



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

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO DE SERPENTE
***Bothrops atrox* E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

FORTALEZA

2009

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

**EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO DE SERPENTE *Bothrops atrox* E
A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

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

FORTALEZA

2009

TERENTIA BATISTA SÁ DE NORÕES

EFEITOS RENAIIS PROMOVIDOS PELO VENENO DE SERPENTE *Bothrops atrox* E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico à Plínio e Antônia, desde
sempre, presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e incentivo fundamentais para a minha formação e conquista de mais uma etapa alcançada.

A minha orientadora, Dra. Helena Serra Azul Monteiro pelo carinho, disponibilidade, apoio e maturidade científica fundamentais para o planejamento, desenvolvimento e execução desse trabalho.

Ao professor Dr. Marcellus pela sua contribuição e orientação nos resultados dos experimentos do óxido nítrico.

A Professora Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros por me acompanhar em mais uma etapa profissional realizada.

A Dra. Diva Maria Borges Nojosa pela contribuição e veneno de *Bothrops atrox* cedido.

Ao professor Dalgimar B. Menezes pela atenção e orientação sobre a análise histológica.

Aos amigos de jornada Rafael Ximenes, Rafael Jorge, Paulo César e Claudênio Diógenes pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos Daniel freire e Renata Alves pelo carinho, amizade e maturidade científica fundamentais para a realização deste projeto.

Ao Professor Dr. Alexandre Havt pelo profissionalismo e maturidade científica importantes para minha aprendizagem na pesquisa.

A doutoranda Antoniella Gomes Souza pela ajuda fundamental nos experimentos de dosagem de nitrito.

Aos bolsistas do laboratório de Farmacologia Renal Antônio Neto, Ana Luiza, João Victor, João Paulo Barbosa, Caio Abner, Francisca Jamila, Expedito Aguiar e Ilanna Mara pela ajuda e companheirismo nos experimentos.

Aos funcionários do IBIMED: Sílvia Helena, Terezinha, Juciê, José Amadeus e Francisca Alves por toda ajuda e respeito com que sempre me trataram.

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Aura Hanes e Marcia pela paciência com que sempre me ajudaram.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa auxílio para execução deste projeto.

A secretária do LFAVET, Beatriz Helena, pela sua ajuda e companhia.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a
amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para o amanhã”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Efeitos renais promovidas pelo veneno de serpente *Bothrops atrox* e a liberação sistêmica de óxido nítrico.

Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina- Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Terentia Batista Sá de Norões, Dissertação de mestrado- UFC, 2009.

Orientadora: Professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil, representando um sério problema de saúde pública pela frequência com que ocorrem e pela morbidade e mortalidade que ocasionam. Envenenamento por serpente *Bothrops atrox* conduz à alteração sistêmica que é responsável pela causa preliminar de morte após acidente ofídico. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos farmacológicos do veneno bruto da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na perspectiva de elucidação dos mecanismos fisiopatológicos causados aos tecidos. Primeiramente, avaliou-se as ações do VBA no sistema de perfusão renal, no qual o órgão era exposto à peçonha de *B. atrox* para se avaliar as possíveis alterações dos parâmetros renais. Após a perfusão renal, os rins foram submetidos à análise histológica. Os parâmetros foram analisados pelo ANOVA e Student t-test, com $p < 0,005$. Os resultados encontrados demonstraram que VBA promoveu diminuição significativa na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR). O fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) aumentaram significativamente. Foi observado aumento e diminuição do percentual de transporte de cloreto e sódio, respectivamente. As alterações histológicas dos rins perfundidos foram discretas, indicando presença de material proteináceo nos glomérulos e túbulos. Realizou-se uma investigação da participação do óxido nítrico (NO) nos efeitos sistêmicos causados por VBA, em um experimento in vivo. Houve um aumento na produção de nitrito no sangue dos animais tratados com VBA. Efetuou-se o bloqueio farmacológico com L-NAME e o aumento na produção de nitrito foi abolida. Através desses resultados conclui-se que o VBA causa alteração nos parâmetros renais e induz aumento na produção de óxido.

Palavras-chave: Bothrops; Veneno de serpentes; Rim; Perfusão; Óxido nítrico.

ABSTRACT

Renal effects promoted by snake *Bothrops atrox* venom and systemic release of nitric oxide.

Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina- Departamento de Fisiologia e farmacologia. Terentia Batista Sá de Norões, Dissertação de mestrado- UFC, 2009. Orientadora: Professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Snakes of the genera *Bothrops* are the most responsible for ophidian accidents occurred in Brazil, representing a serious public health problem due to their frequency, morbidity and mortality rates. Envenomation caused by the species *Bothrops atrox* leads to systemic complication, which is responsible for the preliminary cause of death after ophidian accident. The aim of this work was to evaluate the pharmacological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* (VBA), in perspective of elucidating the physiopathological mechanisms occurred in the tissues. First of all, the actions of VBA were evaluated in the renal perfusion system, in which the organ was exposed to the venom of *B. atrox* to evaluate possible renal parameters alterations. After the renal perfusion, the kidneys were submitted to histological analysis. The parameters were analyzed by ANOVA and Student t-test, with $p < 0,005$. The results showed that VBA decreased the perfusion pressure (PP) and renal vascular resistance (RVR) significantly as in contrast with the urinary flow (UF) and glomerular filtration rate (GFR) which had a significant increase. It was observed both increase and reduction of the percentage of chloride and sodium transport, respectively. The histological alterations of the perfused kidneys were discrete, indicating the presence of proteinaceous substance in the glomeruli and tubules. An investigation was made - in an *in vivo* experiment - into the participation of nitric oxide (NO) in the systemic effects induced by VBA. There was an increase of the nitrite production in the blood of animals that received the VBA treatment. Pharmacological blockade with L-NAME was carried out and the increase of the nitrite production was nullified. Due to these results, we conclude that VBA causes alterations on renal parameters and it induces increase of the oxide production.

Keywords: Bothrops; Snake venoms; Kidney; Perfusion; Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem da espécie <i>Bothrops atrox</i> , indicando uma de suas estruturas descritas, a fosseta loreal.....	19
Figura 2. Imagem da serpente <i>Bothros atrox</i>	19
Figura 3. Distribuição dos acidentes ofídicos de 2001 a 2007, no estado do Ceará, Brasil, segundo o gênero da serpente.....	21
Figura 4. Caso de acidente botrópico, já no estágio de necrose.....	22
Figura 5. Componentes protéicos presentes nos venenos botrópicos.....	24
Figura 6. Componentes não-protéicos presentes nos venenos botrópicos.....	25
Figura 7. Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.....	36
Figura 8. Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n =6).....	37
Figura 9. Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n=6).....	37
Figura 10. Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n = 6).....	38
Figura 11. Visualização da artéria femural para injeção de manitol.....	39
Figura 12. Visualização da identificação (A) e canulação do ureter (B).....	39
Figura 13. Visualização da artéria renal pela artéria mesentérica.....	40
Figura 14. Visualização do rim isolado do rato no sistema de perfusão renal.....	40
Figura 15. Decréscimo da pressão de perfusão (PP) em rim isolado de ratos.....	46
Figura 16. Decréscimo da resistência vascular renal (RVR) em rim isolado de ratos.....	47
Figura 17. Acréscimo do fluxo urinário (FU) em rim isolado de rato.....	48
Figura 18. Acréscimo no ritmo de filtração glomerular (RFG) em rim isolado de rato.....	49
Figura 19. Decréscimo do percentual do transporte de sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de rato.....	51
Figura 20. Decréscimo do percentual do transporte de cloreto (%TCl ⁻) em rim isolado de rato.....	52
Figura 21. Percentual do transporte de potássio (%TK ⁺) inalterado em rim isolado de rato.....	53
Figura 22. Acréscimo do <i>clearance</i> osmótico (C _{OSM}) em rim isolado de rato....	54

Figura 23. Corte histopatológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada por 120 min (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 100X).....	55
Figura 24. Corte histológico de rim direito perfundido com veneno bruto de <i>Bothrops atrox</i> , por 120min, na concentração de 1µg/mL (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 400X).....	56
Figura 25. Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da <i>Bothrops atrox</i> (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,056mg/kg.....	57
Figura 26. Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da <i>Bothrops atrox</i> (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,168mg/kg.....	58
Figura 27. Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da <i>Bothrops atrox</i> (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,28mg/kg.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais.....	42
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	47
Tabela 2. Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	48
Tabela 3. Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5)...	49
Tabela 4. Valores do ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	50
Tabela 5. Valores do percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	51
Tabela 6. Valores do percentual de transporte de cloreto (%TCl ⁻) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	52
Tabela 7. Valores do percentual de transporte de potássio (%TK ⁺) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	53
Tabela 8. Valores do <i>clearance</i> osmótico (C _{OSM}) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).....	54
Tabela 9. Valores das concentrações de nitrito (NO ₂ ⁻) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 0,056mg/kg (n=4).....	57
Tabela 10. Valores das concentrações de nitrito (NO ₂ ⁻) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração de 0,168mg/kg (n=4).....	58
Tabela 11. Valores das concentrações de nitrito (NO ₂ ⁻) dos experimentos realizados com o veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i> (VBA) na concentração	

de 0,28mg/kg (n=4).....

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BK	Bradicinina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
C_{OSM}	<i>Clearance</i> osmótico
DL₅₀	Dose Letal para 50% dos animais
DOP in	Densidade ótica da inulina no perfusato
DOU in	Densidade ótica da inulina na urina
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
EK	Potássio excretado
ENa⁺	Sódio excretado
eNOS	Enzimas óxido nítrico sintases endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Flavina adenina dinucleotído
FK	Potássio filtrado
FNa⁺	Sódio filtrado
FPR	Fluxo de perfusão renal
FU	Fluxo urinário
GMPc	Guanetidina 3'-5'-monofosfato cíclica
HE	Hematoxilina-eosina
i.p	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
INF	Interferon gama
iNOS	Enzimas óxido nítrico sintases indutível
IRA	Insuficiência renal aguda
LAAO	L-aminoácido

LFAFVET	Laboratório de Farmacologia em Venenos e Toxinas
L-NAME	Nitro-L-arginine methyl Ester
nNOS	Enzimas óxido nítrico sintases neuronal
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NOS	Enzimas óxido nítrico sintases
NUROF	Núcleo Regional de Ofiologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PGs	Prostaglandinas
PLA₂	Fosfolipase A ₂
P_{OSM}	Osmolaridade do perfusato
PP	Pressão de perfusão
PPBs	Peptídeos potencializadores da bradicinina
PPT	Tempo parcial de tromboplastina
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RVR	Resistência vascular renal
SAB	Soro antibotrópico
SABC	Soro antibotrópico-crotálico
SABL	Soro antibotrópico-laquétrico
SVMPs	Metaloproteases de venenos de serpentes
TC	Tempo de coagulação
TCI⁻	Cloreto transportado
TK⁺	Potássio transportado
TNa⁺	Sódio transportado
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral
U_{OSM}	Osmolaridade urinária
VBA	Veneno de <i>Bothrops atrox</i>
% TCI⁻	Percentual de cloreto transportado
%TK⁺	Percentual de potássio transportado
%TNa⁺	Percentual de sódio transportado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 As serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	19
1.2 Ofidismo.....	20
1.3 Características clínicas dos envenenamentos botrópicos.....	21
1.3.1 Complicações renais.....	23
1.4 Composição do veneno botrópico e suas ações sobre os tecidos.....	23
1.4.1 Serinoproteases.....	26
1.4.2 Metaloproteases.....	27
1.4.3 Lectinas.....	27
1.4.4 Fosfolipases.....	28
1.4.5 L-aminoácidos oxidases.....	29
1.4.6 Peptídios potencializadores da bradicinina.....	29
1.5 O papel do óxido nítrico nos envenenamentos botrópicos.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais de experimentação.....	35
4.2 Veneno e drogas utilizadas.....	35
4.3 Perfusão de rim isolado.....	35
4.3.1 Sistema utilizado.....	35
4.3.2 Calibração do sistema.....	36

4.3.3 Solução perfusora.....	38
4.3.4 Técnica cirúrgica.....	38
4.3.5 Protocolo experimental.....	41
4.3.6 Análises bioquímicas.....	41
4.3.7 Cálculos de parâmetros funcionais renais.....	42
4.3.8 Estudo histológico.....	43
4.4 Dosagem de nitrito – Determinação da produção de óxido nítrico.....	44
4.5 Análises estatísticas.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Perfusão de rim isolado.....	46
5.2 Análise histológica dos grupos da perfusão.....	55
5.3 Dosagem de nitrito após experimento com veneno bruto da <i>Bothrops atrox</i>	56
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÕES.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9 ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 As serpentes do gênero *Bothrops*

As serpentes são encontradas em quase todo o mundo, mas habitam predominantemente as regiões temperadas e tropicais, em especial pela sua dependência do calor externo. Alimentam-se de presas inteiras, que caçam usando estruturas quimiossensíveis. São exclusivamente carnívoras caçando tanto vertebrados como invertebrados (FERRAREZI, 1994).

A família *viperidae* apresenta mais de 200 espécies. Essa família possui 34 gêneros assim representados: *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothrops*, *Bothriopsis* e *bothrocophias*. Em nosso país existem cinco gêneros que somam aproximadamente 30 espécies, no qual 20 pertencem ao gênero *Bothrops*, 19 *Micrurus*, um *Crotalus* e um *Lachesis*. Os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias* são classificados como uma revisão do *Bothrops* encontrando-se em áreas restritas da América do Sul e Bacia Amazônica, com um número limitado de espécies, sem registros de acidentes (CAMPBELL & LAMAR, 1989; FEITOSA & MONTEIRO, 1997; BRASIL, 2001).

As serpentes peçonhentas *Bothrops* possuem dentes inoculadores bem desenvolvidos e fosseta loreal (figura 1), um orifício situado entre o olho e a narina, que é um órgão termorreceptor, indicando que o animal é peçonhento (por isso é também conhecida popularmente por “serpente de quatro ventas”) (BRASIL, 1998).

Possuem cauda lisa, não tem chocalho e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem (figura 2). São popularmente conhecidas como jararaca e jararacuçu, dentre outros. Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. (BRASIL, 1998; CUPO *et al.*, 1990).



Figura 1: Imagem da espécie *Bothrops atrox*, indicando uma de suas estruturas descritas, a fosseta loreal.

Fonte: www.biology.bangor.ac.uk/~bss166/Updates/Crotalinae1999.htm



Figura 2: Imagem da serpente *Bothros atrox*.

Fonte: www.geocities.com/hotherps/reptiles.html

1. 2 Ofidismo

O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes, aproximadamente 265 espécies, classificadas dentro de 73 gêneros, reunidas em nove famílias. Apenas duas dessas famílias são conhecidas como peçonhentas (*Viperidae* e *Elapidae*), ou seja, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e em outras espécies animais. A família *Elapidae* é composta por serpentes encontradas principalmente na Ásia, África e Austrália. Nas Américas, a família está representada pelas chamadas cobras corais, pertencentes ao gênero *Micrurus*. A família *Viperidae*, com serpentes distribuídas por todo o mundo, tem bastante relevância, uma vez que são responsáveis pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, mas também em outros países das Américas (MELGAREJO, 2003).

Os envenenamentos ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbidade e mortalidade que ocasionam. Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas (CARDOSO & BRANDO, 1982).

No Brasil, o gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico. São anualmente notificados ao Ministério da Saúde mais de 20000 casos de envenenamentos ofídicos, sendo esse gênero responsável por 90% dos casos. Como cerca de 45% são apenas da Região Sudeste do país, provavelmente ocorre importante falha na notificação (BRASIL, 1998; FRANCA & MALAQUE, 2003). As espécies *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. erythromelas* e *B. atrox* são responsáveis pela maior parte desses acidentes em humanos e estão distribuídas em diferentes regiões do Brasil (BOECHAT *et al.*, 2001).

No Ceará existem poucos trabalhos sobre ofidismo. Guimarães *et al.* (1989) fizeram levantamento estatístico na Divisão de Epidemiologia da Secretaria de Saúde de Estado, no período de 1986 a 1988. Nesse estudo, verificaram a ocorrência de 1079 casos de acidentes por serpentes peçonhentas e não peçonhentas, com 17 óbitos e letalidade de 1,6%.

Em um outro estudo, no Departamento de Epidemiologia da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, haviam sido notificados 688 casos de acidentes por serpentes peçonhas, no período de 1992 a 1995, havendo diferenças quanto ao sexo e a faixa etária dos acidentados. Foram mais acometidas as pessoas do sexo masculino (75,6%) e com faixa etária de 10 a 19 anos (FEITOSA *et al.*, 1997).

Rocha (2008), em uma pesquisa recente realizada no estado do Ceará, mostrou que o maior número de casos de acidentes ofídicos em humanos era devido às serpentes do gênero *bothrops*, sendo responsáveis por 87,6%. No período de 2001 a 2007 foram notificados no Ceará, 3877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas. Mais uma vez, foram mais acometidas as pessoas do sexo masculino (74,2%), porém a faixa etária mais atingida foi de 21 a 50 anos, considerando que este tipo de acidente está relacionado à atividade agrícola (figura 3).

