



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

**CLAUDÊNIO DIÓGENES ALVES**

**Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente**  
***Lachesis muta muta***

**Fortaleza**

**2010**

**CLAUDÊNIO DIÓGENES ALVES**

**Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente**  
***Lachesis muta muta***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:  
Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

**Fortaleza**

2010

A478e Alves, Claudênio Diógenes

Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Lachesis muta muta* / Claudênio Diógenes Alves. – Fortaleza-Ce, 2010.  
99 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina. Programa de Pós – Graduação em  
Farmacologia.

1. Venenos de Serpentes 2. *Lachesis muta* 3. Toxicidade 4.  
Rim I. Monteiro, Helena Serra Azul (Orient.) II. Título.

CDD: 615.942

**CLAUDÊNIO DIÓGENES ALVES**

**Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente**  
***Lachesis muta muta***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Aprovada em 28/01/2010.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Profa. Dra. Gisela Costa Camarão**  
**Universidade Federal do Ceará**

*À minha família, alicerce da minha formação social e humana.*

*Em especial aos meus pais, **Claudio Noberto Gomes Alves e Marta Lúcia Diógenes**, pelos exemplos de trabalho e dedicação;*

*Aos meus avós, **José Bessa e Maura Diógenes**, pelos exemplos de vida;*

*Aos meus tios, **Cristina Diógenes e Wellington Figueiredo**, pela participação direta na escolha da minha profissão e exemplo de profissionalismo.*

## AGRADECIMENTOS

À **Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro** por ter orientado-me e proporcionado a chance de crescer como pesquisador.

À **Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins** por ter aceitado-me como seu aluno de iniciação científica e pela co-orientação.

Ao **Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes** pelo incentivo a pesquisa e apoio nos exames histopatológicos.

Ao **Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama**, por ter gentilmente cedido o veneno utilizado nos experimentos.

Ao amigo **Daniel Freire de Sousa**. Sua prestatividade, parceria e amizade foram de fundamental importância para a minha formação acadêmica e humana.

À amiga **Jamile Magalhães** pelo companheirismo e amizade.

Aos doutorandos **Rafael Jorge, Rafael Ximenes, Diogo e Paulo Cesar** pelo companheirismo.

À doutoranda **Terentia Batista** pelo companheirismo.

Aos doutorandos **Rodrigo e Alba** pela realização dos experimentos com células MDCK.

Aos alunos de iniciação científica **João Paulo, Neto, João Victor, Aline e Ramon** pela colaboração com a realização dos experimentos no sistema de perfusão renal e com células MDCK.

Aos mestres **Nayrton Flávio, Emiliano Rios, Francisco Washington, Natália Bitú e Helvira Félix** pelo companheirismo.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Farmacologia **Áurea e Márcia Borges**.

Aos funcionários do Instituto de Biomedicina (IBIMED).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

Àos meus pais, que sempre se dedicaram para proporcionar-me a melhor formação.

*Traduzir-se*

*“Uma parte de mim é  
todo mundo:  
Outra parte é ninguém:  
fundo sem fundo.*

*Uma parte de mim é  
multidão:  
outra parte estranheza  
e solidão.*

*Uma parte de mim  
pesa, pondera:  
outra parte delíra.*

*Uma parte de mim  
almoça e janta:  
outra parte se espanta.*

*Uma parte de mim é  
permanente:  
outra parte se sabe  
derrepente.*

*Uma parte de mim é  
só vertigem:  
outra parte, linguagem.*

*Traduzir uma parte na  
outra parte - que é uma  
questão de vida e morte  
- será arte?”*

*(Ferreira Gullar)*

## RESUMO

O acidente causado pela serpente *Lachesis muta muta* é grave e o seu veneno é responsável por uma série de alterações sistêmicas, como a hipotensão arterial. Neste trabalho, foram investigados os efeitos renais do veneno total desta serpente em sistema de perfusão renal e em cultura de células tubulares renais do tipo MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, cujos rins foram isolados e perfundidos com Solução de Krebs-Hanseleit contendo 6%p/v de albumina bovina previamente dialisada. Foram investigados os efeitos do veneno (10 µg/mL; n=6) sobre a Pressão de Perfusão (PP), Resistência Vascular Renal (RVR), Fluxo Urinário (FU), Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa<sup>+</sup>), de Potássio (%TK<sup>+</sup>) e de Cloreto (%TCl<sup>-</sup>). O veneno da *Lachesis muta muta* foi adicionado após 30 minutos de controle interno. As células MDCK foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal e então avaliadas na presença do veneno total da serpente *Lachesis muta muta* nas concentrações 1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL. Após 24 horas de experimento, foram realizados ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular. O veneno total, na dose de 10µg/mL, causou redução transitória na pressão de perfusão ( $C_{60} = 108,27 \pm 4,88$  mmHg; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $88,17 \pm 5,27^{\#}$  mmHg;  $C_{90} = 108,69 \pm 5,08$  mmHg; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $78,71 \pm 6,94^{\#\#}$  mmHg) e na resistência vascular renal ( $C_{60} = 5,57 \pm 0,49$  mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $3,50 \pm 0,22^{\#}$  mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;  $C_{90} = 5,32 \pm 0,57$  mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $3,11 \pm 0,26^{\#\#}$  mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) além de aumento do fluxo urinário ( $C_{60} = 0,158 \pm 0,015$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $0,100 \pm 0,012^{\#}$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;  $C_{120} = 0,160 \pm 0,020$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $0,777 \pm 0,157^{\#\#}$ ) e do ritmo de filtração glomerular ( $C_{60} = 0,707 \pm 0,051$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $0,232 \pm 0,042^{\#}$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;  $C_{120} = 0,697 \pm 0,084$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $1,478 \pm 0,278^{\#\#}$  mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). A dose estudada também promoveu redução significativa do percentual de transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>) nos três períodos analisados (30, 60 e 90 minutos), com conseqüente aumento do clearance osmótico ( $C_{osm}$ ) ( $C_{90} = 0,141 \pm 0,011$ ; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $0,309 \pm 0,090$ ;  $C_{120} = 0,125 \pm 0,016$ ; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $0,839 \pm 0,184^{\#\#}$ ). A avaliação histopatológica revelou a presença de áreas focais com células com núcleos picnóticos nos túbulos renais dos rins perfundidos com veneno. O veneno também apresentou efeito citotóxico sobre as células MDCK apenas nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL reduzindo a viabilidade destas células a  $38,60 \pm 17,9\%$  e  $10,62 \pm 2,9\%$ , respectivamente. Estes resultados demonstram que o veneno total da *Lachesis muta muta* alterou todos os parâmetros renais avaliados na perfusão renal, induzindo hipotensão transitória e intensa diurese. O veneno também possui ação citotóxica sobre as células MDCK após 24 horas de incubação.

**Palavras-chave:** *Lachesis muta*. Toxicidade. Rim.



## ABSTRACT

The accident caused by the snake *Lachesis muta muta* is serious and its venom is responsible for many systemic changes, such as hypotension. In this work, the renal effects of the total venom of this snake in the renal perfusion system and in cultured renal tubular cells of the type MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) are investigated. Isolated kidneys from Wistar rats, weighing 250 to 300g, were perfused with previously dialysed, Krebs-Henseleit solution containing 6% w/v bovine albumin. The effects of the venom (10 mg / mL, n = 6) on the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), sodium tubular transport (%TNa<sup>+</sup>), potassium tubular transport (%TK<sup>+</sup>) and chloride tubular transport (%TCl<sup>-</sup>) were submitted to analysis. *Lachesis muta muta* venom was added to the system after 30 minutes of internal control. MDCK cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum and then assessed in the presence of the total venom of the snake *Lachesis muta muta* in the concentrations of 1µg/mL, 10µg/mL and 100µg/mL 24 hours afterwards, tests concerning viability and cellular cytotoxicity were brought about. The total venom (10µg/mL) promoted a transient reduction in perfusion pressure ( $C_{60} = 108.27 \pm 4.88$ ; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $88.17 \pm 5.27^{\#}$ ;  $C_{90} = 108.69 \pm 5.08$ ; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $78.71 \pm 6.94^{\#\#}$ ) and renal vascular resistance ( $C_{60} = 5.57 \pm 0.49$ ; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $3.50 \pm 0.22^{\#}$ ;  $C_{90} = 5.32 \pm 0.57$ ; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $3.11 \pm 0.26^{\#\#}$ ); increase in urinary flow ( $C_{60} = 0.158 \pm 0.015$ ; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $0.100 \pm 0.012^{\#}$ ;  $C_{120} = 0.160 \pm 0.020$ ; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $0.777 \pm 0.157^{\#\#}$ ) and in glomerular filtration rate ( $C_{60} = 0.707 \pm 0.051$ ; VT *L. m. muta*<sub>60</sub> =  $0.232 \pm 0.042^{\#}$ ;  $C_{120} = 0.697 \pm 0.084$ ; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $1.478 \pm 0.278^{\#\#}$ ). Such a concentration also reduced significantly sodium tubular transport (%TNa<sup>+</sup>), potassium tubular transport (%TK<sup>+</sup>) and chloride tubular transport (%TCl<sup>-</sup>) in the three periods analyzed (30, 60 and 90 minutes), with a consequent increase in the osmotic clearance ( $C_{osm}$ ) ( $C_{90} = 0.141 \pm 0.011$ ; VT *L. m. muta*<sub>90</sub> =  $0.309 \pm 0.090$ ;  $C_{120} = 0.125 \pm 0.016$ ; VT *L. m. muta*<sub>120</sub> =  $0.839 \pm 0.184^{\#\#}$ ). Histological analysis of the kidneys perfused with the poison revealed focal areas of renal tubular cells with nuclear pyknosis. The venom also promoted a cytotoxic effect on MDCK cells at concentrations 10µg/mL and 100µg/mL, thus reducing the viability of these cells to  $38.60 \pm 17.9\%$  and  $10.62 \pm 2.9\%$ , respectively. These results demonstrate that the venom of *Lachesis muta muta* altered all the renal parameters assessed in renal perfusion, inducing transient hypotension and intense diuresis. The venom also exhibits cytotoxic activity on MDCK cells after 24 hours of incubation.

**Keywords:** *Lachesis muta*. Toxicity. Kidney.

## LISTA DE FIGURAS

1.	Principais características de diferenciação entre as serpentes peçonhentas e não peçonhentas (MS/FUNASA, 2001) .....	18
2.	Distribuição dos casos de acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero envolvido no acidente .....	20
3.	Exemplar da espécie <i>Lachesis muta</i> .....	22
4.	Composição protéica do veneno total da <i>Lachesis muta</i> .....	27
5.	Sistema de perfusão de rim isolado. Fonte: LFAVET - UFC .....	40
6.	Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado. Fonte: LFAVET - UFC .....	41
7.	Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6) .....	42
8.	Valores registrados pelo fluxômetro (L/min.) durante a calibração do sistema (n=6). .....	43
9.	Valores de volume de solução (mL/min.) registrados durante a calibração do sistema (n = 6) .....	43
10.	Administração de manitol (100mg/mL – 3mL independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado .....	44
11.	Identificação e dissecação do ureter (A) e ureter canulado (B) .....	45
12.	Visualização da artéria mesentérica (A), da artéria renal (B) e também da artéria aorta (C) .....	46
13.	Canulação da artéria renal realizada através da artéria mesentérica .....	46
14.	Rim de rato isolado no sistema de perfusão .....	47
15.	Fluxograma do cultivo e tratamento das células MDCK .....	53
16.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> na pressão de perfusão (PP). .....	58
17.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> na resistência vascular renal (RVR).....	59
18.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no fluxo urinário (FU). .....	60

19.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no ritmo de filtração glomerular (RFG).....	61
20.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa <sup>+</sup> ). .....	62
21.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK <sup>+</sup> ). .....	63
22.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ). .....	64
23.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa <sup>+</sup> ). .....	65
24.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK <sup>+</sup> ). .....	66
25.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl <sup>-</sup> ). .....	67
26.	Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> no <i>clearance</i> osmótico (C <sub>osm</sub> ). .....	68
27.	Aspecto morfológico normal dos rins do grupo controle (rins esquerdo) analisado através de microscopia óptica (n=6; aumento de 400x e coloração de hematoxilina-eosina) .....	69
28.	Aspecto morfológico dos rins perfundidos com o veneno total da serpente <i>Lachesis muta muta</i> (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se a presença focal de células com núcleos picnóticos (setas) (n=6; aumento de 400x e coloração de hematoxilina-eosina) .....	70
29.	Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente <i>Lachesis muta muta</i> sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK). Ensaio com MTT.....	72
30.	Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da <i>Lachesis muta muta</i> sobre a integridade da membrana das células tubulares renais (MDCK). Ensaio da atividade LDH. ....	73

## LISTA DE TABELAS

1. Valores de pressão de perfusão (PP) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*. ..... 58
2. Valores da Resistência Vascular Renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*. ..... 59
3. Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 60
4. Valores do ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*. ..... 61
5. Valores do percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 62
6. Valores do percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 63
7. Valores do percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl<sup>-</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 64
8. Valores do percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 65
9. Valores do percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 66
10. Valores do percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl<sup>-</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*..... 67
11. Valores do *clearance* osmótico (C<sub>osm</sub>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta*. ..... 68
12. Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK). Ensaio com MTT..... 72
13. Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* sobre a integridade da membrana das células tubulares renais (MDCK). Ensaio da atividade LDH..... 74
14. Alterações vasculares, urinárias e eletrolíticas apresentadas por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em rim isolado de rato ..... 78

## LISTA DE QUADROS

1. Cálculos para determinação dos parâmetros funcionais renais ..... 49

## ABREVIATURAS

±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg	Micrograma
α	Alfa
°C	Grau(s) centígrado(s)
%	Porcentagem
%TCI <sup>-</sup>	Percentual de cloro tubular total transportado
%pTCI <sup>-</sup>	Percentual de cloro tubular proximal transportado
%TK <sup>+</sup>	Percentual de potássio tubular total transportado
%pTK <sup>+</sup>	Percentual de potássio tubular proximal transportado
%TNa <sup>+</sup>	Percentual de sódio tubular total transportado
%pTNa <sup>+</sup>	Percentual de sódio tubular proximal transportado
AMPc	Adenosina 3', 5' – Monofosfato Cíclica
ANOVA	Análise de varância
BPPs	Peptídios potenciadores da bradicinina
C <sub>60</sub>	Valores do controle no período de 60 minutos
C <sub>90</sub>	Valores do controle no período de 90 minutos
C <sub>120</sub>	Valores do controle no período de 120 minutos
CNP	Peptídio natriurético do tipo c
C <sub>osm</sub>	<i>Clearance</i> osmótico
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase - 1
COX-2	Ciclooxigenase - 2
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECI <sup>-</sup>	Cloreto excretado
EK <sup>+</sup>	Potássio excretado
ENa <sup>+</sup>	Sódio excretado
E.P.M	Erro padrão médio
et al.	...e colaboradores
FLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
FLA <sub>2</sub> s	Fosfolipases A <sub>2</sub>
FU	Fluxo urinário
g	Gramas (s)
h	Hora(s)
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência Renal Aguda
KDa	Kilodalton
L	Litro (s)
LAAO	L-Aminoácido Oxidase
LAAOs	L-Aminoácido Oxidases
LFAVET	Laboratório de Farmacologia em Venenos e Toxinas
LmTX-I	Fosfolipase A <sub>2</sub> básica do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
min. ou min	Minuto (s)
mL	Millilitros

<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases da matriz extracelular
<b>MDCK</b>	Células tubulares renais do tipo Madin-Darby Canine Kidney
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintetase
<b>PAF</b>	Fator de Agregação Plaquetária
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub> ou prostaciclina
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PP</b>	Pressão de Perfusão
<b>p/v</b>	Peso/volume
<b>RFG</b>	Ritmo de Filtração Glomerular
<b>R<sub>T</sub></b>	Resistência elétrica transepitelial
<b>RVR</b>	Resistência Vascular Renal
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SVMPs</b>	Metaloproteinases dos Venenos das Serpentes
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Troboxano A <sub>2</sub>
<b>WEB 2086</b>	Triazolobenzodiazepina
<b>UI</b>	Unidade (s) Internacional (is)
<b>VT <i>L. m. muta</i></b>	Veneno Total da serpente <i>Lachesis muta muta</i>
<b>VT <i>L. m. muta</i><sub>60</sub></b>	Valores do efeito do veneno no período de 60 minutos
<b>VT <i>L. m. muta</i><sub>90</sub></b>	Valores do efeito do veneno no período de 90 minutos
<b>VT <i>L. m. muta</i><sub>120</sub></b>	Valores do efeito do veneno no período de 120 minutos
<b>VWF</b>	Fator de Von Willebrand
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Íon zinco

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Serpentes peçonhentas brasileiras.....</b>	<b>21</b>
1.2.1 O Gênero <i>Lachesis</i> .....	22
<b>1.3 Composição dos venenos ofídicos.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 O veneno Laquético .....	26
<b>1.4 Aspectos clínicos do acidente ofídico e suas complicações.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5 Fisiopatologia da injúria renal e seus mediadores.....</b>	<b>32</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Perfusão de rim isolado de rato .....</b>	<b>39</b>
4.1.1 Animais de experimentação .....	39
4.1.2 Substâncias utilizadas .....	39
4.1.3 Preparo da solução perfusora .....	39
4.1.4 O sistema de perfusão renal .....	40
4.1.5 Calibração do sistema de perfusão de rim isolado de rato.....	42
4.1.6 Técnica cirúrgica .....	44
4.1.7 Protocolo experimental.....	47
4.1.8 Análises bioquímicas.....	48
4.1.9 Cálculo dos parâmetros funcionais renais.....	48
4.1.10 Análise histológica.....	50
4.1.11 Grupos experimentais .....	50
4.1.12 Análise estatística.....	51
<b>4.2 Aspectos éticos.....</b>	<b>51</b>



<b>4.3 Cultura de células tubulares renais (MDCK).....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Linhagem celular .....	52
4.3.2 Cultivo e tratamento das células MDCK.....	52
4.3.3 Avaliação da atividade do veneno total sobre as células MDCK.....	54
4.3.3.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	54
4.3.3.2 Ensaio para atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).....	54
4.3.4 Análise estatística.....	55
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Perfusão de rim isolado de rato .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Análise histológica dos grupos da perfusão renal .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Avaliação da atividade do veneno total sobre as células MDCK .....</b>	<b>71</b>
5.3.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	71
5.3.2 Ensaio para atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).....	73
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>9 ANEXO.....</b>	<b>99</b>

# 1 INTRODUÇÃO

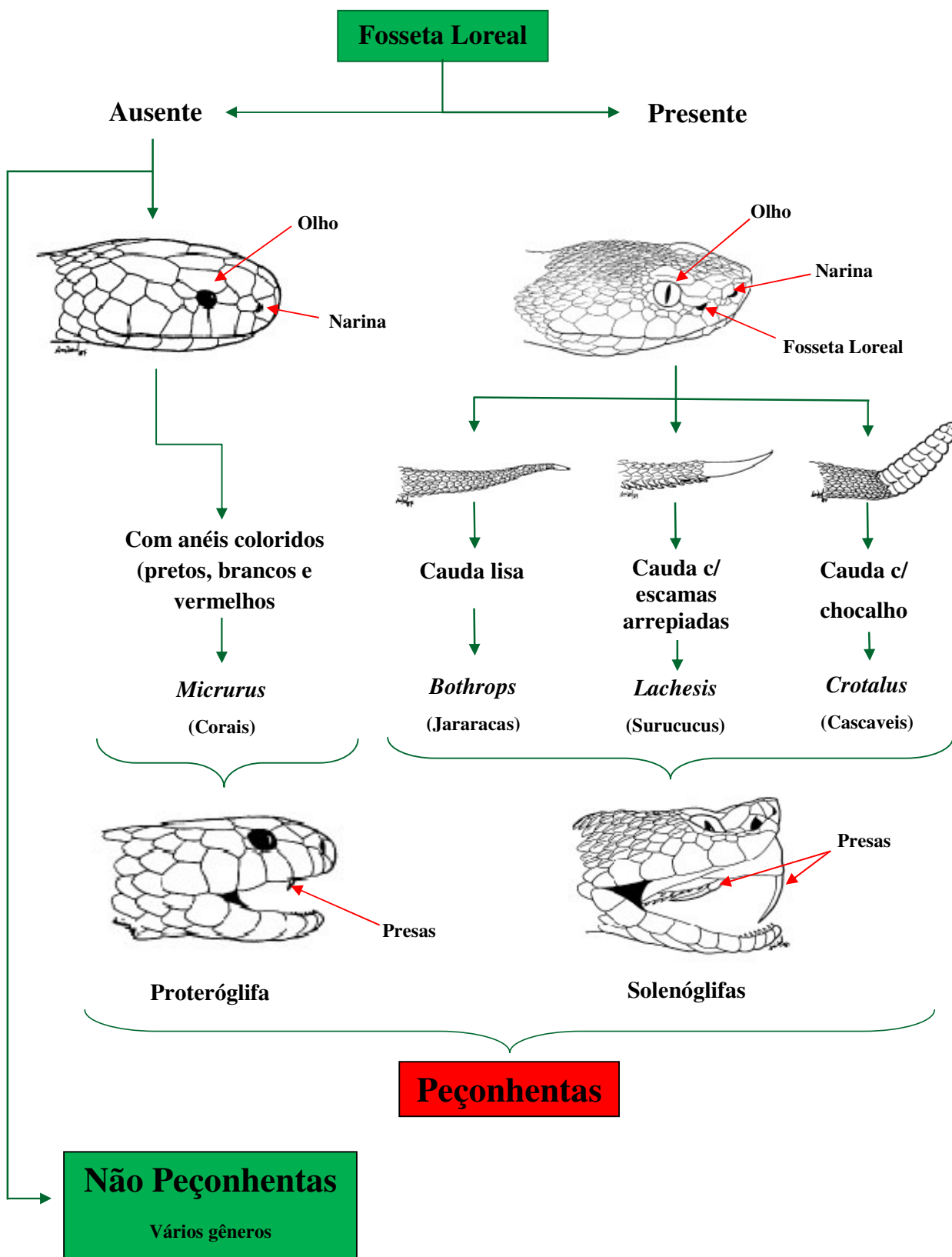
## 1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

Os venenos são encontrados em várias espécies de seres vivos, desde organismos unicelulares a pássaros (RUSSEL e DART, 1991; DUMBACHER *et al.*, 2000). De acordo com a presença ou a ausência de estruturas especializadas para injetá-lo, estes organismos podem ser classificados como animais peçonhentos ou não-peçonhentos, respectivamente.

