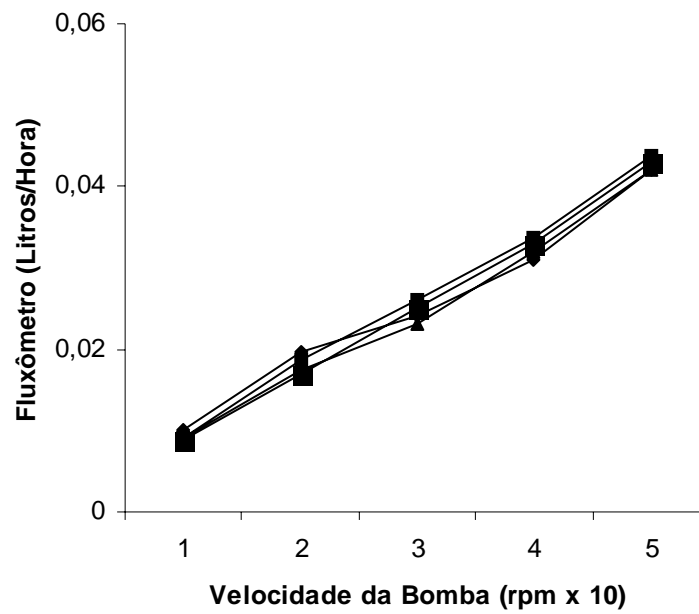


Figura 5. Calibração do sistema. Velocidade da bomba *versus* medida do fluxômetro.

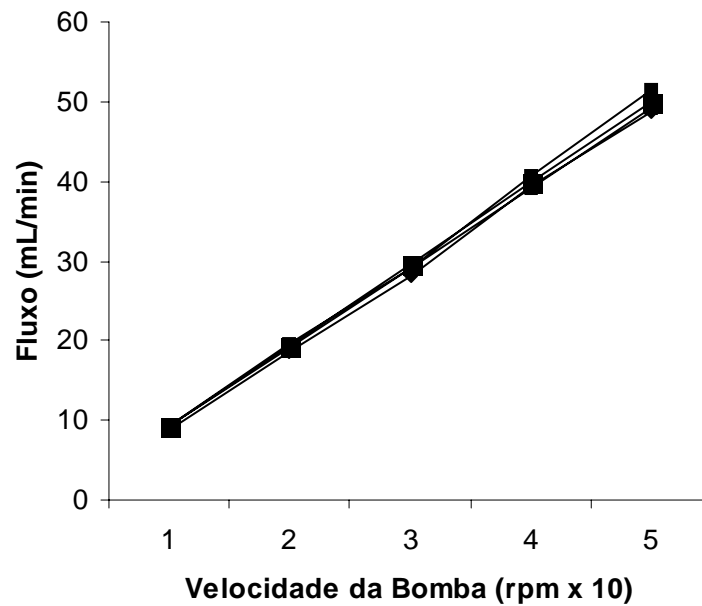


Figura 6. Calibração do sistema. Velocidade da bomba *versus* fluxo na ponta da cânula.

3.2.6. Técnica cirúrgica

O rim direito foi exposto sob anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg) através de uma incisão mediana no abdômen e o fluxo urinário foi interrompido através da ligação do ureter. Administrou-se 3mL de manitol a 20% pela veia femoral durante a cirurgia. Efetuou-se o isolamento da adrenal direita e posterior descapsulação do rim correspondente. O ureter direito foi canulado, para a coleta de urina, através de tubo de polietileno (PE50). A artéria renal foi canulada através da artéria mesentérica para evitar a interrupção do fluxo segundo o método descrito por Balhlmann *et al.* (1967), Nishiitsutji-Uwo *et al.* (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). O rim foi isolado e transferido para um sistema fechado e perfundido com 100mL de perfusato mantido a 37°C (Figura 7).

3.2.7. Procedimento experimental

A pressão de perfusão e o fluxo foram mantidos constantes durante os 30 minutos iniciais. Após esse período, considerado como controle interno, foi adicionada a substância-teste e observadas as mudanças nos parâmetros renais até os 120 minutos.

A variabilidade funcional de cada rim foi avaliada através do ritmo de filtração glomerular, que foi determinado pela depuração renal de inulina, pelo fluxo urinário e pela percentagem de reabsorção tubular de água, sódio, potássio e cloreto.

Para a análise da reabsorção tubular foram coletadas amostras de perfusato e urina em intervalos de 10 minutos, durante um período total de 120 minutos. O volume urinário foi medido, pelo método gravimétrico, em recipientes de vidro previamente pesados. Amostras de perfusato (1,5mL) foram coletadas em recipientes de vidro no ponto médio de cada intervalo de coleta de

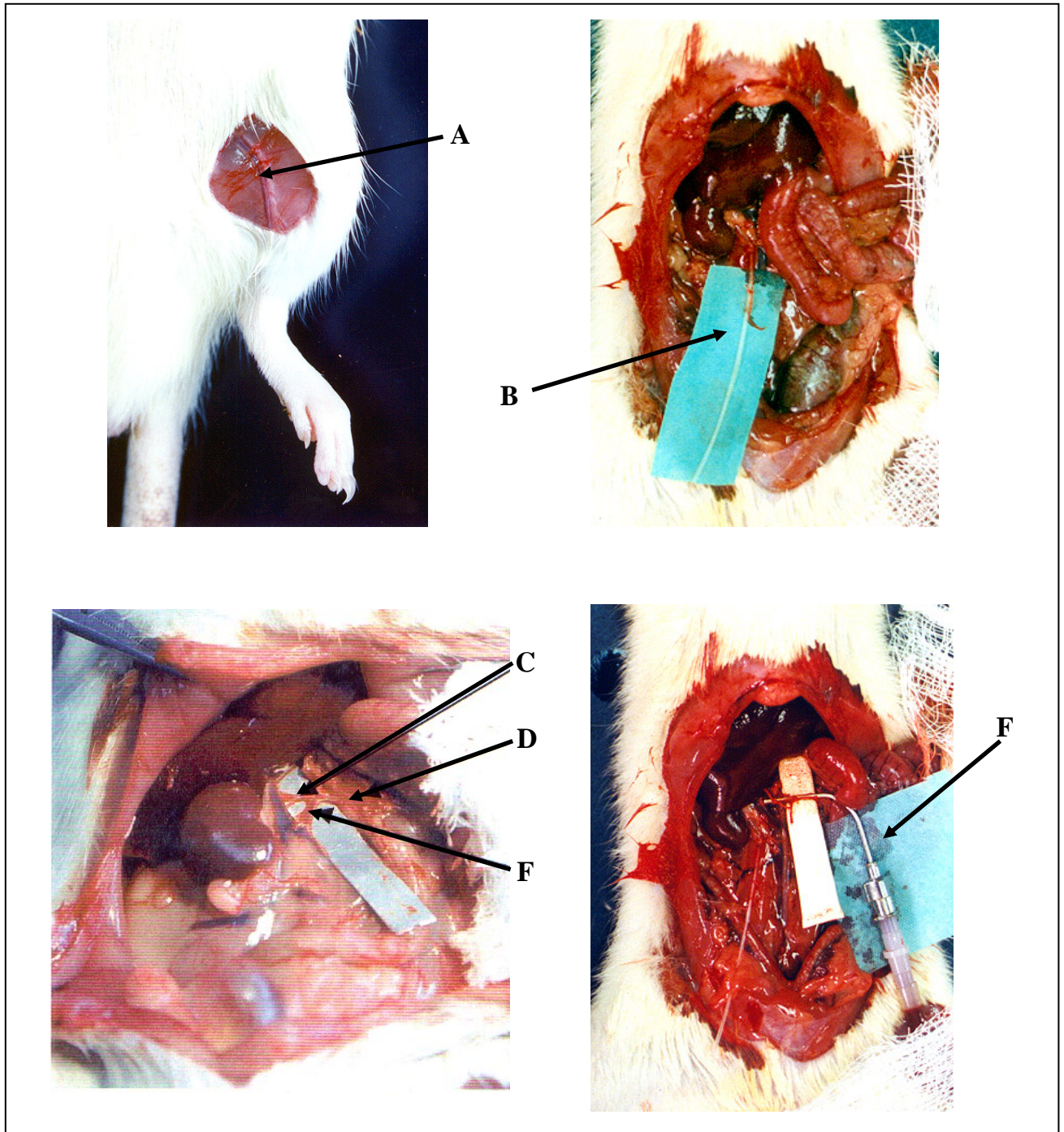


Figura 7 – Técnica cirúrgica. A – veia femoral; B – ureter direito canulado; C – artéria renal; D – artéria mesentérica; E – aorta; F – cânula arterial.

urina. As amostras de urina e de perfusato foram analisadas através do método da espectrofotometria de chama. As leituras fotométricas foram realizadas em fotômetro de chama (*Flame Photometer* - modelo 443 IL); o kit LabTest foi utilizado para a dosagem de cloreto; a inulina foi determinada seguindo o método descrito por Fonteles e Leibach (1982); e a medida de osmolalidade através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer*- modelo 5100c ESCOR). Todas as dosagens bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas e assessoradas pelo farmacêutico bioquímico Domingos Barreto.

3.2.8. Análise histológica

Os fragmentos dos rins direitos, utilizados no sistema de perfusão, como dos rins esquerdos (controle externo) foram retirados ao final de cada experimento e acondicionados numa solução de formal a 10%, para posterior análise através de microscopia óptica. Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia-BIOPSE, e analisadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo Prof. Dr. Dalgimar Beserra Menezes.

3.2.9. Grupos experimentais

Os estudos com veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* e suas frações (crotoquina e fosfolipase A₂) foram iniciados após um período de controle interno de 30 minutos, e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

1. Grupo controle - perfusão somente com solução de Krebs-Henseleit (n=6);

2. Perfusão com o veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* - 10 μ g/mL (n=6);
3. Perfusão com o veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* - 30 μ g/mL (n=6);
4. Perfusão com a fração crotoxina do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* - 10 μ g/mL (n=6);
5. Perfusão com a fração fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* - 10 μ g/mL (n=6).