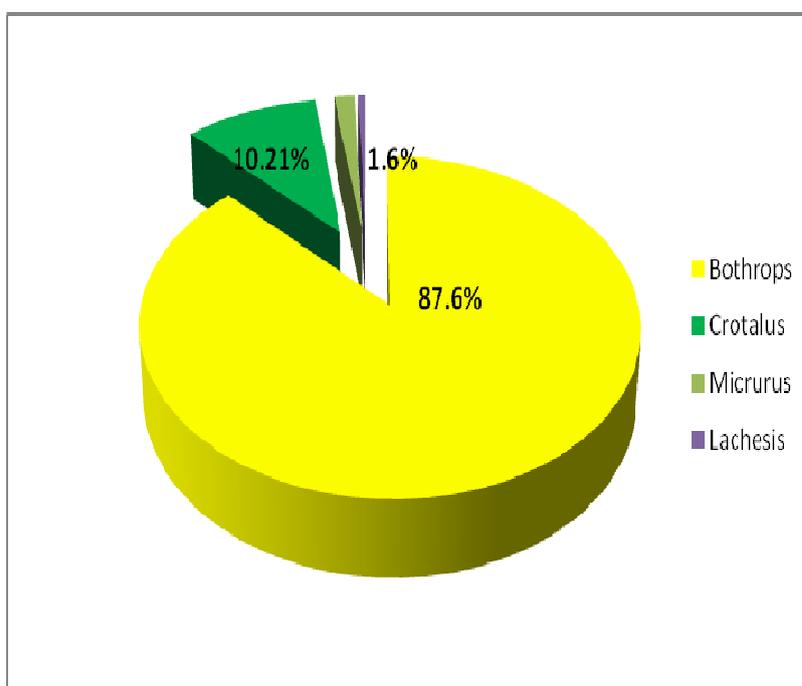


Figura 3: Distribuição dos acidentes ofídicos de 2001 a 2007, no estado do Ceará, Brasil, segundo o gênero da serpente.

Fonte: ROCHA, 2008.

1.3 Características clínicas dos envenenamentos botrópicos

As alterações clínicas decorrentes dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* ocorrem tanto no local da picada como a nível sistêmico. A picada trata-se de uma inoculação subcutânea ou intramuscular. A distância interposta aos sinais da picada nem sempre se correlaciona com as dimensões da serpente e com a quantidade de veneno inoculada (BRASIL 2001; FRANÇA, 2003).

O paciente picado por *Bothrops sp.*, normalmente mostra sinais de perda tecidual tais como abscessos, edema e necrose, promovidos pela presença de enzimas proteolíticas (figura 4). A necrose local pode complicar-se com infecção por bactérias, sobretudo provenientes da boca da serpente, e formação de abscesso (JORGE, 1994).

A necrose geralmente se limita ao tecido subcutâneo, mas pode comprometer estruturas mais profundas como, tendões, músculos e ossos. O período de instalação é variável, ocorrendo, na maioria dos casos, a partir do segundo dia após o acidente. A intensidade e a extensão da necrose estão fortemente relacionadas ao uso de torniquetes e outras intervenções bastante difundidas, porém extremamente prejudicial. A demora entre o acidente e o tratamento soroterápico também podem agravar o caso (FERREIRA *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 2005).



Figura 4: Caso de acidente botrópico, já no estágio de necrose.

Fonte: www.bombeirosemergencia.com.br/picadasdecobra.htm

Esses sinais podem, ainda, ser agravados pela presença de fatores da coagulação no veneno (SANCHEZ *et al.*, 1992) que causam alteração da coagulação sanguínea e sangramento. Além de hemorragia sistêmica, o veneno pode promover choque hemodinâmico e coagulação intravascular disseminada (CIVD). Todos esses sinais são características comuns do envenenamento botrópico (MILANI *et al.*, 1997; WHITE, 2005).

Complicação comum que tem sido bastante reportado em acidentes ofídicos por serpentes do gênero *bothrops* é a hipotensão. Esse efeito sistêmico é capaz de produzir um estado de perfusão insuficiente para vários órgãos. Nessas condições, pode ocorrer desde uma redução da pressão intraglomerular renal, até uma falência cardíaca ou hipóxia (ABUELO, 1995).

Sintomas neurológicos raramente são atribuídos a acidentes causados por serpentes desse gênero. São poucos os casos clínicos no qual é diagnosticada a presença de alterações nervosas (BOCHENER & STRUCHINER, 2003; MISE, 2007).

Considerando o curso clínico dos envenenamentos nas conclusões de atendimentos rotineiras no Brasil, a letalidade nos casos tratados é baixa (0,3%) (BRASIL, 1998), mas um número maior de pacientes apresenta seqüelas como perda do membro ou de um segmento deste (JORGE *et al.*, 1999).

1.3.1 Complicações renais

A complicação mais comum dentre os casos letais de picadas ofídicas no Brasil é a insuficiência renal aguda (IRA). Essa é uma das causas de morte por espécies botrópicas (FRANCA & MALAQUE, 2003). Dependendo da quantidade do veneno injetado o paciente pode progredir para um quadro de falência renal e óbito (OTERO *et al.*, 1997). Um outro fator agravante é a idade do indivíduo. Um estudo realizado no Instituto Butantan, em São Paulo, mostrou que os adultos ≥ 60 anos, em relação aos mais jovens, têm maior probabilidade de desenvolverem insuficiência renal (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A patogênese da lesão renal em acidentes botrópicos é complexa, havendo dois prováveis mecanismos de ação, que é o efeito direto do veneno no rim e os efeitos inflamatórios resultantes da liberação de várias citocinas e mediadores. Fosfolipases A₂, um dos componentes tóxicos da peçonha, promove a liberação de corticosteróides e respostas de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores que iniciam o desenvolvimento das complicações teciduais, incluindo IRA (SITPRIJA, 2006).

1.4 Composição do veneno botrópico e suas ações sobre os tecidos

Os venenos de serpentes são, provavelmente, os mais complexos dentre todos aqueles conhecidos. Contêm 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco é constituído por proteínas e por uma parte não protéica (VARANDA & GIANINNI, 1999). Essas misturas são reconhecidas como fontes úteis de substâncias bioativas, apresentando uma vasta gama de atividades farmacológicas (ZHANG *et al.*, 2003).

Dentre os componentes protéicos, encontra-se uma grande variedade de enzimas como fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, etc (figura 5). Dentre os componentes orgânicos não protéicos encontram-se aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos, lipídeos, principalmente fosfolipídios e aminas biogênicas (VARANDA & GIANNINI, 1999).

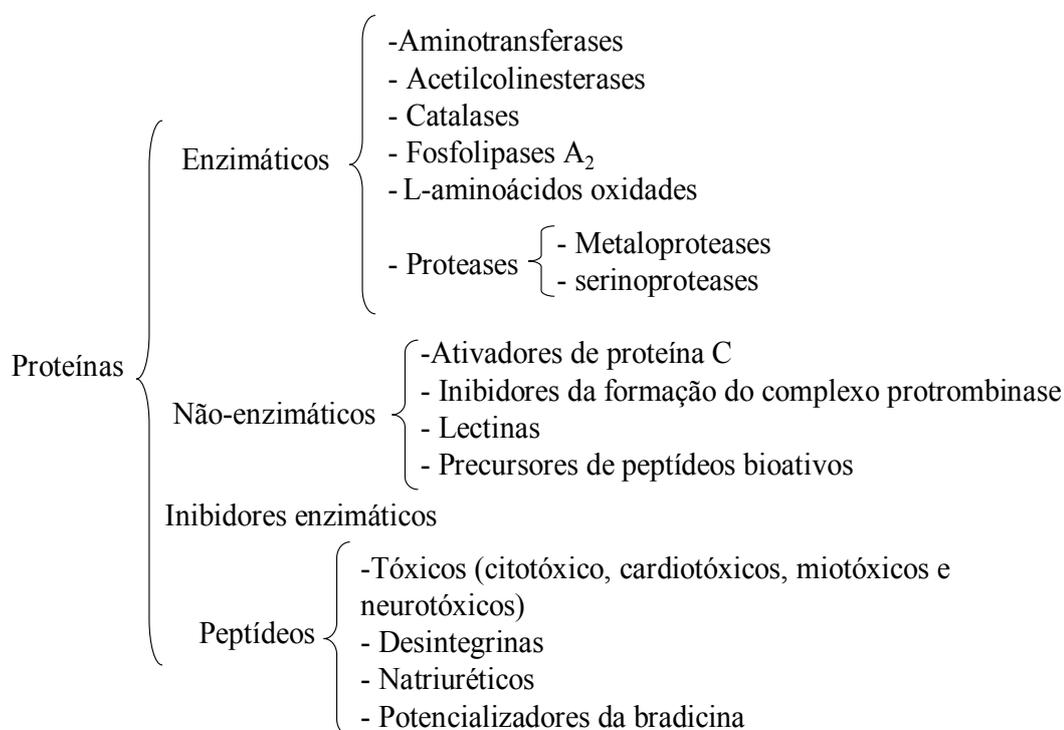


Figura 5: Componentes protéicos presentes nos venenos botrópicos.

Fonte: RAMOS & SELISTRE-DE ARAÚJO, 2005.

Os componentes não protéicos dos venenos podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os constituintes inorgânicos conhecidos são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco, como mostra a figura 6 (PONCE-SOTO *et al.*, 2006). Porém, nem sempre são encontrados em todos os venenos e suas quantidade também varia para cada espécie. O papel biológico de cada um desses constituintes inorgânicos não está claro. Alguns estudos sugerem que cálcio, magnésio e manganês são importantes para a estabilização de

certas proteínas, enquanto que outros, como zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como as metaloproteases (BJARNASON & FOX, 1994; AIRD, 2002).



Figura 6: Componentes não-protéicos presentes nos venenos botrópicos.

Fonte: RAMOS & SELISTRE-DE ARAÚJO, 2005.

A composição dos venenos pode exibir variações associadas com filogenia, sexo, origem geográfica, época, dieta, idade e preferência por presas (CHIPPAUX *et al.*, 1991; MACKESSY *et al.*, 2003).

Além dos componentes presentes nos venenos, outras substâncias também participam dos envenenamentos por serpentes *Bothrops*. Esses acidentes envolvem tanto a ação direta dos componentes da peçonha sobre os tecidos como a liberação de vários mediadores endógenos da vítima, tornando complexa a patogênese dos efeitos sistêmicos causados nesses envenenamentos. Foi proposto que histamina, bradicinina, eicosanoides, PAF e mediadores dos neurônios estão envolvidos nos acidentes por essas serpentes (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949; OHSAKA, 1979; ROTSCCHILD & ROTSCCHILD, 1979; HAVT *et al.*, 2001). Trabalhos têm proposto também o envolvimento de citocinas e óxido nítrico nos acidentes ofídicos por serpentes do gênero *bothrops* (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1997; PETRICEVICH *et al.*, 2000).

As peçonhas das serpentes botrópicas podem ser caracterizadas por três atividades fisiológicas complexas: ação proteolítica, mais bem definida como ação inflamatória aguda, ação coagulante e ação hemorrágica. Diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para

induzir um único efeito, assim como um único tipo de toxina pode ter várias atividades (FRANÇA, 2003; NETTO, 2007).

1.4.1 Serinoproteases

As serinoproteases são encontradas em microorganismos, plantas e diversos animais. São muito abundantes nos venenos de serpentes principalmente na família *Viperidae*, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas contidas no veneno (SERRANO & MAROUN, 2005).

Essas enzimas transformam o fibrinogênio de mamíferos em filamentos de fibrina, ativam fatores da coagulação e a proteína plasmática C, liberam cininas do cininogênio e clivam componentes do complemento C3 (OTERO *et al.*, 1997). Essas proteínas afetam muitos passos da cascata de coagulação, não só de maneira inespecífica, através da degradação proteolítica, mas também seletivamente, através da ativação ou inativação de fatores da coagulação envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD *et al.*, 2000).

Existem várias serinoproteases, como a calicreína-símile, que tem ação hipotensora ao liberar bradicinina, e a enzima trombina-símile, que é responsável pela formação do coágulo de fibrina na etapa final da cascata de coagulação sanguínea, entre outras. Este efeito deve-se, entre outros fatores, à ação desta enzima sobre o fibrinogênio, transformando-o em fibrina. Diferentemente, estas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A e B, enquanto a trombina sérica libera ambos. Isso caracteriza a formação de um complexo de fibrina facilmente degradada pela plasmina, gerando, assim, um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio. Por outro lado, a trombina-símile não ativa o fator XIII da cascata de coagulação, responsável por promover ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. Sem a ativação deste fator, somente o coágulo “frouxo” é formado, sendo este rapidamente removido da corrente sanguínea, tanto pela ação de fibrinólise quanto pela ação do sistema retículo endotelial (MARKLAND, 1998; FONSECA 2006).

O veneno de *B. atrox* contém pelo menos duas formas de uma serinoprotease, a trombina-símile (PETRETSKI *et al.*, 2000). Em adição, uma trombina-símile, isolada do veneno de *Bothrops insularis*, causou severas alterações renais em sistema de perfusão com rim de rato isolado (BRAGA *et al.*, 2007).

1.4.2 Metaloproteases

Muitas metaloproteases dependentes de zinco têm sido isoladas de venenos de serpentes, sendo responsáveis pela indução de hemorragia, bolhas e mionecroses (FRANCESCHI *et al.*, 2001). As metaloproteases, também conhecidas como SVMPs (metaloproteases de venenos de serpentes), agem principalmente como fatores hemorrágicos, exercendo seus efeitos por degradação de proteínas tais como laminina, nidogênio, fibronectina, colágeno tipo I e IV e proteoglicanos de membrana basal endotelial (FOX & SERRANO, 2005; MOURA-DASILVA *et al.*, 2008).

SVMPs com função fibrinogenolítica, geram incoagulabilidade sanguínea, assim como as serinoproteases anteriormente citadas. Proteínas da coagulação sanguínea, como o fibrinogênio (GARCIA *et al.*, 2004) e o fator de von Willebrand (KAMIGUTI *et al.*, 1996) são também alvos de suas atividades proteolíticas e contribuem para seu efeito hemorrágico. Essas proteínas podem também inibir agregação plaquetária (LAING & MOURA-DASILVA, 2005).

Esses dois efeitos das SVMPs sobre componentes da coagulação sanguínea, associados com a digestão proteolítica da membrana basal, parecem ser seus principais mecanismos de indução hemorrágica. Um estudo recente demonstrou que essas proteínas, juntamente com serinoprotease e proteína lectina-símile tipo C de veneno de *Bothrops asper*, são responsáveis por induzir hemorragia, desfibrinogenação, trombocitopenia e hipoagregação plaquetária (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

1.4.3 Lectinas

As lectinas são definidas como proteínas com afinidade específica para moléculas de carboidratos, reconhecidas pela sua capacidade de aglutinar células (ÂNGULO & LOMONTE, 2008).

Lectinas tipo C que perderam a capacidade de se ligar a carboidratos, só foram encontradas nos venenos de serpentes, até os dias atuais. São denominadas proteínas símiles e são metaloproteases com sua cadeia leve homóloga às lectinas específicas para galactose. Possuem ação anticoagulante, inibitória da agregação plaquetária e da trombina (JEBALI *et al.*, 2009).

Recentemente, Havt *et al.* (2005), reportaram que uma lectina isolada de *bothrops pirajai* promove alterações renais em sistema de perfusão de rim de rato isolado. Um outro estudo, no qual também foi isolada uma lectina do veneno de serpente *bothrops insulares*, foi encontrada a presença de alterações renais no mesmo sistema de rim isolado perfundido (BRAGA *et al.*, 2006).

1.4.4 Fosfolipases

As fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem uma superfamília de enzimas definidas por catalisar a hidrólise de ésteres em substratos fosfolipídicos de membranas celulares liberando precursores de mediadores químicos relacionados ao processo inflamatório. Em mamíferos foram descritas 19 famílias com atividade fosfolipásica encontrada sob duas formas: extracelular ou secretória e intracelular ou citosólica (BONFIN *et al.*, 2008).

Os produtos das reações de hidrólises da PLA₂ são ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Os ácidos graxos liberados por essas enzimas, como ácido araquidônico e ácido oléico, podem ser importantes fornecedores de energia. O ácido araquidônico também pode funcionar como segundo mensageiro, bem como precursor de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas), os quais são potentes mediadores da inflamação. Lisofosfolipídios, por sua vez, é importante na sinalização celular, remodelagem fosfolipídica e perturbação membranar (SIX & DENNIS, 2000).

As PLA₂ estão presentes em mamíferos e são também componentes de venenos de serpentes, abelhas, lagartos e escorpiões e podem ser divididos em vários tipos (KINI, 2003). Nas peçonhas de serpentes, essas enzimas parecem possuir uma vasta gama de atividades, incluindo neurotoxicidade, miotoxidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, agregação ou inibição plaquetária, coagulação e efeitos hipotensivos (SAI-NGAM, 2008). Há evidências crescentes de que as PLA₂s são um dos componentes mais tóxicos presentes nos venenos de serpentes (OWNBY *et al.*, 1999).

Duas miotoxinas com atividade de PLA₂ foram isoladas do veneno de *bothrops atrox* (KANASHIRO *et al.*, 2002). Em um outro estudo, uma PLA₂ isolada de veneno botrópico, causou alterações renais, o que pode refletir sua atividade enzimática sobre os fosfolipídios de membrana de células renais e produção de derivados do ácido araquidônico (BRAGA *et al.*, 2008).