Nos primeiros, o veneno é produzido por glândulas especializadas como um complexo enzimático de finalidades principalmente digestivas com atividades tóxicas que neutralizam e matam a presa durante a captura, acrescido de um efeito defensivo contra predadores (INSTITUTO BUTANTAN, 1996). 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 parte deles, são parcial ou totalmente tóxicos e que não possui mecanismo ou estrutura para a liberação de veneno (RUSSEL e DART, 1991).

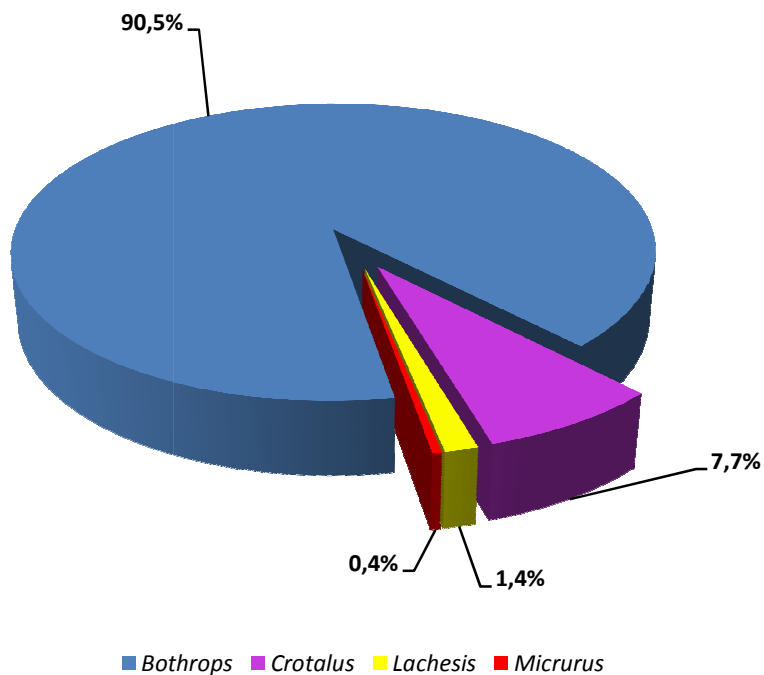
Dentre as serpentes existem algumas diferenças anatômicas que possibilitam a distinção entre as peçonhentas e as não-peçonhentas. No entanto, a presença de fosseta loreal indica com segurança que a serpente é peçonhenta. Esta e outras características anatômicas podem ser visualizadas na **figura 1**.



**Figura 1** - Principais características de diferenciação entre as serpentes peçonhentas e não peçonhentas (MS/FUNASA, 2001).

O valor real da incidência dos acidentes por picadas de serpentes permanece desconhecido, seja por falta de registro ou por metodologia deficiente na captação dos dados (LIZANO *et al.*, 2003). A organização mundial de saúde estima que ocorram no mundo cerca de 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas anualmente. Destes acidentes, ocorrem cerca de 125.000 mortes (CHIPPAUX, 1998).

Em nosso país, os primeiros cuidados historicamente dispensados a pessoas picadas por serpentes foram tomados por Vital Brazil, registrando óbitos decorrentes de acidentes ofídicos na região de Botucatu, no estado de São Paulo, onde posteriormente se desenvolveu os maiores centros de criação de serpentes e produção de soro antiofídico, como o Instituto Butantan (BENCHIMOL; TEIXEIRA, 1993). Os dados mais recentes sobre acidentes ofídicos no Brasil revelam que de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 foram notificados 81.611 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 20.000 casos/ano (CASTRO, 2006; MS/FUNASA, 2001). Dos acidentes atribuídos a serpentes peçonhentas, 0,4% foram por espécies do gênero *Micrurus* (elapídico), 1,4% por espécies do gênero *Lachesis*, 7,7% pelas do gênero *Crotalus* e 90,5% por espécies do gênero *Bothrops* (**Figura 2**). Deve ser feita a ressalva de que há subnotificação, principalmente no Norte, ou seja, tanto o número de casos como o percentual atribuído a cada gênero pode variar bastante. Outro fato relevante é que esse percentual deve variar de região para região, dada a dimensão continental do nosso país e a variação de biomas existentes (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001).



**Figura 2** - Distribuição dos casos de acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero envolvido no acidente. (Fonte: MS/FUNASA, 2001)

No Ceará, os dados epidemiológicos sobre acidentes ofídicos revelam elevada variação anual no número de casos, variando de 387 a 61 casos por ano. A Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará registrou, entre 1987 e 1990, 1256 casos, com 18 óbitos e letalidade de 1,4% (CEARÁ, 1991).

FEITOSA *et al.* (1997), observaram a notificação de 688 casos no período de 1992 a 1995, acometendo pessoas do sexo masculino em 75% dos casos, na faixa etária entre 10 e 49 anos em 72% das ocorrências. Houve uma sazonalidade com os acidentes ocorrendo nos meses de Abril a Setembro. A maioria dos acidentes foi provocada por serpentes do gênero *Bothrops*, 88,3%, seguida pelas do gênero *Crotalus*, 10,7%, *Micrurus*, 0,9% e *Lachesis*, 0,2%

Os dados apresentados até aqui mostram que tanto no Ceará quanto no Brasil a maior prevalência de casos de acidentes ofídicos envolveu o gênero *Bothrops* visto ser populacionalmente mais numérica e possuir grande adaptabilidade a áreas devastadas, o que em si já eleva as estatísticas dos acidentes humanos (HARDY *et al.*, 1998). No Ceará, os acidentes botrópicos

representaram 88,3% do total, estatística bem próxima aos 90,5% encontrados nacionalmente. É interessante notar que o gênero *Lachesis* a nível nacional contribui com 1,4% do total de acidentes, mas no Ceará ele representa apenas 0,2% dos casos. Por se tratar de serpentes encontradas apenas em faixas preservadas de mata atlântica e ilhas úmidas como as que ocorrem no maciço de Baturité, onde a densidade populacional é baixa, os acidentes provocados por estes animais são pouco observados.

Os acidentes ofídicos representam, portanto, um sério problema de saúde pública, principalmente em países tropicais, o que inclui toda a América Latina. Nos países em desenvolvimento os acidentes por animais peçonhentos devem ser tratados com bastante relevância, não apenas pelo número de pacientes que evoluem para o óbito, mas também pelos casos que resultam em morbidades crônicas associadas com amputações, deformidades, falência renal, e suas conseqüências socioeconômicas (LIZANO *et al.*, 2003; WHO, 1981).

## 1.2 Serpentes peçonhentas brasileiras

Calcula-se que existam cerca de 3000 espécies de serpentes no mundo, das quais 410 são venenosas e peçonhentas (BARRAVIERA, 1993). No Brasil existem 358 espécies, distribuídas em 78 gêneros. As três principais famílias de serpentes existentes em nosso país são a *Colubridae*, a *Elapidae* e a *Viperidae*, das quais apenas as duas últimas possuem importância epidemiológica (MS/FUNASA, 1998; 2001).

A família *Elapidae* é composta de 18 espécies, todas incluídas no gênero *Micrurus*. À família *Viperidae*, pertencem os gêneros, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Bothrops* (conhecida popularmente como jararaca ou urutu), *Crotalus* (vulgarmente chamada de cascavel ou maracambóia) e *Lachesis* (também conhecida como surucucu), dos quais apenas os três últimos adquirem importância epidemiológica. Os representantes desta família possuem a cabeça triangular com escamas e fosseta loreal. Os dentes inoculadores de veneno são grandes e implantados no osso maxilar superior situado na parte anterior (RAGE, 1977).

### 1.2.1 O Gênero *Lachesis*

Esse gênero é representado por três espécies: a *Lachesis muta* encontrada na América do Sul, a *Lachesis stenophrys* encontrada na América Central e *Lachesis melanocephala* endêmica na Costa Rica. São as maiores serpentes venenosas do hemisfério ocidental atingindo em média de 2 a 2,5 metros quando adultas, embora, não surpreendentemente, possam atingir mais de 3 metros. Também são as únicas serpentes da família *Viperidae* a por ovos (SANZ *et al.*, 2008).

No Brasil, a única espécie encontrada é a *Lachesis muta* (**Figura 3**), subdividida em duas subespécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctivaga* (BARRAVIERA, 1997). Estão distribuídas pelas grandes florestas tropicais brasileiras, como a Zona da Mata Atlântica e a Floresta Amazônica, embora haja registro de acidentes e captura desta espécie em regiões serranas úmidas do Ceará (FEITOSA *et al.*, 1997; MS/FUNASA, 1998; 2001). Tem um padrão de cor marrom amarelado, com grandes manchas triangulares pretas, as quais apresentam uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçada (GRANTSAU, 1991). São conhecidas como surucucu, surucucu pico de jaca ou surucutinga.



**Figura 3** - Exemplar da espécie *Lachesis muta*.

Fonte: (<http://www.flickr.com/photos/sanjayveiga/2657632100/>)

### 1.3 Composição dos venenos ofídicos

O veneno representa uma importante inovação durante o processo evolutivo das serpentes. Ele possibilitou a transição de um modo mecânico (construção) para um modo químico de dominar e digerir grandes presas. Na verdade o veneno apresenta múltiplas funções como imobilização, paralisação, morte e digestão da presa (AIRD, 2002).

O veneno das serpentes contém uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características individuais variam com a espécie (VARANDA; GIANNINI, 1994). De modo geral, a peçonha das serpentes é constituída por três grupos de compostos: proteínas; compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos.

As proteínas representam cerca de 90% do peso seco dos componentes orgânicos (BON, 1997), que incluem ainda carboidratos, lipídios (especialmente fosfolipídios) e aminas biogênicas (VARANDA, GIANNINI, 1994). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados. Desta forma, são encontrados entre aqueles com atividade enzimática, as fosfolipases  $A_2$  ( $FLA_2$ ), relacionadas à produção de derivados do ácido aracônico (SIX; DENNIS, 2000), as metaloproteinases, responsáveis pela proteólise das membranas basais dos vasos, as trombina símiles que ativam fatores da coagulação, transformam o fibrinogênio em fibrina e induzem a agregação plaquetária (SANTOS *et al.*, 2000), e as L-aminoácido oxidases que induzem ou inibem a agregação plaquetária além de promover apoptose (DU; CLEMETSON, 2002).

As fosfolipases  $A_2$  compõem uma superfamília de enzimas definidas por sua habilidade de catalisar a hidrólise do éster ligado à posição central (sn-2) de glicerofosfolipídios de membrana celulares, liberando precursores de mediadores químicos relacionadas ao processo inflamatório (CHACUR *et al.*, 2003).

Em um mesmo veneno são encontradas uma variedade de  $FLA_2$  que podem possuir atividade neurotóxica, citotóxica, cardiotoxica, miotóxica, hipotensiva, pró-



inflamatória, coagulante ou agregante de plaquetas, com características moleculares de estrutura quaternária monomérica ou multiméricas, homo ou heterodiméricas, ligadas por pontes dissulfídicas, tóxicas ou não tóxicas, cataliticamente ativas ou não. Todas são dependentes de cálcio para atuar e os resíduos da alça de ligação ao cálcio são particularmente conservados (MURAKAMI e ARNI, 2003).

Estruturalmente são reconhecidos três tipos diferentes: a) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49, que catalisam a hidrólise do éster ligado à posição sn-2 do glicerofosfolipídio (Asp49); b) as variantes, também denominadas proteínas semelhantes a FLA<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub> símile) por serem estruturalmente semelhantes, mas destituídas de atividade enzimática, contendo lisina em substituição ao ácido aspártico (Lys49) (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003); c) variantes com serina ocupando a posição 49 (Ser49), (KRIZAJ *et al.*, 1991; POLGÁR *et al.*, 1996), as duas últimas enzimaticamente inativas (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

*In vitro* as fosfolipases A<sub>2</sub> apresentam efeitos na placa neuromuscular, atividade citolítica que se expressa pela ruptura de lipossomos compostos de fosfolípidios carregados negativamente (SOARES *et al.*, 2000), induzem degranulação de mastócitos com conseqüente aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (LANDUCCI, *et al.*, 1998), além de provocarem lesão renal em sistema de rim isolado de rato (BARBOSA *et al.*, 2002).

Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as fosfolipases A<sub>2</sub> desestabilizam os fosfolípidios das membranas celulares e induzem lesão da membrana celular, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

As metaloproteinases, por sua vez, participam do remodelamento do tecido conectivo no processo de cicatrização das feridas dos seres humanos (MITCHELL, 2005). Nos venenos das serpentes além de lesarem as células endoteliais, contribuindo para a hemorragia local ou sistêmica (RUIZ DE TORRENT *et al.*, 1999), facilitam a disseminação do veneno a partir do local da inoculação (ANAI *et al.*,

2002), onde contribuem com a mionecrose, a dermonecrose, a formação de bolhas e a inflamação (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

A especificidade de substrato das metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) é muito semelhante ao das metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal da microvasculatura (TANJONI *et al.*, 2003), a qual, quando rompida, deixa extravasar sangue, constituindo o mecanismo fisiopatológico da hemorragia provocada pelas SVMPs (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). Uma das SVMPs bem estudada, a jararhagina, isolada do veneno da *B. jararaca*, é um dos principais componentes responsáveis pela hemorragia. Além de degradar a matriz extracelular, também atua em proteínas plasmáticas da coagulação importantes para a hemostasia (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (DU, CLEMETSON, 2002). São enzimas largamente distribuídas em diferentes microorganismos tais como bactérias, fungos, algas verdes e venenos de serpentes. Nestes, supõe-se que sejam toxinas, ainda que seu modo de ação não esteja esclarecido (STABELI *et al.*, 2004).

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

As lectinas também denominadas lectinas do tipo-C são proteínas não enzimáticas encontradas em muitos animais vertebrados, moluscos, vegetais, bactérias e cogumelos (KILPATRICK, 2002), que se ligam não covalentemente a mono ou oligossacarídeos de modo dependente de cálcio.

As lectinas do tipo-C que perderam a capacidade de se ligar a carboidratos são encontradas somente em venenos de serpentes (OGAWA *et al.*, 2005), como

por exemplo, o fator X, ativador da coagulação sanguínea, do veneno da *Vipera russeli* e são, portanto, denominadas lectinas símiles. De fato, a maioria das lectinas do tipo C isoladas dos venenos de serpentes não consegue se ligar a carboidrato e não podem ser consideradas verdadeiras lectinas (DRICKAMER, 1999; MORITA, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2003), sendo, portanto, denominadas lectinas símiles.

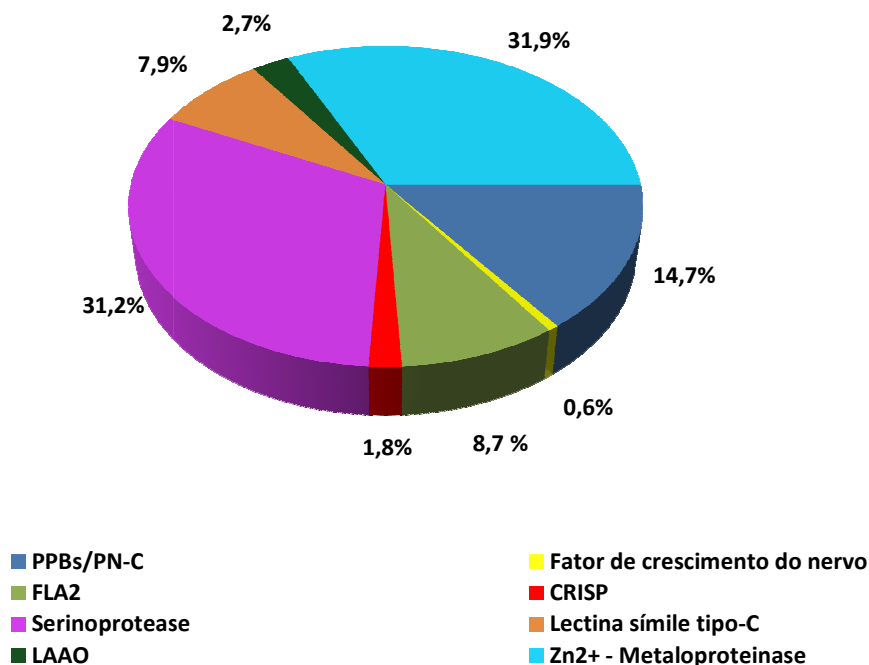
Nos mamíferos as lectinas então envolvidas na aderência celular a outras células e à matriz extracelular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). As dos venenos das serpentes, quando injetadas em outros animais, podem aglutinar hemácias *in vitro*, estimular mitose em linfócitos, provocar agregação plaquetária, induzir edema, liberar cálcio dos estoques intracelulares e inibir a proliferação de algumas linhagens de células (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). Também podem se ligar ao fator de Von Willebrand (VWF) e induzir sua interação com a glicoproteína plaquetária Ib. Outras, ao contrário, ligam-se à glicoproteína plaquetária Ib impedindo o VWF de mediar a agregação plaquetária, ou inibem a coagulação por formar complexos não covalentes com os fatores IX e IXa, X e Xa, bloqueando sua participação na cascata da coagulação, e algumas interagem diretamente com a trombina inibindo suas funções de agregação de plaquetas, quebra do fibrinogênio e ativação da coagulação (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Por fim, os componentes inorgânicos mais encontrados são elementos como o cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIDERICH; TU, 1991). Alguns atuam como estabilizadores de proteínas, outros, participam dos mecanismos catalíticos de componentes enzimáticos (BJARNASON; FOX, 1994).

### 1.3.1 O veneno Laquético

O veneno Laquético, bem como os demais, é constituído principalmente por componentes de natureza protéica que são agrupados em poucas famílias de proteínas. Sendo assim, as proteínas encontradas no veneno da *Lachesis muta* são distribuídas em 8 famílias diferentes: Peptídios potenciadores da bradicinina (BPPs), fatores de crescimento do nervo, fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), serinoproteases, proteínas

secretórias ricas em cisteína (CRISP), lectinas símile do tipo-C, L - aminoácido oxidase (LAAO) e metaloproteinases dependente de  $Zn^{2+}$  (SANS *et al.*, 2008). A contribuição de cada uma destas famílias para a composição protéica do veneno laquéutico pode ser vista na **figura 4**.



**Figura 4 - Composição protéica do veneno total da *Lachesis muta*.** Os dados estão expressos como percentual relativo das proteínas totais do veneno. BPPs/PN-c - Peptídios potenciadores da bradicinina/ Peptídio natriurético C; FLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub>; LAAO - L-aminoácido oxidase; CRISP - Proteína secretória rica em cisteína. Adaptado de SANS *et al.*, 2008.

Como visto anteriormente, 31,9 % da composição protéica do veneno da *Lachesis muta* é composto por metaloproteinases. Dado semelhante também pode ser observado na peçonha da *Lachesis stenophrys* onde estas proteínas contribuem com cerca de 38,2% da sua composição protéica. As metaloproteinases são largamente responsáveis pela síndrome hemorrágica observada nos envenenamentos por serpentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

No veneno laquétrico há pelo menos duas metaloproteinases bem conhecidas: o LHF-I (fator hemorrágico I), que é uma proteína ácida, de alto peso molecular (100 kDa), com alta atividade hemorrágica (RUCAVADO *et al.*, 1999) e o LHF-II (fator hemorrágico II), proteína de 22 kDa e com fraca atividade hemorrágica. Comumente, estas metaloproteinases são chamadas de hemorraginas. A combinação de desfibrinação e lesão direta da parede do vaso podem levar a hemorragias maciças e potencialmente fatais (WARRELL, 1989). Algumas metaloproteinases de veneno inibem a coagulação do sangue. A maioria das metaloproteinases são fibrinogenases e elas clivam peptídeos da região C terminal do fibrinogênio. São classificadas em a e b-fibrinogenases, de acordo com sua especificidade pela cadeia do fibrinogênio. A a-fibrinogenase inibe a coagulação do sangue porque o fibrinogênio "truncado" não forma um coágulo de fibrina tão forte como o fibrinogênio nativo. Desta forma, uma sutil destruição física do fibrinogênio leva à ação anticoagulante das metaloproteinases.