3.2.10. Cálculo dos parâmetros renais

Para a determinação dos parâmetros renais foram utilizadas as seguintes fórmulas:

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

- FU - fluxo urinário (mL.g⁻¹.min⁻¹)

FU = peso do volume urinário / peso do rim esquerdo x 10

- FPR - fluxo de perfusão renal (mL. g⁻¹.min⁻¹)

FPR= fluxo registrado a cada 10min / intervalo de tempo x peso do rim

- RVR = resistência vascular renal (mmHg.mL.g⁻¹.min⁻¹)

RVR = PP/FPR

- RFG - ritmo de filtração glomerular (mL.g⁻¹.min⁻¹)

RFG=DOU_{in}/ DOP_{in} x FU, onde

DOU_{in} = densidade ótica da inulina na urina

DOP_{in} = densidade ótica da inulina no perfusato

- FNa⁺ - sódio filtrado (μ Eq.g⁻¹.min⁻¹)

FNa⁺ = RFG x PNa⁺, onde

PNa⁺ = concentração de sódio no perfusato

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

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

UNa^+ = concentração de sódio na urina

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

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

- % TNa^+ - percentual de sódio transportado

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

- Cosm - *clearance* osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

$$\text{Cosm} = (\text{U}_{\text{osm}} / \text{P}_{\text{osm}}) \times \text{FU}, \text{onde}$$

U_{osm} = osmoridade urinária

P_{osm} = osmoridade de perfusato

- CH_2O - *clearance* de água livre ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

$$\text{CH}_2\text{O} = \text{FU} - \text{C}_{\text{osm}}$$

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

$$\text{dTNa}^+ = \text{CH}_2\text{O} \times \text{PNa}^+$$

- Ad Na^+ - aporte distal de sódio ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

$$\text{Ad Na}^+ = \text{dTNa}^+ + \text{ENa}^+$$

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

$$\text{pTNa}^+ = \text{FNa}^+ \times \text{AdNa}^+$$

- % pTNa^+ = percentual de transporte proximal de sódio

$$\% \text{pTNa}^+ = \text{pTNa}^+ \times 100 / \text{FNa}^+$$

Todos os cálculos realizados para a determinação dos parâmetros foram repetidos para o potássio e o cloreto.

3.2.11. Estatística

Foi usado um computador PC – AMD (950MHz) e programa GraphPrism para análise de dados, expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, compilados em quatro grupos de 30 minutos denominados: 30, 60, 90 e 120 minutos. Os dados foram avaliados através da análise da variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, como comparativo entre os grupos, com significância de 5%.

3.3. Aspectos Éticos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará.

Resultados

4. Resultados

4.1. Estudo da toxicidade aguda do veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus*

Após a análise histológica dos rins, fígado, coração, pulmão e cérebro, foi observado que os corações, cérebros, rins e pulmões de animais tratados com veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* nas doses de 1200 (n=5), 2400 (n=5), 3600 (n=5), 4800 (n=5) e 7200 μ g/kg (n=5) de peso corporal, apresentaram aspectos normais.

Foi observado microvacuolização discreta em hepatócitos, dispersa nas zonas 1, 2 e 3 do lóbulo e esteatose em todos os animais tratados com as doses 3600, 4800 e 7200 μ g/kg (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). Enquanto que em animais tratados com as doses de 1200 (n=5) e 2400 μ g/kg (n=5), apenas um animal de cada apresentou tais alterações.

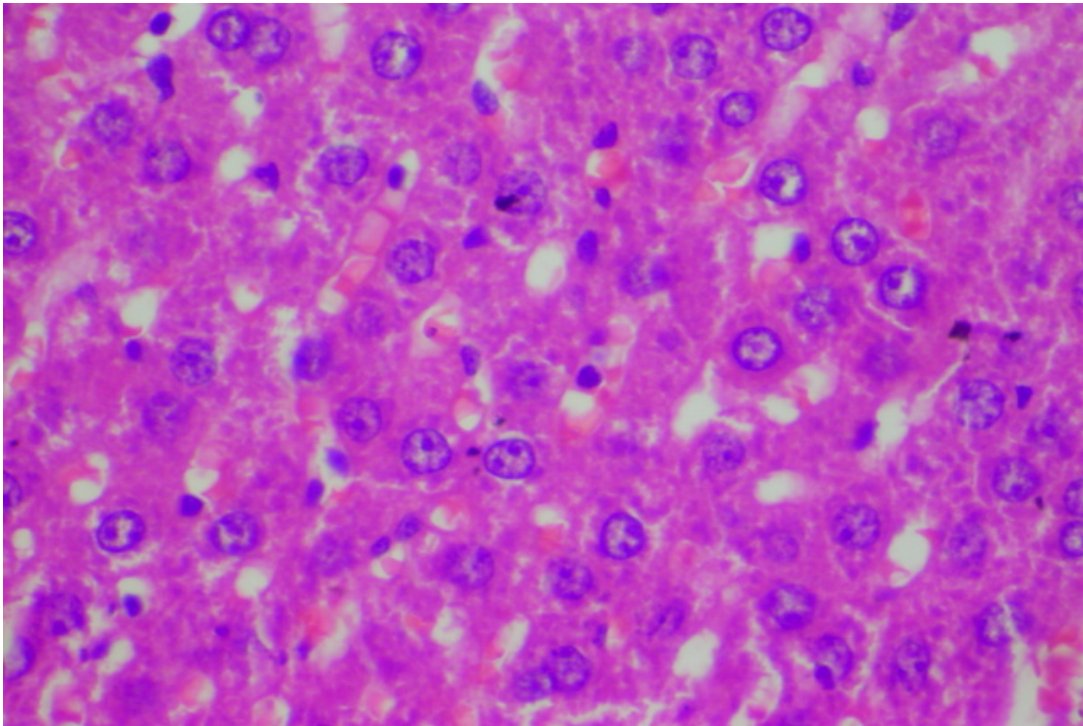


Figura 8. Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na dose de 3600 µg/kg, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.

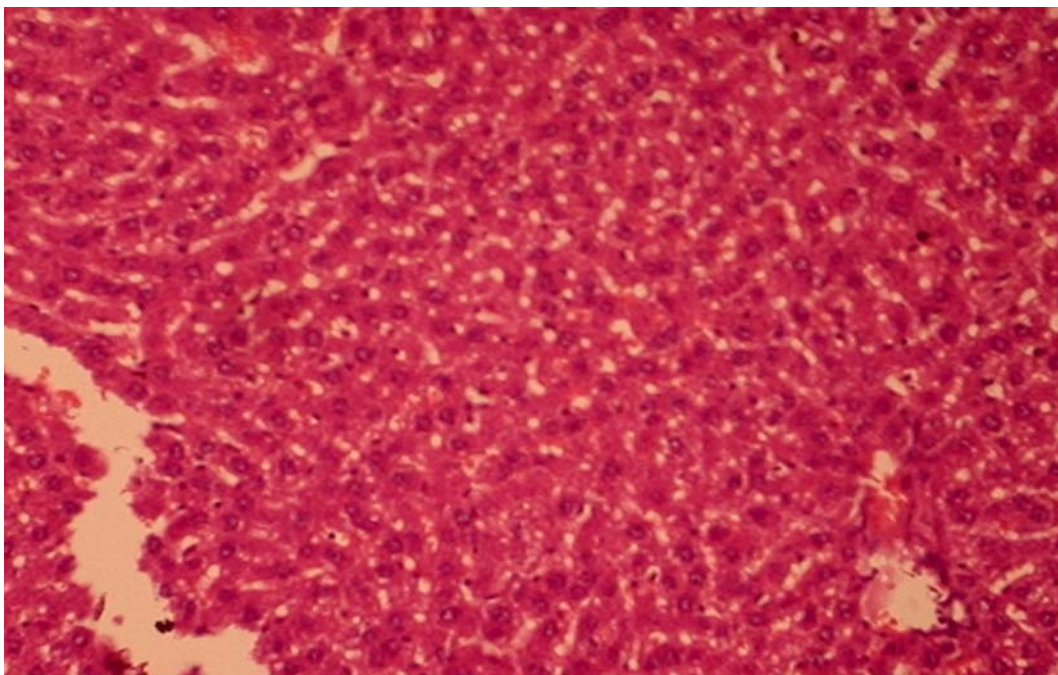


Figura 9. Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na dose de 4800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.

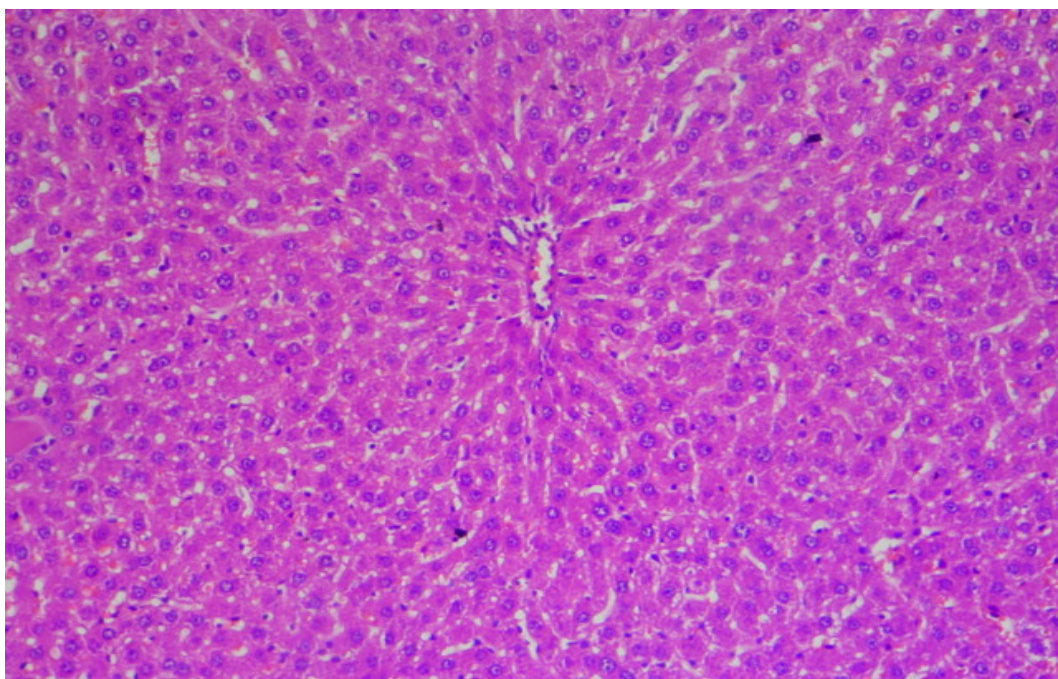


Figura 10. Análise histológica de fígado do grupo tratado com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na dose de 7200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, onde se observa microvacuolização discreta em hepatócitos.

4.2. Perfusão de rim isolado de rato

O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* e as suas frações crotoxina (CTX) e fosfolipase A₂ (FLA₂) foram administrados no sistema de perfusão de rim isolado de rato 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.

O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* foi utilizado nas doses de 10 e 30µg e as frações crotoxina e fosfolipase A₂ foram testadas na dose de 10µg.

A dose de 10µg do veneno bruto causou alterações na fisiologia renal, nos parâmetros de pressão de perfusão (PP) e ritmo de filtração glomerular (RFG). Foi observado um aumento na PP nos períodos de 90 e 120 minutos (Figura 11) e no RFG apenas no período de 60 minutos (Figura 14). O fluxo urinário (FU) apresentou uma tendência de aumento, apesar de não ser estatisticamente significativa (Figura 13).

Os parâmetros de percentual de transporte total de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCl⁻) não foram modificados após a administração do veneno bruto na dose de 10µg (Figuras 15, 16 e 17).