1.4.5 L-aminoácido oxidase

A enzima L-aminoácido (LAAO) oxidase é uma flavoenzima que cataliza a deaminação de substratos L-aminoácidos em um α -cetoácido com produção de amônia e peróxido de hidrogênio. LAAO encontrada em venenos de serpentes parece contribuir para a toxicidade do veneno, possivelmente através da geração de peróxido de hidrogênio formado como resultado da reoxidação da redução transitória do cofator flavina por oxigênio molecular. É encontrada em muitos venenos de serpentes, todavia, o papel exato dessa enzima não é bem compreendido. Ela representa aproximadamente 30% dos venenos totais de algumas espécies de serpentes e geralmente apresenta uma cor amarela (TAKATSUKA *et al.*, 2001).

As LAAOs provenientes de bactérias, fungos e espécies de plantas, estão envolvidas na utilização de fontes de nitrogênio, porém, suas funções nos venenos de serpentes é ainda pouco compreendida, embora desempenhem papel na indução de apoptose, alteração plaquetária, sendo consideradas toxinas (DU & CLEMETSON, 2002).

Essas enzimas demonstraram induzir apoptose (ANDE *et al.*, 2006; ZHANG AND WU, 2008; ALVES *et al.*, 2008) e isso é parcialmente devido à geração de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pertence a espécies reativas de oxigênio (ERO) e a perturbação mitocondrial tem sido associada com o aumento da produção de ERO (ZHANG & WU, 2008).

Uma LAAO isolada de veneno bruto de *Bothrops insularis* foi responsável por promover alterações renais em sistema de perfusão de rim isolado. Observou-se a presença de necrose no rim, como resultado de lesão celular induzida por essa enzima (BRAGA *et al.*, 2008).

1.4.6 Peptídeos potencializadores da bradicinina

Rocha e Silva *et al.* foram os primeiros a descobrir e descrever o neuropeptídeo bradicinina como regulador crucial da pressão sanguínea (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o veneno de serpente *Bothrops jararaca* continha grandes quantidades de peptídeos potencializadores da bradicinina (PPBs), que foram caracterizados como inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina (DA SILVA *et al.*, 1979; FERREIRA *et al.*, 1970).

Os PPBs foram extensamente estudados devidos suas ações potencializadoras da função da bradicinina sobre o músculo liso, sobre o qual causavam hipotensão (UFKES *et al.*, 1977; FERREIRA *et al.*, 1970).

Esses peptídeos não são componentes exclusivos do veneno de *Bothrops jararaca*. Outros pesquisadores isolaram esses mesmos peptídeos de outras espécies do gênero botrópico (HAYASHI *et al.*, 2003; HAYASHI & CAMARGO, 2005).

Características estruturais dos PPBs e seu potente efeito anti-hipertensivo pela inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA), foram a base para o desenvolvimento do captopril, o primeiro inibidor sintético, direcionado contra o sítio ativo da ECA (CUSHMAN *et al.*, 1982; CUSHMAN *et al.*, 1987).

Estudos farmacológicos com os PPBs identificados, mostraram que mesmo aquelas sequências de peptídeos, que mostraram-se fracos inibidores das ECA somáticas, também possuíam uma forte atividade farmacológica, atuando como potencializadores do efeito hipotensor induzido pela bradicinina (HAYASHI *et al.*, 2005; HAYASHI *et al.*, 2003; IANZER *et al.*, 2007). De fato, mais recentemente evidências obtidas por experimentos *in vivo* e *in vitro*, sugeriram que os efeitos farmacológicos dos PPBs não eram exclusivamente baseados nas suas ações sobre a ECA (HAYASHI *et al.*, 2005; IANZER *et al.*, 2007).

As ações biológicas e os efeitos farmacológicos da bradicinina são mediados por dois tipos diferentes de receptores, denominados B₁ e B₂ (REGOLI *et al.*, 1994). Entre as principais ações fisiológicas da bradicinina está sua participação nos mecanismos de controle do tônus vascular. A sua ação vasodilatadora arterial deve-se principalmente à ativação de receptores B₂ na superfície de células endoteliais, seguida pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina. A bradicinina promove mudança bifásica do pH intracelular, que pode também modular a liberação de NO pela célula (HECKER *et al.*, 1994).

1.5 O papel do óxido nítrico nos envenenamentos botrópicos

O óxido nítrico (NO) possui muitas ações biológicas importantes em vários tecidos (KONE, 1997). Dentre elas, se destaca sua importante ação como mediador endógeno no controle do tônus vascular devido a sua potente atividade vasodilatadora (MONCADA *et al.*, 1991).

Em 1980, foi primeiramente conhecido como Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) quando descoberto por Furchgott & Zawadzki. Subsequentemente foi identificado como óxido nítrico pelos grupos de Moncada e Ignarro (DUSSE et al., 2003). Após este mediador ter sido reconhecido, houve uma enorme expansão da compreensão à cerca do papel desempenhado pelo endotélio.

Para além do seu papel fisiológico, o NO tem sido implicado na gênese de uma variedade de condições patológicas como inflamação, ateroscleroses e lesões hipertensivas vasculares na qual ocorre infiltração de células inflamatórias (OLSEN, 1972; BUSSE & MULSCH, 1990; LIBBY & HANSSON, 1991).

A biossíntese de NO é controlada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), presentes em diversos tecidos. Existem três isoformas conhecidas de NOS: uma forma induzível- iNOS, importante em respostas a estímulos patológicos; e duas forma constitutivas- eNOS e nNOS que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio e nos neurônios (RANG *et al.*, 2004; NATHAN, 1994; SNYDER & BREDT, 1992; HARE & COLUCCI, 1995; WANG *et al.*, 1999).

Nos rins foram isoladas as três isoformas das NOS. Na mácula densa constatou-se forte presença da nNOS e nas arteríoloas glomerulares foram encontradas as isoformas iNOS e eNOS nos ramos aferentes e eferentes, com maior concentração nas arteríoloas eferentes (BACHMANN *et al.*, 1995).

O NO participa na regulação da hemodinâmica glomerular e medula renal, através de respostas de retroalimentação tubuloglomerular, de liberação de renina, e pelo controle no volume de flúidos extracelulares (RAIJ & BAYLIS, 1995; KONE & BAYLIS, 1997).

Muitos análogos de L-arginina que inibem a síntese de NO, são responsáveis por causarem lesão tecidual (PALMER *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1988). Injúrias histológicas e bioquímicas severas nos rins foram reportadas, induzidas pela administração oral crônica de inibidores de NOS (KASHIWAGI *et al.*, 2000).

Elevados níveis sorológicos de NO tem sido descrito em envenenamentos por *Bothrops atrox* (BARROS *et al.*, 1998). Adicionalmente, experimento com camundongos que receberam venenos de serpentes de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*, reportou incrementos de NO nos soros desses animais, sugerindo que esse mediador, juntamente com ação direta do veneno nos tecidos, teria um papel relevante na patogênese das alterações sistêmicas característica de envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*. Todavia, o

papel do óxido nítrico nessa patologia tem sido objeto de poucos estudos (PETRICEVICH *et al.*, 2000).

Outro estudo, também relacionado com envenenamento botrópico, mostra que o NO parece desempenhar um papel crítico nas alterações locais agudas patológicas, tais como hemorragia e mionecrose, induzidas por veneno de *Bothrops asper*. Em contrapartida, não contribui para o edema local e às fases tardias da infiltração inflamatória. Inibição da síntese de NO, não afeta a coagulopatia induzida pelo veneno, todavia, inibição da NOS aumenta os efeitos letais do veneno de *Bothrops asper*, quando testado por via intraperitoneal, sugerindo que NO tem um papel protetor em modelo de envenenamento, provavelmente associado com sua participação na hemostasia vascular (CHAVES *et al.*, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública no Brasil, não só pela frequência com que ocorrem, mas também pela morbidade e mortalidade que ocasionam (CARDOSO & BRANDO, 1982). O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, tanto pela porcentagem predominante dos acidentes ofídicos registrados, quanto pelo seu potencial farmacológico. A serpente *Bothrops atrox* é uma dentre as espécies deste gênero que é responsável pela maior parte dos acidentes em humanos (BOECHAT *et al.*, 2001).

A complicação sistêmica mais séria após um acidente botrópico é a insuficiência renal aguda (IRA). Além de bastante grave, esse quadro é muito comum nos casos em que o paciente evolui ao óbito (BOER-LIMA *et al.*, 2002). A utilização de modelos experimentais para investigar a patogênese das lesões renais causados por venenos botrópicos, tem mostrado severas alterações renais. Porém, a patogênese dessas complicações após envenenamentos por espécies do gênero *Bothrops* ainda não é bem definido (SITPRIJA, 2006).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do veneno total de *Bothrops atrox* no sistema de perfusão de rim de rato isolado e investigar a participação do óxido nítrico no envenenamento botrópico, na perspectiva de elucidação dos mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade que é de muita relevância para a busca de substâncias com valor terapêutico.

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos renais causados pelo veneno de serpente *Bothrops atrox* na perspectiva de elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia renal.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos renais induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* em rim de rato isolado;
- Avaliar as alterações histológicas renais produzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*;
- Avaliar a participação do óxido nítrico no envenenamento promovido por *Bothrops atrox*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Ratos Wistar adultos machos pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum de 8 a 12 horas antes dos experimentos com água “*ad libitum*”.

4.2 Veneno e drogas utilizadas

O veneno de *Bothrops atrox* (VBA) foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Diva Maria Borges Nojosa, Coordenadora do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As drogas e sais utilizados para realização da dissertação foram obtidos da empresa Sigma (EUA).

4.3 Perfusão de rim isolado

4.3.1 Sistema utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C. Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema, como demonstrado na figura 7.

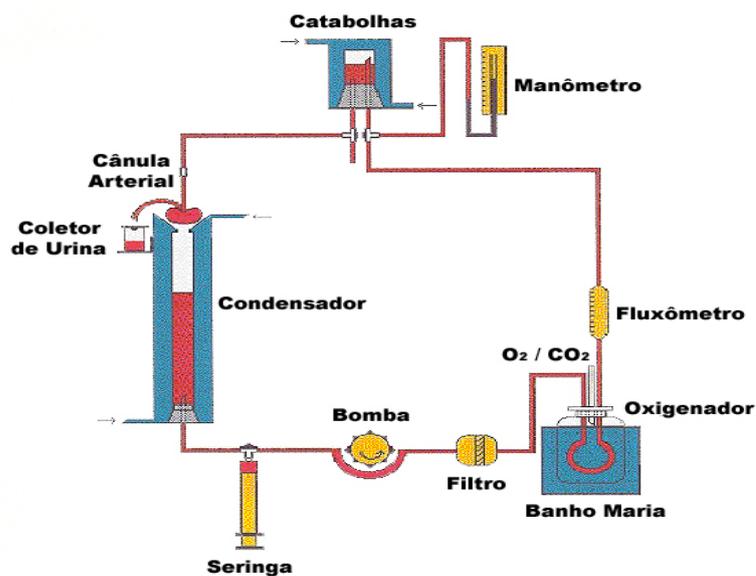


Figura 7: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

4.3.2 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. Foi avaliado em cada uma das bombas a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (FU) em L/h e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 8, 9 e 10, abaixo.

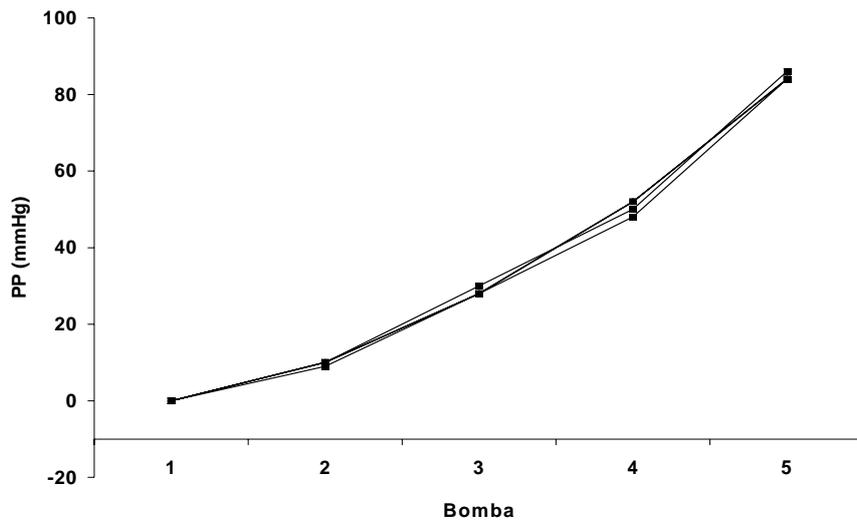


Figura 8: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n=6).

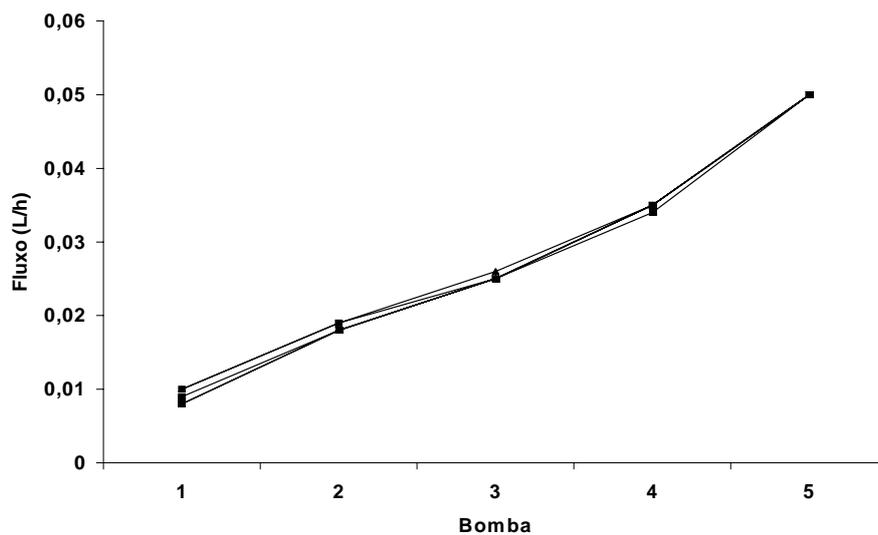


Figura 9: Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n=6).

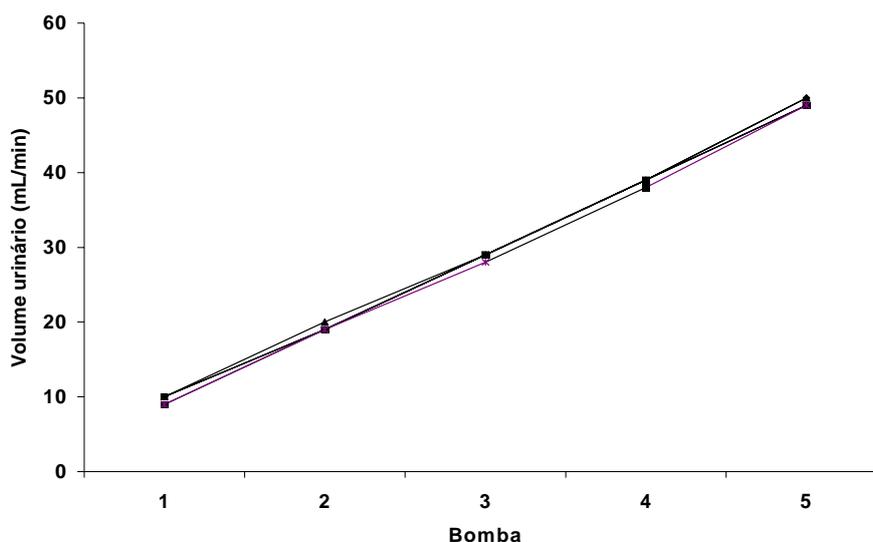


Figura 10: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema nas cinco velocidades da bomba de perfusão (n = 6).

4.3.3 Solução perfusora

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

4.3.4 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. Inicialmente a veia femoral foi isolada e o manitol (100 mg) administrado (figura 11), a fim de facilitar a canulação posterior do 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. Rebateram-se as vísceras abdominais para o lado esquerdo, a fim de facilitar a visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.



Figura 11: Visualização da artéria femural para injeção de manitol.

Com uma lupa (7X) o ureter foi identificado, dissecado e canulado com tubo de polietileno PE-30 (figura 12), bem como a artéria mesentérica superior e artéria renal (figura 13). 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.

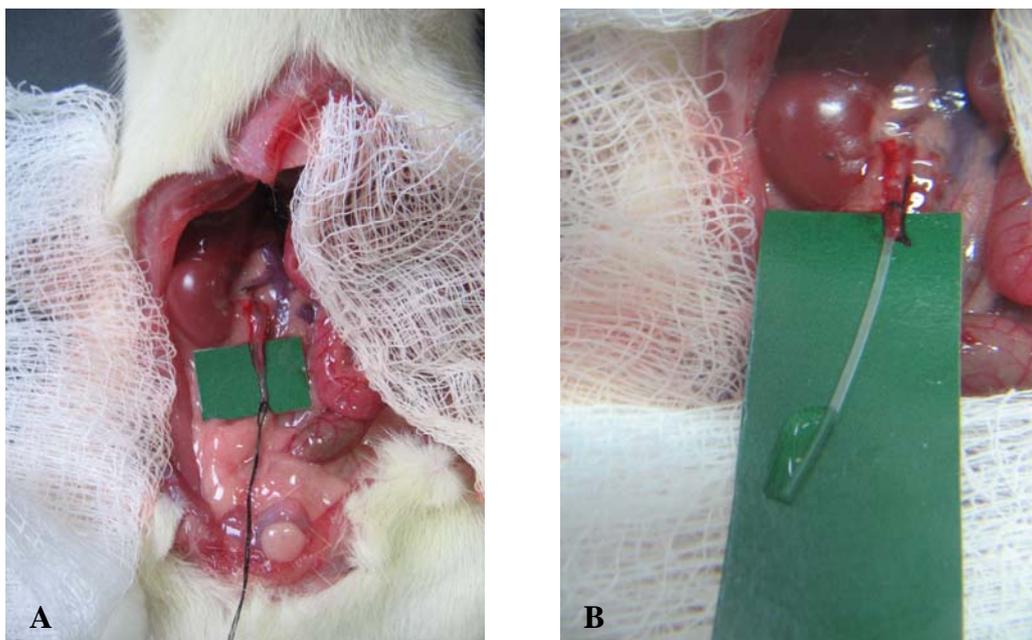


Figura 12: Visualização da identificação (A) e canulação do ureter (B).