As serinoproteases também estão em grande quantidade no veneno da *Lachesis muta*, mais precisamente, contribuem com 31,2% da sua composição total (SANZ *et al.*, 2008). Entre as proteínas desta família, as ativadoras da proteína C exibem efeitos anticoagulantes diretos. Fisiologicamente, o zimogênio da Proteína C circulante no sangue é ativado pela trombina. A Proteína C ativada inibe os fatores V e VIII ativados e, conseqüentemente, as vias intrínsecas e comuns da cascata de coagulação. Outro grupo de serinoproteases, as trombina símile, depletam o fibrinogênio e tornam o plasma incoagulável.

É importante lembrar que na peçonha laquétrica observou-se tanto atividade agregadora plaquetária quanto anti-agregante plaquetária, esta última muito em função de uma desintegrina detectada no veneno. Nos acidentes usualmente há consumo de fator V e fibrinogênio, além de fatores II, VIII, IX e X, mas a contagem de plaquetas permanece normal, eventualmente em função dos compostos trombina símile, que induzem consumo de fibrinogênio sem gerar trombocitopenia.

O veneno laquétrico também apresenta acentuada ação do tipo cininogenase – ação hipotensiva (DINIZ *et al.*, 2004; FELICORI *et al.*, 2003; WEINBERG *et al.*, 1992). Nele são encontradas enzimas chamadas cininogenases que atuam sobre o cininogênio endógeno do plasma, liberando peptídeos vasoativos como a bradicinina

e as calicreínas, responsáveis em parte pela queda da pressão arterial (HAAD, 1980; GIOVANI-DE-SIMONE *et al.*, 1997). O precursor inativo das calicreínas é o calicreinogênio, encontrado no plasma e pâncreas e que pode ser ativado pela plasmina ou fatores de coagulação.

Os peptídeos potenciadores da bradicinina estão presentes em abundância nos venenos do gênero *Lachesis*. No veneno de *Lachesis muta* representam 14,7% dos componentes protéicos (SANZ *et al.*, 2008). Tratam-se de oligopeptídeos com ação inibitória tanto sobre a metabolização da bradicinina, quanto sobre a conversão de angiotensina I em II. (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949; SOARES *et al.*, 2005).

SOARES *et al.* (2005), através de técnicas de biologia molecular e análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF) revela a ocorrência de cinco novos BPPs (*Lm*-BPP 1, *Lm*-BPP 2, *Lm*-BPP 3, *Lm*-BPP 4 e *Lm*-BPP 5) e um peptídeo natriurético tipo-C (*Lm*-CNP) no veneno de *Lachesis muta*. Segundo estes autores, todos estes peptídeos teriam uma mesma proteína precursora plurifuncional.

As FLA<sub>2</sub>s, juntamente com outras toxinas, são responsáveis pela ação inflamatória do veneno laquéico. Além da miotoxicidade, as FLA<sub>2</sub>s (Asp-49-atividade catalítica e Lys-49- sem atividade catalítica) têm se mostrado capazes de desencadear diferentes eventos inflamatórios (edema de pata, de pele, degranulação de mastócitos, aumento da permeabilidade vascular) em modelos experimentais. Alguns estudos indicam que os efeitos inflamatórios induzidos pelas FLA<sub>2</sub>s são, pelo menos em parte, independentes da capacidade de mobilizar o ácido araquidônico e iniciar a biossíntese de eicosanóides, uma vez que a injeção de FLA<sub>2</sub> inativas cataliticamente (Lys-49) induz a formação de edema e a degranulação de mastócitos, apoiando a teoria da dissociação entre as atividades catalítica e farmacológica. Estas FLA<sub>2</sub>s sem atividade catalítica desencadeariam uma forte atividade inflamatória através de uma região formada por resíduos de aminoácidos carregados positivamente (região catiônica - interação com membrana). A atividade catalítica ou o conteúdo de carga positiva da proteína de várias FLA<sub>2</sub>s têm sido postulados como o principal elemento implicado na atividade inflamatória delas.

DAMICO *et al.* (2006), purificou e caracterizou funcionalmente uma FLA<sub>2</sub> básica (*LmTX-I*) presente no veneno de *Lachesis muta muta* classificada como cataliticamente ativa (Asp49). Seus achados revelaram que a *LmTX-I* possui ação neurotóxica dominante em preparação neuromuscular de pintinhos, enquanto a atividade miotóxica foi principalmente observada na maior concentração estudada (30µg/mL).

#### **1.4 Aspectos clínicos do acidente ofídico e suas complicações**

Nos acidentes envolvendo as serpentes do gênero *Bothrops* os pacientes de um modo geral apresentam dor e edema no local da picada, ambas de caráter progressivo, equimose (extravasamento de sangue para os tecidos) e sangramento, podendo também ocorrer bolhas e necrose na área afetada. Náuseas, vômitos, sudorese, hemorragia, efeitos no sistema nervoso como mialgia e paralisia, dor abdominal, insuficiência renal aguda (IRA), hipotensão arterial e, mais raramente, choque, podem também acometer o paciente acidentado. Estes sintomas e complicações podem variar dependendo do tipo de acidente que pode ser classificado como leve, moderado ou grave (SITPRIJA, 2006; SANTORO *et al.*, 2008; MS/FUNASA, 2001).

O acidente crotálico embora ocorra em menor número apresenta o maior coeficiente de letalidade devido à frequência com que evolui para a insuficiência renal aguda. São responsáveis por uma mortalidade de até 11% nos casos tratados com soro específico, e de 72% nos casos não tratados (ROSENFELDE, 1991). O quadro clínico é caracterizado por manifestações locais pouco importantes, como dor de pequena intensidade ou ausente e parestesia local acompanhada de edema discreto ou eritema no local da picada. Mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência ou inquietação, secura da boca e mialgias podem aparecer precocemente. Também podem ocorrer incoagulabilidade sangüínea ou aumento do Tempo de Coagulação (TC) em aproximadamente 40% dos pacientes além de manifestações neurológicas como ptose palpebral, flacidez da musculatura da face e incapacidade de movimentação do globo ocular (oftalmoplegia). A principal complicação do acidente crotálico, é a IRA, com necrose tubular geralmente de instalação nas primeiras 48 horas (MS/FUNASA, 2001; RIBEIRO *et al.*, 1998).

O envenenamento elapídico em alguns aspectos é semelhante ao crotálico. É caracterizado por dor local discreta, acompanhada na maioria das vezes por parestesia. Pode ocorrer vômito em um primeiro momento, com posterior fraqueza muscular progressiva, ocorrendo ptose palpebral, oftalmoplegia e a presença de fácies miastênica (MS/FUNASA, 2001).

Os envenenamentos provocados por *Lachesis* são pouco comuns, mas muito severos. Após a inoculação do veneno, a primeira hora de evolução é dramática, semelhante à do choque hipovolêmico, com hipotensão severa nos primeiros 30-45 minutos de evolução, hipotermia, vômito, diarreia e alterações sensoriais. Ocasionalmente, sinais neurotóxicos estão presentes (DINIZ e OLIVEIRA, 1992).

De acordo com a severidade do acidente ou sensibilidade do paciente podem ocorrer complicações sistêmicas como bradicardia, choque cardiovascular, incoagulabilidade sanguínea, hemólise e distúrbios renais (FRANÇA e FAN, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2003; RUCAVADO *et al.*, 1999).

Embora o veneno laquético exerça ação proteolítica por ação direta de proteases e metaloproteinases, quadro eventualmente agravado por isquemia frente a alterações tromboembólicas e torniquete, a necrose no local da picada é pouco freqüente no acidente com *Lachesis muta* quando a soroterapia ocorre em até três horas após a inoculação do veneno.

O quadro hemorrágico observado no acidente laquético é causado por toxinas chamadas hemorraginas. Vale notar que em venenos que apresentam ambas as atividades (hemorrágica e coagulante), como os de *Bothrops* e *Lachesis*, seus componentes atuam em sinergismo, disparando quadro de hemorragia local e sistêmica (ESTÊVÃO-COSTA *et al.*, 2000; RUCAVADO *et al.*, 1999; SOUZA, *et al.*, 2001; SANCHEZ *et al.*, 2003).

Os sintomas clínicos provocados pelos acidentes com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* apresentam várias semelhanças (de MOURA *et al.*, 1998). Como reflexo dessa semelhança sintomática, surgem problemas clássicos, como o visto na região Norte, em que a diferenciação dos acidentes causados por *Bothrops atrox* e *Lachesis muta* é um grande problema para o tratamento do acidente ofídico daquela região (COLOMBINI, 2003). Acidentes na região Amazônica com ação local



francamente proteolítica remetem mais ao gênero *Bothrops*. (HARDY *et al.*, 1998). O diagnóstico diferencial entre estas duas espécies, com base nos sintomas do paciente é muito difícil e o soro antibotrópico não neutraliza bem a toxicidade do veneno laquético (BOLAÑOS *et al.*, 1982).

Os acidentes laquéticos são classificados como moderados e graves, não existindo, portanto a classificação: acidente leve. Por serem serpentes de grande porte, considera-se que a quantidade de veneno por elas injetada seja muito grande - cerca de 400 mg potencialmente inoculáveis por animal adulto - o que aumenta a gravidade dos acidentes (BOLAÑOS *et al.*, 1972).

### **1.5 Fisiopatologia da injúria renal e seus mediadores**

O entendimento da fisiopatologia da injúria renal induzida por substância nefrotóxicas tem implicações para as terapias em potencial e para as medidas preventivas (SCHNELLMANN e KELLY, 1999). Muitos mediadores estão envolvidos neste processo e alguns deles serão descritos aqui.

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 é um produto gênico de resposta imediata nas células inflamatórias e imunes (FOEGH e RAMWELL, 2001).

O mecanismo de ação 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 PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, causam vasodilatação no rim e aumentam a liberação de renina (KRAMER *et al.*, 1985; FOEGH e RAMWELL, 2001).

A PGE<sub>2</sub>, um modulador importante da hemodinâmica renal, exerce efeitos diuréticos e natriuréticos (SCHNEIDER *et al.*, 2004). Em coelhos, as células renais capazes de produzir PGE<sub>2</sub> em quantidades significativas incluem: mácula densa, ductos coletores medulares e corticais e células intersticiais medulares, enquanto que os túbulos proximais produzem pouca PGE<sub>2</sub> (SCHNEIDER *et al.*, 2004).

A PGE<sub>1</sub>, a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> aumentam a excreção de água e de sódio (FOEGH e RAMWELL, 2001). A PGI<sub>2</sub> 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).

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 PGE<sub>2</sub>, sua biossíntese envolve múltiplas etapas enzimáticas e requer a ação seqüencial da fosfolipase A<sub>2</sub>, das ciclooxigenases e das PGE<sub>2</sub> sintetases (SCHNEIDER *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm mostrado que a produção de prostaglandinas regula a 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 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 NO 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  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  da medula renal, enquanto não tem efeito na enzima cortical.

A enzima  $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , 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  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  medular, sendo a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mais sensível ao 20-HETE do que a  $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (BELTOWSKI *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 fosfolípidios que contêm ácido araquidônico, produzindo uma 8-epi-PGF $2\alpha$  cujas propriedades poderosas se assemelham às do tromboxano (HONDEGHEM e RODEN, 2001).

A bradicinina é um 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 peptídeos renais que causariam o término da ação desse mediador (POMPERMAYER *et al.*, 2002).

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.

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 AMPc (HONDEGHEM 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 A1 – 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 AMPc e de outros mecanismos.

## 2 JUSTIFICATIVA

A ciência que se dedica ao estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas e animais é denominada Toxinologia e está em contínua expansão no Brasil e no mundo. Por estar envolvidas em mecanismos de defesa e possuírem, portanto, características de letalidade as toxinas são substâncias biologicamente ativas e exercem seus efeitos em quase todas as células e tecidos.

O conhecimento dos mecanismos de ação das toxinas e anti-toxinas animais e vegetais faz-se necessário para a busca de técnicas de diagnóstico, melhorias no tratamento do paciente envenenado e/ou para a descoberta de novos agentes terapêuticos (SOARES, 2005).

São diversos os grupos de organismos venenosos e peçonhentos. No entanto, uma das classes mais estudadas é a *Reptilia*, mais especificamente a subordem das *Serpentes* (ANDRADE-FILHO, 2001). Desde que ROCHA e SILVA, em 1949, descobriu a bradicinina utilizando o veneno da *Bothrops jararaca*, ficou claro a importância destas pesquisas.

Medicamentos de uso generalizado foram produzidos nesta linha, como os inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina). Inicialmente identificado como um fator potenciador da bradicinina (BPF) presente no veneno da *Bothrops jararaca* (AMORIM *et al.*, 1967; ROCHA e SILVA, 1965; FERREIRA, 1965), teve em seguida constatadas suas características de ação como inibidor das enzimas inativadoras da bradicinina (FERREIRA, 1965; FERREIRA, 1966; FERREIRA,

VANE, 1967), posteriormente da conversão da angiotensina I em angiotensina II (BAHKLE, 1968; BAHKLE; REYNARD; VANE, 1969), sendo finalmente sintetizado artificialmente (CUSHMAN *et al.*, 1977). O captopril é atualmente um dos antihipertensivos mais utilizados em todo o mundo (FERREIRA, 1998).

Pode ser citada ainda a toxina botulínica que é amplamente utilizada na medicina estética e em pacientes com patologias motoras. Outra droga é o *curare*, um alcalóide letal, que é um bloqueador neuromuscular e foi introduzido na prática da anesthesiologia em procedimentos cirúrgicos. Esse alcalóide serviu de protótipo para o desenvolvimento do relaxante muscular conhecido como atracúrio (HARVEY *et al.*, 1998).

A despeito da importância biológica e toxicológica do veneno da *Lachesis muta*, existem poucos estudos sobre o seu efeito, se comparados aos venenos de outras espécies do gênero *Bothrops* ou mesmo de outros gêneros da família Viperidae, como o *Crotalus*. Além disso, não existem estudos relativos à sua atividade biológica em rim isolado de rato.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos renais do veneno total da serpente *Lachesis muta muta* visando obter resultados que possam subsidiar a elucidação de seus mecanismos de ação fisiopatológicos, bem como buscar a descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou substâncias de valor terapêutico.

### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do veneno total da *Lachesis muta muta* em rim isolado;
- Avaliar as alterações renais histopatológicas provocadas pelo veneno total da *Lachesis muta muta*;
- Estudar o efeito do veneno total da *Lachesis muta muta* sobre a viabilidade e proliferação de células tubulares renais (MDCK).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Perfusão de rim isolado

#### 4.1.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, entre 250 e 300g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec<sup>®</sup>) e água “*ad libitum*”. Os mesmos foram mantidos em jejum durante as 12 horas que antecederam cada experimento apenas com água “*ad libitum*”.

#### 4.1.2 Substâncias utilizadas

Foi utilizado o veneno da serpente *Lachesis muta muta* na dose de  $10\mu\text{g/mL}$  (VT *L. m. muta*  $10\mu\text{g/mL}$ ) que foi gentilmente cedido pelo Dr. Marcus H. Toyama da UNESP.

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

A solução empregada nos experimentos foi a de Krebs-Henseleit modificada, contendo albumina bovina a 6% p/v e cujos componentes estão listados no anexo A.

#### 4.1.3 Preparo da solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20x, continha  $\text{NaCl} = 138\text{g}$ ,  $\text{KCl} = 7\text{g}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 3,2\text{g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} = 5,8\text{g}$  e  $\text{Uréia} = 10\text{g}$ . Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foram separados e acrescidos de  $\text{NaHCO}_3 = 4,2\text{g}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} = 0,74\text{g}$ , glicose = 2g, e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado

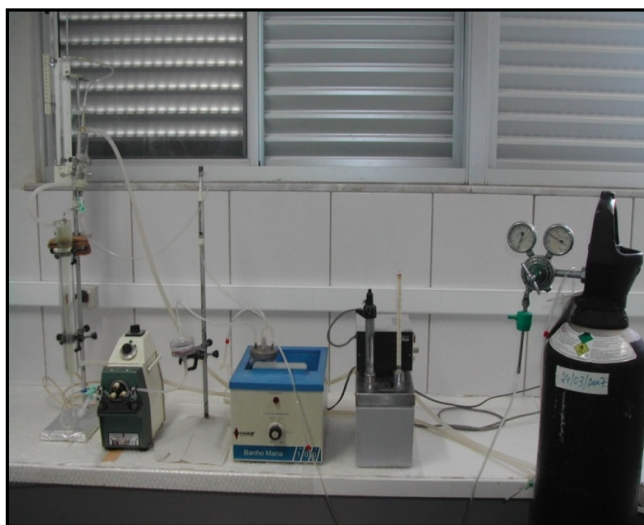


para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, aos qual se adicionou albumina bovina (6g%). Em seguida, solução foi dializada com albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (BALLARD, HANSON, 1968; COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

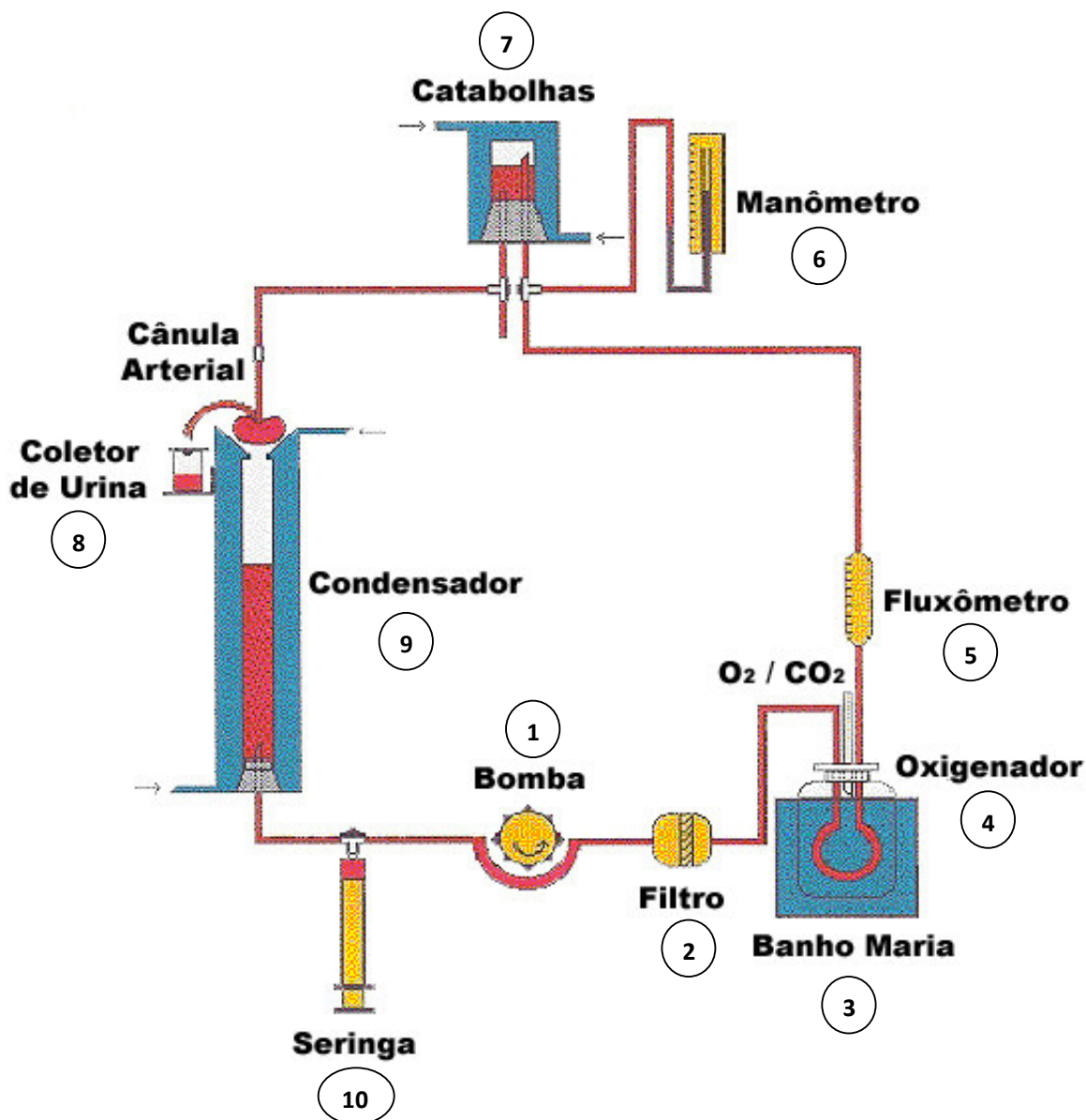
A solução de Krebs-Henseleit para a diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

#### 4.1.4 O Sistema de perfusão renal

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. Esta técnica permite o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas (NIZET, 1975). O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à temperatura de 37 °C. Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constante as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema como demonstrado nas **figuras 5 e 6**.