Foi observado que a dose de 30µg do veneno bruto (Cdccolli) causou diminuição estatisticamente significativa nos parâmetros de PP e de RVR nos período de 120 minutos (Figuras 11 e 12, respectivamente). Houve um decréscimo também no FU nos períodos de 90 e 120 minutos (Figura 13) e no RFG no período de 120 minutos (Figura 14).

Os parâmetros de $\%TNa^+$, $\%TK^+$ e $\%TCl^-$ não apresentaram modificações após a administração do veneno bruto utilizado na dose de $30\mu g$ (Figuras 15, 16 e 17).

A fração crotoxina (CTX) causou uma diminuição no RFG nos períodos de 60, 90 e 120 minutos (Figura 14), enquanto o FU permaneceu estável (Figura 13).

O percentual de transporte total de potássio foi diminuído em todos os períodos, após a administração da CTX (Figura 16), enquanto houve diminuição no percentual de transporte total de cloreto nos períodos de 60 e 120 minutos (Figura 17).

Observou-se que a fração fosfolipásica promoveu uma diminuição no RFG no período de 120 minutos (Figura 14), enquanto a PP, a RVR e o FU permaneceram inalterados (Figuras 11,12 e 13). Houve uma diminuição no percentual de transporte total potássio nos períodos de 60,90 e 120 minutos (Figura 16) e de cloreto no período de 60 minutos (Figura 17), entretanto o percentual de transporte total de sódio permaneceu inalterado (Figura 15).

Os percentuais de transporte proximal de sódio ($\%pTNa^+$) apresentaram redução, aos 120 minutos, apenas no grupo tratado com crotoxina (Figura 18). A redução máxima, no percentual de transporte proximal de potássio ($\%pTK^+$) ocorreu aos 120 minutos, no grupo tratado com crotoxina, enquanto com o grupo tratado com fosfolipase A_2 ocorreu aos 60 minutos. Os grupos perfundidos com veneno bruto não apresentaram alterações no transporte proximal do potássio (Figura 19). Os percentuais de transporte proximal de cloreto ($\%pTCl^-$) dos grupo tratados com veneno bruto e com fosfolipase A_2 não foram alterados, apenas o grupo perfundido com crotoxina apresentou redução no transporte desse íon (Figura 20).

O *clearance* osmótico apresentou um aumento, apesar de não ser estatisticamente significativo, no grupo tratado com veneno bruto na dose de

10µg, e uma redução no grupo tratado com veneno bruto na dose de 30µg. Não houve alteração nos grupos tratados com crotoxina e com fosfolipase A₂ (Figura 21).

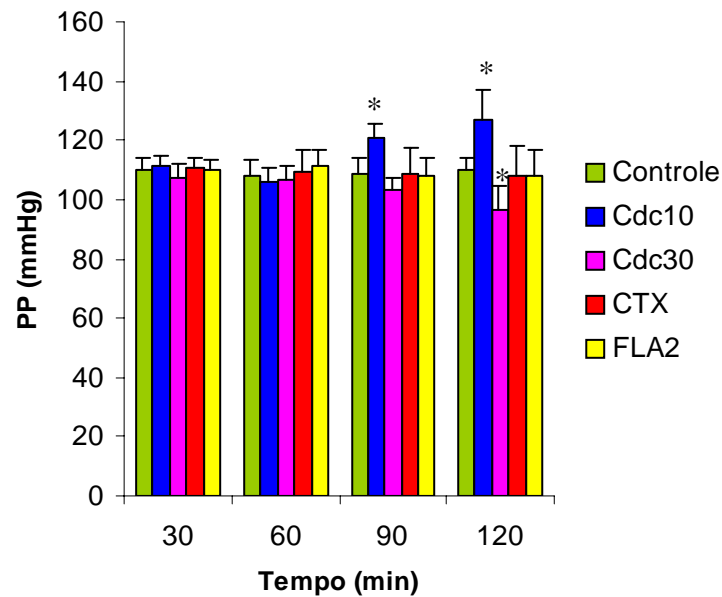
4.3. Análise histológica dos grupos da perfusão renal

Após a análise histológica dos rins perfundidos com veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* e as frações crotoxina e fosfolipase A₂, foi observado a presença de alterações morfológicas significativas.

Os rins perfundidos com veneno bruto, na dose de 10µg apresentaram glomérulos com quantidade significativa de material proteináceo e quantidade moderada nos túbulos (Figura 23). Além disso, foi observada a presença de degeneração hidrópico vacuolar. Os vasos e o interstício apresentavam aspectos normais.

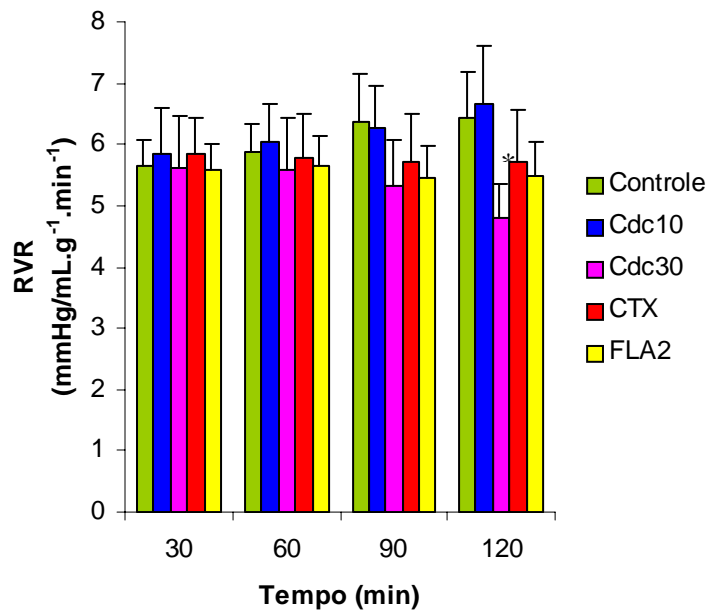
No grupo experimental onde os rins foram perfundidos com dose maior do veneno bruto (30µg), foram observadas alterações semelhantes ao do grupo anterior. No entanto, a deposição de material proteináceo nos glomérulos foi moderada. Além disso, foi constatada a presença de necrose tubular focal e de glóbulos hialinos (Figura 24).

Os rins perfundidos com crotoxina, na dose de 10µg, apresentaram glomérulos normais e uma quantidade moderada de material proteináceo nos túbulos e nos espaços urinários (Figura 25), enquanto os rins perfundidos com fosfolipase A₂ apresentaram uma quantidade intensa de material proteináceo depositado nos glomérulos, nos túbulos e nos espaços urinários. Neste último grupo, foi observado também a ocorrência de necrose tubular focal (Figura 26).



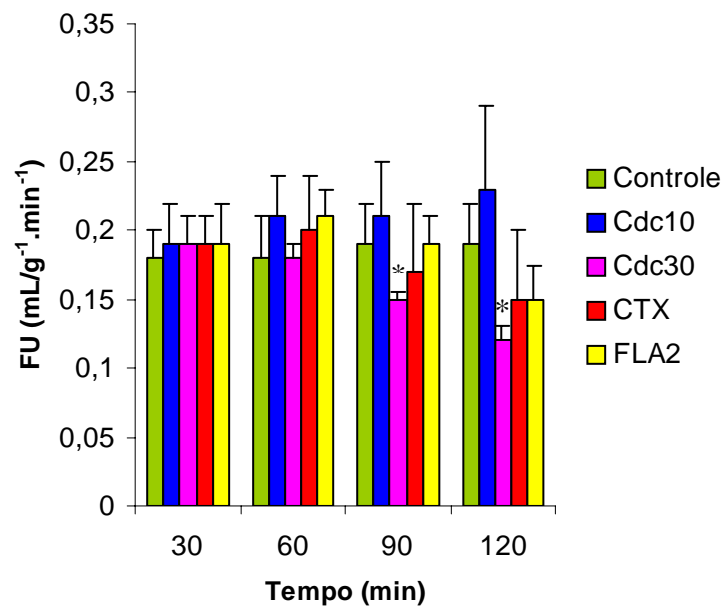
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	110,1±3,68	111,1±3,5	107,3±4,6	110,6±3,2	110,3±3,1
60	108,3±4,88	106,2±4,2	106,8±5,0	109,6±7,0	111,5±5,1
90	108,7±5,08	120,6±5,1*	103,2±4,1	108,4±9,1	107,9±6,5
120	110,3±3,69	126,8±10,2*	96,7±8,1*	108,3±10,0	108,3±8,4

Figura 11. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



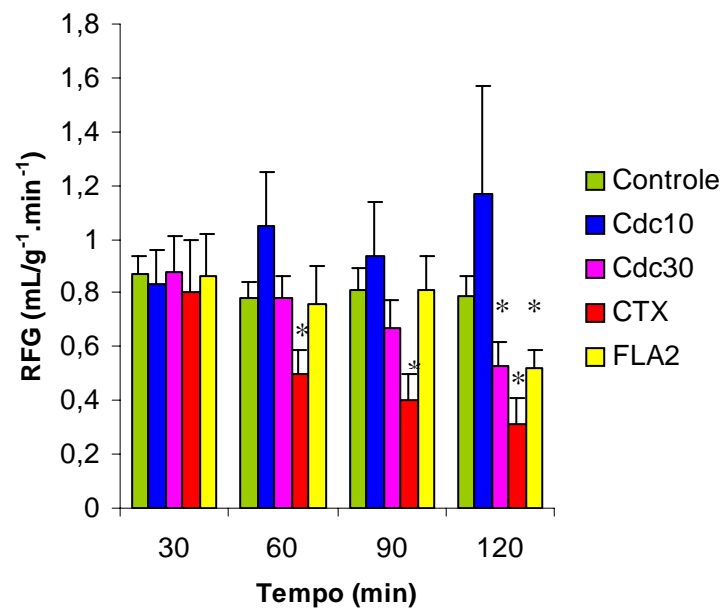
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	5,65±0,42	5,85±0,75	5,61±0,86	5,84±0,60	5,57±0,43
60	5,88±0,44	6,03±0,63	5,58±0,86	5,79±0,71	5,64±0,49
90	6,38±0,76	6,27±0,70	5,33±0,74	5,72±0,77	5,46±0,51
120	6,42±0,78	6,67±0,94	4,8±0,56*	5,72±0,84	5,48±0,57