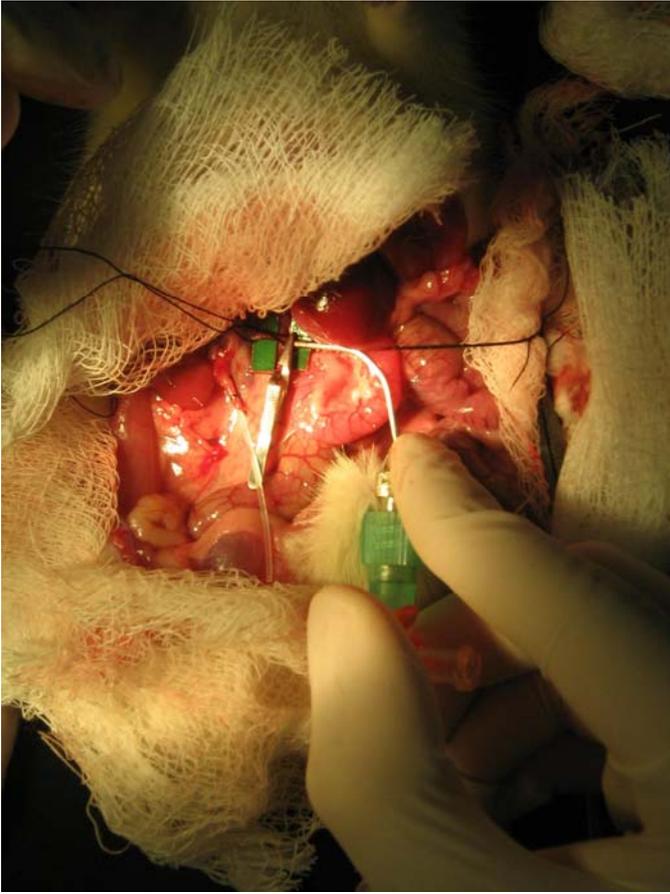


Figura 13: Visualização da artéria renal pela artéria mesentérica.

No início do procedimento cirúrgico uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo* evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem interrupção do fluxo (figura 14).



Figura 14: Visualização do rim isolado do rato no sistema de perfusão renal.

4.3.5 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 minutos iniciais foram utilizados como controle interno para os experimentos com a concentração de $1\mu\text{g/mL}$ (0,1 mg em 100mL) da peçonha da serpente *Bothrops atrox*. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20°C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal.

4.3.6 Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem &44 - Bayer[®] diagnóstica). Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal de Ceará.

A inulina do perfusato e urina foram determinadas 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 (LAFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

As osmolaridades das amostras de urina e perfusato foram medidas utilizando um osmômetro (Osmômetro de Pressão a Vapor - modelo WESCOR[®] 5520). Esse parâmetro foi determinado, também, no LAFAVET.

4.3.7 Cálculos de parâmetros funcionais renais

As seguintes fórmulas foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Quadro 1: Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais.

1. FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo urinário
FU = (Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo) x 10 (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)
2. PP (mmHg) = Pressão de perfusão. Leitura em manômetro
3. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular
RFG = (DOU in / DOP in x FU) sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato
4. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal (registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)
5. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal
RVR = PP (mmHg) / FPR
6. FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio filtrado
FNa ⁺ = RFG x PNa ⁺ (PNa ⁺ = Concentração de sódio no perfusato)
7. ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio excretado
ENa ⁺ = FU x UNa ⁺ (UNa ⁺ = Concentração de sódio na urina)
8. TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio transportado
TNa ⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺

9. %TNa⁺ = Percentual de sódio transportado
$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$
10. C_{OSM} (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico
$[U_{OSM} / P_{OSM}] \times FU$ (onde U_{OSM} = Osmolaridade urinária e P_{OSM} = Osmolaridade do perfusato)
11. FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio filtrado
$FK^+ = RFG \times PK^+$ (PK^+ = concentração de potássio no perfusato)
12. EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio excretado
$EK^+ = FU \times UK^+$ (UK^+ = Concentração de potássio na urina)
13. TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio transportado
$TK^+ = FK^+ \times EK^+$
14. %TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Percentual de potássio transportado
$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$
15. TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto transportado
$TCl^- = FCl^- \times ECl^-$
16. % TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Percentual de cloreto transportado
$\% TCl^- = TCl^- \times 100 / F TCl^-$

4.3.8 Estudo histológico

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

Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, e em seguida cortados, em uma espessura de 5 μm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON®). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido).

4.4 Dosagem de nitrito – Determinação da produção de óxido nítrico

Ratos Wistar, machos, foram anestesiados com halotano para posterior infusão intravenosa do veneno da serpente *Bothrops atrox*, com suas respectivas doses (0,056 mg/kg, 0,168 mg/kg e 0,28 mg/kg), nos grupos experimentais (4 animais por grupo). Em seguida foi feita a coleta de sangue do plexo orbital, em diferentes intervalos de tempo (5 e 15 minutos após a administração do veneno) antes da morte do animal. O sangue foi centrifugado e o sobrenadante conservado a uma temperatura de -70°C para posterior dosagem de nitrito.

O bloqueio farmacológico com L-NAME (10mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p) foi realizado aos 60 minutos antes da administração do veneno bruto de *Bothrops atrox* (nas respectivas doses) em outros grupos experimentais (4 animais por grupo).

A dosagem de nitrito foi obtida como indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) no plexo orbital através da concentração total nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). O nível total de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ foi determinado com NO_3^- das amostras (0,04mL), convertido em NO_2^- pela incubação em uma solução de 0,04mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada “overnight”. Após plaqueamento de 80 μL de cada amostra, em duplicata (placas de 96 poços), uma série de diluições da curva padrão de referência de NO_2^- (640 μmol , 320 μmol , 160 μmol , 80 μmol , 40 μmol , 20 μmol , 10 μmol , 5 μmol , 2,5 μmol , 1,25 μmol e 0,625 μmol) foi preparada. A seguir, foram adicionadas 80 μL da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, NEDD e água destilada) em cada poço.

A coloração púrpura/magenta apareceu imediatamente e foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

4.5 Análises estatísticas

Os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão de cinco experimentos em cada grupo. Diferenças estatísticas entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de

Studente e Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

4.6 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número 55/09.

5 RESULTADOS

5.1 Perfusão rim isolado

A administração de veneno bruto de *Bothrops atrox*, na dose de 1µg/mL no sistema de perfusão renal em ratos, demonstrou um decréscimo dos parâmetros vasculares a partir dos 60 minutos, atingindo um decréscimo mais significativo aos 90 min. A pressão de perfusão (PP) decaiu para 73.01 ± 5.5 mmHg em comparação o controle, 103.6 ± 2.5 mmHg (figura 15 e tabela 1). A resistência vascular renal (RVR) teve um decréscimo de 21% (figura 16 e tabela 2) em comparação ao controle ($C_{30} = 5.101 \pm 0.37$; $VBA_{90} = 4.052 \pm 0.35$ mmHg).

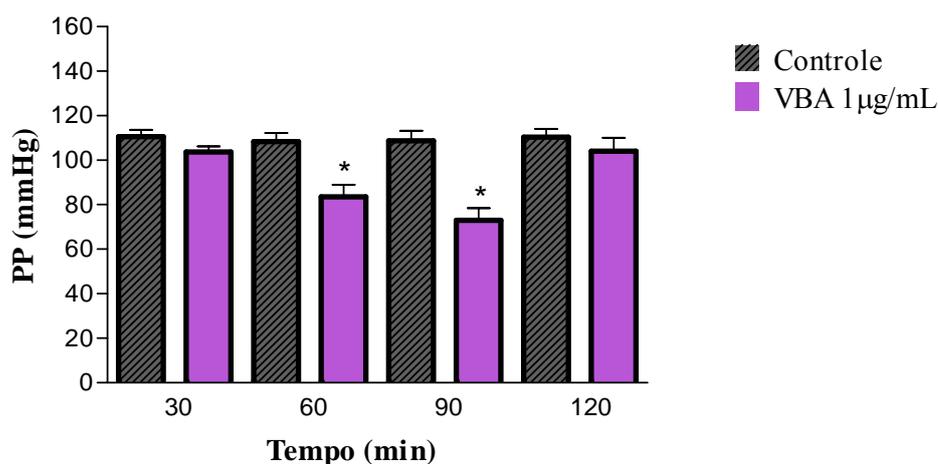


Figura 15: Decréscimo da pressão de perfusão (PP) em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de 1µg/mL. Os resultados dos experimentos do grupo Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 1: Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 1 μ g/mL (n=5).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA 1 μ g/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	110,61	3,08	103,6	2,5
60	108,27	3,98	83,5*	5,5
90	108,69	4,59	73,0*	5,5
120	110,29	3,75	104,0	6,0

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

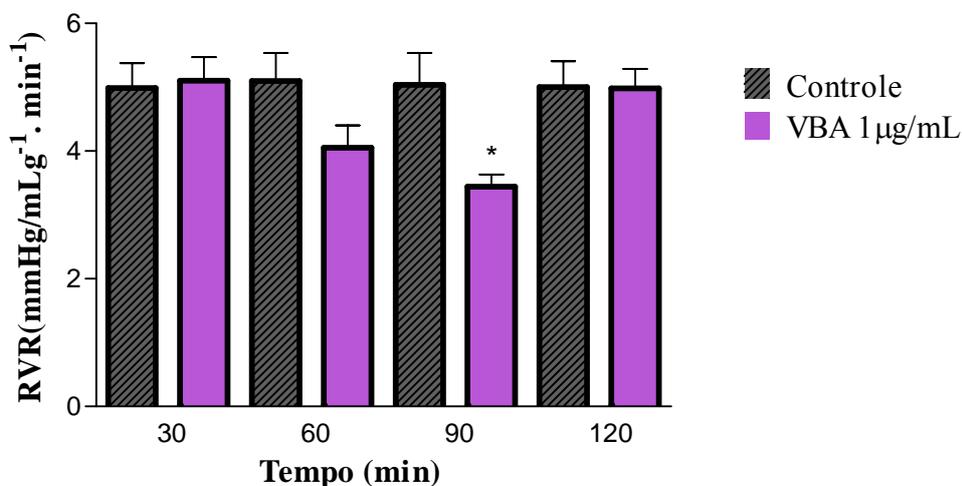


Figura 16: Decréscimo da resistência vascular renal (RVR) em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de 1 μ g/mL. Os resultados dos experimentos do grupo Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 2: Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ ($n=5$).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA $1\mu\text{g/mL}$	
	Média	EPM	Média	EPM
30	4,99	0,39	5,10	0,37
60	5,10	0,44	4,05	0,35
90	5,04	0,50	3,44*	0,19
120	5,00	0,41	4,98	0,31

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

Os parâmetros funcionais também sofreram alteração. A partir dos 60 minutos de perfusão, o fluxo urinário (FU) foi reduzido, porém ocorreu reversão desse efeito e aos 120 minutos ocorreu um acréscimo significativo atingindo valores de $0.5937 \pm 0.12 \text{ mL/g/min}$, equivalente a 71% do controle ($C_{30} = 0.1785 \pm 0.009 \text{ mL/g/min}$). Esses resultados são mostrados na figura 17 e tabela 3. O ritmo de filtração glomerular (RFG) teve um acréscimo de 60% quando comparado com o controle ($C_{30} = 0.8163 \pm 0.10$; $VBA_{120} = 2.059 \pm 0.4631 \text{ mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (figura 18 e tabela 4).

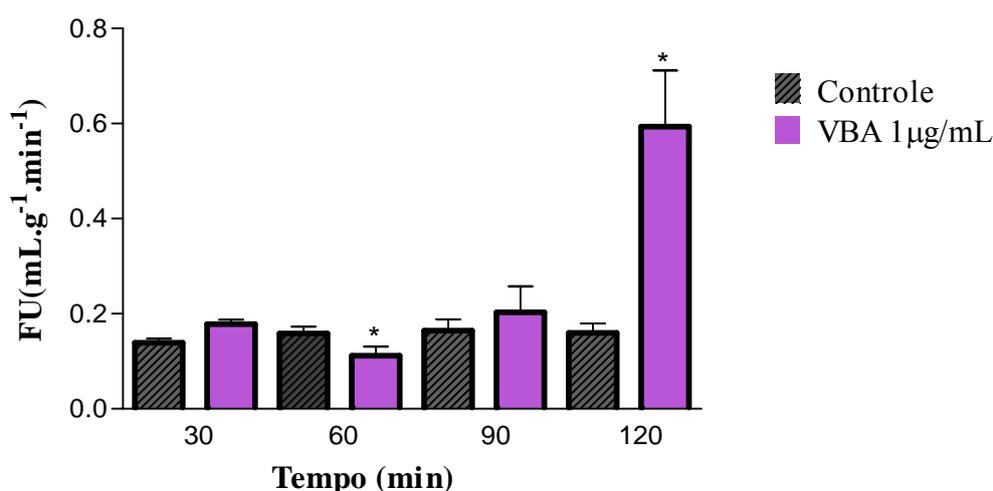


Figura 17: Acréscimo do fluxo urinário (FU) em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de $1\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos do grupo Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos

em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 3: Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ ($n=5$).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA $1\mu\text{g/mL}$	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,139	0,009	0,179	0,009
60	0,158	0,015	0,112*	0,019
90	0,164	0,024	0,203	0,054
120	0,160	0,020	0,594*	0,118

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

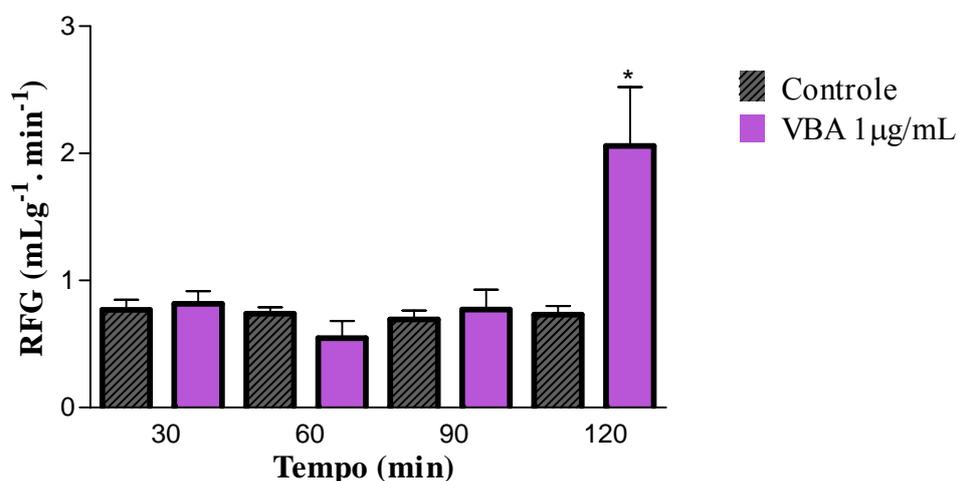


Figura 18: Acréscimo no ritmo de filtração glomerular (RFG) em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de $1\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos do grupo Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 4: Valores do ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA 1µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,768	0,080	0,816	0,099
60	0,739	0,049	0,547	0,134
90	0,695	0,068	0,770	0,158
120	0,731	0,067	2,059*	0,463

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mL.g⁻¹. min⁻¹, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

Alguns dos transportes de eletrólitos tiveram seus parâmetros alterados. O percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) apresentou uma redução aos 120 minutos de perfusão (C₃₀= 81.76 ± 1.46; VBA₁₂₀= 69.63 ± 2.24) (figura 19 e tabela 5). Houve também alteração no percentual de transporte de cloreto (%TCl⁻) aos 120 minutos quando comparado com o controle (C₃₀= 76.80 ± 3.34; VBA₁₂₀= 68.55 ± 1.51). Esses resultados podem ser visualizados na figura 20 e tabela 6. Com relação ao transporte percentual de potássio (%TK⁺), não foi observada nenhuma alteração (figura 21 e tabela 7).