**Figura 5** - Sistema de perfusão renal. Fonte: LAFAVET - UFC



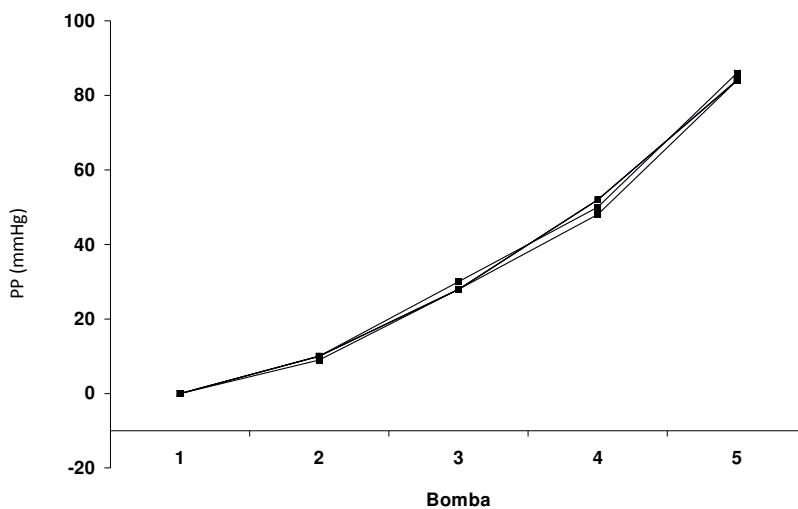
1 - Bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema.  
 2 - Filtração da solução perfusora (Millipore 5 $\mu$ m).  
 3 - Manutenção de uma temperatura constante do pulmão tipo silástico entre 36 e 37 °C.  
 4 - Promoção das trocas gasosas (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).  
 5 - medida do fluxo de perfusão (L/min).

6 - Medida da pressão de perfusão (mmHg).  
 7 - Evita a entrada de bolhas nos rins.  
 8 - Frasco que coleta a urina. É trocado a cada 10 minutos.  
 9 - Mantém a solução aquecida na temperatura de 37 °C durante todo o experimento.  
 10 - Seringa coletora de perfusato. A coleta é realizada a cada 10 minutos.

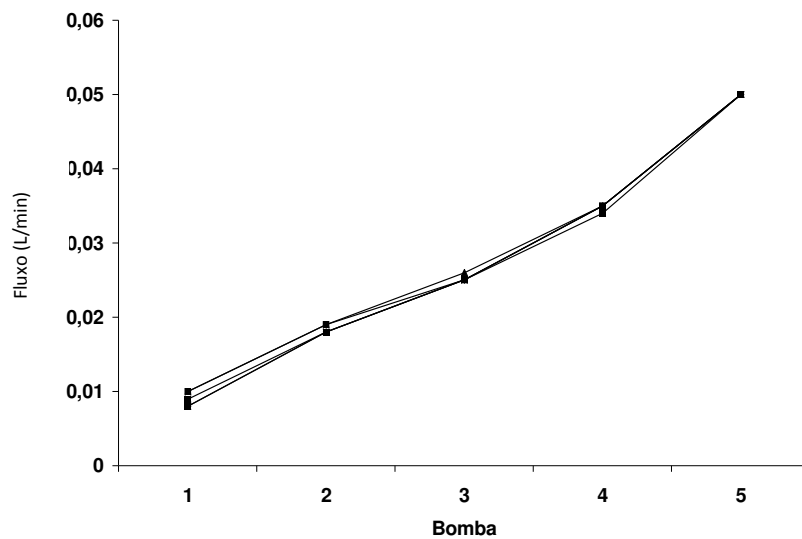
**Figura 6** - Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado. Fonte: LAFAVET – UFC.

#### 4.1.5 Calibração do sistema de perfusão de rim isolado de rato

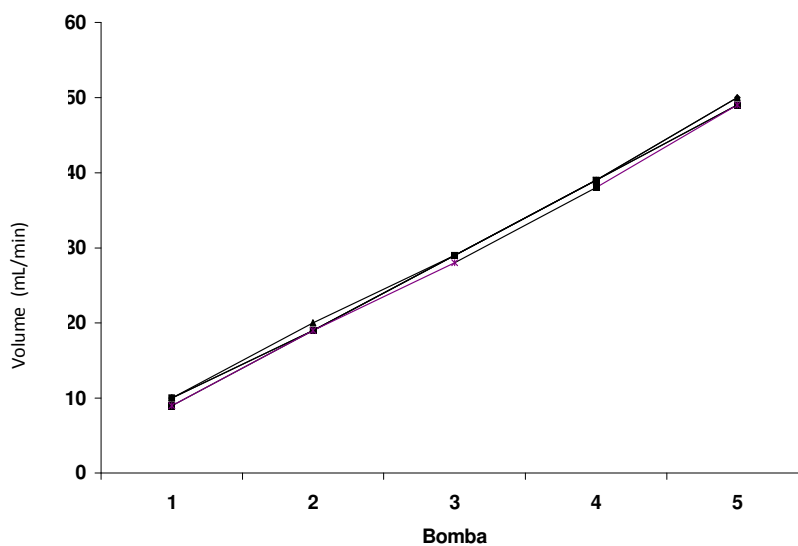
A calibração do sistema foi realizada antes de cada experimento com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foram observados para cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5) a pressão de perfusão (mmHg), o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As **figuras 7, 8 e 9** mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.



**Figura 7** - Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 8** - Valores registrados pelo fluxômetro (L/min.) durante a calibração do sistema (n=6).

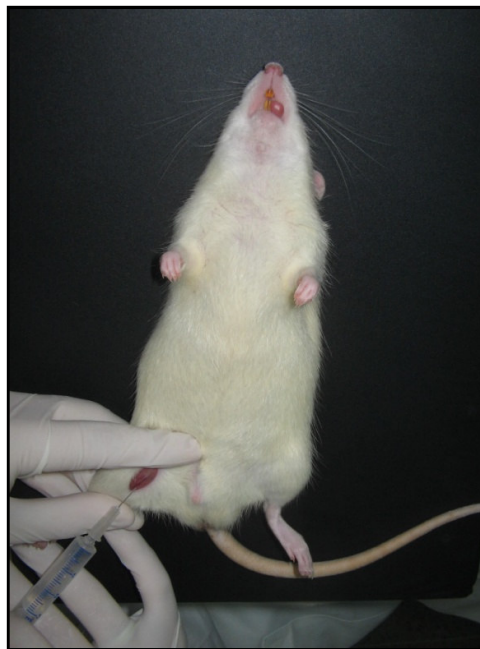


**Figura 9** - Valores de volume de solução (mL/min.) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

#### 4.1.6 Técnica cirúrgica

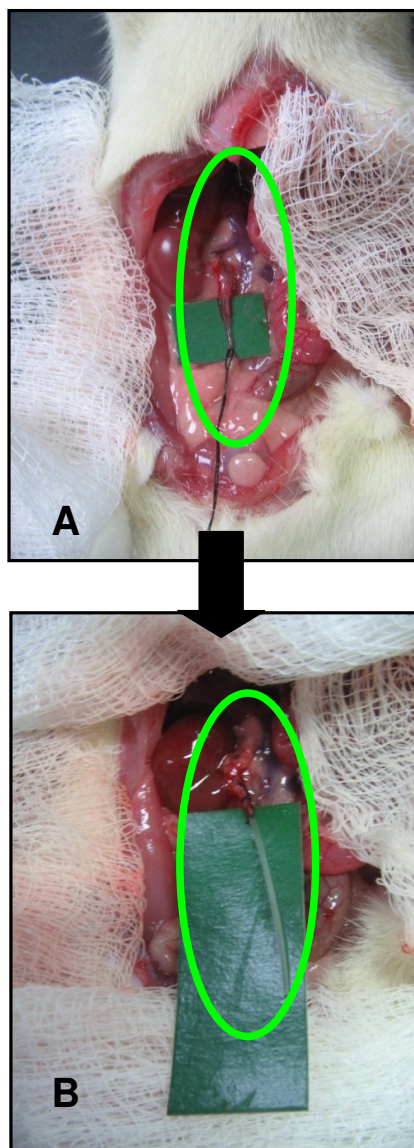
As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhmann *et al.* (1967); Nishiitsutji-Uwo *et al.* (1967); Ross, (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Os animais (n=6) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL independentemente do peso) foi administrado (**Figura 10**), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

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

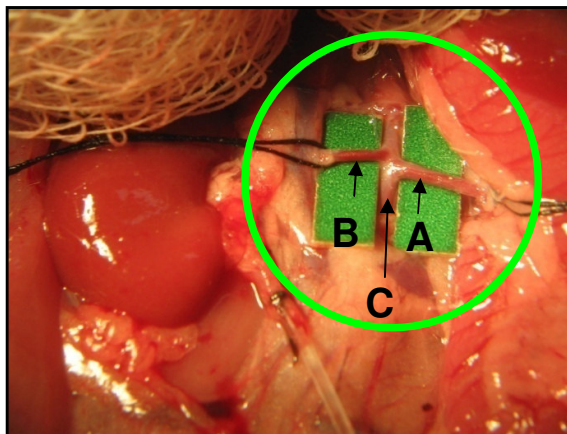


**Figura 10** - Administração de manitol (100mg/mL – 3mL independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado.

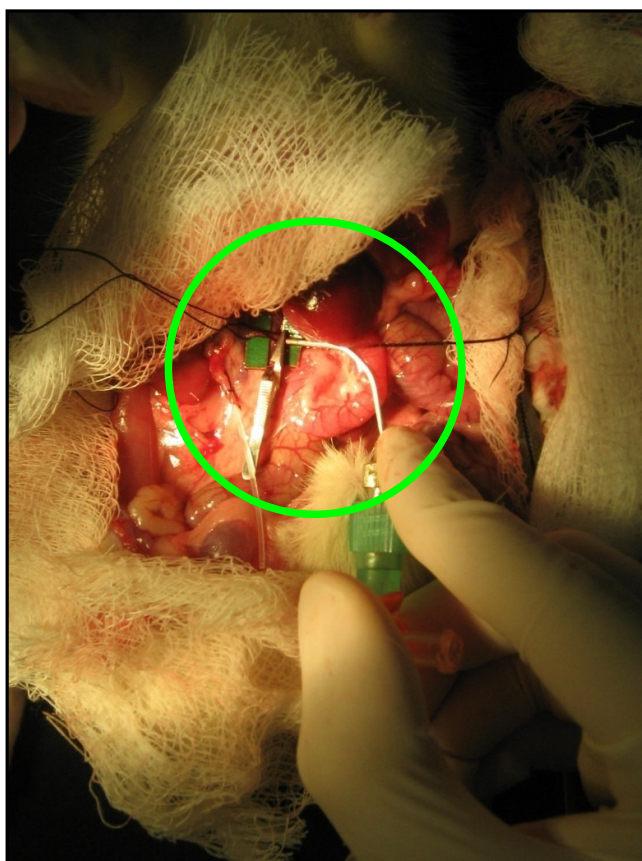
Com uma lupa (aumento de 7 vezes) o ureter foi identificado, dissecado e canulado – tubo de polietileno PE-30 (**Figura 11**), bem como a artéria mesentérica superior, artéria renal (**Figura 12**) e a glândula supra-renal identificadas. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Outra cânula metálica foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi fixada (**Figura 13**).



**Figura 11** - Identificação e dissecação do ureter (A) e ureter canulado (B).

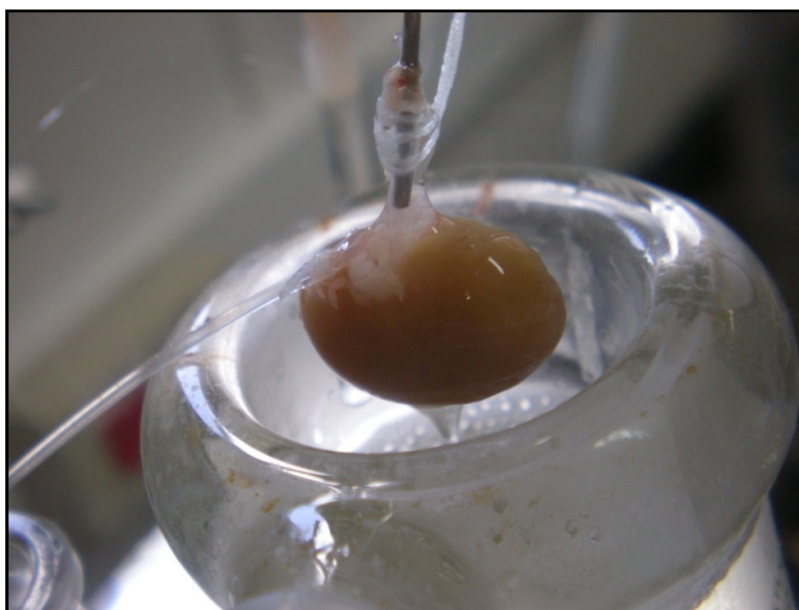


**Figura 12** - Visualização da artéria mesentérica (A), da artéria renal (B) e também da artéria aorta (C).



**Figura 13** - Canulação da artéria renal realizada através da artéria mesentérica.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (**Figura 14**).



**Figura 14** - Rim de rato isolado no sistema de perfusão.

#### 4.1.7 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Após os 30 minutos iniciais, considerados como controle interno, foi adicionada a substância-teste e observadas as mudanças nos parâmetros renais até os 120 minutos.

A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente. Amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos, e depois congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes no cálculo dos parâmetros da função renal.



#### 4.1.8 Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas determinações de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem 744 - Bayer® diagnóstica). Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme WALSER *et al.* (1955) e FONTELES *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Esse parâmetro foi determinado no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAFVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foram medidas utilizando um osmômetro (Osmômetro de Pressão a Vapor - modelo WESCOR® Vapro 5520). Esse parâmetro foi determinado, também, no LFAFVET.

#### 4.1.9 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

O **quadro 1** descreve as fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros funcionais renais avaliados (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

**1. FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo urinário**

FU = (Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo) x 10

**2. PP (mmHg) = Pressão de perfusão.** Leitura em manômetro**3. RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular**

RFG = (DOU in / DOP in x FU) sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato

**4. FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo de perfusão renal** (registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)**5. RVR (mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal**

RVR = PP (mmHg) / FPR

**6. FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado**

FNa<sup>+</sup> = RFG x PNa<sup>+</sup> (PNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio no perfusato)

**7. ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado**

ENa<sup>+</sup> = FU x UNa<sup>+</sup> (UNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio na urina)

**8. TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado**

TNa<sup>+</sup> = FNa<sup>+</sup> - ENa<sup>+</sup>

**9. %TNa<sup>+</sup> = Percentual de sódio transportado**

%TNa<sup>+</sup> = TNa<sup>+</sup> x 100 / FNa<sup>+</sup>

**10. %TpNa<sup>+</sup> = Percentual de sódio proximal transportado**

%TpNa<sup>+</sup> = TpNa<sup>+</sup> x 100 / FNa<sup>+</sup>

**11. FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio filtrado**

FK<sup>+</sup> = RFG x PK<sup>+</sup> (PK<sup>+</sup> = concentração de potássio no perfusato)

**12. EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio excretado**

EK<sup>+</sup> = FU x UK<sup>+</sup> (UK<sup>+</sup> = Concentração de potássio na urina)

**13. TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio transportado**

TK<sup>+</sup> = FK<sup>+</sup> - EK<sup>+</sup>

**14. %TK<sup>+</sup> = Percentual de potássio transportado**

%TK<sup>+</sup> = TK<sup>+</sup> x 100 / FK<sup>+</sup>

**15. %TpK<sup>+</sup> = Percentual de potássio proximal transportado**

%TpK<sup>+</sup> = TpK<sup>+</sup> x 100 / FK<sup>+</sup>

**16. TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto transportado**

TCl<sup>-</sup> = FCl<sup>-</sup> - ECl<sup>-</sup>

**17. %TCl<sup>-</sup> = Percentual de cloreto transportado**

%TCl<sup>-</sup> = TCl<sup>-</sup> x 100 / F TCl<sup>-</sup>

**18. %TpCl<sup>-</sup> = Percentual de cloreto proximal transportado**

%TpCl<sup>-</sup> = TpCl<sup>-</sup> x 100 / F TCl<sup>-</sup>

**19. Cosm (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Clearance osmótico**

[Uosm / Posm] x FU (onde Uosm = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)

**Quadro 1** - Cálculos para determinação dos parâmetros funcionais renais.

#### 4.1.10 Análise histológica

Após cada experimento, ambos, rim direito (perfundido) e rim esquerdo (controle), foram fixados numa solução de formal a 10%, para posterior análise histológica.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação, diafanização, e, em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON). Todas as lâminas foram confeccionadas e analisadas no Laboratório de Patologia-BIOPSE pelo Prof. Dr. Dalgimar Beserra De Menezes.

#### 4.1.11 Grupos experimentais

O estudo com o veneno total de *Lachesis muta muta* sobre a função renal foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos, e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

1. Grupo controle - perfusão somente com solução de Krebs-Henseleit (n=6);
2. Grupo tratado - Perfusão com o veneno total de *Lachesis muta muta* - 10µg/mL (n=6);

#### 4.1.12 Análise estatística

Foi usado o programa estatístico GraphPrism 5.0 para análise dos dados, que foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de seis experimentos em cada grupo.

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 de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos) e teste t de Student como comparativo entre os grupos controle e tratado. O critério de significância utilizado foi  $p < 0,05$ .

#### **4.2 Aspectos éticos**

Todos os nossos experimentos foram feitos de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 55/09.

### 4.3 Cultura de células tubulares renais (MDCK)

#### 4.3.1 Linhagem celular

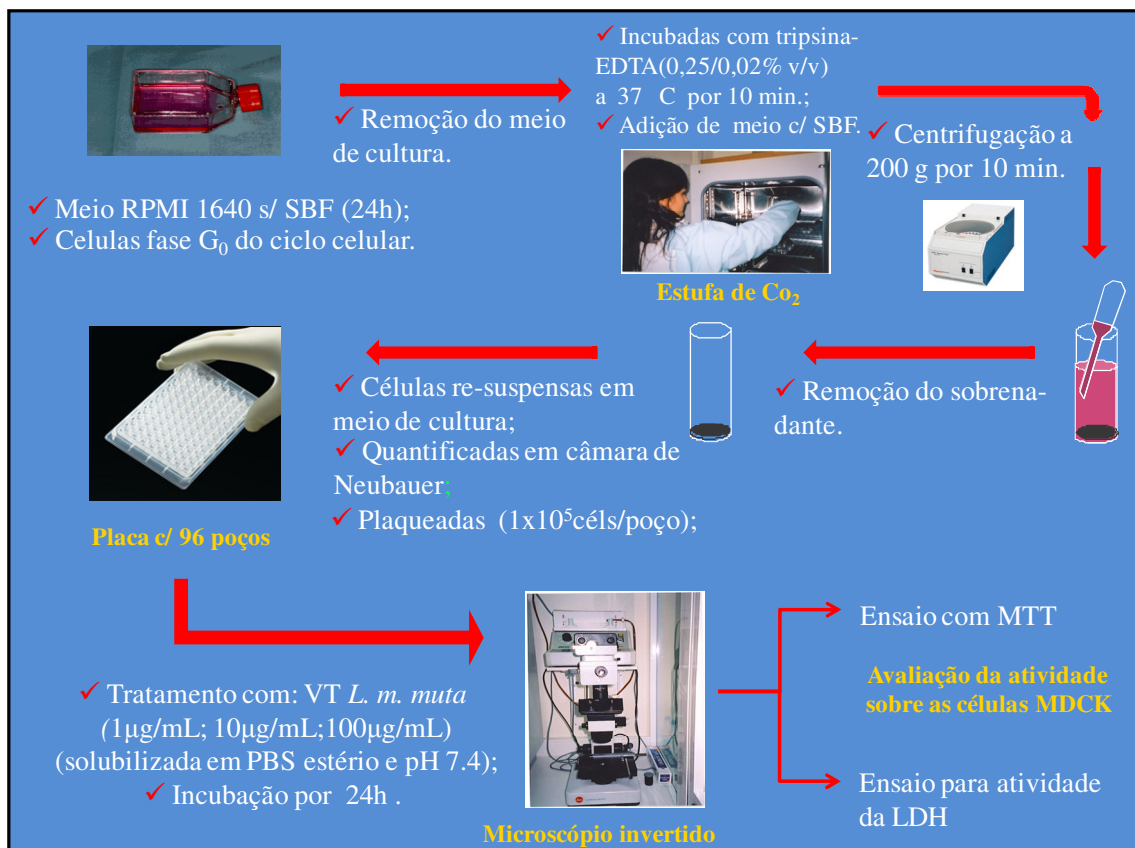
As células utilizadas foram células tubulares renais do tipo MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) que foram cultivadas no Laboratório de Cultura Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.3.2 Cultivo e tratamento das células MDCK

Foram cultivadas em garrafas de polietileno para cultura (volume de 250mL) e o meio de cultura usado foi o RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal (SBF), penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de cada experimento as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24h para a obtenção de células na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Para cada experimento o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10min. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF. A suspensão foi então centrifugada a 200g por 10min (MARTINS *et al.* 2005; CHAIM, 2005). O sobrenadante foi descartado e as células re-suspensas em meio de cultura. As células foram então quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (1x10<sup>5</sup>céls/poço) permitindo o crescimento confluyente por 2h.