Figura 12. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



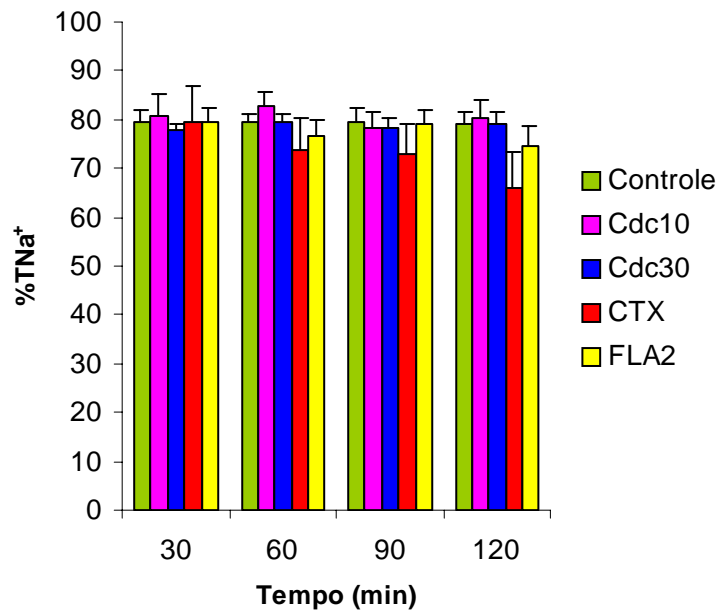
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	0,18±0,02	0,19±0,03	0,19±0,02	0,19±0,02	0,19±0,03
60	0,19±0,03	0,21±0,03	0,18±0,01	0,20±0,04	0,21±0,02
90	0,19±0,03	0,21±0,04	0,15±0,005*	0,17±0,05	0,19±0,02
120	0,19±0,03	0,23±0,06	0,12±0,01*	0,15±0,05	0,15±0,025

Figura 13. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



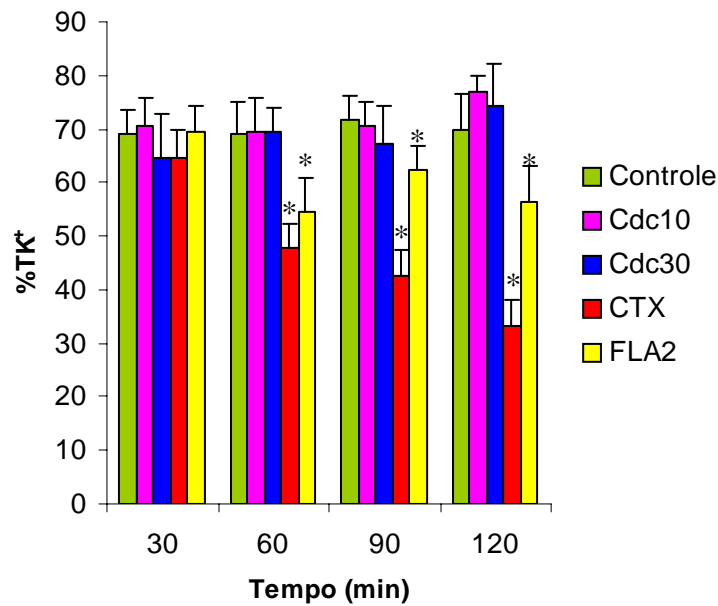
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	0,87±0,07	0,83±0,13	0,88±0,13	0,80±0,20	0,86±0,16
60	0,78±0,06	1,05±0,20*	0,78±0,20	0,50±0,09*	0,76±0,14
90	0,81±0,08	0,94±0,20	0,67±0,10	0,40±0,10*	0,81±0,13
120	0,79±0,07	1,17±0,40	0,53±0,09*	0,31±0,10*	0,52±0,07*

Figura 14. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



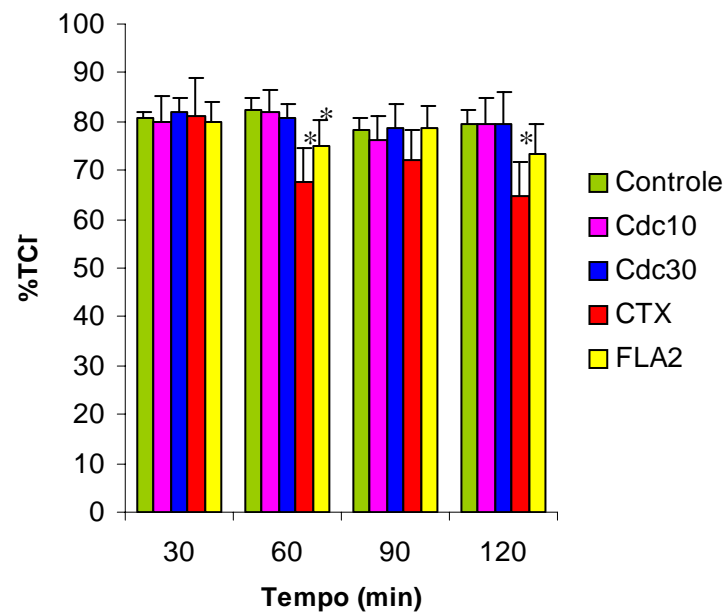
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	79,63±2,24	80,60±4,52	77,94±1,36	79,43±7,29	79,67±2,64
60	79,50±1,80	82,78±3,06	79,31±2,04	73,75±6,39	76,78±3,29
90	79,43±2,75	78,21±3,41	78,16±2,19	72,83±6,42	79,24±2,81
120	79,14±2,53	80,38±3,53	78,94±2,44	66,03±7,22	74,71±3,88

Figura 15. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



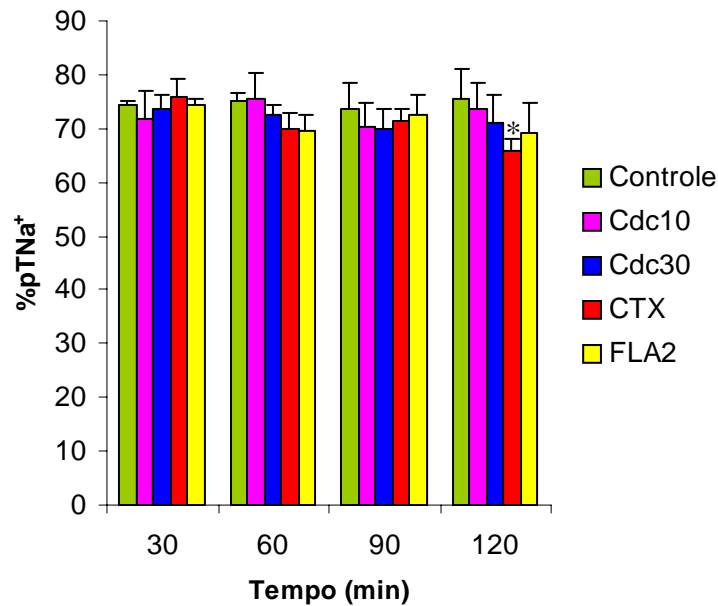
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	69,13±4,5	70,57±5,09	64,78±8,27	64,69±5,14	69,59±4,61
60	69,04±6,2	69,41±6,45	69,45±4,32	47,62±4,53*	54,52±6,32*
90	71,84±4,5	70,46±4,71	67,33±6,94	42,61±4,75*	62,19±4,62*
120	69,94±6,49	76,79±3,28	74,27±7,87	33,28±4,78*	56,26±6,81*

Figura 16. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



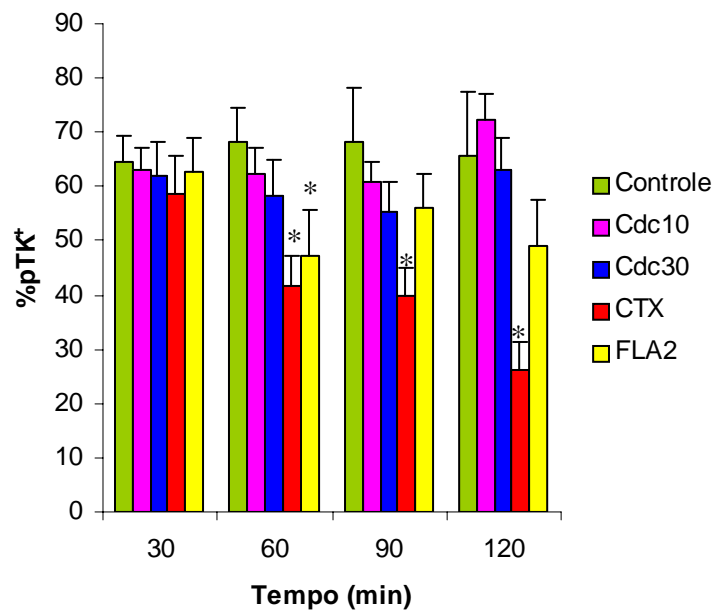
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	80,9±1,15	80,10±5,33	81,94±2,98	81,18±7,55	80,07±3,89
60	82,25±2,72	81,78±4,51	80,83±2,76	67,62±6,96*	75,04±4,26*
90	78,32±2,54	76,30±4,88	78,79±6,40	71,97±6,40	78,51±4,59
120	79,53±2,67	79,45±5,21	79,66±6,25	64,62±6,93*	73,43±6,01

Figura 17. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCI). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



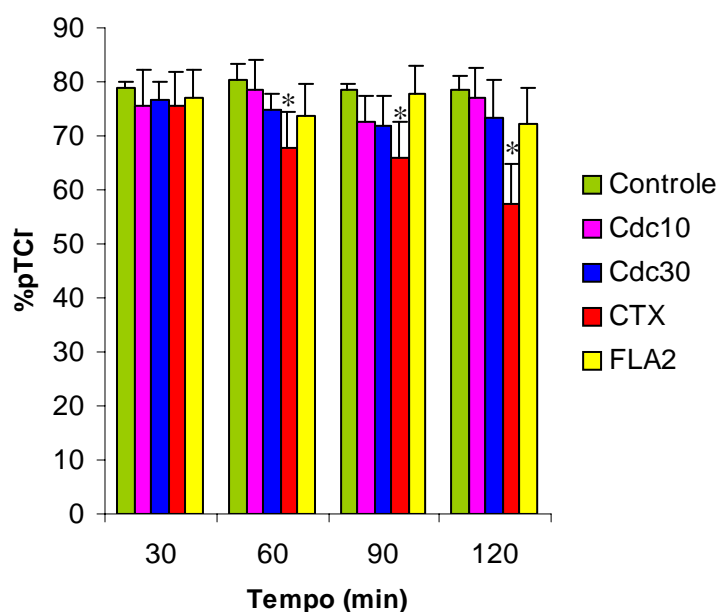
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	74,43±0,65	71,6±5,38	73,75±2,48	75,77±3,35	74,2±1,2
60	75,22±1,52	75,63±4,62	72,41±2,12	69,80±3,08	69,7±2,7
90	73,53±4,99	70,38±4,25	69,83±3,66	71,28±2,27	72,6±3,8
120	75,53±5,72	73,82±4,76	71,12±5,14	65,76±2,22*	69,0±5,7