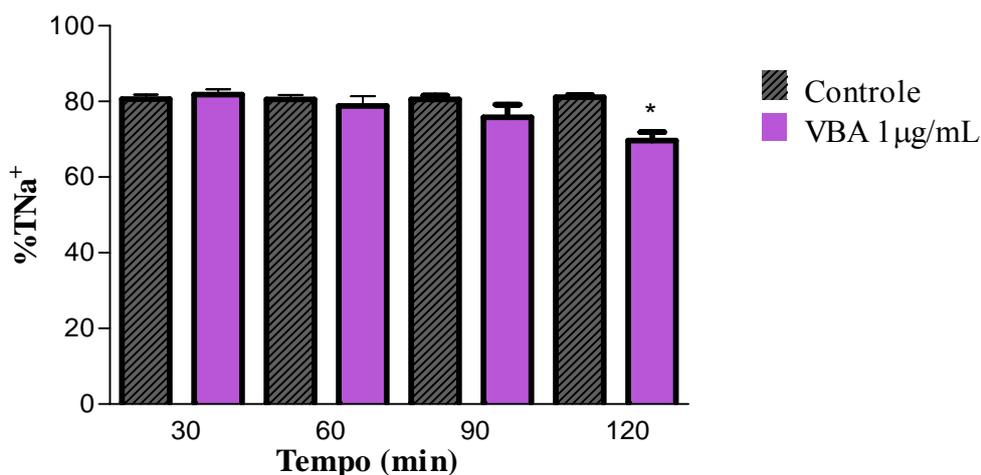


Figura 19: Decréscimo do percentual do transporte de sódio (%TNa⁺) em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de 1µg/mL. Os resultados dos experimentos do grupo Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando p<0,05.

Tabela 5: Valores do percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA 1µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	80,66	1,09	81,76	1,46
60	80,52	1,15	78,78	2,56
90	80,52	1,06	75,82	3,31
120	81,15	0,53	69,63*	2,24

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

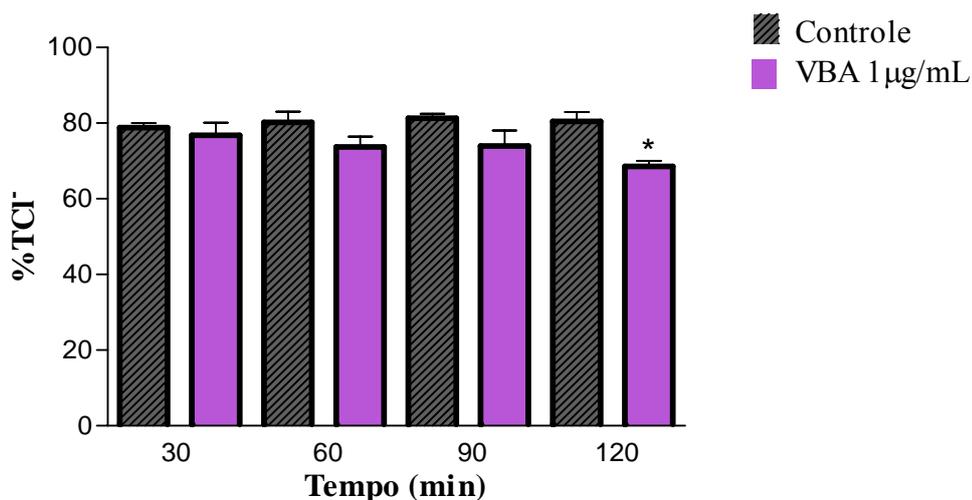


Figura 20: Decréscimo do percentual do transporte de cloreto (%TCI) em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de 1µg/mL. Os resultados dos experimentos do grupo Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 6: Valores do percentual de transporte de cloreto (%TCI) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA 1µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	78,81	1,25	76,80	3,34
60	80,18	2,90	73,67	2,75
90	81,25	1,20	73,98	4,07
120	80,49	2,47	68,55*	1,51

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

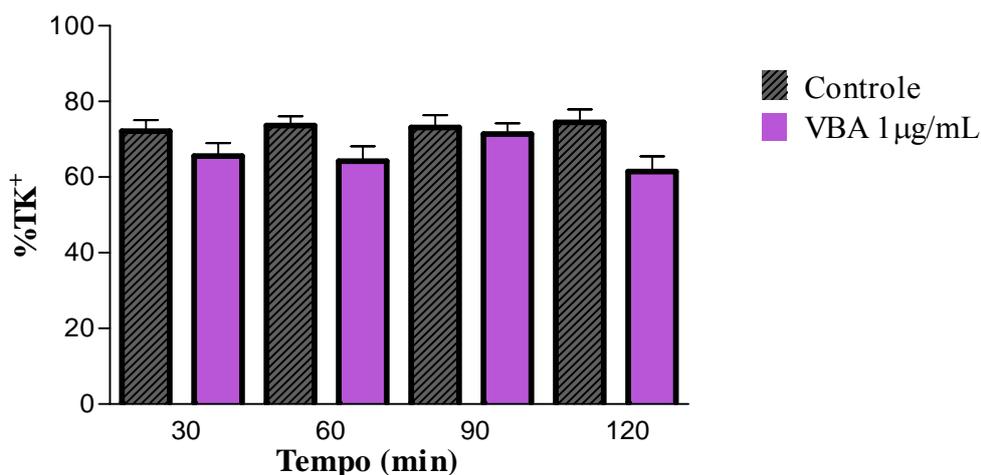


Figura 21: Percentual do transporte de potássio (%TK⁺) inalterado em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de 1µg/mL. Os resultados dos experimentos do grupo Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média ± E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando p<0,05.

Tabela 7: Valores do percentual de transporte de potássio (%TK⁺) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 1µg/mL (n=5).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA 1µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	72,14	2,90	65,53	3,45
60	73,66	2,39	64,19	3,94
90	73,15	3,26	71,37	2,87
120	74,46	3,40	61,49	3,95

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBA (n=5) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

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 VBA promoveu alteração significativa nesse parâmetro aos 120 minutos, quando comparado com o controle (C₃₀= 0.1340 ± 0.008; VBA₁₂₀= 0.5673 ± 0.112 mL.g⁻¹.min⁻¹), como pode ser observado na figura 22 e tabela 8.

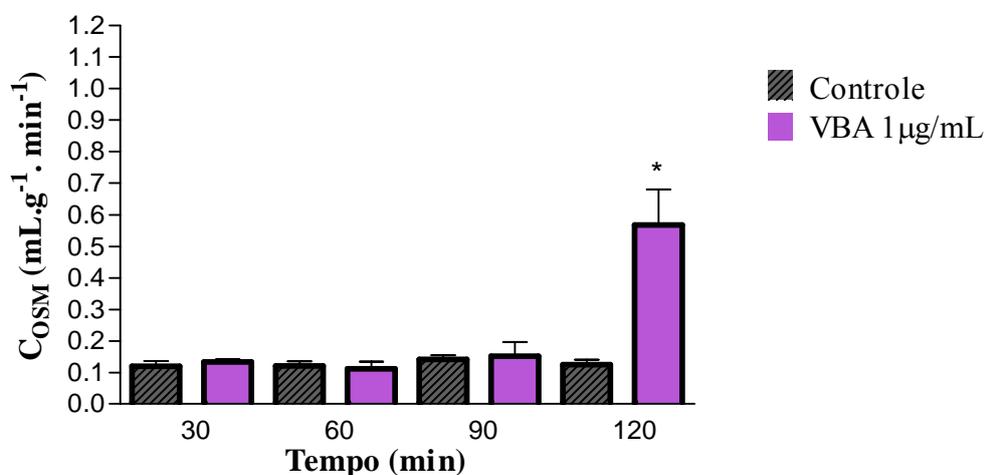


Figura 22: Acréscimo do clearance osmótico (C_{OSM}) em rim isolado de rato. Efeito do veneno bruto de *Bothrops atrox* (VBA) na dose de $1\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos experimentos do grupo Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média \pm E.P.M, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min), comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste t de Student, considerando $p<0,05$.

Tabela 8: Valores do *clearance* osmótico (C_{OSM}) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ ($n=5$).

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		VBA $1\mu\text{g/mL}$	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,120	0,017	0,13	0,008
60	0,121	0,015	0,11	0,023
90	0,142	0,013	0,15	0,044
120	0,125	0,016	0,57*	0,112

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle ($n=6$) e VBA ($n=5$) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

5.2 Análise histológica dos grupos da perfusão

Após a análise histológica dos rins perfundidos com veneno bruto de *Bothrops atrox*, foi observado a presença de alterações morfológicas significativas.

A figura 23 mostra um corte histológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-hanseleit mostrando que não há alterações provocadas pelo veículo. As lâminas analisadas demonstraram que glomérulos, túbulos, vasos e interstícios encontravam-se normais.

Os rins perfundidos com VBA, na concentração de 1µg/mL, apresentaram túbulos com quantidade significativa de material proteináceo. Esses resultados são mostrados na figura 24.

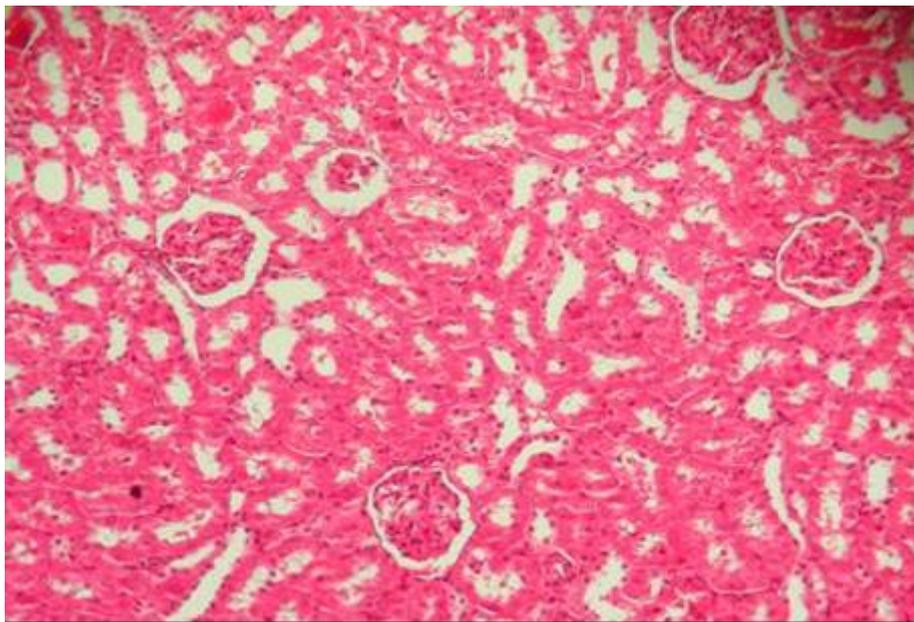


Figura 23: Corte histopatológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada por 120 min (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 100X).

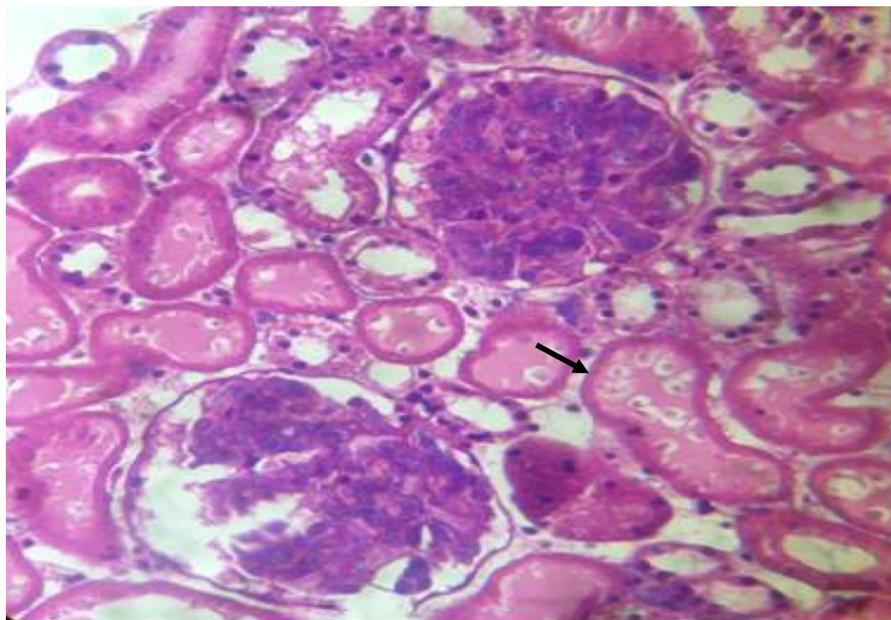


Figura 24: Corte histológico de rim direito perfundido com veneno bruto de *Bothrops atrox*, por 120min, na concentração de 1 μ g/mL (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 400X).

5.3 Dosagem de nitrito após experimento com veneno bruto da *Bothrops atrox*

Após a infusão do VBA nas dose de 0,056, 0,168 e 0,28 mg/kg (10, 30 e 50% da DL50-Dose Letal para 50% dos animais, respectivamente) do VBA, nos grupos experimentais, foi realizada a coleta de sangue do plexo orbital em diferentes intervalos de tempos (5 e 15 minutos), antes da morte do animal. Após a reação de Griess (descrita em material e métodos), observou-se um aumento significativo na produção de nitrito (μ mol) com as doses de 0,056 mg/kg e 0,168 mg/kg, logo após os cinco minutos de infusão do VBA (Controle_{5min}= 5 μ mol; VBA 0,056mg/kg_{5min}= 26 μ mol; VBA 0,168mg/kg_{5min}= 32 μ mol). O bloqueio farmacológico com L- NAME (LN) na dose de 10mg/kg aos 60 minutos antes da infusão do VBA nos grupos experimentais nas doses de 0,056 e 0,168mg/kg, demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na produção de nitrito quando comparado com os grupos tratados somente com VBA (VBA 0,056mg/kg_{5min}= 26 μ mol; LN+VBA_{5min}= 15,4 μ mol). Os resultados com a dose de 0,056mg/kg podem ser observados na figura 25 e tabela 9 e com a dose de 0,168mg/kg podem ser observados na figura 26 e tabela 10.

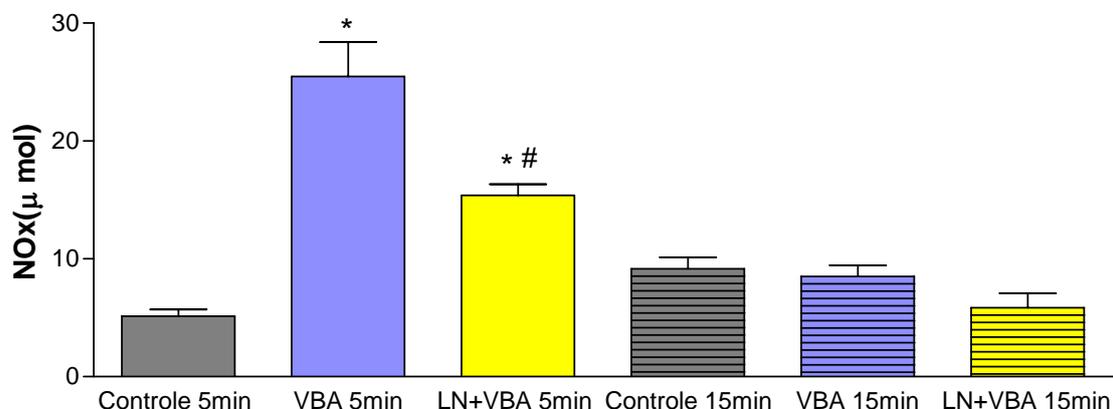


Figura 25: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,056mg/kg. As dosagens foram realizadas aos 5 e 15 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle e VBA em cada tempo de dosagem.

Tabela 9: Valores das concentrações de nitrito (NO_2^-) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 0,056mg/kg (n=4).

Tempo (min)	Grupos estudados					
	Grupo controle		VBA 0,056mg/kg		LN + VBA	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
5	5,13	0,58	25,5*	2,89	15,4*#	0,94
15	9,16	0,99	8,51	0,95	5,86	1,23

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e VBA (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) com $p < 0,05$, unidade em μmol , compilados e distribuídos em dois períodos (5 e 15min).

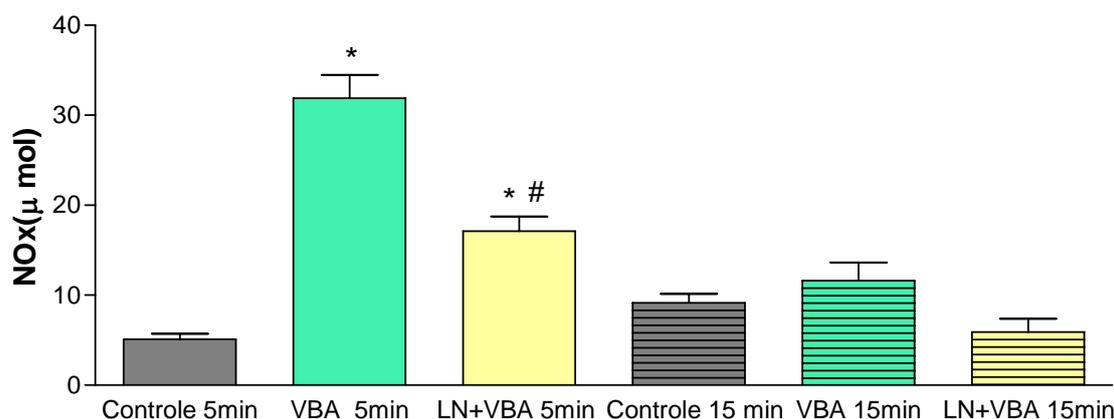


Figura 26: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,168mg/kg. As dosagens foram realizadas aos 5 e 15 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle e VBA em cada tempo de dosagem.

Tabela 10: Valores das concentrações de nitrito (NO_2^-) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 0,168mg/kg ($n=4$).

Tempo (min)	Grupos estudados					
	Grupo controle		VBA 0,168mg/kg		LN + VBA	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
5	5,13	0,58	31,88*	2,60	17,11*#	1,65
15	9,16	0,99	11,62	2,01	5,91	1,46

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle ($n=4$) e VBA ($n=4$) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) com $p < 0,05$, unidade em μmol , compilados e distribuídos em dois períodos (5 e 15min).