As células foram então avaliadas na presença de diferentes concentrações do veneno total da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta* 1µg/mL; VT *L. m. muta* 10µg/mL; VT *L. m. muta* 100µg/mL), solubilizados em PBS estéril e pH 7.4. Durante cada experimento (24h) as placas foram avaliadas usando microscópio invertido. Após esse período também foram realizados ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular (**Figura 15**).

As alíquotas de células para estoque foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à -80°C e mantidas em nitrogênio líquido (Fresheney, 2000).



**Figura 15** - Fluxograma do cultivo e tratamento das células MDCK. Fonte: LCC – Laboratório de Cultivo Celular.

### 4.3.3 Avaliação da atividade do veneno total sobre as células MDCK

#### 4.3.3.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

As células MDCK foram adicionadas a placas de 96 poços com densidade de  $1 \times 10^5$  e tratadas com diferentes concentrações do veneno total da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta* 1µg/mL; VT *L. m. muta* 10µg/mL; VT *L. m. muta* 100µg/mL) por 24 horas. Após a exposição das células ao veneno, 100µL de sobrenadante de cada poço foi retirado e então adicionado 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) (Sigma) 2,5 mg/mL dissolvido em PBS. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (sal de formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 4 horas, à 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e então foi adicionado dodecil sulfato de sódio 10% (SDS – 10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram incubadas por 17h e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (570nm). Os ensaios foram realizados em triplicata (MOSMANN,1983) e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre as absorbâncias encontradas nos grupos tratados e a absorbância média do grupo controle (sem veneno; representa 100% de células viáveis).

#### 4.3.3.2 Ensaio para atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

Para avaliar a integridade de membrana no processo de morte celular, foi quantificada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta enzima é responsável pela redução do piruvato a lactato na presença do NADH. Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular pode indicar alteração na integridade da membrana plasmática. As células foram cultivadas em placas de 96 poços. Decorridas 24h do tratamento com as diferentes concentrações do veneno em estudo, 20µL do sobrenadante foi incubado com 1mL de uma solução de NADH e piruvato. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (340nm) e o decréscimo da absorbância foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática (RACHER *et al.*, 1990).

Os testes foram realizados utilizando o reagente analítico Labtest LDH Liquiform e foram seguidas as instruções do fabricante. A atividade da LDH foi determinada a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade LDH (UI/L)} = \frac{(\text{Absorbância 1} - \text{Absorbância 2}) \times F}{2}$$

F - fator do reagente informado pelo fabricante.

#### 4.3.4 Análise estatística

Foi usado o programa estatístico GraphPrism 5.0 para análise dos dados, que foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos em cada grupo realizados em triplicata .

Os dados foram avaliados através de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos). O critério de significância utilizado foi  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfusão de rim isolado

O veneno total da serpente *Lachesis muta muta* foi administrado 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 total da serpente *Lachesis muta muta* foi utilizado na dose de 10µg/mL e causou alterações na fisiologia renal, nos parâmetros de pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG).

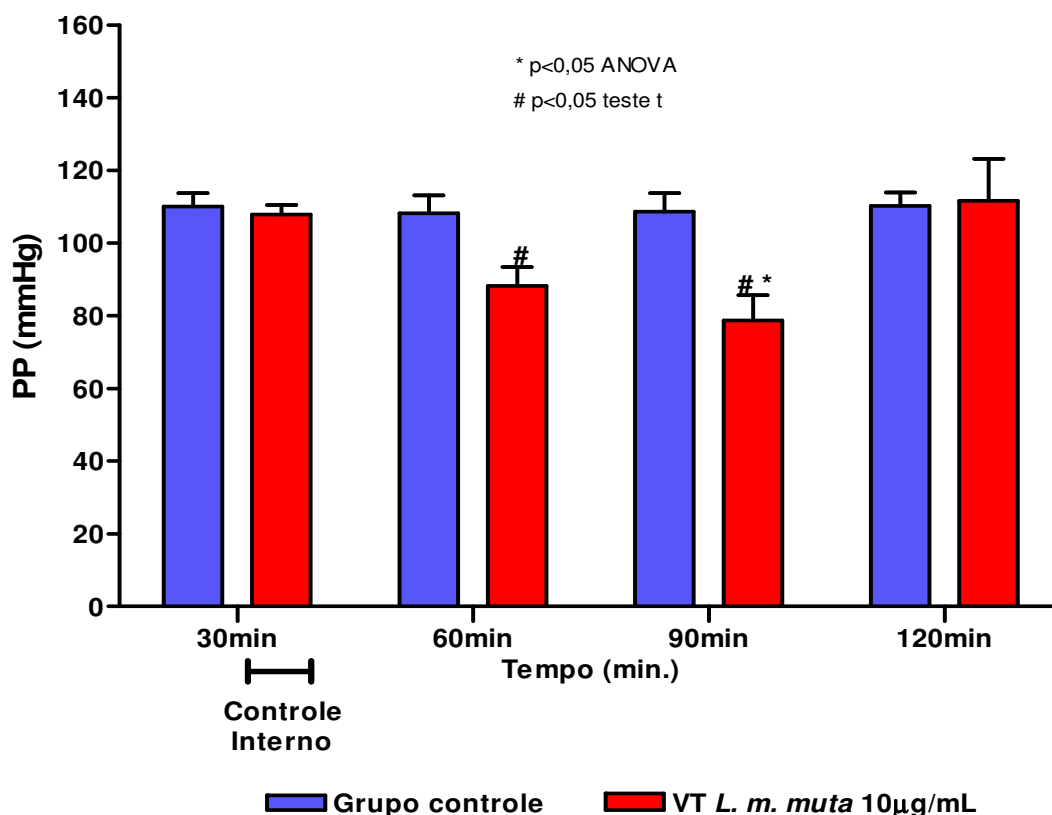
Foi observada redução significativa da PP nos períodos de 60 e 90 minutos (**Figura 16 e Tabela 1**). No parâmetro RVR também foi observada redução significativa nos períodos de 60 e 90 minutos (**Figura 17 e Tabela 2**). Quanto ao FU e RFG foi observada redução significativa destes parâmetros no período de 60 minutos e aumento significativo aos 120 minutos (**Figura 18 e Tabela 3; Figura 19 e Tabela 4**).

O percentual de transporte total de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>) foi significativamente reduzido após a administração do veneno total (10µg/mL) em todos os períodos analisados (**Figura 20 e Tabela 5; Figura 21 e Tabela 6; Figura 22 e Tabela 7**).

O percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>), de potássio (%pTK<sup>+</sup>) e de cloreto (%pTCl<sup>-</sup>) foi significativamente reduzido nos períodos de 30, 60 e 90 minutos após a adição do veneno (**Figura 23 e Tabela 8; Figura 24 e Tabela 9; Figura 25 e Tabela 7**).

Para verificar a capacidade de depuração do rim isolado em nível de moléculas osmoticamente ativas, realizou-se o cálculo do *clearance* osmótico ( $C_{osm}$ ).

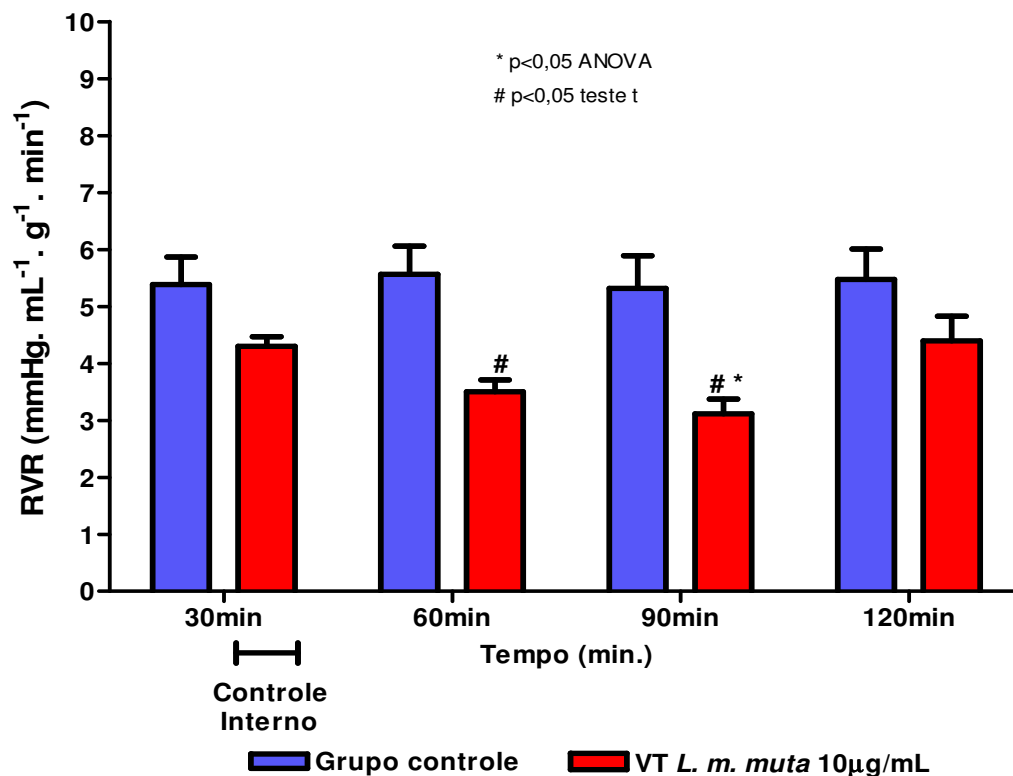
O veneno total (10 $\mu$ g/mL) promoveu aumento significativo deste parâmetro aos 120 minutos (**Figura 26 e Tabela 8**).



**Figura 16 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) na pressão de perfusão (PP).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	110,10	3,68	107,90	2,59
60	108,27	4,88	88,17 #	5,27
90	108,69	5,08	78,71 #*	6,94
120	110,28	3,69	111,60	11,63

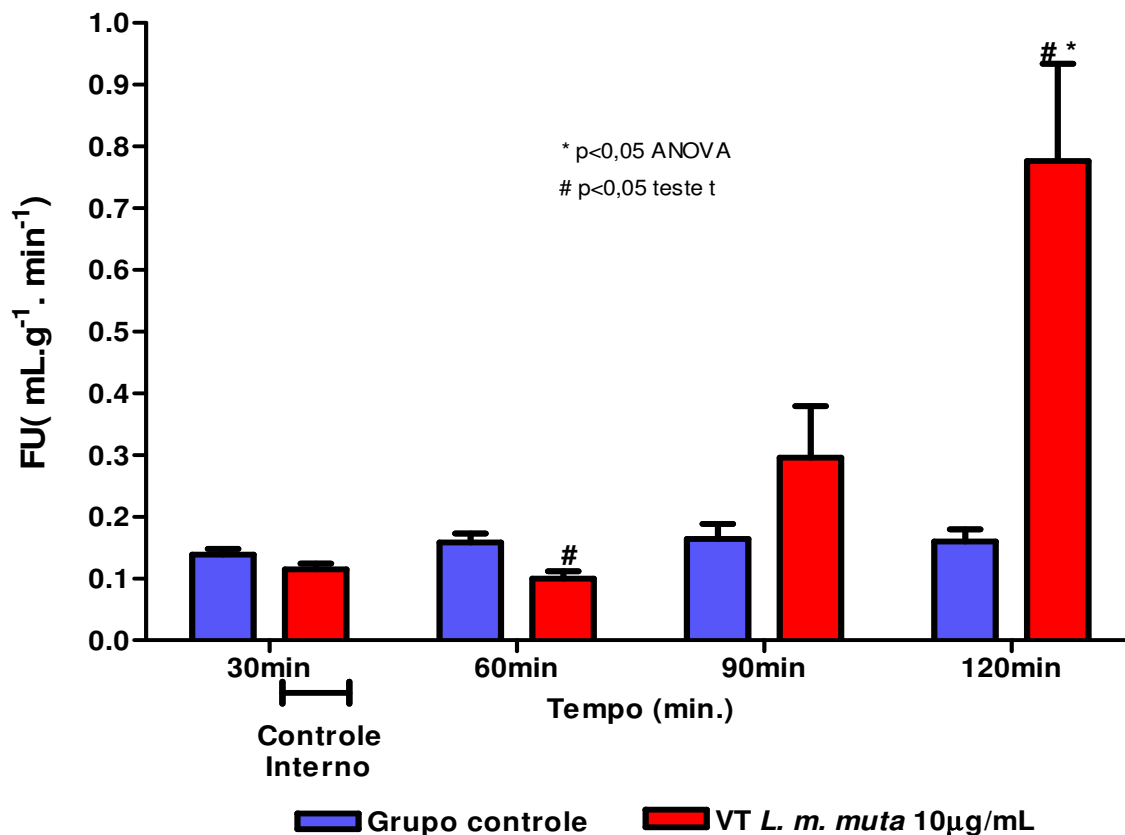
**Tabela 1 - Valores de pressão de perfusão (PP) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.



**Figura 17 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) na resistência vascular renal (RVR).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	4,30	0,17
60	5,57	0,49	3,50 #	0,22
90	5,32	0,57	3,11 #*	0,26
120	5,48	0,53	4,40	0,43

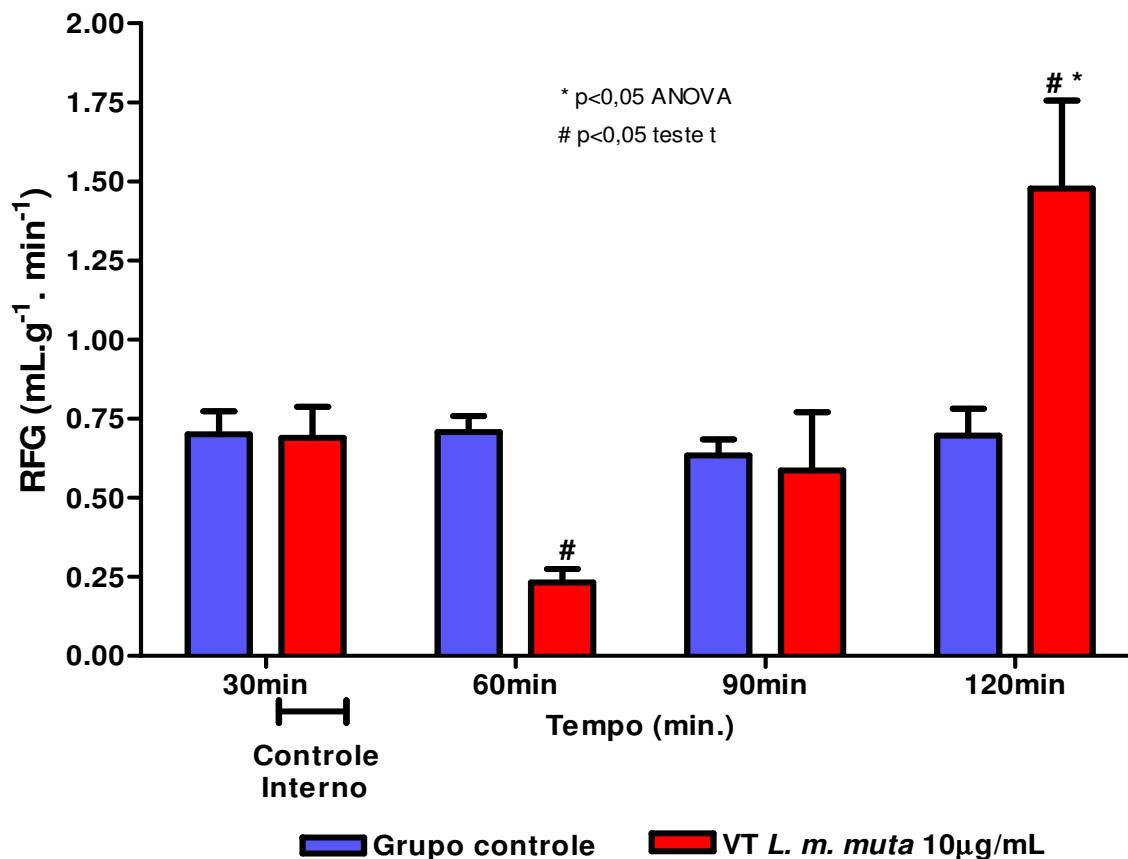
**Tabela 2 - Valores da Resistência Vascular Renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.



**Figura 18 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no fluxo urinário (FU).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo(n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,139	0,009	0,115	0,009
60	0,158	0,015	0,100 #	0,012
90	0,164	0,024	0,296	0,084
120	0,160	0,020	0,777 #*	0,157

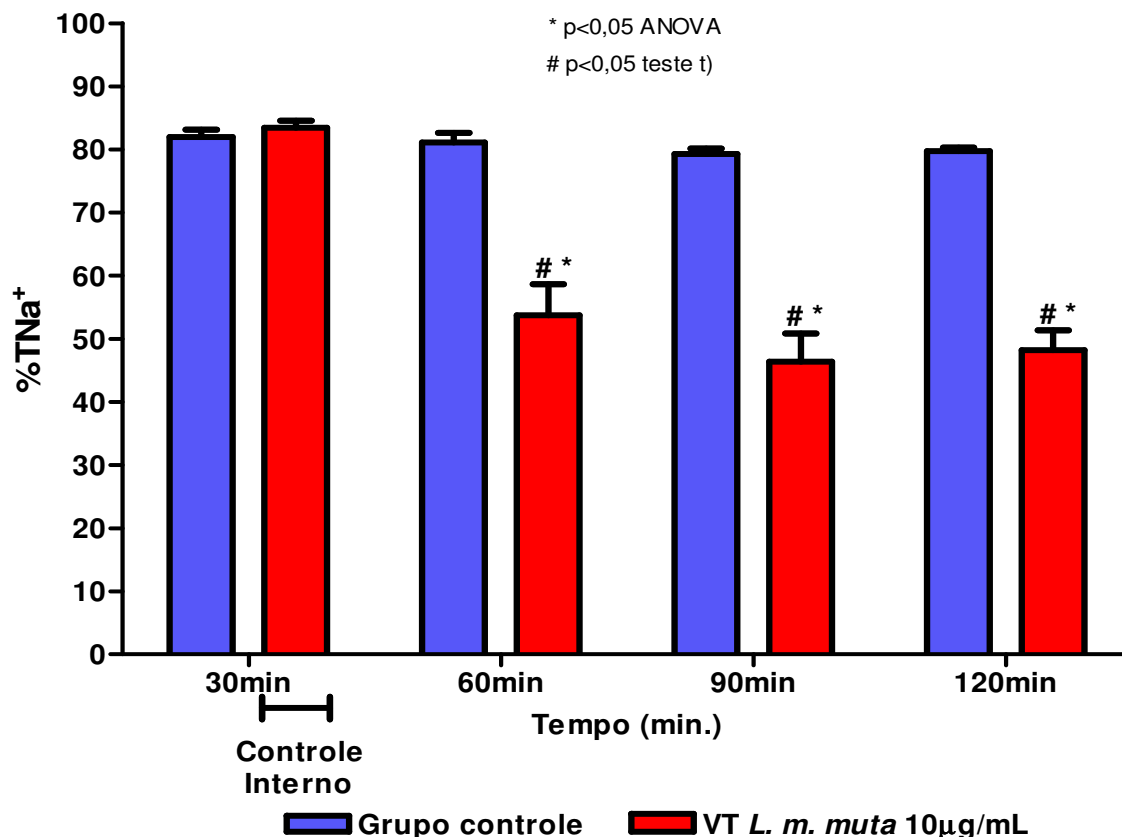
**Tabela 3 - Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.