Figura 18. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



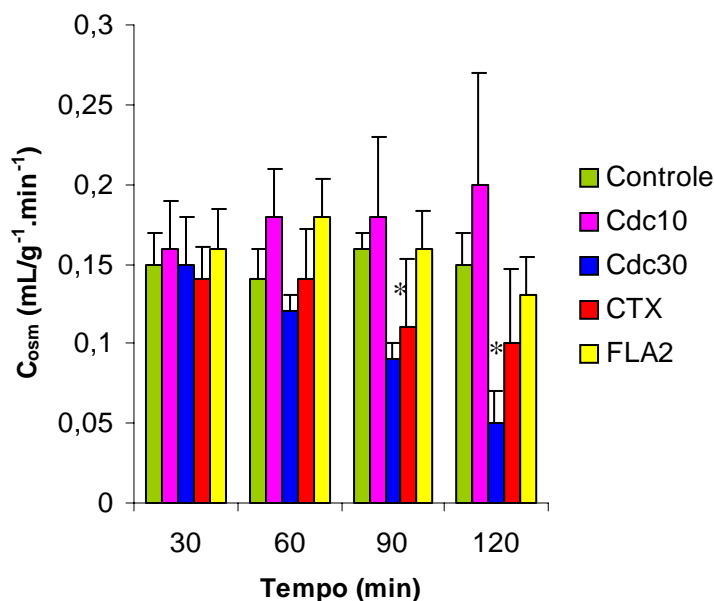
Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	64,66±4,73	62,93±4,33	62,1±6,2	58,8±6,9	62,79±6,32
60	68,40±6,23	62,52±4,73	58,4±6,5	41,8±5,5*	47,08±8,7*
90	68,27±9,88	60,71±3,91	55,5±5,3	39,7±5,2*	55,99±6,20
120	65,56±12,02	72,37±4,64	63,0±5,9	26,1±5,3*	49,24±8,39

Figura 19. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	78,82±1,24	75,64±6,6	76,8±3,3	75,5±6,4	77,20±5,04
60	80,49±3,00	78,63±5,4	74,8±3,1	67,6±7,0*	73,53±6,26
90	78,58±1,14	72,47±5,0	72,0±5,4	65,8±6,9*	77,90±5,12
120	78,36±2,87	76,89±5,6	73,4±7,1	57,5±7,4*	72,19±6,68

Figura 20. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotocina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.



Tempo (min)	Controle	Cdc10	Cdc30	CTX	FLA2
30	0,15±0,02	0,16±0,03	0,15±0,03	0,14±0,02	0,16±0,02
60	0,14±0,02	0,18±0,03	0,12±0,01	0,14±0,03	0,18±0,02
90	0,16±0,01	0,18±0,05	0,09±0,01*	0,11±0,04	0,16±0,02
120	0,15±0,02	0,20±0,07	0,05±0,02*	0,10±0,05	0,13±0,02

Figura 21. Efeitos renais promovidos pelo veneno bruto (10 e 30µg/mL) e pelas frações (30µg/mL) da serpente *Crotalus durissus collilineatus* no clearance osmótico (C_{osc}). Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). Cdc10 = veneno bruto na dose de 10 µg; Cdc30 = veneno bruto na dose de 30 µg; CTX = crotoxina na dose de 10 µg e FLA2 = fosfolipase A2 na dose de 10 µg.

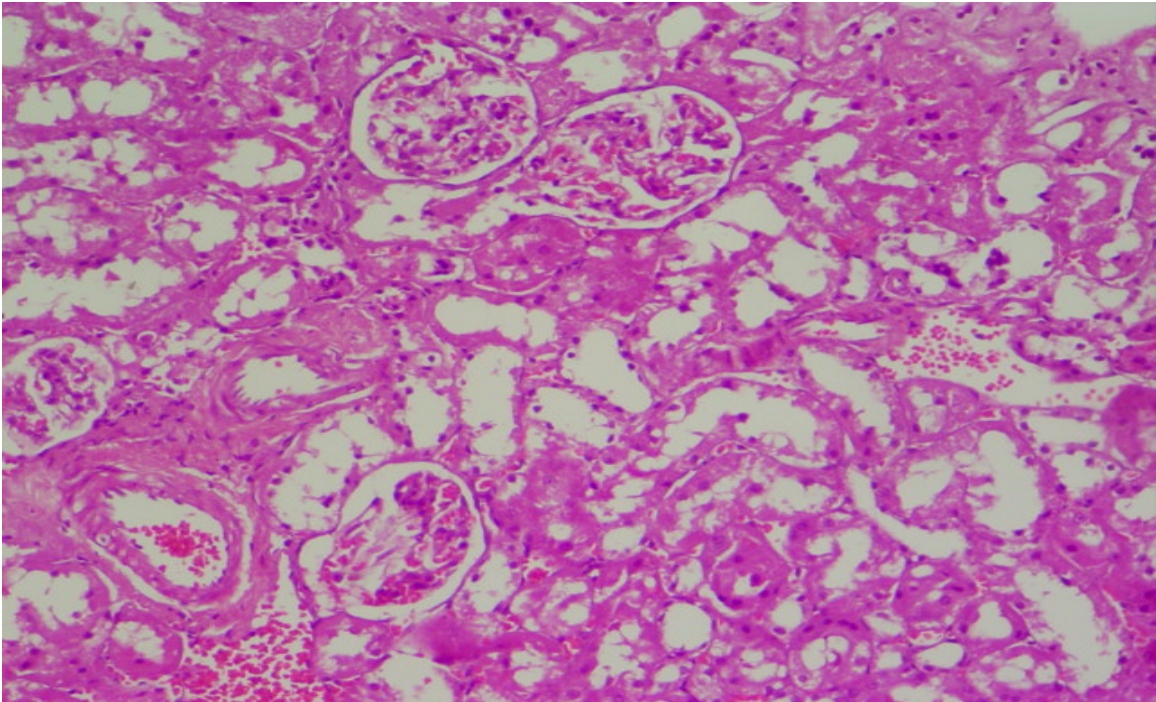


Figura 22 Análise histológica dos rins do grupo controle.

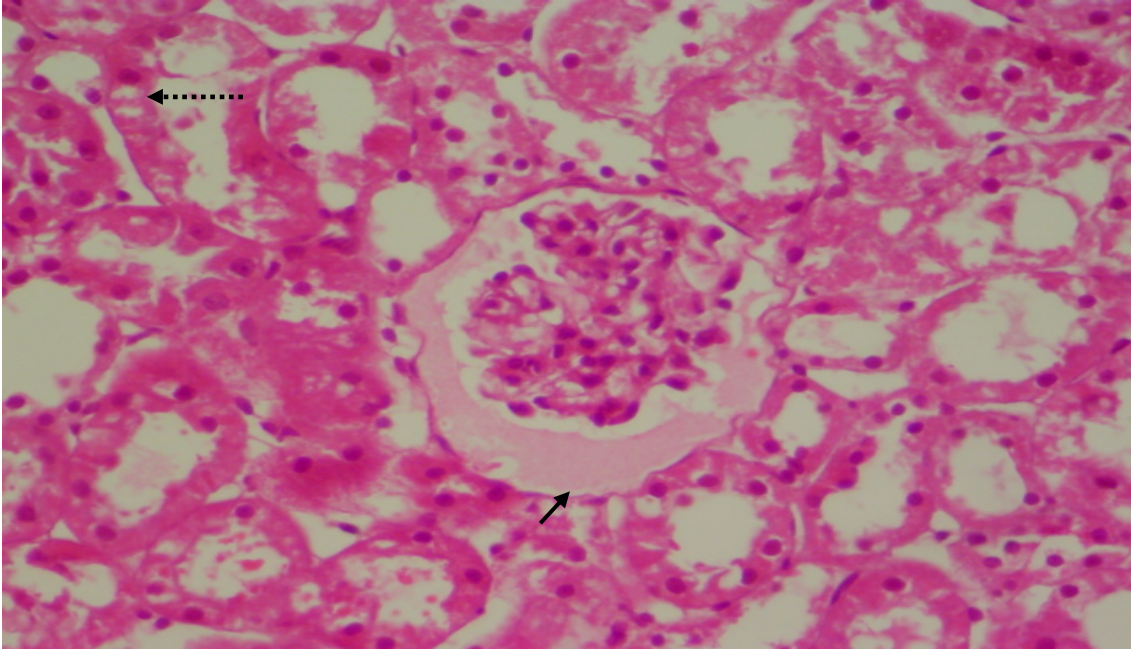


Figura 23 Aspecto morfológico de rim perfundido com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço glomerular (seta menor) e a presença de degeneração hidrópico vacuolar das células tubulares (seta tracejada). (Aumento de 400x ; coloração H.E.)

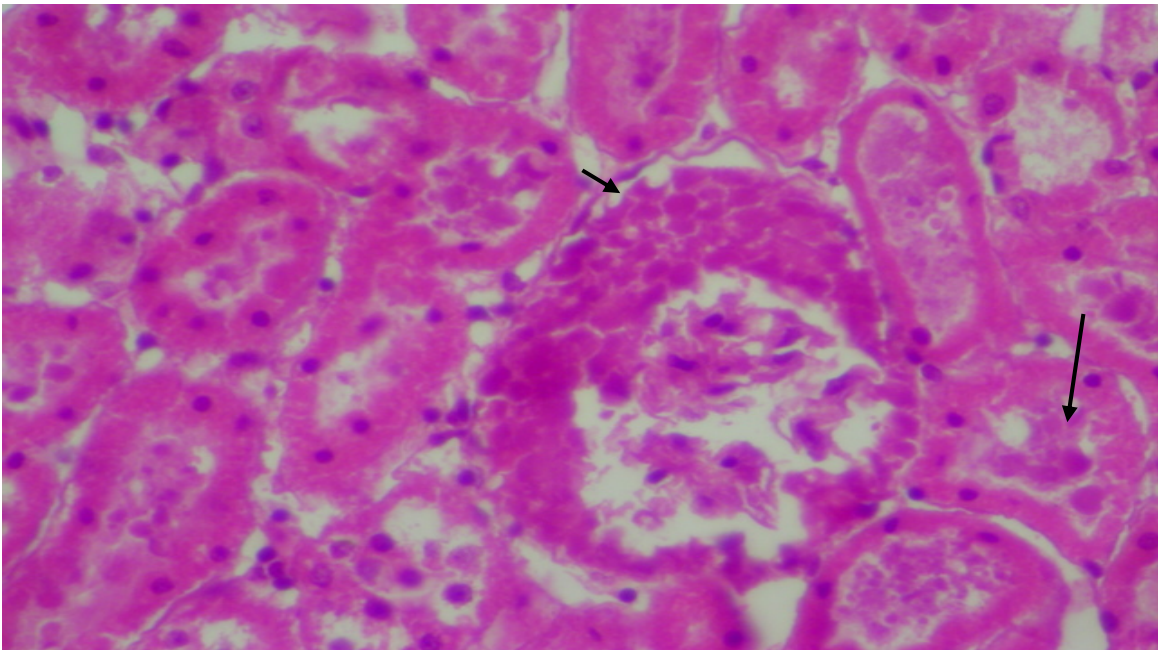


Figura 24 Aspecto morfológico de rim perfundido rim perfundido com veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (30µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo nos espaços glomerular (seta menor) e tubular (seta maior). (Aumento de 400x ; coloração H.E.).