Na dose de 0,28 mg/kg, um aumento significativo na produção de nitrito foi observado somente aos 15 minutos após infusão do VBA (Controle_{15min} = $9\mu\text{mol}$; VBA 0,28mg/kg_{15min} = $41\mu\text{mol}$). Após bloqueio com L- Name aos 60 minutos antes da infusão do VBA no grupo experimental, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na produção de nitrito quando comparado com o grupos tratado somente com VBA (figura 27 e tabela 11).

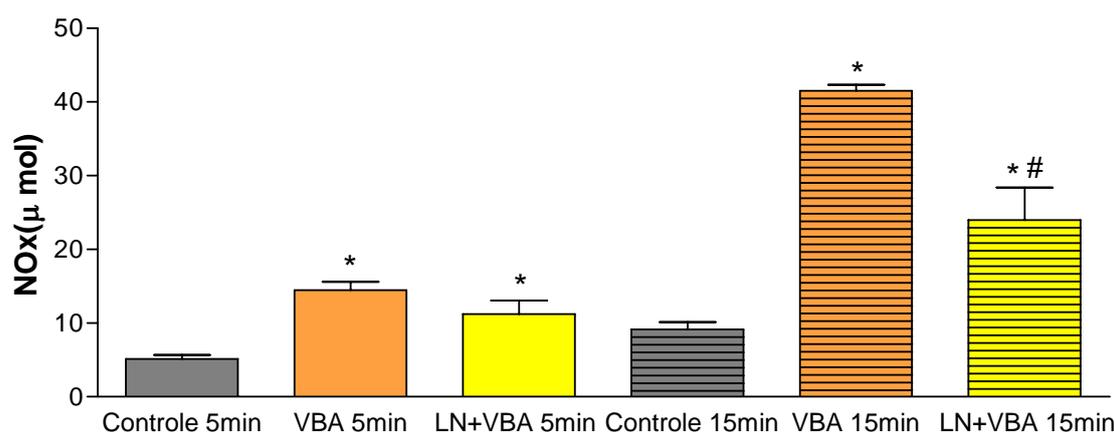


Figura 27: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, na dose de 0,28mg/kg. As dosagens foram realizadas aos 5 e 15 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle e VBA em cada tempo de dosagem.

Tabela 11: Valores das concentrações de nitrito (NO_2^-) dos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops atrox* (VBA) na concentração de 0,28mg/kg (n=4).

Tempo (min)	Grupos estudados					
	Grupo controle		VBA 0,28mg/kg		LN + VBA	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
5	5,13	0,58	14,5*	1,11	11,22*	1,83
15	9,16	0,99	41,5*	0,87	24,0*#	4,41

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=4) e VBA (n=4) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) com $p < 0,05$, unidade em μmol , compilados e distribuídos em dois períodos (5 e 15min).

Testes preliminares de dosagem de nitrito foram realizados também com as doses de 0,056, 0,168 e 0,28mg/kg. Porém a concentração de nitrito foi dosada em maior número de intervalos de tempo (1, 5, 15, 30 e 60 min). Esses resultados podem ser consultados no anexo II.

6 DISCUSSÃO

A insuficiência renal aguda é uma dos problemas mais comuns nos casos de envenenamentos por espécies de gênero *Bothrops*, constituindo-se a principal causa de morte (FRANCA & MALAQUE, 2003). Outra complicação comum que tem sido bastante reportado em acidentes ofídicos por serpentes botrópicas, é a hipotensão, um efeito sistêmico capaz de produzir um estado de perfusão insuficiente para vários órgãos (ABUELO, 1995).

Um dos fatores que dificulta a elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese dos efeitos causados por peçonhas botrópicas, e as demais peçonhas ofídicas, é o fato de que essas substâncias apresentam uma variedade de componentes bioativos que possuem uma vasta gama de atividades farmacológicas. Dentre todos os venenos conhecidos, os das serpentes são, provavelmente, os mais complexos, contendo 20 ou mais componentes diferentes, no qual mais de 90% do peso seco é constituído por proteínas com uma grande variedade de enzimas (VARANDA & GIANNINI, 1999).

Soma-se a isto, a capacidade que os componentes dos venenos ofídicos têm de mediar liberação de substâncias endógenas ao interagir no sistema fisiológico da vítima. As frações dos venenos, bem como as do veneno de *Bothrops atrox* (VBA), possuem tanto atividades diretas sobre os tecidos como atividades indiretas ao induzir ou liberar mediadores endógenos. Logo, uma única fração do veneno pode liberar várias substâncias bioativas.

Foi proposto que a histamina, bradicinina, eicosanoides, PAF e mediadores dos nervos autônomos estão envolvidos nos envenenamentos por serpentes *Bothrops* (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949; OHSAKA, 1979; ROTSCCHILD & ROTSCCHILD, 1979; HAVT *et al.*, 2001). Alguns trabalhos também evidenciam a participação do óxido nítrico e de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10, interferon gama (INF) e fator de necrose tumoral (TNF-*alfa*) nos acidentes botrópicos (BARROS *et al.*, 1998; PETRICEVICH *et al.*, 2000).

A infusão de VBA no sistema de perfusão renal na concentração de 1µg/mL causou diminuição da pressão de perfusão (PP) e da resistência vascular renal (RVR) aos 60 minutos. Aos 120 minutos, ocorreu um acréscimo significativo no ritmo de filtração glomerular (RFG) e no fluxo urinário (FU).

Em relação ao transporte de eletrólitos, houve uma redução gradual no transporte tubular de sódio, atingindo valores significativos aos 120 minutos de experimento. Houve um aumento no percentual de transporte de cloreto também aos 120 minutos. Nenhuma alteração significativa foi observada no percentual de transporte de potássio.

O *clearance* osmótico, que é a capacidade de depuração renal em relação às moléculas osmoticamente ativas, teve seus valores acrescidos aos 120 minutos. Esse aumento pode ser devido a uma possível disfunção tubular. A diminuição da reabsorção tubular do sódio, molécula com grande capacidade de carrear água, pode ter sido responsável pela alteração desse parâmetro (HARDMAN *et al.*, 2006).

Analisando o decréscimo dos parâmetros vasculares, é consensual a afirmativa de que venenos botrópicos promovem hipotensão. Os mecanismos responsáveis por causarem a hipotensão sistêmica, característica de serpentes desse gênero, provavelmente são os mesmos que afetam a pressão de perfusão renal observada no presente estudo (ABUELO, 1995).

Braga *et al.* (2006), analisando os efeitos renais e vasculares do veneno bruto de *Bothrops insularis*, também demonstraram uma diminuição dos parâmetros vasculares renais no mesmo sistema de perfusão. Outro trabalho realizado com veneno de *Bothrops jararacussu*, reportou a diminuição da PP e da resistência vascular com aumento do RFG e do FU, dados que corroboram com os resultados desse experimento (HAVT *et al.*, 2001).

Primeiramente, deve-se considerar que o VBA, assim como os demais venenos desse gênero, é um pool de substâncias bioativas. Sendo assim, não se pode atribuir a um componente específico do veneno a redução da PP renal observada. O que se pode avaliar, embasado na literatura científica, à cerca dos efeitos pressóricos dessa peçonha, é quais componentes estariam causando essa alteração renal.

As complicações renais nos envenenamentos ofídicos podem decorrer de coagulação intravascular disseminada, que na condição desse experimento não tem relevância, uma vez que o perfusato do sistema é desprovido de fibrinogênio e fatores da coagulação sanguínea. Essas alterações podem também decorrer da ação nefrotóxica direta do veneno que possui atividade proteolítica ou, ainda, serem devido a espasmos dos vasos sanguíneos em resposta a liberação de substâncias vasoativas (SITPRIJA & CHAIYABUTR, 1999; CALGAROTTO *et al.*, 2008).

Tomando como possibilidade a ação de substâncias vasoativas que estariam sendo liberadas no sistema de perfusão renal, os principais mediadores que alteram a pressão das arteríolas renais, causando vasodilatação são bradicinina (BK), dopamina, prostaglandinas (PGs) e o óxido nítrico (CONSTANZO, 2007).

Rocha e Silva *et al.* (1949) foram os primeiros a descobrir e descrever o neuropeptídeo bradicinina como regulador crucial da pressão sanguínea. Posteriormente, foi demonstrado

que o veneno de serpente *Bothrops jararaca* continha grandes quantidades de peptídeos potencializadores da bradicinina (PPBs), que foram caracterizados como inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina (DA SILVA *et al.*, 1979; FERREIRA *et al.*, 1970).

Partindo-se, então, da premissa científica seguida por Rocha e Silva (1949) e Ferreira (1970), pode-se sugerir que o efeito hipotensor do VBA é devido a um importante componente que não foi ainda isolado.

Os PPBs não são componentes exclusivos do veneno de *Bothrops jararaca*. Outros pesquisadores isolaram esses mesmos peptídeos de outras espécies do gênero botrópico (HAYASHI *et al.*, 2003; HAYASHI & CAMARGO, 2005). Pode-se supor que o VBA, assim como os demais venenos do gênero, possui os PPBs. Logo, essas substâncias poderiam ser as responsáveis pelo efeito de redução da pressão de perfusão renal.

A ação que os PPBs possuem de potencializar a função da BK decorre da capacidade que essas moléculas têm de inibir a enzima cininase II, responsável por inativar a BK (HARDMAN *et al.*, 2006). Logo, os níveis dessa substância encontram-se possivelmente aumentados nos envenenamentos por serpentes botrópicas, as quais apresentam esses peptídeos na sua composição.

As cininas renais agem de modo parácrino para regular o volume e a composição da urina (SAITOH *et al.*, 1995). A calicreína é sintetizada e secretada pelas células de conexão do néfron distal. O cininogênio tissular e os receptores de cinina estão presentes nas células do ducto coletor.

A BK, por sua vez, promove vasodilatação ao atuar em receptores presentes na superfície de células endoteliais renais, estimulando a liberação de potentes mediadores como as prostaglandinas e NO. Ocorre também natriurese inibindo a reabsorção de sódio no ducto coletor cortical (HARDMAN *et al.*, 2006).

Todavia, Havt *et al.* (2005) estudando a hipotensão causada pelo veneno da *Bothrops pirajai*, utilizando íleo de cobaias, constataram que os efeitos observados não foram devido a possíveis potencializadores de BK presentes na peçonha.

Petricevich *et al.* (2000), em um estudo utilizando camundongos que receberam injeções intraperitoneais de veneno botrópico, reportaram um aumento severo de citocinas no soro desses animais. Estas moléculas são produtos de reações inflamatórias, condição comum em acidentes por essas espécies. Foi constatado também um aumento na produção de óxido nítrico (NO), através da dosagem de nitritos. Os autores sugeriram que esses mediadores

apresentavam papel relevante nos efeitos sistêmicos características dos envenenamentos botrópicos.

Outros trabalhos também associaram efeitos sistêmicos, como hipotensão, com o aumento de citocinas e NO. Pacientes em terapia com citocinas apresentaram hipotensão que estava relacionada com aumento na produção de NO (LIBBY & HANSSON, 1991; ISHIMITSU *et al.*, 1992). Outro trabalho demonstrou que um inibidor da enzima produtora de NO, a óxido nítrico sintase (NOS), anulava a hipotensão induzida por TNF-*alfa* em modelo de cachorro (KILBOURN *et al.*, 1990). Esses resultados sugerem que citocinas induzem a expressão de NOS, enzimas responsáveis pela síntese de NO.

Com base nesses achados, o aumento da produção de NO em envenenamentos botrópicos pode ser, em parte, causado por elevações nos níveis de citocinas. A ativação de NOS por essas moléculas geraria concentrações micromolares de NO. Contudo, os mecanismos pelos quais os venenos botrópicos induzem a produção de citocinas e NO não são conhecidos.

A produção desses mediadores pode ser consequência de destruição tecidual causada por veneno, já que necrose proeminente, hemorragia e edema são características de envenenamentos botrópicos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1997).

Embasado nesses achados, realizou-se experimentos *in vivo* para avaliar a possível participação do NO no envenenamento pela peçonha de *Bothrops atrox*. Ratos receberam concentrações de 0,056 mg/kg, 0,168 mg/kg e 0,28 mg/kg de VBA por via intraperitoneal. Essas concentrações equivalem a 10%, 30% e 50% da DL₅₀ do VBA, respectivamente. O valor da DL₅₀ para o VBA, por sua vez, corresponde a 5,6mg/kg, injetado por via intraperitoneal em camundongos, estimado em um estudo realizado por Boechat *et al.* (2001).

A administração do VBA, nesse experimento, foi realizada por via intravenosa. Logo, fez-se necessário um reajuste da DL₅₀ estimada por Boechat *et al.*, uma vez que as vias de administração possuem biodisponibilidades diferentes. Para uma dose intravenosa da droga, a biodisponibilidade é considerada 100%, pois não sofre nenhum tipo de interferência. Já a via intraperitoneal, tem como fator limitante a absorção, que diminui sua biodisponibilidade (KATZUNG, 2007).

Analisando os resultados, observou-se um significativo aumento na produção de nitrito (NO₂⁻) nos níveis séricos dos animais aos cinco minutos após infusão do VBA, nas doses de

0,056 e 0,168mg/kg. Com a dose de 0,28mg/kg foi observado um aumento significativo na produção de NO_2^- somente aos 15 minutos após infusão do veneno.

Incrementos significantes nos níveis sorológicos de NO já havia sido descrito em envenenamentos por serpentes *Bothrops atrox* (BARROS *et al.*, 1998). Esses resultados, sugerem a participação do NO no mecanismo de diminuição da pressão de perfusão da peçonha em estudo.

O mecanismo de sinalização intercelular do NO é, em geral, realizado através de receptores de membrana expressos na célula alvo. Esses receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com o citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinalização intracelular que finalizará em uma resposta celular. As características químicas do NO de alta difusibilidade é fundamental para a sua sinalização direta em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido a sua penetração na célula, sem intermediários membranosos, o organismo utiliza NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (DUSSE *et al.*, 2003; STABILE *et al.*, 2007).

O NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMPc (Guanetidina 3'-5'-monofosfato cíclica), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas (DUSSE *et al.*, 2003). Essa biomolécula mostra-se particularmente importante nos vasos de resistência em virtude da sua liberação contínua, produzindo um tônus vasodilatador e contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial (RANG *et al.*, 2004; IGNARRO, 1987; IGNARRO, 1991; FLORA-FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Sabe-se que o NO é uma substância instável, mas pode formar nitrosotióis mais estáveis, após a sua combinação com grupo heme da hemoglobina ou por oxidação a nitrato e nitrito, que são excretados na urina (RANG *et al.*, 2004; SNYDER & BREDT, 1992; NATHAN, 1994). Logo, o aumento na produção de NO_2^- nos níveis séricos dos animais é indicativo de aumento da produção do NO.

A fim de se confirmar a participação do NO nos efeitos causado por VBA, realizou-se bloqueio farmacológico com L-NAME aos 60 minutos antes da infusão do VBA nas respectivas doses. Nesses grupos, observou-se uma diminuição significativa na produção de NO_2^- , se mantendo próxima a do grupo controle, quando comparado com os grupos que receberam apenas VBA.

As enzimas NOS são fundamentais para o controle da biossíntese de NOS. Como descrito anteriormente, existem três isoformas conhecidas de NOS: uma forma induzível (iNOS) e duas formas constitutivas (eNOS e nNOS) (RANG *et al.*, 2004; NATHAN, 1994; SNYDER & BREDT, 1992; HARE & COLUCCI, 1995; WANG *et al.*, 1999).

Ao avaliar a participação do NO utilizando um bloqueador inespecífico (L-NAME) de NOS, sugere-se um aumento da produção de NO, causado por substâncias biologicamente ativas do VBA e que atuam na fisiologia vascular através da isoforma iNOS e/ou da isoforma eNOS, uma vez que são ambas inibidas pelo L-NAME (ZATS & BAYLIS, 1998; DIAS & COLOMBARI, 2006). A isoforma iNOS foi isolada nos rins, onde constatou-se forte presença na mácula densa (BACHMANN *et al.*, 1995)

Supõe-se, então, que o efeito causado por o VBA na perfusão renal, estaria sendo causado pelo aumento da produção de NO, sintetizado por NOS presentes no rim. Outra suposição é que essas enzimas estariam sendo induzidas por citocinas liberadas a partir de células lesadas.

Analisando os parâmetros de transporte eletrolítico no sistema de perfusão renal, tem-se como resultado, uma diminuição no percentual de transporte de sódio, indicando que houve aumento na excreção de sódio, após infusão do VBA, com significância aos 120 minutos. Observou-se também uma diminuição na excreção de cloreto.

O NO além de participar como um agente vasodilatador alterando a hemodinâmica renal, ele também participa no controle de fluidos extracelulares (RAIJ & BAYLIS, 1995; KONE & BAYLIS, 1997). Esse mediador exerce um papel importante na excreção renal. Um estudo, no qual se inibiu experimentalmente a produção de NO, resultou em diminuição da irrigação renal e na diminuição da eliminação de sódio, demonstrando que esse mediador estimula a excreção de sódio (BACHMANN *et al.*, 1994).

Com base nesses achados, o aumento da excreção de sódio obtidos no experimento de perfusão renal poderia está relacionado com a ação do NO. Logo, supõe-se que o aumento da produção de NO no sistema de perfusão, além de contribuir para o efeito hipotensor, também estaria contribuindo para o aumento na excreção de sódio.