**Figura 19 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,689	0,098
60	0,707	0,051	0,232 #	0,042
90	0,633	0,051	0,586	0,185
120	0,697	0,084	1,478 #*	0,278

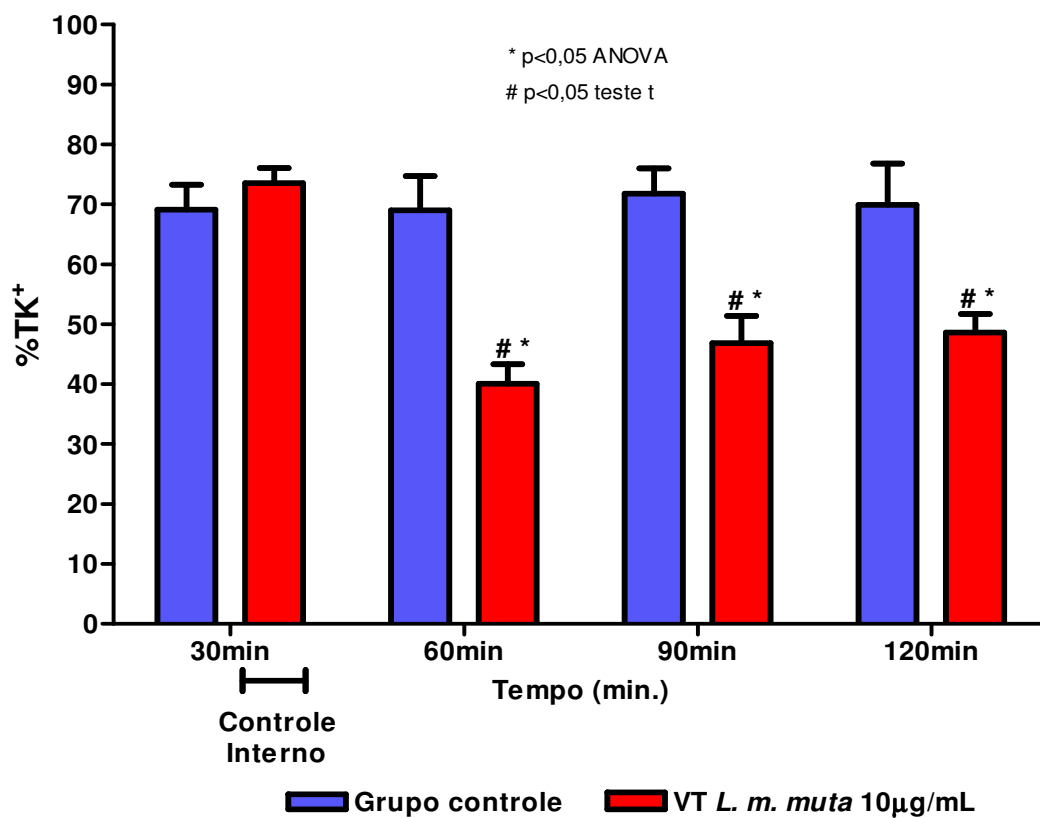
**Tabela 4 - Valores do ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**



**Figura 20 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	83,45	1,15
60	81,11	1,52	53,75 #*	4,89
90	79,26	0,90	46,39 #*	4,43
120	79,76	0,56	48,22 #*	3,14

**Tabela 5 - Valores do percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**



**Figura 21 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	69,13	4,14	73,56	2,55
60	69,04	5,68	40,09 <sup>#*</sup>	3,25
90	71,84	4,21	46,88 <sup>#*</sup>	4,49
120	69,94	6,86	48,59 <sup>#*</sup>	3,11

**Tabela 6 - Valores do percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**



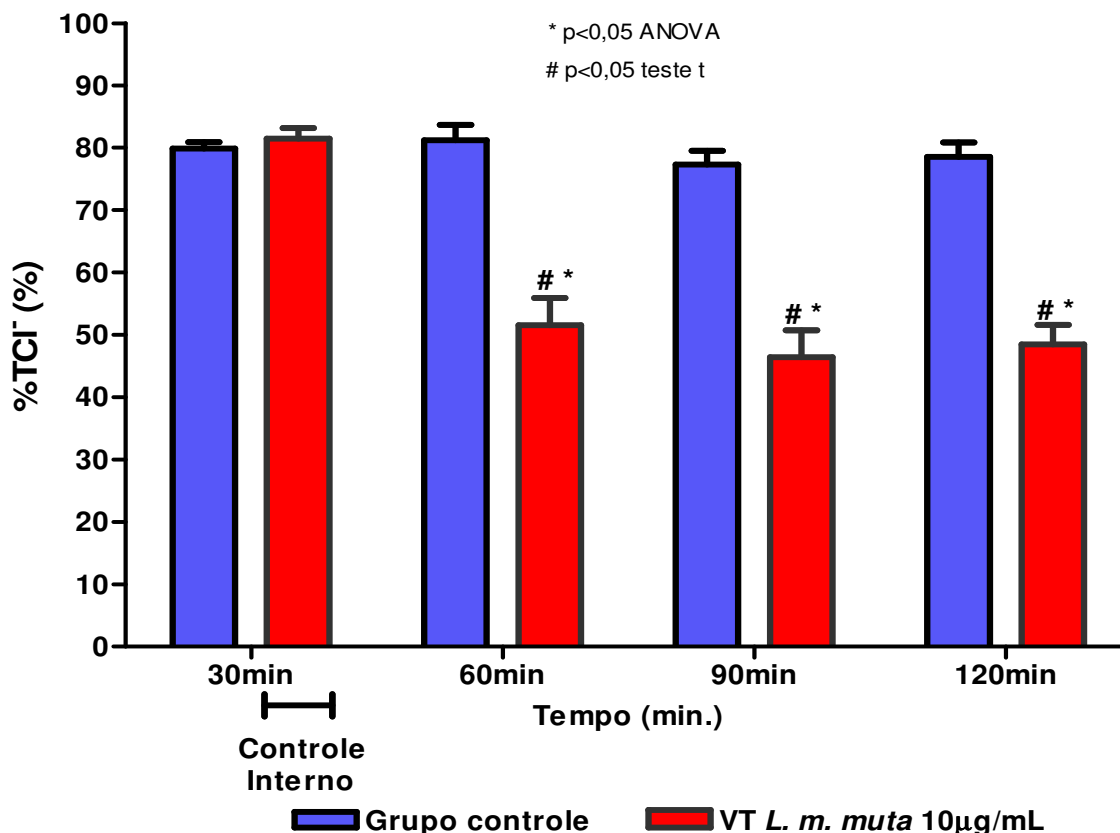
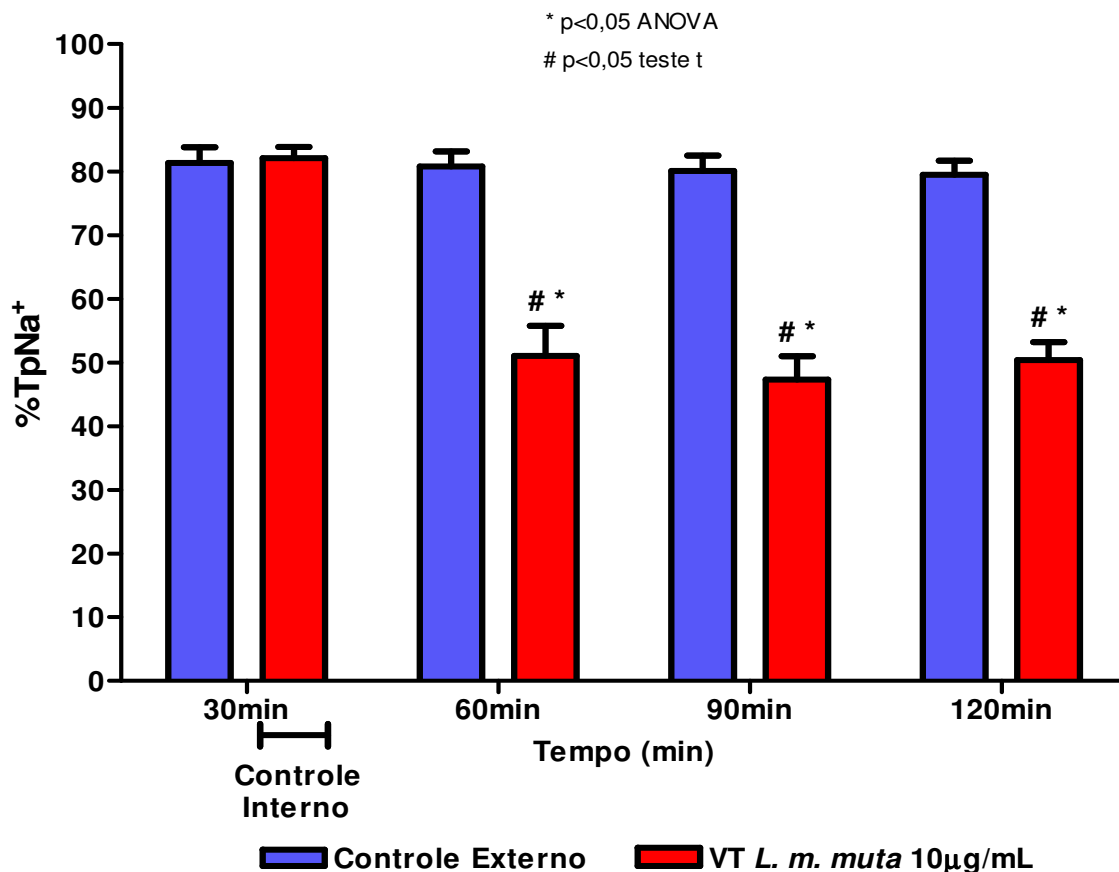


Figura 22 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl<sup>-</sup>). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	1,03	81,48	1,70
60	81,25	2,44	51,54 <sup>#*</sup>	4,35
90	77,32	2,22	46,42 <sup>#*</sup>	4,33
120	78,53	2,23	48,49 <sup>#*</sup>	3,07

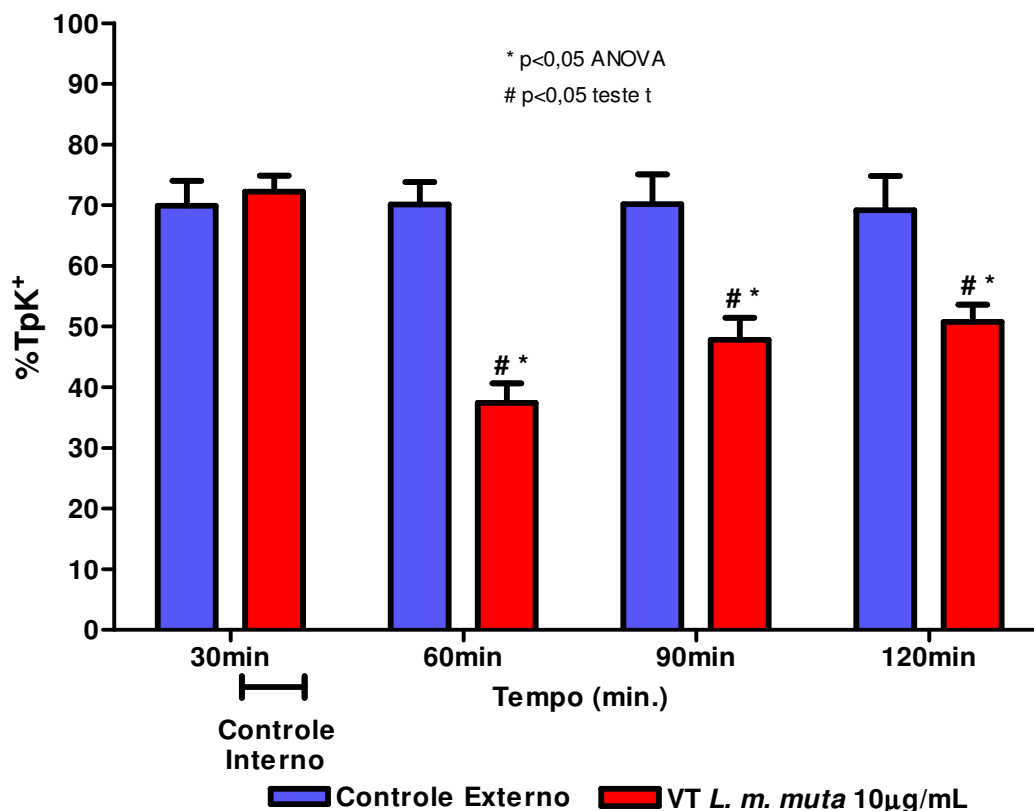
Tabela 7 - Valores do percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl<sup>-</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.



**Figura 23 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao controle interno (n=6); # significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	81,30	2,47	82,10	1,74
60	80,76	2,39	51,07 #*	4,64
90	80,11	2,34	47,30 #*	3,70
120	79,45	2,24	50,38 #*	2,85

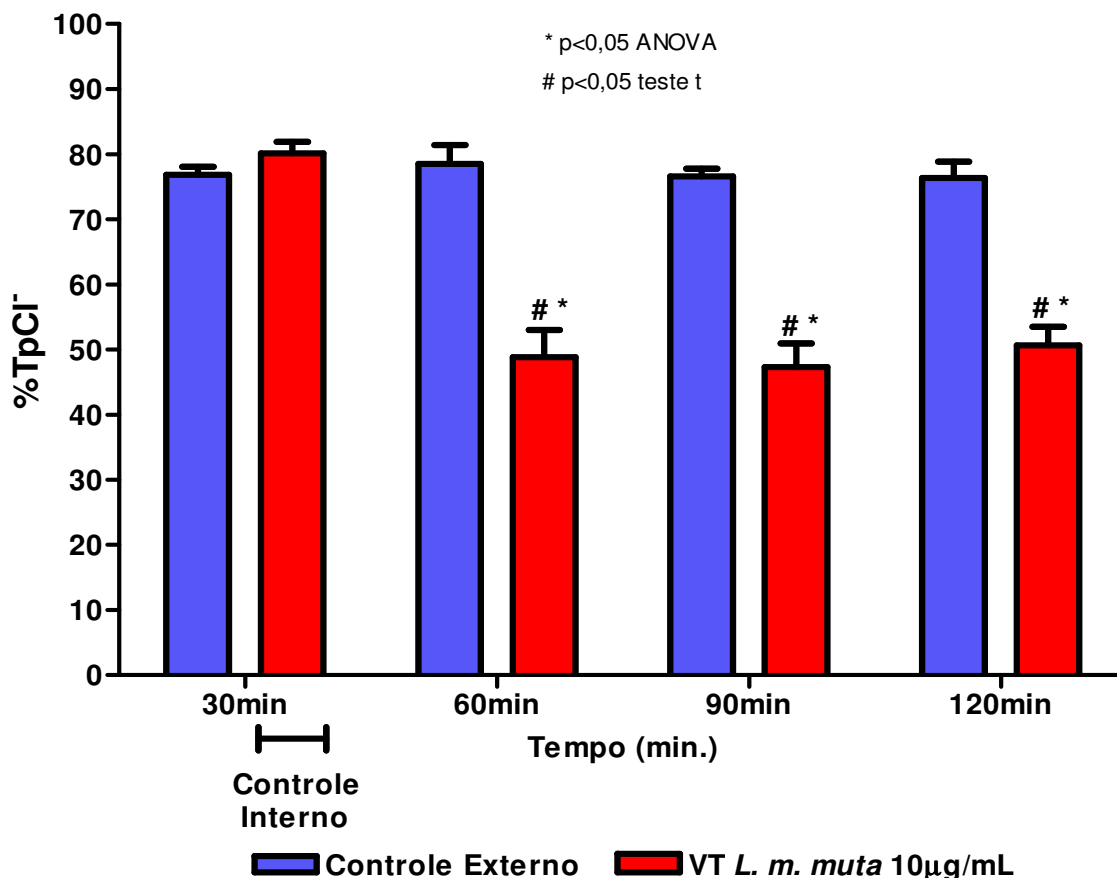
**Tabela 8 - Valores do percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao controle interno (n=6); # significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**



**Figura 24 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK<sup>+</sup>). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	69,92	4,09	72,21	2,67
60	70,13	3,69	37,42 #*	3,19
90	70,18	4,86	47,79 #*	3,67
120	69,17	5,64	50,76 #*	2,86

**Tabela 9 - Valores do percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK<sup>+</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.**



**Figura 25 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* no percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl<sup>-</sup>).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	76,81	1,25	80,13	1,73
60	78,49	2,90	48,86 #*	4,13
90	76,58	1,20	47,33 #*	3,64
120	76,36	2,47	50,65 #*	2,84

**Tabela 10 - Valores do percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl<sup>-</sup>) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*).** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (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 t de student com p<0,05. \* significa p<0,05 em relação ao controle interno (n=6); # significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

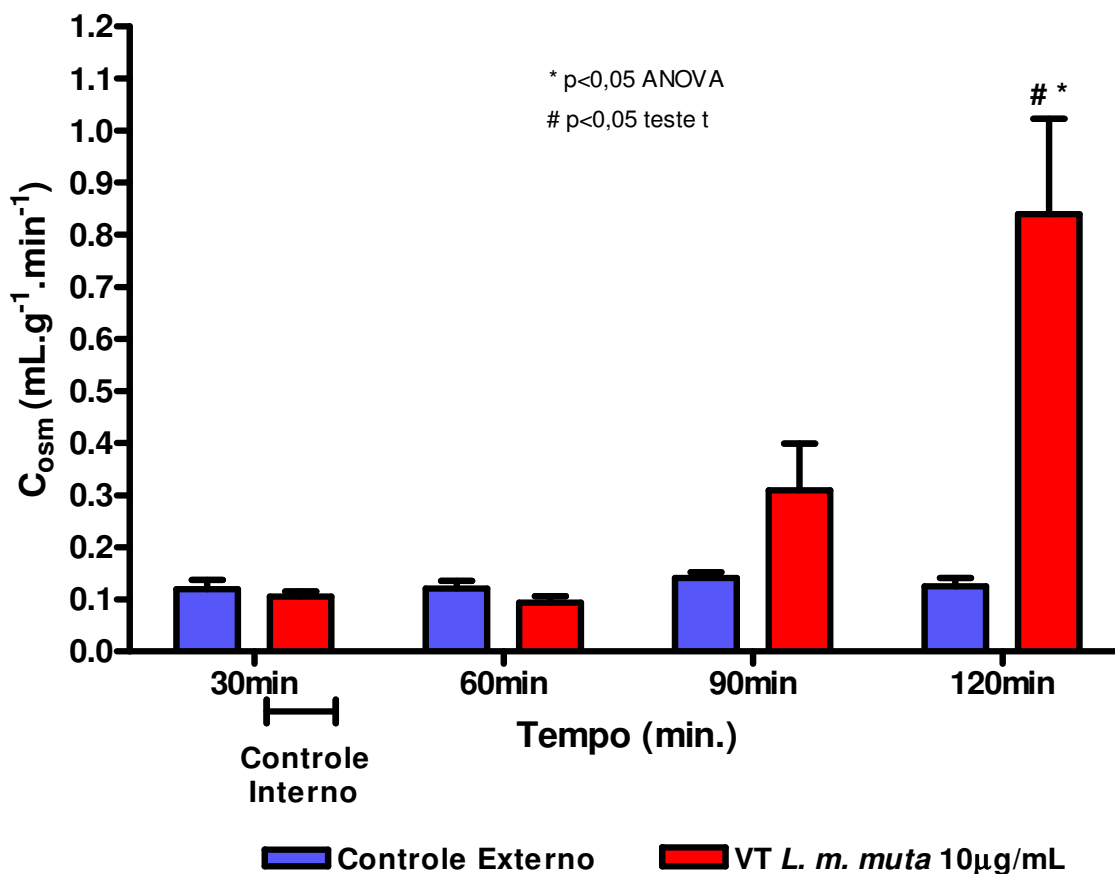


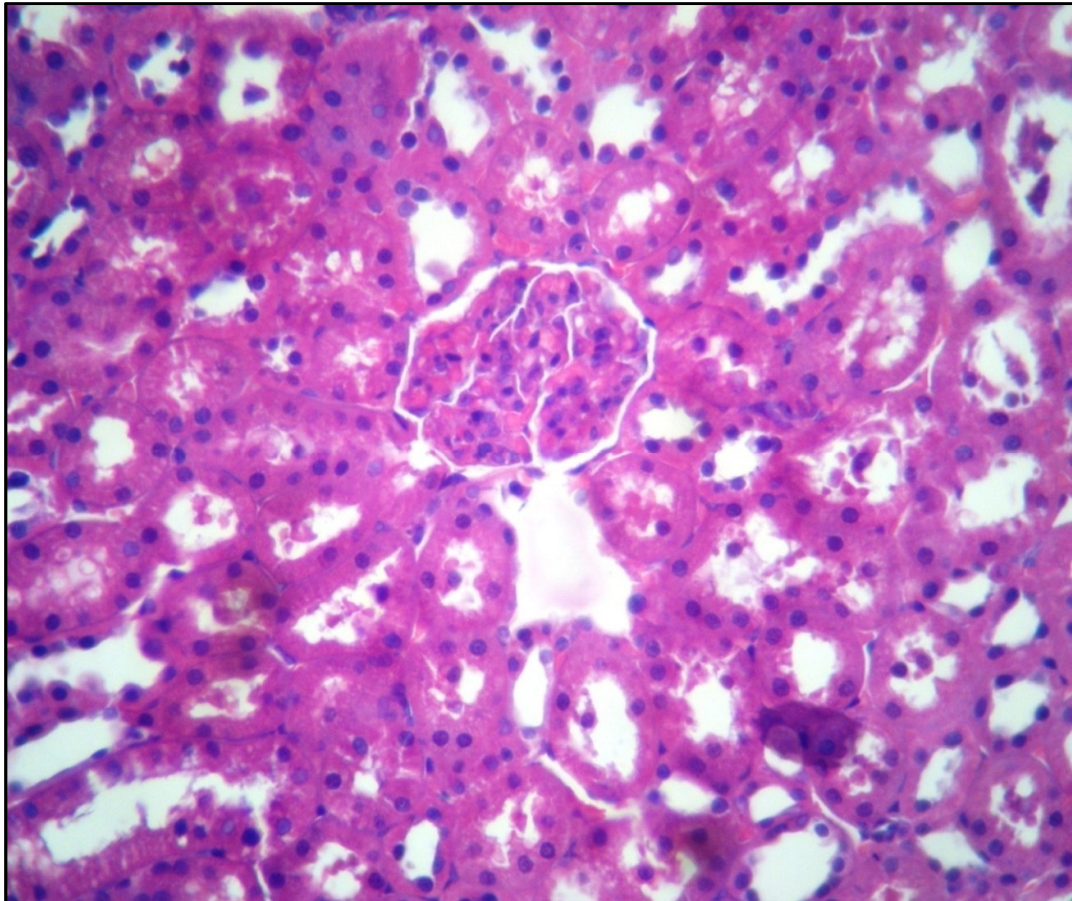
Figura 26 - Efeitos renais promovidos pelo veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*) no *clearance* osmótico ( $C_{osc}$ ). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao controle interno (n=6); # significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