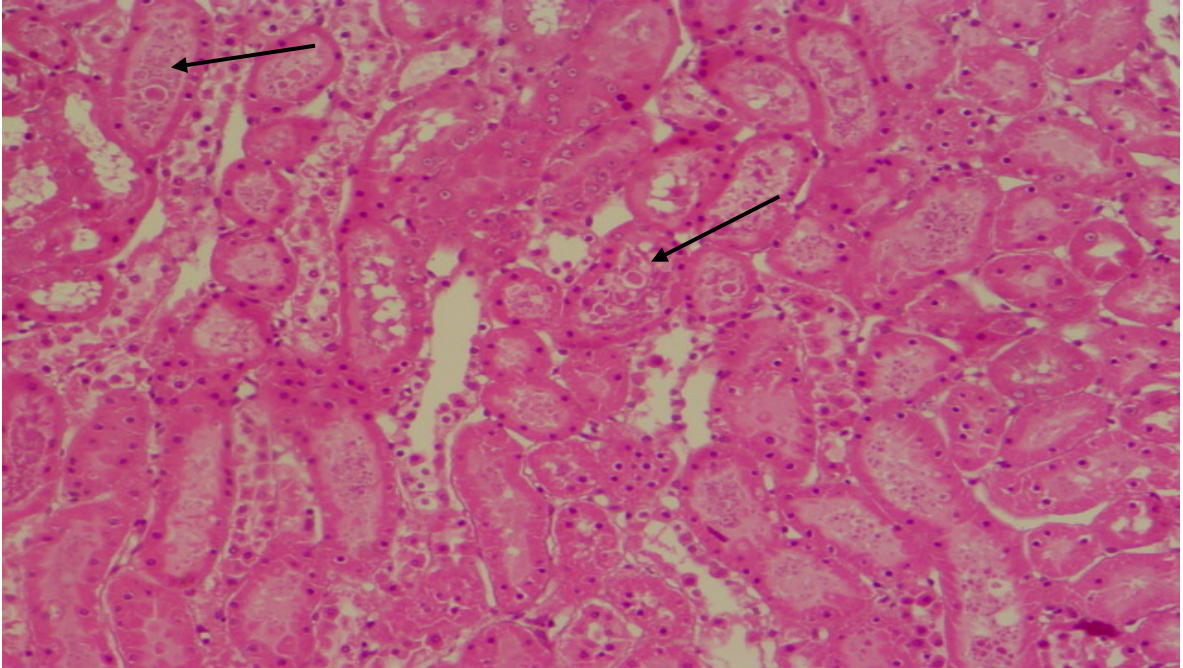


Figura 25 Aspecto morfológico de rim perfundido com a fração crotoxina do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10 μ g/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço tubular (setas). (Aumento de 400x ; coloração H.E.).

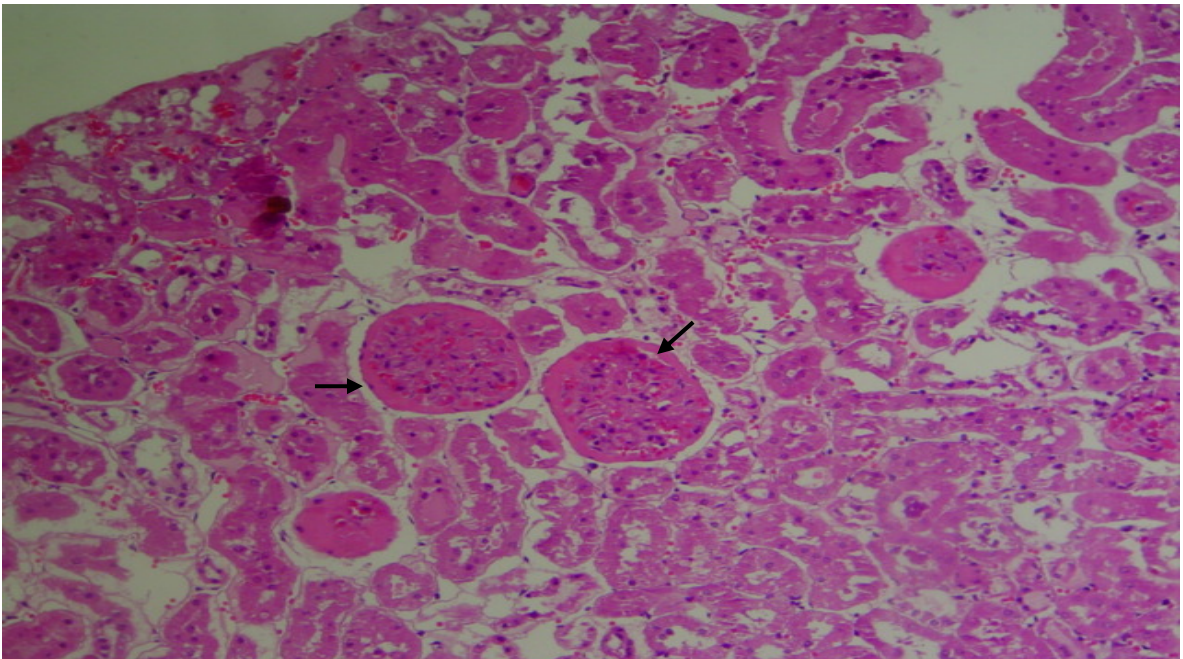


Figura 26 Análise histológica dos rins perfundidos com a fração fosfolipase A₂ do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (10 μ g/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se o acúmulo de material proteináceo no espaço glomerular (setas). (Aumento de 100x ; coloração H.E.).

Discussão

5. Discussão

As respostas do rim isolado de rato ao veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* fazem parte de uma estratégia para avaliar as alterações dos parâmetros renais causadas por tais substâncias.

Comparando-se os resultados de estudos prévios (Martins *et al.*, 1998, 2002, 2003; Monteiro *et al.*, 2001) realizados com os venenos das subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella* com os resultados de nossos experimentos, observa-se que os venenos de *C d terrificus* e de *C d collilineatus* induzem alterações renais semelhantes entre si no que diz respeito aos parâmetros de pressão de perfusão, de resistência vascular renal, de fluxo urinário e de ritmo de filtração glomerular. Todos estes parâmetros apresentaram uma tendência de redução, enquanto os transportes tubulares dos íons sódio, potássio e cloreto permaneceram inalterados.

É importante destacar que foram observadas semelhanças entre os venenos brutos de *C d cascavella* (Martins *et al.*, 1998) e de *C d collilineatus*, nos parâmetros supracitados, apenas com a dose mais baixa (10µg) deste último, enquanto que a infusão na dose mais alta (30µg) produziu alterações renais semelhantes às do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* (Monteiro *et al.*, 2001).

Com base nesses dados, é razoável sugerir que essa diferença seja decorrente da existência de sinergismo ou antagonismo do efeito de alguns componentes do veneno bruto.

A fração crotoxina do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* causou diminuição de vários parâmetros renais. Pode-se sugerir que a diminuição no percentual de transporte proximal de sódio, produzida pela fração crotoxina,

poderia produzir um grande aporte de sódio para o néfron distal, o que estimularia a secreção de potássio, levando à caliurese (Fonteles *et al.*, 1998).

Foi observado que a fração fosfolipase A₂ do veneno de *C d collilineatus* não causou alteração na resistência vascular renal, de forma semelhante à crotoxina. No entanto, em relação ao transporte de eletrólitos, observou-se uma diminuição no transporte de potássio e cloreto sem qualquer efeito no transporte tubular de sódio.

A presença de transporte de cloreto independente de sódio, no ramo ascendente delgado da alça de Henle (Liu *et al.*, 2002), poderia explicar essa alteração específica no transporte de cloreto que ocorreu no grupo perfundido com a fração fosfolipase A₂.

A análise histológica dos rins perfundidos com veneno bruto de *C d collilineatus* e com as frações deste, revelou a ação nefrotóxica direta do veneno.

Achados histológicos e efeitos nefrotóxicos diretos foram correlacionados por Boer-Lima e colaboradores (1999), ao demonstrarem que as alterações morfológicas vistas nos glomérulos e túbulos renais, causadas pelo veneno de *Bothrops moojeni*, foram compatíveis com as alterações tubulares agudas que ocorrem na insuficiência renal aguda, como a diminuição no ritmo de filtração glomerular.

Segundo Cruz-Höfling e colaboradores (2001), alterações tubulares como presença de vacúolos, células edemaciadas, cilindros hialinos e massas proteináceas amorfas no lúmen dos túbulos são sinais comuns de injúria e disfunção renais, particularmente de necrose tubular aguda. Além disso, alterações na composição fosfolipídica da membrana têm sido descritas como causa da disfunção da membrana (Boer-Lima *et al.*, 1999).

Portanto, a presença de material proteináceo nos túbulos pode ter contribuído para a diminuição no ritmo de filtração glomerular observada com

nos rins perfundidos com veneno bruto na dose de 30µg e nos grupos tratados com as frações crotoxina e fosfolipase A₂.

Há relatos de interferência com a função de membrana e atividade fosfolipásica A₂ (Cummings *et al.*, 2000). Os lisofosfolipídios, produzidos pela ação da FLA₂, podem alterar as características de permeabilidade e desacoplar a respiração mitocondrial (Goldstein e Schnellmann, 1996). Além disso, a ativação da FLA₂ pelo cálcio tem mostrado contribuir para a injúria tubular renal em processos isquêmicos (Choi *apud* Schrier *et al.*, 2004).

O ritmo de filtração glomerular é considerado um dos parâmetros mais importantes para a avaliação funcional dos rins (Wang *et al.*, 2004).

Estudos dirigidos aos mecanismos da queda do ritmo de filtração glomerular pela adenosina têm demonstrado que a contração das células mesangiais e a diminuição na pressão hidrostática glomerular resultam da vasoconstrição pré-glomerular e de uma vasodilatação pós-glomerular de desenvolvimento mais lento (Oldroyd *et al.*, 2000).

A adenosina exógena, quando infundida diretamente dentro da artéria renal em animais, produz um efeito pronunciado sobre a hemodinâmica dos rins, com uma diminuição sustentada no fluxo sanguíneo renal e na fração de filtrado (Balakrishnan *et al.*, 1993). De forma semelhante, quando níveis de adenosina endógena são aumentados através de manobras farmacológicas, também há uma diminuição sustentada no ritmo de filtração glomerular (Balakrishnan *et al.*, 1993).

A queda no ritmo de filtração glomerular é relacionada a uma vasoconstrição da arteríola aferente mediada pelo receptor A₁ da adenosina, e em menor extensão, à vasodilatação da arteríola eferente mediada pelo receptor A₂ (Kuan *et al.*, 1993).