Por outro lado, a diminuição no transporte tubular de sódio pode ser conseqüência de destruição de células tubulares renais. Venenos botrópicos são extremamente lesivos aos túbulos renais, uma vez que são capazes de induzir necrose dos mesmos (SITPRIJA, 2006).

Os rins perfundidos com VBA, na concentração de 1µg/mL, apresentaram alteração na arquitetura renal, provocando fenômenos degenerativos reversíveis representados por quantidade significativa de material proteináceo nos túbulos e quantidade moderada nos glomérulos. Os vasos e o interstício apresentaram aspectos normais. Evangelista *et al.* (2008), estudando os efeitos renais da serpente *Crotalus durissus cascavella*, reportaram a presença do mesmo material proteináceo nos túbulos.

Mesmo na insuficiência renal aguda instalada, a presença de necrose tubular é observada apenas em células tubulares ocasionais, e em alguns casos, pode não ser detectável. Além disso, os glomérulos podem se apresentar morfológicamente normais (SCHRIER *et al.*, 2004). Esses achados podem ser a explicação para a aparente ausência de efeitos deletérios do VBA sobre os rins.

7 CONCLUSÕES

As alterações renais promovidas pelo veneno de *Bothrops atrox* (VBA) ocorrem em quase todos os parâmetros renais avaliados nesse estudo. No sistema de perfusão de rim de rato isolado, ocorreu um decréscimo significativo da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, demonstrando que a peçonha em estudo promove diminuição dos parâmetros vasculares renais, possuindo ação vasoativa.

Em relação ao transporte de eletrólitos, o VBA promoveu alteração no percentual de transporte de sódio e cloreto. Houve uma diminuição no percentual de transporte de sódio, indicando que a peçonha aumenta a excreção de sódio, enquanto que o cloreto teve seu transporte percentual aumentado. Não foi observado alteração no percentual de transporte de potássio. Ocorreram alterações histológicas discretas no rim perfundido, o qual apresentou material proteináceo nos túbulos.

Alteração do *clearance* osmótico foi observada, no sistema de perfusão renal, bem como aumento do fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular.

No experimento *in vivo*, avaliando a participação do óxido nítrico (NO) nos efeitos do VBA, observou-se um aumento significativo na produção de nitrito, demonstrando que a concentração de NO encontra-se elevada no envenenamento pela serpente *Bothrops atrox*. Logo, esse mediador pode ter participação nos efeitos renais causados pela peçonha.

O presente trabalho teve como perspectiva a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos renais causados pelo VBA, visando a busca de componentes da peçonha que possam ser utilizadas como ferramentas farmacológicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AIRD, S.D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, 2002.

ALVES, R.M., ANTONUCCI, G.A., PAIVA, H.H., CINTRA, A.C.O., FRANCO, J.J., MENDONÇA-FRANQUEIRO, E.P., DORTA, D.J., GIGLIO, J.R., ROSA, J.C., FULY, A.L., DIAS-BARUFFI, M., SOARES, A.M., SAMPAIO, S.V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp Biochemistry and Physiology**, Part A 151, 542–550, 2008.

ÂNGULO, Y., LOMONTE. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, 2008.

ANDE, S.R., KOMMOJU, P.R., DRAXL, S., MURKOVIC, M., MACHEROUX, P., GHISLA, S., FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis** (11) 1439–1451, 2006.

ARAÚJO, S.D., DE SOUSA, A., NUNES, F.P., GONSALVES, L.R. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Rev Inflamm**, 56 (10): 409-413, 2007.

BACHMANN, S., MUNDEL, P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. **American J Kidney Dis**, (24): 112-129, 1994.

BACHMANN, S., BOSSE, H.M., MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **American J Phys**, 5 Parte 2: pp. 885-898, 1995.

BARROS, S.F., FRIEDLANSKAIA, I., PETRICEVICH, V.L., KIPNIS, T.L. Localin inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Med. Inflamm**, (7) 339-346, 1998.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Theor.**, 62: 325-372, 1994.

BOCHENER, R., STRUCHINER, C.J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informações. **Cadernos de Saúde Pública**, 18: 735-746, 2003.

BOECHAT, A.L, PAIVA, C.S, FRANÇA, F.O, DOS-SANTOS, M.C, Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop São Paulo**, 43 (1):7-14, 2001.

BOER-LIMA, P.A., GONTIJO, J.A., CRUZ-HOFLING, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 67: 217-22, 2002.

BONFIN, V.L., DE CARVALHO, D.D., PONCE-SOTO, L.A., KASSAB, B.H., MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A₂ D-49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. **Cell. Biol. Toxicol.**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília, 1998.

BRAGA, M.D., MARTINS, A.M.C., ALVES, C.D., MENEZES, D.B., MARTINS, R.D., BARBOSA, P.S.F., OLIVEIRA, I.M.S., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., FILHO, E.B.S.D., FAGUNDES, F.H.R., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S.A. Purification and effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon** 51: pp.181-190, 2008.

BRAGA, M.D., MARTINS, A.M., AMORA, D.N., DE MENEZES, D.B., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., MARANGONI, S., ALVES, C.D., BARBOSA, P.S., DE SOUSA ALVES, R., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon.** 51(2): pp.199-207, 2008.

BRAGA, M.D., MARTINS, A.M., AMORA, D.N., DE MENEZES, D.B., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., MARANGONI, S., BARBOSA, P.S., DE SOUSA ALVES, R., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon.** Jun 15;47(8):859-67, 2006.

BRAGA, M.D., MARTINS, A.M., DE MENEZES, D.B., BARBOSA, P.S., EVANGELISTA, J.S., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, 49(3): pp. 329-338, 2007.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. **Biochimie.** v. 82, p. 851-859, 2000.

BÜSSE, R. AND MÜLSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett.** 275, pp. 87-90, 1990.

CAMPBELL, J.A, LAMAR, WW. The Venomous reptiles of Latin America. New York: Cornell University Press, p: 425,1989.

CARDOSO, J.L.C., BRANDO, R.B. **Acidentes por animais peçonhentos.** 1ª. Ed. Santos, São Paulo, 1982.

CHAVES F., TEIXEIRA C.F., GUTIÉRREZ J.M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Inflamm Res**, 55 (6) :245-53, 2006.

CHEN, J.C., CHEN, H.M., SHYR, M.H., FAN, L.L., CHI, T.Y., CHI, C.P., CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J Formos Med Assoc**, 99 (3): 213-118, 2000.

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

CONDREA, E., FLETCHER, J.E., RAPUANO, B.E., YANG, C.C., ROSENBERG, P. Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysine in *Naja nigricolis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipase A₂. **Toxicon** 19, pp. 705–720, 1981.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3^a. Ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.

CUPO, P., AZEVEDO, M.M., HERING, S.E., ET AL. Acidentes ofídicos: Análise de 102 casos. **Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc Bras Med Trop**, pp. 23-24, 1990.

CUSHMAN, D.W., ONDETTI, M.A., GORDON, E.M., NATARAJAN, S., KARANEWSKY, D.S., KRAPCHO, J. ET AL., Rational design and biochemical utility of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme, **J Cardiovasc Pharmacol** 10, pp. 17–30. (13), 1987.

CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S., SABO, E.F., ONDETTI, M.A. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme, **Am J Cardiol** 49, pp. 1390–1394, 1982.

DA SILVA, A.O., LÓPEZ, M., GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop Med Hyg** 28: pp. 401-407, 1979.

DU, X.Y., CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**. 40 (6): 659-65, 2002.

DUSSE, L.M., VIEIRA, L.M., CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39 (4): 343-350, 2003.

EVANGELISTA, J.S.A.M. Estudo de efeitos vasculares, renais e citotóxicos do veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella*. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, 2008.

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** 30 (4): 295-301, 1997.

FERRAREZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das Serpentes (Squamata) II. Família Colubridae. In: Nascimento, L.B., editor, eds., *Herpetologia no Brasil*, 1. PUC-MG. Fundação Biodiversitas e Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, 81-91, 1991.

FERREIRA, L.A., MOLLRING, T., LEBRUN, F.L., RAIDA, M., ZNOTTKA, R., HABERMEHL, G.G. Structure and effects of a kinin potentiating fraction F (AppF) isolated from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom, **Toxicon** 33, pp. 1313–1319, 1995.

FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., LEBRUN, I., BATISTA, M.B.C., PREZOTO, B.C., ANDREONI, A.S.S., ET AL. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bthrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). **Toxicon** 30, pp. 33-40, 1992.

FERREIRA, S. H., BARTELT, D.C., GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom, **Biochemistry** 9, pp. 2583–2593, 1970.

FLORA-FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and function. **Rev. Assoc. Bras.** 46 (3): 265-271, 2000.

FONSECA, F.V. Isolamento e caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase de veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.

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

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

FOX J.W., SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology, 45(8):969-85, 2005.

FRANÇA, F.O.S., MALAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Edited by Cardoso, J.L.C., Franca, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr, V. Sarvier-FAPESP, São Paulo, Brazil. p. 72-86, 2003.

FRANCESCHI, A., RUSCAVADO, A., MORA, N., GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** 38, 63-77, 2000.

GARCÍA, L.T., PARREIRAS E SILVA, L.T., RAMOS, O.H.P., CARMONA, A.K., BERSANETTI, P.A., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases, **Comp. Biochem. Physiol.** 138, pp. 23–32, 2004.

GUIMARÃES, J.A., FONSECA NETO, M.D., ROUQUAYROL, M.Z., LIMA VERDE, J.S. **Acidentes ofídicos: Identifique-trate**. Centro de Atendimento Toxicológico, Fortaleza, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33, pp. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, UK, p. 321-352, 1997

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUSCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom, **Toxicon**. [Epub ahead of print] In Press, Corrected Proof, 2009.

HANSON, R.W., BALLARD, F.S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid Res.** 9: pp. 667-668, 1969.

HAYASHI, M.A., CAMARGO, A.C. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme, **Toxicon** 45, pp. 1163–1170, 2005.

HAYASHI, M.A., MURBACH, A.F., IANZER, D., PORTARO, F.C., PREZOTO, B.C. FERNANDES, B.L. ET AL. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme, **J Neurochem** 85, pp. 969–977, 2003.

HARDMAN, J. G., et al. **Bases Farmacológicas da Prática Médica** - Goodman e Gilman. 11 ed., McGraw-Hill/Guanabara Koogan, New York/Rio de Janeiro, 2006.

HARE, J.M., COLUCCI, W.S. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. **Prog Cardiovasc Di** , 38: 155-166, 1995.

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

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

HECKER, M., PORSTI, I., BUSSE, R.. Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE-inhibitors. **Braz J Med Biol Res** 27: pp. 1917-1921, 1994.

SIX, D.A., DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A (2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**. Oct 31; 1488(1-2):1-19, 2008.

IANZER, D., SANTOS, R.A., ETELVINO, G.M., XAVIER, C.H., DE ALMEIDA SANTOS, J., MENDES, E.P. ET AL. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*, **J Pharmacol Exp Ther** 322, pp. 795–805, 2007.

JEBALI, J., BAZAA, A., SARRAY, S., BENHAJ, K., KARBOUL, A.E.L., AUEB, M., MARRAKCHI, N., GARGOURI, A. c-type lectin protein isoforms of *Macrovipera lebetina*: cDNA cloning and genetic diversity. **Toxicon**, 52 (2): 228-73, 2009.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., O'CONNELL, J.L. Prognostic factor for amputation in the case of envenoming by snake of the *Bothrops* genus (Viperidae). **Annals of Tropical and Parasitology** 93: 401-408, 1999.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., SILVA, M.L., KUSANO, E.J.U., MENDONÇA, J.S. Bacteriology of abscesses complicating *Bothrops* snake bite in humans: a prospective study. **Toxicon** 32: 743-748, 1994.

KAMIGUTI, A.S., HAY, C.R., THEAKSTON, R.D., ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases, **Toxicon** 34, pp. 627–642, 1996.

KASHIWAGI, M., SHINOZAKI, M., HIRAKATA, H., TAMAKI, K., HIRANO, T., TOKUMOTO, M., GOTO, H., OKUDA, S., FUJISHIMA, M. Locally activated rennin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. **J Am Soc Nephrol** 11: pp. 616-624, 2000.

KANASHIRO, M.M., ESCOCARD, R.C.M., PETRETSKI, J.H., PRATES, M.V., ALVES, E.W., MACHADO, O.L.T., DIAS DA SILVA, W., KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom, **Biochemical Pharmacology** 64: pp. 1179-1186, 2002.

KATZUNG B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10 ed., Lange, São Paulo, 2007.

KILBOURN, R.G., GROSS, S.S., JUBRAN, A., ADAMS, J., GRIFFITH, O.W., LEVI, R., LODATO, R.F. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87: 3629-363, 1990.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, 42: 827–840, 2003.

KONE, B.C. Nitric oxide in renal health and disease. **Am J Kidney Dis** 30: pp. 311-333, 1997.

KONE, B.C., BAYLIS, C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. **Am J Physiol** 272: F561-F578, 1997.

LAING, G.D., MOURA-DA-SILVA, A.M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis, **Toxicon** 45, pp. 987–996, 2005.

LIBBY, P., HANSSON, G.K. Biology of disease: involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. **Lab. Invest.** 64, pp. 5–15, 1991.

MACKESSY, S.P., WILLIAMS, K., ASHTON, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganos concolor*: a case of venom pedomorphosis?, **Copeia**, pp. 769–782, 2003.

- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36 (12): 1749-1800, 1998.
- MARTINEZ-MALDONADO, M. and OPAVA-STITZER S. Free water clearance curves during saline, manitol, glucose and urea diuresis in rats. **J Physiol**, (280) 487-97, 1978.
- MEDEIROS, J.V., GADELHA, G.G., LIMA, S.J., GARCIA, J.A., SOARES, P.M., SANTOS, A.A., BRITO, G.A., SOUZA, M.H. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br J Pharmacol**, 2007.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. p. 33-59, 2003.
- MISE, Y.F., LIRA-DA-SILVA, R.M., CARVALHO, F.M. Envenomation by Bothrops in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2007.
- MILANI JR, R., JORGE, M.T., DE CAMPOS, F.P., MARTINS, F.P., BOUSSO, A., CARDOSO, J.L., RIBEIRO, L.A., FAN, H.W., FRANCA, F.O., SANO-MARTINS, I.S., CARDOSO, D., IDE FERNANDEZ, C., FERNANDES, J.C., ALDRED, V.L., SANDOVAL, M.P., PUORTO, G., THEAKSTON, R.D., WARRELL, D.A. Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil. **Q.J.M.** 90, pp. 323–334, 1997.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Res.** 43, pp. 109–142, 1991.
- MORENO, E, et al. Características clinicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, 2005.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., RAMOS, O.H., BALDO, C., NILAND, S., HANSEN, U., VENTURA, J.S., FURLAN, S., BUTERA, D., DELLA-CASA, M.S., TANJONI, I., CLISSA, P.B., FERNANDES, I., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., EBLE, J.A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases, **Biochimie** (90) 484–492, 2008.
- NATHAN, C. Nitric oxide and biopterin: a study in Chiaroscuro. **J. Clin. Invest.**, 93 (5): 1875-1876, 1994.
- NETTO, C.C., GUEDES, H.L., SILVA, F.P.J.R., DE SALLES, C.M., ALEXANDRE, G., OLIVEIRA, C.L., TORRIANI, I., DE SIMONE, S.G. Structural characterization and low-resolution modelo of BJ-48, a trombina-like enzyme from Bothrops ralaracussu venom. **Biophys Chem**, 2007.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee, C.Y. Editor, 1979. **Snake Venoms Springer-Verlag**, Berlin, pp. 48–546, 1979.
- OLSEN, F. Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** 80, pp. 253–256, 1972.

OTERO, R., NÚÑEZ, V., GUTIÉRREZ, J.M., ROBLES, A., ESTRADA, R., OSÓRIO, R.G., DEL-VALLE, G., VALDERRAMA, R., GIRALDO, C.A. Neutralizing capacity of a new monovalent anti-*Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. **Braz J Med Biol Res**, V. 30 (3) pp.375-379, 1997.

OWNBY, C.L., SELISTRE DE ARAÚJO, H.S., WHITE, S.P., FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon** 37, pp. 411–415, 1999.

PALMER, R.M., ASHTON, D.S., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** 333: pp. 664-666, 1987.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide releases accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327: pp. 524-526, 1987.

PETRETSKI, J.H. ET AL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz J Med Biol Res.**, Ribeirão Preto, v. 33 (11) pp.1293-1300, 2000.

PETRICEVICH, V.L., TEIXEIRA, C.F., TAMBOURGI, D.V., GUTIÉRREZ, J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon** 38(9): pp.1253-1266, 2000.

PONCE-SOTO, L.A., BONFIM, V.L., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J.C., MARANGONI. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and PLA2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotic characterization using in vitro neuromuscular preparation. **Protein J.**, 2006.

RAIJ, L., BAYLIS, C. Glomerular actions of nitric oxide. **Kidney Int** 48: 20-32, 1995.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE P.K. **Farmacologia**, 5^a ed., pp. 309-332. Elsevier, 2004.

REGOLI, D., GOBEIL, F., NGUYEN, Q. ET AL. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. **Life Sci** 55: pp.735-49, 1994.