Tempo (min.)	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,120	0,017	0,106	0,010
60	0,121	0,015	0,094	0,012
90	0,141	0,011	0,309	0,090
120	0,125	0,016	0,839 #*	0,184

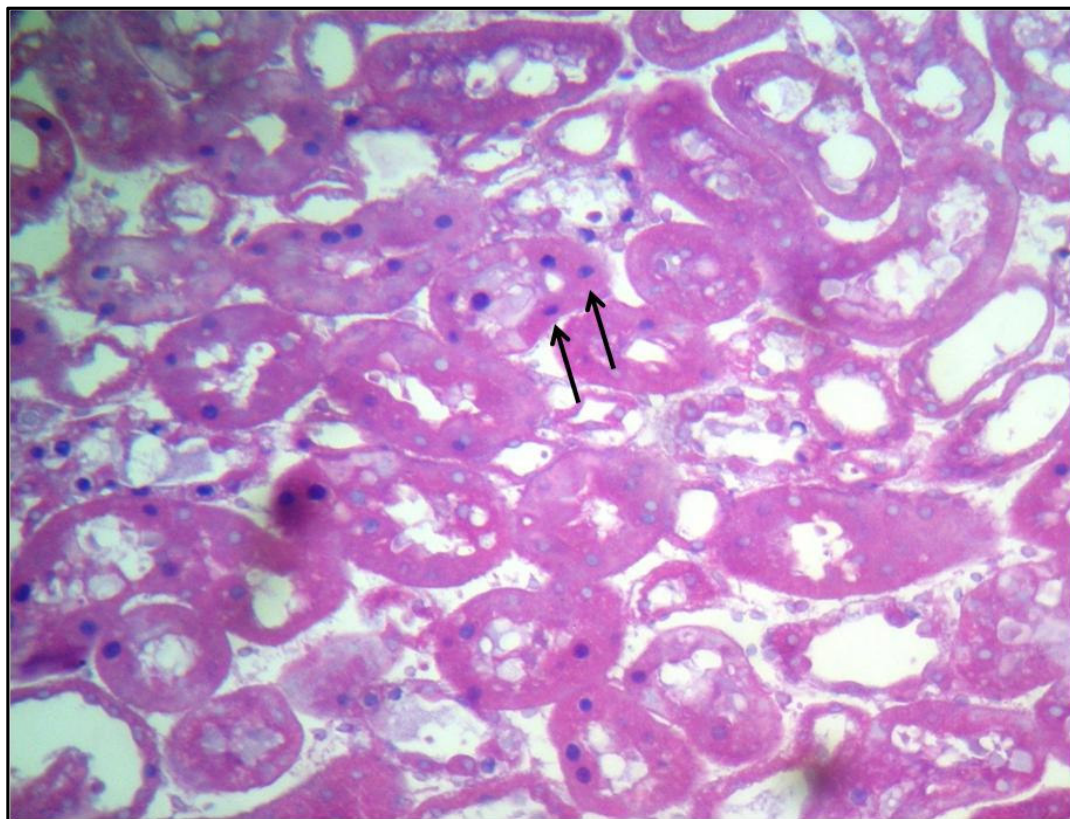
Tabela 11 - Valores do *clearance* osmótico ( $C_{osc}$ ) dos experimentos realizados com o veneno total (10µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* (VT *L. m. muta*). Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t de student com  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao controle interno (n=6); # significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo (n=6) no mesmo período avaliado.

## 5.2 Análise histológica dos grupos da perfusão renal

Na análise histológica dos rins perfundidos com veneno total da *Lachesis muta muta* na dose de 10µg/mL, foi observada a presença focal de células com núcleos picnóticos, indicativo de morte celular (**Figura 28**). Os glomérulos e túbulos não apresentaram deposição de material proteináceo e os vasos e o interstício apresentaram aspecto normal semelhante ao observado nas lâminas dos rins do grupo controle (rins esquerdo não perfundidos) (**Figura 27**).



**Figura 27** - Aspecto morfológico normal dos rins do grupo controle (rins esquerdo) analisado através de microscopia óptica (n=6; aumento de 400x e coloração de hematoxilina-eosina).



**Figura 28** - Aspecto morfológico dos rins perfundidos com o veneno total da serpente *Lachesis muta muta* (10µg/mL), analisado através de microscopia óptica, onde observa-se a presença focal de células com núcleos picnóticos (setas) (n=6; aumento de 400x e coloração de hematoxilina-eosina).

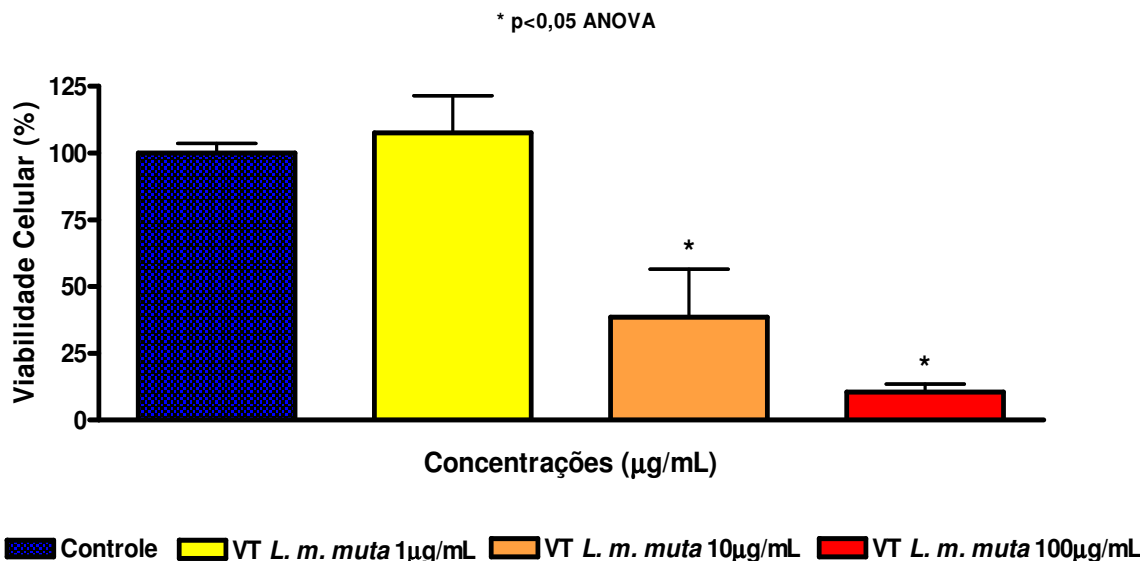
### 5.3 Avaliação da atividade do veneno total sobre as células MDCK

O veneno total da serpente *Lachesis muta muta* apresentou efeito citotóxico sobre células tubulares renais (MDCK) apenas nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL.

#### 5.3.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

O veneno total da serpente *Lachesis muta muta* nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL, após 24 horas de incubação, reduziu a viabilidade das células MDCK a  $38,60 \pm 17,9\%$  e  $10,62 \pm 2,9\%$ , respectivamente quando comparado aos valores do grupo controle. Na concentração de 1µg/mL não foi observada nenhuma alteração significativa (**Figura 29 e Tabela 12**).





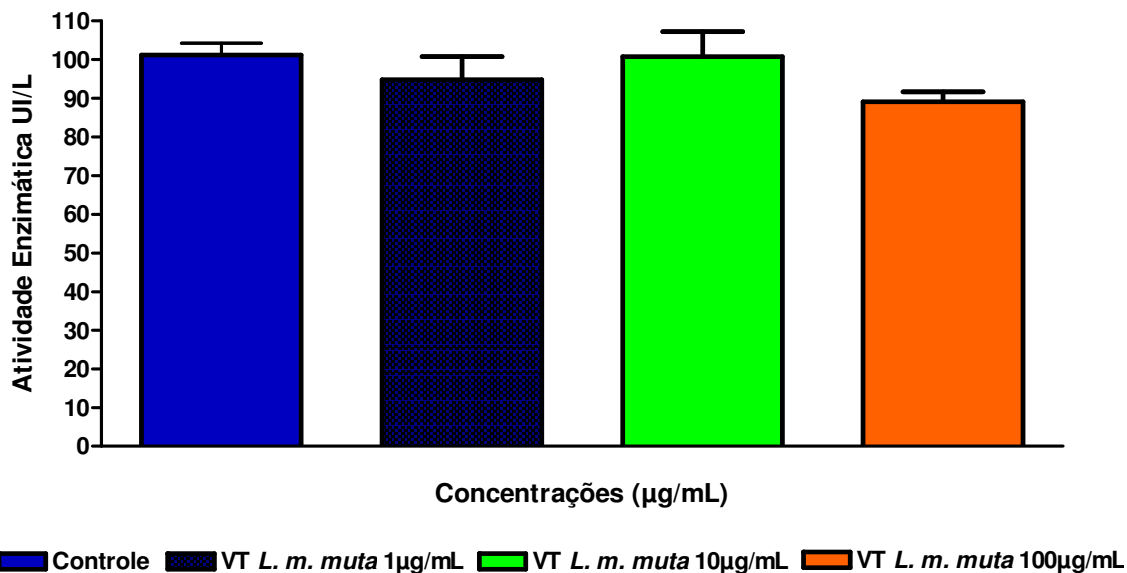
**Figura 29 - Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK). Ensaio com MTT.** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) da absorbância e representam o percentual de células viáveis após um período de incubação de 24 horas com o veneno. Os dados foram avaliados através de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos). O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (n=9).

Tempo(h)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 1µg/mL		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL		VT <i>L. m. muta</i> 100µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
24h	100,00	3,551	107,5	13,97	38,60*	17,90	10,62*	2,913

**Tabela 12 - Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK). Ensaio com MTT.** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) da absorbância e representam o percentual de células viáveis após um período de incubação de 24 horas com o veneno. Os dados foram avaliados através de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos). O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao Grupo controle (n=9).

### 5.3.2 Ensaio para atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

O veneno da *Lachesis muta muta* não promoveu alteração significativa no ensaio para atividade da LDH em nenhuma das concentrações avaliadas (**Figura 30 e Tabela 13**).



**Figura 30 - Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da *Lachesis muta muta* sobre a integridade da membrana das células tubulares renais (MDCK). Ensaio da atividade LDH.** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. e representam a atividade da enzima LDH liberada após um período de incubação de 24 horas com o veneno. Os dados foram avaliados através de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos). O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (n=9).

Tempo(h)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VT <i>L. m. muta</i> 1µg/mL		VT <i>L. m. muta</i> 10µg/mL		VT <i>L. m. muta</i> 100µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
24h	101,2	3,022	94,85	5,920	100,8	6,480	89,13	2,579

**Tabela 13 - Efeitos do veneno total (1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL) da serpente *Lachesis muta muta* sobre a integridade da membrana das células tubulares renais (MDCK). Ensaio da atividade LDH.** Os dados são expressos por média ± Erro Padrão Médio (E.P.M.) e representam a atividade da enzima LDH liberada após um período de incubação de 24 horas com o veneno. Os dados foram avaliados através de Análise da Variância (ANOVA), com pós-teste de Dunnett's (múltipla comparação entre os grupos). O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . \* significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (n=9).

## 6 DISCUSSÃO

Como visto na introdução, o envenenamento laquético é pouco freqüente e contribui com apenas 1,4% do total de acidentes ofídicos notificados em todo o Brasil (MS/FUNASA, 2001) e somente com 0,2% dos envenenamentos com animais peçonhentos encontrados no Ceará (FEITOSA *et al.*, 1997).

No entanto, a despeito destas estatísticas, os acidentes laquéticos são considerados graves e passíveis de acontecer em qualquer área da Mata Atlântica brasileira, do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Norte e Ceará (FEITOSA *et al.*, 1997; DE FREITAS *et al.*, 2005), bem como em toda a Região Amazônica.

No envenenamento provocado por picada de surucucu são evidentes dor fortíssima e edema no local com repercussão precoce (20 minutos) no aparelho gastrointestinal (vômito e diarreia) e cardiovascular (hipotensão).

De acordo com a severidade do acidente ou sensibilidade do paciente podem ocorrer ainda complicações sistêmicas como bradicardia, choque cardiovascular, incoaguabilidade sanguínea, hemólise e distúrbios renais (FRANÇA e FAN, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2003; RUCAVADO *et al.*, 1999).

Embora o quadro de Insuficiência Renal Aguda (IRA) seja pouco freqüente nos acidentes laquéticos, a prevenção da IRA deve ser tentada em todo paciente acidentado por animal peçonhento. Deve ser realizada pela administração precoce do antiveneno específico; tratamento da hipotensão arterial; tratamento do choque e manutenção de um estado de hidratação adequado. Considera-se que este último objetivo é alcançado quando o fluxo urinário é de 1 ml a 2 ml/kg/hora nas crianças e de 30 a 40 ml/h nos adultos (MS/FUNASA, 2001).

Na experimentação em rim isolado de rato, a análise da urina, do perfusato, dos parâmetros funcionais e da histopatologia é útil 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.

Em virtude da ausência literária de estudos com o veneno da serpente *Lachesis muta* em sistema de perfusão renal, tentaremos aqui especular os seus mecanismos de ação sobre os parâmetros funcionais renais através da comparação entre os resultados encontrados no presente trabalho, os achados dos efeitos renais de venenos do gênero *Bothrops*, estudados por outros pesquisadores do grupo (LFAVET) e informações presentes na literatura científica.

É notório que os venenos de *Bothrops* e *Lachesis* possuem diferenças tanto quantitativas quanto qualitativas. No entanto, os sintomas clínicos provocados pelos venenos destas serpentes apresentam várias semelhanças (DE MOURA *et al.*, 1998). Além disso, observa-se que em ambas as peçonhas são encontradas grandes quantidades de substâncias com atividade proteolítica que tem sido correlacionada com a patogênese dos principais efeitos locais e sistêmicos (FOX *et al.*, 2006). Estudos de proteômica e de espectroscopia de massa revelaram que 51,5% e 14,0% dos componentes protéicos do veneno da *Bothrops jararaca* são metaloproteinases e serinoproteinases, respectivamente. Estudos semelhantes relacionados à composição protéica do veneno de *Lachesis muta* demonstraram que as metaloproteinases representam 31,9 % dos constituintes protéicos e as serinoproteinases contribuem com 31,2% (SANZ *et al.*, 2008).

Os resultados vasculares obtidos no sistema de rim isolado revelaram redução significativa da pressão de perfusão e resistência vascular renal nos períodos de 60 e 90 minutos, sendo que aos 120 minutos estes parâmetros normalizaram-se. Houve redução do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular aos 60 minutos, com tendência de aumento aos 90 minutos, tornando-se significativo aos 120 minutos. Nos parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio, de cloreto e de potássio houve redução significativa em todos os períodos analisados (60, 90 e 120 min.), além de aumento não significativo do *clearance* osmótico aos 90 minutos, mas significativo aos 120 minutos.

HAVT *et al.* (2001), descrevem que o veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (10 µg/mL) em rim isolado de rato causou diminuição significativa da pressão de perfusão renal e resistência vascular renal aos 90 e 120 min. e decréscimo do transporte tubular de sódio e potássio em todos os períodos analisados. No entanto, este veneno promoveu aumento significativo do ritmo de

filtração glomerular e do fluxo urinário apenas no período de 120 minutos. Também foi demonstrado que a dexametasona foi incapaz de bloquear os efeitos do veneno no rim, enquanto o WEB 2086 (um antagonista do receptor do fator de ativação plaquetária) bloqueou seus efeitos no RFG, FU e %TK<sup>+</sup>.

Curiosamente, MONTEIRO e FONTELES (1999) usando o mesmo sistema de perfusão renal e avaliando a ação do veneno da *Bothrops jararaca* não observaram nenhum aumento no FU e RFG na concentração de 10 µg/mL. De maneira oposta, o veneno desta serpente na dose supracitada promoveu um intenso decréscimo destes dois parâmetros.

BRAGA (2006), mostrou que o veneno da *B. insularis* produziu uma queda em todos os parâmetros renais avaliados. Houve queda nos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal; nos parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular; nos parâmetros eletrolíticos relativos ao sódio e ao cloreto, sem alteração significativa nos de potássio; e queda no *clearance* osmótico.

O veneno da *Bothrops moojeni* alterou mais intensamente os parâmetros da função renal que o veneno da *Bothrops jararaca*. Usado na concentração de 10 µg/mL ele induziu redução significativa da pressão de perfusão, da resistência vascular renal e dos transportes de sódio, de cloreto e de potássio. Em contraste, produziu uma diurese intensa que não foi observada na perfusão em rim isolado de rato com o veneno da *Bothrops jararaca* (BARBOSA *et al.*, 2002).

Note que apesar dos estudos citados anteriormente terem avaliado a ação de venenos pertencentes a serpentes do mesmo gênero, eles apresentaram semelhanças quanto aos parâmetros vasculares, mas alguns diferiram quanto aos parâmetros de função renal (FU, RFG, %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup>, %TCl<sup>-</sup>) (**Tabela 14**).

**Tabela 14** - Alterações vasculares, urinárias e eletrolíticas apresentadas por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em rim isolado de rato.

	<i>B. jararacussu</i> (10 µg/mL)	<i>B. moojeni</i> (10 µg/mL)	<i>B. jararaca</i> (10 µg/mL)	<i>B. insularis</i> (10 µg/mL)
PP	↓	↓	↓	↓
RVR	↓	↓	↓	↓
FU	↑	↑	↓	↓
RFG	↑	↑	↓	↓
%TNa <sup>+</sup>	↓	↓	↓	↓
%TK <sup>+</sup>	↓	↓	↓	
%TCl <sup>-</sup>		↓		↓
C <sub>osm</sub>			↓	↓

PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal; FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular; %TNa<sup>+</sup>= percentual de transporte de sódio; %TK<sup>+</sup>= percentual de transporte de potássio; %TCl<sup>-</sup>= percentual de transporte de cloro; Cosm= clearance osmótico.

↓ Redução do parâmetro; ↑ Elevação do parâmetro; Ausência de seta = sem efeito.

Estes achados da perfusão renal corroboram com vários dados descritos na literatura. Como já é bastante difundido, os venenos botrópicos são caracterizados por promoverem hipotensão em diversos casos de acidentes envolvendo as serpentes desse gênero. Os mecanismos que promovem esse vaso-relaxamento sistêmico podem ser os mesmos que afetam a pressão de perfusão renal.

Os potenciadores da bradicinina presentes nos venenos *Bothrops*, já bem estudados por FERREIRA (1992), que influenciam na produção renal de bradicinina seguida de óxido nítrico, poderiam explicar esta queda.

Os BPPs também estão presentes em abundância na peçonha do gênero *Lachesis*. No veneno de *Lachesis muta*, por exemplo, eles, juntamente com um peptídeo natriurético tipo-c, representam 14,7% da sua composição protéica (SANZ *et al.*, 2008).

SOARES *et al.*, 2005 identificou 5 (cinco) BPPs (*Lm*-BPP 1, *Lm*-BPP 2, *Lm*-BPP 3, *Lm*-BPP 4 e *Lm*-BPP 5) e 1(um) peptídio natriurético do tipo C (*Lm*-CNP) no veneno de *Lachesis muta*.

No acidente laquétrico, o efeito sinérgico destas moléculas resultaria em vasodilatação, contribuindo significativamente com o quadro geral de toxicidade do veneno. Essas substâncias propiciariam a rápida difusão das toxinas do veneno no sistema circulatório, assim como o estabelecimento de um quadro de choque hipotensivo que é a principal causa de morte da presa ou vítima (RIBEIRO e JORGE, 1997).

Desse modo, os BPPs e o CNP presentes no veneno da *Lachesis muta* podem estar envolvidos na redução transitória da pressão de perfusão e da resistência vascular observada na perfusão renal.

Outro possível mecanismo que explicaria os resultados encontrados na PP e RVR seria a destruição de estruturas teciduais renais por ação proteolítica do veneno, induzindo a liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas (CHAVES *et al.*, 2005).

Nos 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).

A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> têm ação vasodilatadora no rim (FOEGH e RAMWELL, 2001; KRAMER *et al.*, 1985). Infusões intrarenal de prostaglandinas aumentaram o fluxo sanguíneo renal e produziram efeito natriurético, inibindo a reabsorção tubular de sódio e na alça ascendente de Henle reduziram o transporte tubular de cloro (SIMMONS *et al.*, 2004).

Por não termos realizado estudos com frações isoladas do veneno da *Lachesis muta muta*, não podemos afirmar que a redução dos parâmetros vasculares renais observada nos experimentos é devido a um componente específico. Mesmo com essa limitação, como verificado por PETRICEVICH *et al.* (2000), outros mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina



-1 (IL-1), IL-6, IL-10 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) podem estar envolvidos nesse processo de diminuição da PP e RVR.

Esses mediadores inflamatórios com potencial relaxante podem ter contribuído para a redução da resistência vascular renal e pressão de perfusão observados após a administração do veneno da *Lachesis muta muta*.

O veneno da *L. m. muta* na dose de 10 $\mu$ g/mL mostrou ser capaz de promover uma diminuição transitória da PP e da RVR, o que, isoladamente, poderia explicar a redução do FU e do RFG ocorrido no período de 60 minutos. Além disso, essa diminuição transitória da PP e da RVR poderia provocar isquemias em algumas áreas dos rins e, assim promover lesão renal de modo indireto.