Soares e colaboradores (2001) sugerem que outras regiões moleculares da subunidade CB da crotoxina, além da região catalítica, podem participar das

atividades tóxicas exercidas pela fração fosfolipase A_2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Além disso, a atividade da FLA $_2$ pode variar em até três vezes, e esta variação parece estar relacionada às quantidades diferentes de isoformas de crotoxina presentes nos venenos (Francischetti *et al.*, 2000).

Segundo Cummings e colaboradores (2000), vários estudos têm mostrado que a toxicidade das fosfolipases A_2 secretórias (FLA $_{2s}$) pode ser independente da sua habilidade de produzir ácido araquidônico. Além disso, tem sido demonstrado que FLA $_{2s}$ requerem fosfolipídios de membrana específicos para mediar a injúria celular (Diaz *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2001).

Assim, poderíamos sugerir que a fração fosfolipase A_2 do veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus*, atuaria mais como agonista da adenosina do que como enzima catalítica, levando-se em consideração que essa fração possui a menor atividade fosfolipásica, quando comparada com as frações fosfolipásicas A_2 dos venenos das subespécies *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus* (Rangel-Santos *et al.*, 2004; Santoro *et al.*, 1999).

No entanto, alguns estudos têm demonstrado que o processo inflamatório participa da injúria celular produzida pelas fosfolipases A_2 secretórias, provenientes de venenos de serpentes (Han *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Uma explicação para a atividade das FLA $_{2s}$ sobre a membrana plasmática foi proposta por Sevanian (1988). Esse autor propôs que os insultos celulares resultam da ativação prolongada de isoformas de FLA $_{2s}$, com conseqüente liberação dos produtos da hidrólise de fosfolipídios que poderiam agir como detergentes e alterar a fluidez da membrana, diminuindo a integridade desta organela. Além disso, a liberação de fosfolipídios de membrana como resultado da peroxidação lipídica induzida por oxidante e/ou pelo metabolismo de FLA $_2$, poderiam diminuir a integridade da membrana independentemente dos ácidos graxos livres ou liso-fosfolipídios (Sevanian, 1988).

Uma explicação para a aparente ausência de efeitos deletérios do veneno bruto sobre os rins, observada no teste da toxicidade aguda, vem das observações de Schrier e colaboradores (1999), que apontam que mesmo na insuficiência renal aguda instalada, a presença de necrose tubular aguda é observada apenas em células tubulares ocasionais, e em alguns casos, pode não ser detectável. Além disso, os glomérulos podem se apresentar morfológicamente normais (Schrier *et al.*, 2004).

Boer-Lima e colaboradores (1999) apontam que lesões subcelulares, não visualizadas pela microscopia óptica, são suficientes para provocar as alterações observadas. Os autores citam um trabalho de Solez e colaboradores (1979) que relataram que alterações morfológicas na necrose tubular aguda em humanos eram relativamente sutis, quando comparadas com a intensa redução observada no ritmo de filtração glomerular.

Boer-Lima e colaboradores (1999) comentam ainda que, do ponto de vista funcional, a severidade da necrose tubular aguda pode ser correlacionada mais com o número total de néfrons danificados e/ou obstruídos do que com o total de tecido renal afetado.

Portanto, alterações morfológicas sutis, mas importantes poderiam ser imperceptíveis por causa do tamanho da amostra tecidual examinada.

Alguns estudos demonstram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta uma maior seletividade para tecido hepático de rato (Bancher *et al.*, 1973; Barraviera *et al.*, 1995). Também foi relatada a ocorrência de lesões hepáticas induzidas, experimentalmente, pela administração de veneno crotálico em coelhos, ratos e em cães (Amorin *et al.*, 1951). Ainda com relação às alterações histológicas, Saliba e colaboradores (1983) demonstraram que o veneno causa degeneração hidrópica, esteatose hepática e necrose do miocárdio em bovinos. Em seres humanos, as alterações podem ser produzidas através de

dois mecanismos: lesão de mitocôndrias e efeito de citocinas nos hepatócitos, principalmente interleucinas 6 e 8 (Barraviera *et al.*,1995).

Na experimentação em rim isolado de rato, a análise da urina, do perfusato e a histopatologia são úteis para estabelecer um perfil razoável dos efeitos funcionais e morfológicos de uma substância sobre o rim. Com as informações obtidas dessas análises, pode-se estabelecer a identificação do local, da natureza e da extensão da lesão nefrotóxica.

O estudo da variabilidade molecular das fosfolipases A_2 secretórias encontradas, tantos nos tecidos de mamíferos quanto nos venenos de serpentes, e a elucidação dos diferentes mecanismos fisiopatológicos das diversas FLA₂ podem auxiliar no entendimento das funções biológicas de todas essas diferentes FLA₂s. O estudo de tais substâncias apresenta-se, portanto, como uma promissora área de pesquisa.

Conclusões

6. Conclusões

- ❖ O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* causou as alterações hepáticas observadas no teste de toxicidade aguda.

- ❖ O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* causou importantes alterações renais no modelo de rim isolado de rato, promovendo diminuição no fluxo urinário e no ritmo de filtração glomerular assim como alterações na pressão de perfusão e na resistência vascular renal.

- ❖ As principais alterações renais produzidas pelas frações crotoxina e fosfolipase A₂, do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus* foram diminuição no transporte de tubular de íons e redução no ritmo de filtração glomerular.

- ❖ As frações crotoxina e fosfolipase A₂ causaram uma diminuição no transporte tubular de potássio.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AMORIN, M.F., MELLO, R.F. e SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Mem Inst Butantã São Paulo* 23:63-108, 1951.

BANCHER, W., ROSA, R.R. e FURLANETO, R.S. Estudos sobre fixação eletiva e quantitativa do veneno *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Mem Inst Butantã São Paulo* 37:139-148, 1973.

BALHLMANN, J., GIEBISCH, G. and OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 212 : 77-82, 1967.

BALAKRISHNAN, V.S., COLES, G.A. and WILLIAMS, J.D. A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function. *Am J Physiol* 265: F504-F510, 1993.

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

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

BARRAVIERA, B. Systemic inflammatory response syndrome in envenoming. *Toxicon* 35 (1): 13-14, 1997.

BELTOWSKI, J., MARCINIAK, A., WÓJCICKA, G. and GÓRNY, D. Nitric oxide decreases renal medullary Na⁺ -K⁺ -ATPase activity through cyclic GMP - protein kinase G dependent mechanism. *J Physiol Pharmacol* 54 (2): 191-210, 2003.

BOCHNER, R. e STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad Saúde Pública Rio de Janeiro* 19 (1): 7-16, 2003.

BOER-LIMA, P.A., GONTIJO, J.A.R. and CRUZ-HÖFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am J Trop Med Hyg* 61 (5): 698-706, 1999.

BON,C., CHANGEUX, J.-P., JENG, T.W. and FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem* 99: 471-481,1979.

BOWMAN, W.C. and RAND, M.J. *Textbook of Pharmacology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.12.1-12.41,1980.

BREZIS, M. and EPSTEIN, F.H. Pathophysiology of acute renal failure. In: HOOK, J.B. and GOLDSTEIN, R.S.(Ed). *Toxicology of the kidney*. 2nd ed. New York: Raven Press, p.129-152,1993.

BREZIS, M. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* 275 (44): F623-F632, 1998.

BROWN, N.J. and ROBERTS II, L. J. Histamine, Bradykinin, and Their Antagonists. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. HARDMAN, J.G. and LIMBIRD, L.E. (Ed). New York: McGraw-Hill, p.645-667, 2001.

BUCARETCHI, F., HERRERA, S.R.F., HYSLOP, S., BACARAT, E.C.E., and VIEIRA, R.J. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44 (3): 133-138, 2002.

CAMILO, M.A.P. *apud* MARTINS, A.M.C., TOYAMA, M.H., HAVT, A. NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced renal toxicity in isolated rat kidney. *Toxicon* 40:1165-1171, 2002.

CARDOSO, D.F., LOPES-FERREIRA, M. FAQUIM-MAURO, E.L., MACEDO, M.S., FARSKY, S.H.P. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Med Inflamm* 10:125-133, 2001.

CHACUR, M., LONGO, I., PICOLO, G., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., GUERRA, J.L., TEIXEIRA, C.F.P. and CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon* 41: 667- 678, 2003.

CHIPPAUX, J.-P., WILLIAMS, V. and WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29 (11): 1279-1303,1991.

CHOI, K.H. *apud* SCHRIER, R.W., WANG,W., POOLE, B. and MITRA, A. Acute renal failure: definitions, pathogenesis, and therapy. *J Cli Invest* 114: 5-14, 2004.

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

CUMMINGS,B.S., MCHOWAT,J. and SCHNELLMANN,R.G. Phospholipase A₂ in cell injury and death. *JPET* 294: 793-799, 2000.

DENG, X., WELCH, W.J. and WILCOX, C.S.A. Role of nitric oxide in short-term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics. *Hypertension* 27: 1173-1179, 1996.

DÍAZ, C., LÉON, G., RUCAVADO, A., ROJAS, N., SCHROIT, A.J. and GUTIÉRREZ, J.M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxin phospholipase A₂ : role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch Biochem Biophys* 391 (1): 56-64, 2001.

DUMBACHER, J.P., SPANDE,T.F. and DALY, J.W. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) from New Guinea. *PNAS* 97 (24): 12970-12975, 2000.

DUNN, R.D. and BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1533: 29-37, 2001.

FEITOSA, R.F.G., MELO, I.M.L.A. e MONTEIRO, H.S.A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará-Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 30 (4): 295-301,1997.

FOEGH, M.L. & RAMWELL, P.W. Os Eicosanóides: Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos & Compostos Relacionados. *In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica*. 8^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.273-285, 2001.

FONTELES, M.C. and LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated rat kidney. *Arch Int Physiol Biochim* 90: 159-161,1982.

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

FONTELES, M.C., GREENBERG, R.N., MONTEIRO, H.S.A., CURRIE, M.G. and FORTE, L.R. Novel natriuretic and kaliuretic peptides. *Am J Physiol* 275: F191-F197,1998.

FORTE-DIAS, C.L., LIN, Y., EWELL, J., DINIZ, C.R. and LIU, T.-Y. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J Biol Chem* 269 (22): 15646-15651,1994.

FORTE-DIAS, C.L., JANNOTTI, M.L.D., FRANCO, F.J.L., MAGALHÃES, A. and DINIZ, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 37:1747-1759,1999.

FRANÇA, F.O.S. e FAN, H.W. Acidente laquético. *In: Schvartsman, S.(Ed.) Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. 2^a ed., São Paulo: Savier Editora, p.170-172,1992.*

FRANCESCHI, J.P., TAVARES, D.Q., HERTEL, R. and LOBO DE ARAÚJO, A. Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. *Toxicon* 5: 661-666,1981.

FRANCESCHI, J.P. and BRAZIL, O.V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 19 (6): 875-887,1981.

FRANCISCHETTI, I.M.B., GOMBAROVITS, M.E.C., VALENZUELA, J.G., CARLINI, C.R. and GUIMARÃES, J.A. Intraspecific variation in the rattlesnake venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Comp Biochem Physiol* 127 C: 23-26, 2000.

GANONG, W.F. *Review of Medical Physiology*. 19th ed. Stamford: Appleton & Lange, p.670,1999.

GOLDSTEIN, R.S. and SCHNELLMANN, R.G. Toxic responses of the kidney. In: KLAASSEN, C.D.(Ed). *Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, pp.417-442,1996.

HAN, S.K., KIM, K.P., KODURI, R., BITTOVA, L., MUNOZ, N.M., LEFF, A.R., WILTON, D.C., GELB, M.H. and CHO, W. Roles of Trp³¹ in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A₂. *J Biol Chem* 274: 11881-11888, 1999.

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

HAWGOOD, B.J. *apud* SANTORO, M.L., SOUSA-E-SILVA, M.C.C. *et al.* Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem Physiol* 122C: 61-73, 1999.

HEWITT, W.R., GOLDSTEIN, R.S. and HOOK, J.B. Toxic responses of the kidney. In: AMDUR, M.O., DOULL, J. and KLAASSEN, C.D.(Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, p.354-382,1991.

HONDEGHEM, L.M. & RODEN, D.M. Drogas utilizadas nas arritmias cardíacas. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.193-215, 2001.

JENG, T.-W., HENDON, R.A. and FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(2): 600-604, 1978.

KOEPPEN, B.M. and STANTON, B.A. *Renal Physiology*. 2nd ed. St. Louis: Mosby, p.31-51, 1997.

KRAMER, H.J., STINNESBECK, B.A., KLAUTKE, H.J., KIPNOWSKI, J., GLAENZER, K. and DUESING, R. Interaction of renal prostaglandin with the renin-angiotensin and renal adrenergic nervous system in healthy subjects during dietary changes in sodium intake. *Clin Sci* 68: 387-393, 1985.

KRIŽAJ, J.I., FAURE, G., GUBENŠEK, F. and BON, C. Reexamination of crotoxin-membrane interactions. *Toxicon* 34 (9):1003-1009, 1996.

KUAN, C.J., HERZER, W.A. and JACKSON, E.K. Cardiovascular and renal effects of blocking A₁ adenosine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 822-828, 1993.

LANDUCCI, E. C. T., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., ANTUNES, E. and NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipase A₂. *Toxicon* 38: 199-208, 2000.

LENNON, B.W. and KAISER, I.I. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol* 97B: 695-699, 1990.

LINDSTRÖM, K.E., RÖNNSTEDT, L., JAREMKO, G. and HARALDSSON, B. Physiological and morphological effects of perfusing isolated rat kidney with hyperosmolar mannitol solutions. *Acta Physiol Scand* 166: 231-238,1999.

LIU, W., MORIMOTO, T., KONDO, Y., HNUMA, K., UCHIDA, S., SASAKI, S., MARUMO, F. and IMAI, M. Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *Am J Physiol* 282: F451-F457, 2002.

MARTINS, A. M.C., MONTEIRO, H.S.A., JÚNIOR, E.O.G., MENEZES, D.B. and FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36: 1441-1450,1998.

MARTINS, A.M.C., TOYAMA, M.H., HAVT, A. NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced toxicity in isolated rat kidney. *Toxicon* 40: 1165-1171, 2002.

MARTINS, A. M.C., LIMA, A.A.M., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. *Pharmacol Toxicol* 92:14-20, 2003.

MEBS, D. and OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther* 48: 223-236,1990.

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

MONTEIRO, H.S.A., DA SILVA, I.M.S.C., MARTINS, A.M.C. and FONTELES, M.C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney *Braz J Med Biol Res* 34: 1347-1352, 2001.

MORROW, J.D. and ROBERTS II, L.J. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*.10th ed. HARDMAN, J.G. and LIMBIRD, L.E. (Ed). New York: McGraw-Hill, p.669-685, 2001.

MURAKAMI, M.T. and ARNI, R.K. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s. *Toxicon* 42: 903-913, 2003.

MS (Ministério da Saúde) /Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).*Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: MS/FUNASA, 2001.

NICASTRO,G., FRANZONI,L., CHIARA, C., MANCIN, A.C. GIGLIO, J.R. and SPISNI,A. Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem* 270:1969-1979, 2003.

NISHITSUJI-UWO,G.M., ROSS, B.D. and KREBS, H.A. Metabolic activities of isolated perfused kidney. *Biochem J* 103: 852-862,1967.

NISHIOKA, S.A., JORGE, M.T., SILVEIRA, P.V.P. and RIBEIRO, L.A. South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop* 33 (4): 401-402, 2000.

NIZET, A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. *Kidney Int* 7:1-11,1975.

NOGUEIRA, R.M.B e SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 31:47-56, 2004.

OGUNGBADE, G.O., AKINSANMI, L.A., JIANG, H. and OYEKAN, A.O. Role of epoxyeicosatrienoic acids in renal functional response to inhibition of NO production in the rat. *Am J Physiol* 285: F955-F964, 2003.

OLDROYD, S.D., FANG, L., HAYLOR, J.L., YATES, M.S., EL NAHAS, A.M. and MORCOS, S.K. Effects of adenosine receptor antagonists on the responses to contrast media in the isolated rat kidney. *Clin Sci* 98:303-311, 2000.

PETRICEVICH, V.L. Cytocine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr Drug Target Inflamm & Allergy* 3: 325-332, 2004.

PINHO, F.M.O. e PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev Ass Med Bras* 47(1):24-29, 2001.

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

RACUSEN, L.C. and NAST, C.C. Renal histopathology, urine cytology, and cytopathology of acute renal failure. *In: SCHRIER, R.W.(Ed). Atlas of Diseases of the Kidney*. Philadelphia: Current Medicine, 1999.

RADVANY, F. and BON, C. Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. *J Biol Chem* 257: 12616-12623, 1982.

RANG, H.P., DALE, M.M. e RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4^aed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.32, 2001.

RANGEL-SANTOS, A., DOS-SANTOS, E.C., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C., CARDOSO, D.F. and MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 43(7): 801-810, 2004.

RESENDE, A.C., BALLEJO, G. and SALGADO, M.C.O. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilatation. *Braz. J Med Res* 31:1229-1235, 1998.

RIBEIRO, L.A., ALBUQUERQUE, M.J., PIRES-DE-CAMPOS, V.A.F., KATZ, G., TAKAOKA, N.Y., LEBRÃO, M.L. and JORGE, M.T. Óbitos por

serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev Ass Med Brasil* 44 (4): 312-318,1998

ROSS, H.A. The isolated perfused rat kidney. *Cryobiology* 8: 431- 440,1978.

RUSCHITZKA, F., SHAW, S., NOLL, G., BARTON, M., SCHULZ, E., MÜLLER, G.A., LÜSCHER, T.L. Endothelial vasoconstrictor prostanoids, vascular reactivity, and acute renal failure. *Kidney Int* 54 (67): S199-S201,1998.

RUSSEL, F.E. & DART, R.C. Toxic effects of animal toxins. In: AMDUR, M.O., DOULL, J. and KLAASSEN, C.D. (Ed). *Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, pp.354-382,1991.

RUSSEL, F.E. Toxic effects of animal toxins. In: KLAASSEN, C.D.(Ed). *Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, p.801-839,1996.

SALIBA, A.M. *apud* NOGUEIRA, R.M.B e SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 31:47-56, 2004.

SAMPAIO, S.C., BRIGATTE, P. SOUSA-E-SILVA, M.C.C., DOS-SANTOS, E.C., RANGEL-SANTOS, A.C., CURI, R. and CURY, Y. Contribution of crotoxin for inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* 41: 899-907, 2003.

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

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., WARRELL, D.A. and 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* 94:551-559, 2001.

SANTORO, M.L., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., GONÇALVES, L.R.C., ALMEIDA-SANTOS, S.M., CARDOSO, D.F., LAPORTA-FERREIRA, I.L., SAIKI, M., PERES, C.A. and SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem Physiol* 122 C: 61-73, 1999.

SCHNEIDER, A., ZHANG, Y., ZHANG, M., LU, J.W., RAO, R., FAN, X., REDHA, R., DAVIS, L., BREYER, R.M., HARRIS, R., GUAN, Y. and BREYER, M.D. Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGE-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* 65: 1205-1213, 2004.

SCHRIER, R.W., WANG,W., POOLE, B. and MITRA, A. Acute renal failure: definitions, pathogenesis, and therapy. *J Cli Invest* 114: 5-14, 2004.

SCHNELLMANN, R.G and KELLY, K.J. Pathophysiology of nephrotoxic acute renal failure. *In: SCHRIER,R.W.(Ed). Atlas of Diseases of the Kidney.* Philadelphia: Current Medicine,1999.

SEVANIAN, A. *apud* CUMMINGS, B. S., MCHOWAT, J. and SCHNELLMANN,R.G. Phospholipase A₂ in cell injury and death. *JPET* 294: 793-799, 2000.

SOARES, A.M., MANCINI, A.C., CECCHINI, A.L., ARANTES, E.C., FRANÇA, S.C., GUTIÉRREZ, J.M. and GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 877-888, 2001.

SOLEZ, K. *apud* BOER-LIMA, P.A., GONTIJO, J.A.R. and CRUZ-HÖFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am J Trop Med Hyg* 61 (5): 698-706, 1999.

STOLTE, H., SCHUREK, H.J. and ALT, J.M. Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with *in vivo* experimental conditions. *Kidney Int* 16: 377-384,1979.

TAKEDA, M., YOSHITOMI, K. and IMAI, M. Regulation of Na⁺-3HCO₃⁻ cotransport convoluted tubule via adenosine A₁ receptor. *Am J Physiol* 265: F511-F519,1993.

UENO, N., MURAKAMI, M., TANIOKA, T., FUJIMORI, K., TANABE, T., URADE, Y. and KUDO, I. Coupling between cyclooxygenase, terminal

prostanoid synthase and phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276 (37): 34918-34920, 2001.

VALENTIN, E. and LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1488: 59-70, 2000.

WANG, W. Renal potassium channels: recent developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 549-555, 2004.

WEIR, M.R. Renal effects of nonselective NSAIDs and coxibs. *Cleveland Clin J Med* 69(1): SI53-SI58, 1997.

WILCOX, C.S., WELCH, W.J., SCHREINER, G.F. and BELARDINELLI, L. Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine antagonist. *J Am Soc Nephrol* 10: 714-720, 1999.

YANG, T. Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. *Acta Physiol Scand* 177: 417-421, 2003.