Entretanto, a intensa diurese promovida pelo veneno da *L. m. muta* foi independente da redução da pressão de perfusão. Logo, outros agentes desencadearam o aumento do FU e RFG.

Talvez este aumento do fluxo urinário seja devido à ação sinérgica ou isolada dos seguintes fatores: 1° - A presença de substâncias que promoveriam especificamente diurese como o peptídeo natriurético do tipo C (*Lm*-CNP) encontrado no veneno da *Lachesis muta* (HAVT *et al.* (2001) por exemplo atribuiu a ação diurética do veneno da *Bothrops jararacussu* ao PAF); 2° - A ação natriurética das prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>) sintetizadas pelo rim após injúria renal; 3° - A perda da função de transporte das células epiteliais tubulares em virtude de lesão renal promovida por uma ação citotóxica do veneno, o que levaria a uma redução dos transportes de sódio, de cloreto e de potássio com conseqüente aumento do *clearance* osmótico, FU e RFG.

A patogênese da lesão renal é complexa e nos acidentes ofídicos há dois possíveis mecanismos de ação, que é a ação direta do veneno no rim e os efeitos inflamatórios resultantes da liberação de várias citocinas e mediadores (FERREIRA *et al.*, 1992). Fosfolipases promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores. Metaloproteinases dependentes de zinco induzem a liberação inicial de fator de necrose tumoral. Todos esses mediadores são o passo inicial para o

desenvolvimento das complicações teciduais renais, incluindo a IRA (SITPRIJA, 2006).

Na análise histológica dos rins perfundidos com veneno total da *Lachesis muta muta* na dose de 10µg/mL, a presença focal de células com núcleos picnóticos foi a única alteração visualizada (**Figura 28**). Esses achados histológicos são sugestivos de morte celular (apoptose/necrose).

Poderíamos inferir que a morte das células dos túbulos renais observada no presente estudo pudesse ser conseqüência de hipoperfusão renal promovida pelo veneno, já que houve diminuição da PP. No entanto, essa hipótese é questionável por dois aspectos: 1° - em virtude do caráter transitório de redução da PP, somente no período de 90 minutos observa-se pressão de perfusão menor que 80 mmHg (pressão que caracteriza hipoperfusão renal - GUYTON & HALL, 2002); 2° - os resultados dos experimentos com as células MDCK comprovaram a ação citotóxica renal do veneno da *Lachesis muta muta*. As células MDCK constituem uma linhagem celular bem estabelecida e são freqüentemente empregadas para investigar as respostas celulares à agentes tóxicos e venenos (CHAN *et al.*, 1989; COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; PEIXOTO e COLLARES-BUZATO, 2005; SCHWERDT *et al.*, 2004).

O veneno total da serpente *Lachesis muta muta* apresentou efeito citotóxico sobre as células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de incubação apenas nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL.

DAMICO *et al.* (2007), também avaliaram a citotoxicidade do veneno da serpente *Lachesis muta muta* em cultura de células MDCK. Os seus resultados mostram que a concentração de 10µg/mL reduziu de modo significativo a viabilidade celular à 75% (valor aproximado) após 3 horas de incubação e a aproximadamente 65% após 24 horas de exposição ao veneno. A concentração de 100µg/mL do veneno diminuiu significativamente a viabilidade celular à 70,2 ± 3,4% após 1 hora de incubação e a 15% após 5 horas. Ao analisar estes resultados, os autores concluíram que a concentração de 10µg/mL reduziu significativamente a viabilidade celular de maneira independente do tempo. No entanto, o decréscimo da viabilidade celular provocado pela concentração de 100µg/mL foi tempo dependente.

No trabalho supracitado, para investigar se o veneno alterou a função de barreira epitelial foi determinada a resistência elétrica transepitelial ( $R_T$ ) através da monocamada de células MDCK. O veneno provocou redução da  $R_T$  em todas as concentrações analisadas. A determinação deste parâmetro biofísico fornece informações gerais sobre a integridade e funcionalidade da barreira epitelial (KOTYK AND JANACEK, 1977; LO *et al.*, 1999). Logo, alterações neste parâmetro indicam que pelo menos um dos seguintes parâmetros da monocamada de células MDCK foi alterado: viabilidade celular, permeabilidade da membrana celular, permeabilidade das junções celulares e/ou adesão das células ao substrato.

O veneno da *L. m. muta* afetou significativamente a viabilidade celular e adesão celular, tornando plausível a sugestão dos autores de que as alterações destes dois parâmetros seriam os principais responsáveis pelo decréscimo da resistência elétrica transepitelial. Também foi sugerido que metaloproteinasas/desintegrinas do veneno poderiam estar envolvidas no destacamento das células MDCK do substrato após exposição ao veneno (DAMICO *et al.*, 2007).

Através da análise dos nossos resultados podemos notar que o veneno total da *L. m. muta* (10 $\mu$ g/mL) apresentou efeito citotóxico sobre as células MDCK maior que os obtidos por DAMICO *et al.*, 2007. Desconsiderando o elevado EPM dos valores de viabilidade encontrados para esta concentração (38,60  $\pm$  17,9%) é importante salientar que diferenças na composição do veneno usado em nosso trabalho e nos experimentos realizados por DAMICO *et al.*, (2007), também podem contribuir para a diferença dos valores encontrados.

Além dos achados histológicos e dos resultados sobre as células MDCK, especula-se que a lesão a nível tubular tenha sido responsável pelos efeitos renais observados ao avaliarmos o *clearance* osmótico, que é a capacidade de depuração renal em relação às moléculas osmoticamente ativas. Observa-se aos 120 minutos após a administração do veneno um aumento de 7,9 vezes desse parâmetro em relação ao grupo controle interno e de 6,7 em relação ao grupo controle no mesmo período. Esse aumento pode ser devido a disfunção tubular promovida pela perda de viabilidade das células tubulares, não permitindo a reabsorção de eletrólitos como

o sódio, que tem grande capacidade de carrear água, levando a um aumento do *clearance* osmótico bem como do FU e do RFG.

No entanto, será importante a realização de estudos adicionais correlacionando a toxicidade do veneno e o tempo de exposição das células renais às toxinas, para podermos responder a seguinte questão: Até que ponto a redução da viabilidade das células epiteliais tubulares durante o experimento pode influenciar nos resultados encontrados para o fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular?

Um resultado adicional ainda não descrito aqui foi o encontrado para a atividade da lactato desidrogenase. O veneno da *Lachesis muta muta* não promoveu liberação da enzima citoplasmática LDH em nenhuma das concentrações avaliadas. Tal resultado revela que não houve ruptura das membranas das células epiteliais tubulares (MDCK) *in vitro*.

A perda da integridade da membrana celular pela peroxidação lipídica é uma característica morfológica marcante da necrose celular. Neste caso, ocorre extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular com conseqüente processo inflamatório local (PERES e CURI, 2005).

Logo, em vista destes resultados, seria razoável sugerir que a morte celular observada na cultura de células MDCK e nos rins, pela presença focal de células com núcleos picnóticos, estaria relacionada com mecanismos apoptóticos, pois na apoptose a membrana da célula permanece íntegra e não há inflamação.

Porém, deve-se ressaltar que há diversos padrões celulares associados à necrose, dependendo do tipo celular em questão, do agente lesivo e de sua concentração (WYLLIE *et al.*, 1980; POMPÉIA, 2000). Assim, o mecanismo de morte celular (apoptose/necrose) observada em nossos experimentos tem caráter inconclusivo, sendo necessário a realização de estudos adicionais.

Dado o efeito hipotensivo e diurético encontrado, sugere-se a investigação, após o fracionamento do veneno, de peptídeos que possam ser capazes de promover especificamente essas ações, sem ações deletérias, para que dessa forma os mesmos possam ser utilizados como potenciais ferramentas farmacológicas.

## 7 CONCLUSÃO

- O veneno total da *Lachesis muta muta* na concentração de 10µg/mL alterou todos os parâmetros renais avaliados no sistema de rim isolado de rato, induzindo hipotensão transitória e intensa diurese.
  
- O veneno total da *Lachesis muta muta* (10µg/mL) provocou a morte (apoptose/necrose) de células epiteliais tubulares.
  
- As concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL do veneno total da *Lachesis muta muta* são citotóxicas sobre as células MDCK após 24 horas de incubação.
  
- A citotóxicidade do veneno total da *Lachesis muta muta* sobre as células MDCK é dependente da sua concentração.
  
- A ação citotóxica observada no veneno total da *Lachesis muta muta* não promove a lise das membranas celulares das células MDCK.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S. D. Orphidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.

AMORIM, D. S.; FERREIRA, S. H.; MANÇO, J. C.; TANAKA, A.; SADER, A. A.; CARDOSO, S. Potentiation of circulatory effects of bradykinin by a fator contained in the *Bothrops jararaca* venom. **Cardiology**. v. 50, p. 23-32, 1967.

ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**. v. 40, n.1, p. 63-68, 2002.

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

BAHKLE, Y. S. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by a cell-free extracts of drug lung. **Nature**. v. 220, p. 919-921, 1968.

BAHKLE, Y. S.; REYNARD, A. M.; VANE, J. R. Metabolism of the angiotensins in isolated perfused tissues. **Nature**. v. 222, p. 56, 1969.

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

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

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. **J. B. M.** v. 65, n. 4, p. 209-250, 1993.

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

BARRAVIERA, B. Acidentes ofídicos. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. cap. 129, p. 1561-1577.

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

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

BENCHIMOL, J. L.; TEIXEIRA, L. A. Cobras, lagartos & outros bichos: uma história comparada dos Institutos Oswaldo Cruz e Butantan. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1993.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venoms. **Pharmacol. Ther.** v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOLAÑOS, O. R. Toxicity of Costa Rica snake venoms for white mouse. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 360-363, 1972.

BOLAÑOS, R.; ROJAS, O.; FLORES, C. Aspectos biomedicos de cuatro casos de mordedura de serpiente por *Lachesis muta* (Ophidia:Viperidae) in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**. 30(1):53-58,1982.

BON, C. Snake venom and pharmacopoeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling Publishing, 1997. p. 194-209.

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

BRAGA, M. D. M. Avaliação dos efeitos vasculares e renais do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas. 2006. 238f. Tese (Doutorado em farmacologia). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Ceará. 2006.

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

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. **Zoonoses no Ceará um desafio a vencer**. [Fortaleza],1991. 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  $A_2$  from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, p. 667- 678, 2003.

CHAIM, O.M. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermédia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. 2005. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)**. Setor de Ciências Biológicas, UFPR, Curitiba, 2005.

CHAN, A. B.; ALLEN, C. N.; SIMMONS, N. L.; PARSONS, M. E.; HIRST, B. H. Resistance to acid of canine kidney (MDCK) and human colonic (T84) and ileo-caecal (HCT-8) adenocarcinoma epithelial cell monolayers *in vitro*. **Q. J. Exp. Physiol.**, v. 74, p. 553–556, 1989.

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

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin World Health Organization**, v. 76, p. 515-524, 1998.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE JR. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J Physiol.**, v. 266, n.1, p. 103-121, 1977.

COLLARES-BUZATO, C. B.; LE SUEUR, L. P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 181, 124–132, 2002.

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J. and SCHNELLMANN, R. G. Phospholipase  $A_2$  in cell injury and death. **JPET**. 294: 793-799, 2000.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**. v. 16, p. 5484-5491, 1977.

DAMICO, D. C. S.; BUENO, L. G. F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; NOVELLO, J. C. Functional characterization of a basic D49 phospholipase  $A_2$  (*LmTX-I*) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). **Toxicon**. 47: 759–765, 2006.



DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**. 49: 678–692, 2007.

DE FREITAS, M. A.; SILVA, T. F. S. A. **Herpetofauna da Mata Atlântica Nordestina**. 1. Ed. Editora USEB. 2005. 14p.

DE MOURA, R. S.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE CARVALHO, C. R. M. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**. 36, 771–780. 1998.

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

DINIZ, M. R.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). **Toxicon**. 30(3): 247-58, 1992.

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 9, p. 585–590, 1999.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**. v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

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**. v. 97 (24): p.12970-12975, 2000.

ESTEVIÃO-COST, M. I.; MARTINS, M. S.; SANCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. **Toxicon**. v. 38(1): p.139-44, Jan 2000.

FARMAN, N.; PRADELLES, P.; BONVALET, J. P. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> alpha, 6-keto-PGF<sub>1</sub> alpha, and TxB<sub>2</sub> synthesis along the rabbit nephron. **Am. J. Physiol.** v. 252, p. 53-59, 1987.

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

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará – Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

FELICORI, L. F.; SOUZA, C. T.; VELARDE, D. T.; MAGALHÃES, A.; ALMEIDA, A. P.; FIGUEIREDO, S.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C. R.; SANCHEZ, E. F. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. **Protein Expr Purif.** v. 30, n. 1, p. 32-42, Jul 2003.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAID, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein Chem.** v. 17, n. 3, p. 285-289, 1998.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). **Toxicon.** v. 30, p. 33–40, 1992.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia.** v. 21, p. 347-349, 1965.

FERREIRA, S. H. Bradykinin-potentiating factor. In: ERDOS, E. G. (Ed.). **Hypotensive peptides.** New York: Springer-Verlag, 1966. p. 356-367.

FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. **Br. J. Pharmacol.** v. 30, n. 2, p. 417-424, 1967.

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

FONTELES, M. C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. 1980. **Dissertação** (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J.; WHERTHEIM, S. J. Support of kidney function by long-fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** v. 244, p. 235-246, 1983.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.** v. 275, n. 2, p. 191-197, 1998.

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

FRIDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmacol.** v. 20, p. 1549-1556, 1971.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Fisiologia renal. In: **Fundamentos de Guyton: Tratado de Fisiologia Médica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

GIOVANE-DE-SIMONE, S.; AGUIAR, A. S.; GIMENEZ, A. R.; NOVELLINO, K.; DE MOURA, R.S. Purification, properties and N-terminal amino acid sequence of a kallikrein-likes enzyme from the venom of *Lachesis muta rhombeata* (Bushmaster). **J Protein Chem.**,16(8):808-18,1997.

GRANTSOU, R. **As cobras venenosas do Brasil.** 1. ed. São Bernardo do Campo: Bandeirante S.A. Gráfica e Editora, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie.** v. 82, n. 9/10, p. 841-850, 2000.

HAAD, J. S. Accidentes humanos por las serpientes de los gêneros *Bothrops* y *Lachesis*. **Mem. Inst. Butantan.** v. 44/45, p. 403-423, 1980/1981.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J Lipid Res.**, v. 9, n. 5, p. 667-8, 1968.

HARDY Sr., D. L.; HAAD, J. J. S. A review of venom toxinology and epidemiology of envenoming of the bushmaster (*Lachesis*) with report of a fatal bite. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, 33(6):113-123, 1998.

HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev.**, 3(2):183-211, 1990.

HARVEY, A. L.; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLFELDT, J. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36:1635-40, 1998.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF. **Toxicon**, v. 39, n.12, p.1841-1846, 2001.

HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A<sub>2</sub> at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 4, p. 293-306, 1979.

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

INSTITUTO BUTANTAN. **O Butantan e as serpentes do Brasil**. São Paulo, 1996. 1 CD-ROM.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.

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

KOTYK, A. and JANACEK, K. Membrane transport an interdisciplinary approach. **Biomembranes**, v. 9, p. 3-348, 1977.

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.**, v. 68: 387-393,1985.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 202, p. 1165-1168, 1991.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. 1525p. cap. 2, p 47-86, cap 3, p. 87-118, cap. 4, p.119-144.

LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, c. 343, p. 257-263, 1998.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963–977, 2003.

LO, C. M.; KEESE, C. R.; GIAEVER, I. Cell–substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. **Exp. Cell Res.**, v. 250, p. 576–580, 1999.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.

MÁLAQUE, C. M. S.; FRANÇA, F. O. S. Acidente laquético. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADAD, V. editors. **Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapêutica dos Accidentes**. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 87–90.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P. H.; BEACHAM, D. A.; NIEWIAROWSKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry**, v. 39, p. 9859-9867, 2000.

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

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F *et al.* Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 595-599, 2005.

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

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

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

MORITA T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.**, v. 4, n. 4, p. 357-373, 2004.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS) /FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/ FUNASA, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS) /FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/ FUNASA, 2001.

MURAKAMI, M. T. and ARNI, R. K. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A<sub>2</sub>s. **Toxicon**, v. 42, p. 903-913, 2003.

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

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

NOGUEIRA, R. M. B e SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 31, p. 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.

OGAWA, T.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1-14, 2005.

PEIXOTO, E. B.; COLLARES-BUZATO, C. B. Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased tight junction-associated protein expression in cultured MDCK strains. **Cell Struct. Funct.**, v. 29, p. 165–178, 2005.

PERES, C. M.; CURI, R.; **Como cultivar células**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

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

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzyme activity of low-Mr phospholipase A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v. 319, p. 961-968, 1996.

POMPÉIA, C. **Toxicidade do ácido araquidônico em leucócitos**. São Paulo, 2000. P. 12-24. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2000.

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**, v. 105, p.155-162, 2002.

RACHER, A. J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. **Cytotechnology**, v. 3, p. 301-307, 1990.

RAGE, J. Diversity of snakes. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling, 1977. p.34-47.

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

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; CAMPOS, V. A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRAO, M. L.; JORGE, M. T. Deaths caused by venomous snakes in the State 220 of São Paulo: evaluation of 43 cases from to 1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 44, p. 312-318, 1998.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 475–480, 1997.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 216, 1949.

ROSENFELDE, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 951-962.

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

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

RUCAVADO, A.; Sanchez, E. F.; Franceschi, A; Magalhães, A.; Gutierrez, J. M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom; **Toxicon**, p. 1297-1312, 1999.

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**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, p. 354-382, 1991.

SANCHEZ, E. F.; SOUZA, C. T.; BELLO, C. A.; RICHARDISON, M.; OLIVEIRA, E. B.; MAGALHÃES, A. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, v. 41(8), p. 1021-31, Jun 2003.



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

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

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETTI, M.; BISCOGLIO, M. J.; RIVERA, E.; CRESCENTI, E. J.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of proteomics**, v. 71, p. 46-60, 2008.

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.

SCHWERDT, G.; FREUDINGER, R.; SCHUSTER, C.; SILBERNAGL, S.; GEKLE, M. Inhibition of mitochondria and extracellular acidification enhance ochratoxin A-induced apoptosis in renal collecting duct-derived MDCK-C7 Cells. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 14, p. 47-56, 2004.

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

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442-448, Oct. 2006.

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

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 mitotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, M. R.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; ZINGALI, R. B.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, L.; DINIZ, M. R. Identification of novel

bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46(1), p. 31-8, Jul. 2005.

SOUZA, C. T.; MOURA, M. B.; MAGALHÃES, A.; HENEINE, L. G.; OLORTEGUI, C. C.; DINIZ, C. R.; SANCHEZ, E. F. Inhibition of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom by human alpha2-macroglobulin and rabbit immunoglobulin. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 130(2), p. 155-68, Sep. 2001.

STABELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C.; SELISTRE-DEARAÚJO, H.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

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

TAKEDA, M.; YOSHITOMI, K. and IMAI, M. Regulation of  $\text{Na}^+$ - $3\text{HCO}_3^-$  cotransport convoluted tubule via adenosine  $\text{A}_1$  receptor. **Am J Physiol.**, 265: F511-F519, 1993.

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

UENO, N.; MURAKAMI, M.; TANIOKA, T.; FUJIMORI, K.; TANABE, T.; URADE, Y. and KUDO, I. Coupling between cyclooxygenase, terminal 100 prostanoid synthase and phospholipase  $\text{A}_2$ . **J Biol Chem**, v. 276 (37), p. 34918-34920, 2001.

VARANDA, E. A.; GIANINNI, M. J. S. M. Bioquímica de veneno de serpentes. In: BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de janeiro: Científica, 1994. Cap 14, p. 205-223.

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

WARRELL, D. A. Snake bite in five continents. In. BUNCH, C. (Ed.). **Horizons inmedicine**. London: Bailliere Tindall, 1989. p. 106-114.

WUINBERG, M. L.; FELICORI, L. F.; BELLO, C. A.; MAGALHÃES, H. P.; ALMEIDA, A. P.; MAGALHÃES, A. ; SANCHEZ, E. F. Biochemical properties of a bushmaster

snake venom serine proteinase (LVKa), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings; **J Pharmacol Sci**, v. 96, n. 3, p. 333-42, Nov. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. **Who Offset Publ.**, v. 58, p. 1-44, 1981.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. K. R.; CURRIE, A. R. Cell death the significance of apoptosis. **Int ver cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

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

## 9 ANEXO

- Substâncias utilizadas na perfusão renal
- Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as substâncias abaixo.

NaHCO<sub>3</sub> (Synth)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Synth)

NaCl (Synth)

MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O (Reagen)

CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O (Reagen)

Manitol (Reagen)

Uréia (Reagen)

KCl (Merck)

Glicose (Squibb)

Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)

Heparina (CEME)

Inulina (Sigma)

Pentobarbital Sódico (Cristália)

Albumina Bovina

- Solução de Krebs-Henseleit

114.0mM de NaCl; 4.96mM de KCl; 1.24mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O;  
24.99mM de NaHCO<sub>3</sub>; 2.10mM de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; e 3.60mM de glicose