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

RIBEIRO, L.A., GADIA, R., JORGE, M.T. Comparação entre a epidemiologia do acidente e a clínica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, em adultos idosos e não idosos. **Revi. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41 (1): 46-49, 2008.

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

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 trypsin. **Am. J. Physiol.** 156, pp. 261–271, 1949.

ROTSCHILD, A.M., ROTSCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee, C.Y. Editor, 1979. **Snake Venoms Springer-Verlag**, Berlin, p. 541, 1979.

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

SAI-NGAM, A., PHONGTANANANT, S., NUCHPRAYOON, I. Phospholipase A2 genes and their expressions in thai Russel's viper venoms glands. **Toxicon**, 52 (2): 395-9, 2008.

SAITOH, S., SCICLI, A.G., PETERSON, E., CARRETERO, O.A. Effect of inhibiting renal kallikrein on prostaglandin E2, water, and sodium excretion. **Hypertension**, 25: 1008-1013, 1995.

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

SERRANO, S.M.T., MAROUN R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** : official journal of the International Society on Toxinology, 45(8):1115-32, 2005.

SERRANO, S.M., HAGIWAHA, Y., MURAYAMA, N., NIGUCHI, S., MENTELE, R., SAMAPIO, C.A., CAMARGO, A.C., FINK, E. Purification and characterization of a kinin releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem**, 251(3) 845-53, 1998.

SITPRIJA, V., CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **Nat. Toxins** 8, pp. 271–277, 1999.

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

SNYDER, S.H., BREDT, D.S. Biological role of nitric oxide. **Science Am**, 266: 68-77, 1992.

STABILE, A.M., MORETO, V., ANTUNES-RODRIGUES, J., CARNIO, E.C. Participation of induzible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. **Regul Pept**, 140 (3): 136-141, 2007.

TAKATSUKA, H., SAKURAI, Y., YOSHIOKA, A., KOKUBO, T., USAMI, Y., SUZUKI, M., MATSUI, T., TITANI, K., YAGI, H., MATSUMOTO, M., FUJIMURA, Y. Molecular characterization of L- amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhofi* with special reference to platelet aggregation. **Biochim Biophys Acta**, 1544: 267-277, 2001.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: **Venenos**. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. BARRAVIERA, B., p.205–223, 1999.

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

WANG, D., WEI, J., HSU, K., JAU, J., LIEU, M., CHAO, T., CHEN, H.I. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *Chen Journal of Biomedical Science*, 1999.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951-967, 2005.

UFKES, J.G., ARSEN, P.N., VAN DER MEER, C. The mechanism of action of two bradykinin-potentiating peptides on isolated smooth muscle, *Eur J Pharmacol* 44, pp. 89-97, 1977.

ZHANG, Y.I., WANG, J.H., LEE, W.H., WANG, Q., LIV, H., ZHENG, Y.T., ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom l-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, pp. 598-604, 2003.

ZHANG, L., WU, W.T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Nat. Prod. Res.* 22, pp. 554-563, 2008.

9 ANEXOS

Resumos publicados em anais de congressos

1. XIMENES,R.M. ; NORÕES,T.B.S. ; JORGE, A.R.C. ; SOUSA, D. F. ; ALVES, R. S. ; BINDÁ, A. H. ; MATOS, F. J. A. ; MONTEIRO, H. S. A. Diuretic effect of crude extract of roots from *Bredemeyera floribunda* Willd. in isolated rat kidney. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil X Internacional Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil X Internacional Congress of Ethnopharmacology, 2008.
2. NORÕES,T.B.S. ; Ximenes, R. M. ; LEITE,C.A.V.G. ; SOUSA, D. F. ; JORGE, A.R.C. ; ALVES, R. S. ; Praciano,T.P. ; Chagas, J.F. ; J.M.FERREIRA, ; M.G.R.QUEIROZ, ; MENEZES, D. B. ; MONTEIRO, H. S. A. . Biochemical and hematological effects induced by subcutaneous doses of *Bothrops jararacussu* venom in rats. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. Biochemical and hematological effects induced by subcutaneous doses of *Bothrops jararacussu* venom in rats, 2009.
3. LEITE,C.A.V.G. ; Ximenes, R. M. ; SOUSA, D. F. ; NORÕES,T.B.S. ; JORGE, A.R.C. ; ALVES, R. S. ; Sousa, P.C.P. ; MENEZES, D. B. ; HAVT, A. ; MONTEIRO, H. S. A. . Biochemical and hematological effects induced by intraperitoneal doses of *bothrops jararacussu* venom in rats. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. Biochemical and hematological effects induced by intraperitoneal doses of *bothrops jararacussu* venom in rats, 2009.
4. Ximenes, R. M. ; LEITE,C.A.V.G. ; SOUSA, D. F. ; NORÕES,T.B.S. ; JORGE, A.R.C. ; ALVES, R. S. ; Bruno,P.A.M. ; QUEIROZ, M. G. R. ; MENEZES, D. B. ; HAVT, A. ; MONTEIRO, H. S. A. . Biochemical and hematological effects induced by intramuscular doses of *bothrops jararacussu* venom in rats. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. Biochemical and hematological effects induced by intramuscular doses of *bothrops jararacussu* venom in rats, 2009.
5. SOUSA, D. F. ; Brito,T.S. ; Batista Lima,F.J. ; JORGE, A.R.C. ; J.M.FERREIRA, ; Chagas, J.F. ; Praciano,T.P. ; NORÕES,T.B.S. ; Ximenes, R. M. ; ALVES, C. D. ; NOJOSA, M.D.B. ; MAGALHAES, P. J. C. ; MONTEIRO, H. S. A. . *Bothrops lutzi* venom promoted relaxation on isolated rat aorta. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. *Bothrops lutzi* venom promoted relaxation on isolated rat aorta, 2009.
6. SOUSA, D. F. ; JORGE, A.R.C. ; Chagas, J.F. ; Praciano,T.P. ; J.M.FERREIRA, ; NORÕES,T.B.S. ; Sousa, P.C.P. ; Ximenes, R. M. ; ALVES, C. D. ; ALVES, R. S. ; QUEIROZ, M. G. R. ; MENEZES, D. B. ; Nojosa,D.M.B ; HAVT, A. ; MONTEIRO, H. S. A. . Study in vitro of renal of *Bothrops lutzi* venom. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. Study in vitro of renal of *Bothrops lutzi* venom, 2009.
7. XIMENES,R.M. ; NORÕES,T.B.S. ; Jorge,A.R.C. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; SOUSA, D. F. ; ALVES, R. S. ; MATOS, F. J. A. ; MONTEIRO, H. S. A. . Efeitos do Extrato Bruto

de *Bredemeyera floribunda* Willd. e modelo de rim isolado: um estudo preliminar. In: III Reunião Regional FESBE, 2008, Fortaleza. Efeitos do Extrato Bruto de *Bredemeyera floribunda* Willd. e modelo de rim isolado: um estudo preliminar, 2008.

8. NORÕES, T.B.S. ; R.S.ALVES., ; XIMENES, R.M. ; Jorge, A.R.C. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; SOUSA, D. F. ; TOYAMA, H. M. ; MONTEIRO, H. S. A. . Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops atrox* em perfusão de rim isolado. In: III Reunião Regional FESBE, 2008, Fortaleza. Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops atrox* em perfusão de rim isolado, 2008.

9. ALVES, R. S. ; Jorge, A.R.C. ; NORÕES, T.B.S. ; LEITE, C.A.V.G. ; MARTINS, R. D. ; TOYAMA, M. H. ; MARTINS, A. M. C. ; MONTEIRO, H. S. A. . Bloqueio farmacológico das ações do veneno de *Tityus serrulatus* em modelo de rim isolado. In: III Reunião Regional FESBE, 2008, Fortaleza. Bloqueio farmacológico das ações do veneno de *Tityus serrulatus* em modelo de rim isolado, 2008.

10. ALVES, R. S. ; MARTINS, R. D. ; XIMENES, R.M. ; NORÕES, T.B.S. ; SOUSA, D. F. ; LEITE, C.A.V.G. ; QUEIROZ, M. G. R. ; TOYAMA, M. H. ; MONTEIRO, H. S. A. Novo peptídeo isolado do veneno de *tityus serrulatus* em modelo de rim isolado :um estudo preliminar. In: 40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Águas de Lindóia/SP. Novo peptídeo isolado do veneno de *tityus serrulatus* em modelo de rim isolado :um estudo preliminar, 2008.

11. XIMENES, R.M. ; NORÕES, T.B.S. ; SOUSA, D. F. ; JORGE, A.R.C. ; SANTOS, J. V. A. ; Araújo, R.M. ; Silveira, E.R. ; MATOS, F. J. A. ; MONTEIRO, H. S. A. Toxicidade aguda oral de *Bredemeyera floribunda* Willd. E *Harpalce Brasiliana Benth* em camundongos. In: 40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica, 2008, Águas de Lindóia/SP. Toxicidade aguda oral de *Bredemeyera floribunda* Willd. E *Harpalce Brasiliana Benth* em camundongos, 2008.

12. JORGE, A.R.C. ; ALVES, R. S. ; NORÕES, T.B.S. ; SOUSA, D. F. ; XIMENES, R.M. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; Silva Neto, A.G. ; ARAÚJO, A.L.G.C. ; Nojosa, D.M.B; MONTEIRO, H. S. A. . Estudo dos efeitos biológicos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* em rim isolado de rato. In: 40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Águas de Lindóia/SP. Estudo dos efeitos biológicos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* em rim isolado de rato, 2008.

13. R.S.ALVES.; MARTINS, R. D.; JORGE, A.R.C.; XIMENES, R.M.; NORÕES, T.B.S. ; LEITE, C.A.V.G. ; QUEIROZ, M. G. R. ; TOYAMA, M. H. ; MONTEIRO, H. S. A. . Ações do peptídeo natriurético isolado do veneno de *Tityus serrulatus* em modelo de rim isolado. In: XVIII Congresso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, 2008, Coquimbo. Ações do peptídeo natriurético isolado do veneno de *Tityus serrulatus* em modelo de rim isolado, 2008. v. 1. p. 169-169.

14. XIMENES, R.M.; JORGE, A.R.C.; ALVES, R. S.; NORÕES, T.B.S.; SOUSA, D. F.; SANTOS, J. V. A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of high oral ingestion of sodium chloride in renal function of rats. In: XVIII Congresso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, 2008, Coquimbo. Effects of high oral ingestion of sodium chloride in renal function of rats, 2008. v. 1. p. 199-199.

Resultados preliminares de dosagem de nitrito após administração de veneno de *Bothrops trox*.

Foi observado aumento significativo de nitrito com todas as doses administradas (0.056, 0.168 e 0.28mg/kg) nos ratos em intervalo de um minuto (Controle_{1min} = 5.6 ± 1.1; VBA 0,056mg/kg_{1min} = 29.5 ± 3.8; VBA 0,168mg/kg_{1min} = 16.7 ± 2.0; VBA 0,28mg/kg = 34.50 ± 2.1 μmol) (figura 1).

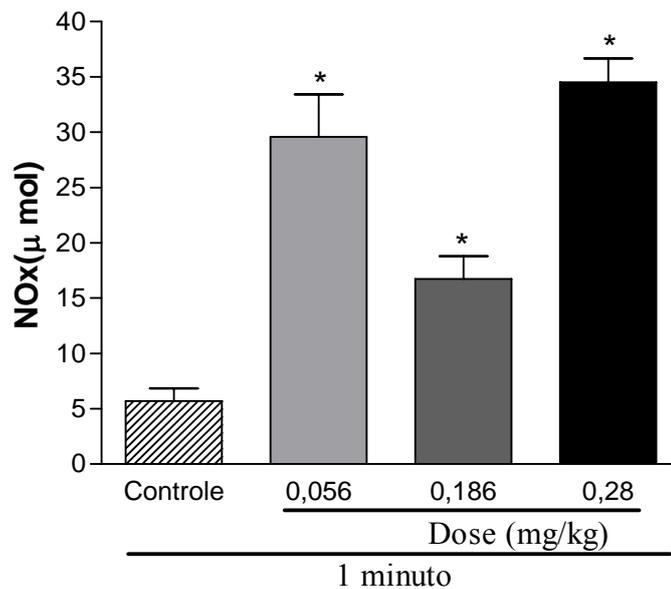


Figura 1: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, nas doses de 0.056, 0.168 e 0.28mg/kg. As dosagens foram realizadas um minuto após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média ± E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem.

Foi observado aumento significativo de nitrito com todas as doses administradas (0.056, 0.168 e 0.28mg/kg) nos ratos em intervalo de cinco minutos (Controle_{5min} = 7.18 ± 2.0; VBA 0,056mg/kg_{5min} = 35.2 ± 4.1; VBA 0,168mg/kg_{5min} = 36.5 ± 4.3; VBA 0,28mg/kg_{5min} = 25.9 ± 7.2 μmol) (figura 2).

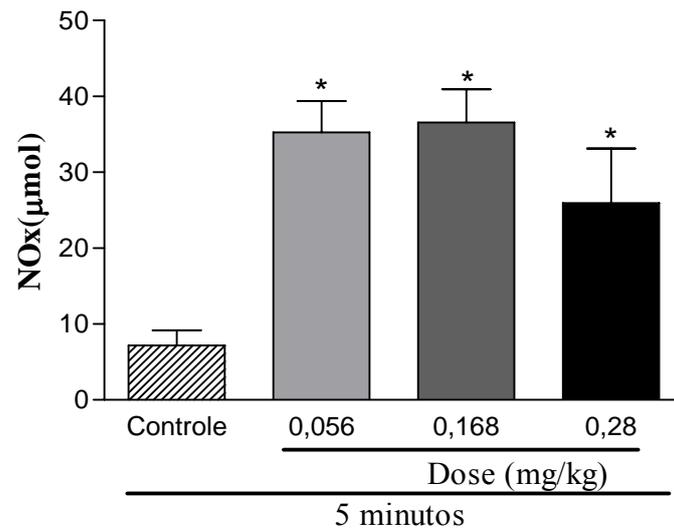


Figura 2: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, nas doses de 0.056, 0.168 e 0.28mg/kg. As dosagens foram realizadas cinco minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem.

Foi observado aumento significativo de nitrito somente com a dose de 0.28mg/kg administrada nos ratos em intervalo de 15 minutos (Controle_{15min} = 7.18 ± 2.0 ; VBA 0,28mg/kg = $25.9 \pm 7.2 \mu\text{mol}$) (figura 3).

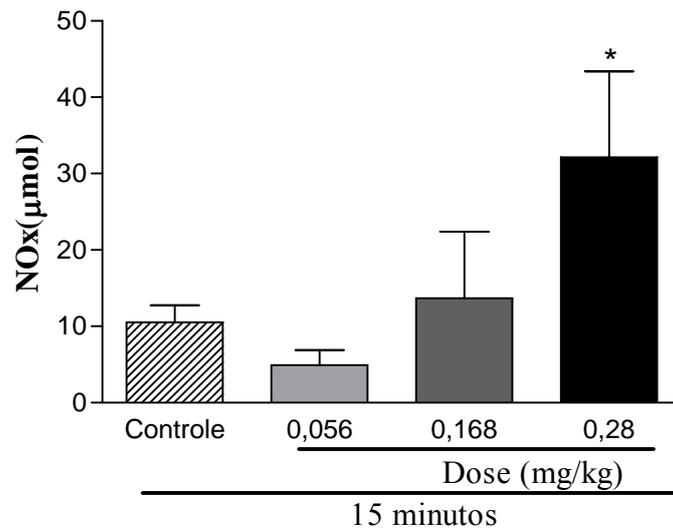


Figura 3: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, nas doses de 0.056, 0.168 e 0.28mg/kg. As dosagens foram realizadas 15 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem.

Foi observado aumento de nitrito somente com a dose de 0.168mg/kg administrada nos ratos em intervalo de 30 minutos ($\text{Controle}_{30\text{min}} = 5.87 \pm 1.1$; $\text{VBA } 0,168\text{mg/kg} = 9.86 \pm 0.9\mu\text{mol}$) (figura 4).

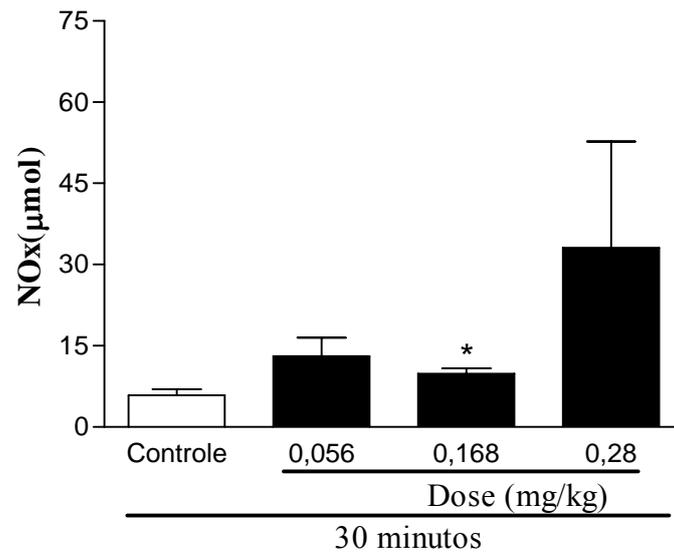


Figura 4: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, nas doses de 0.056, 0.168 e 0.28mg/kg. As dosagens foram realizadas 30 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem.

Não foi observado aumento de nitrito em nenhuma dose administradas administrada nos ratos em intervalo de 60 minutos (figura 5).

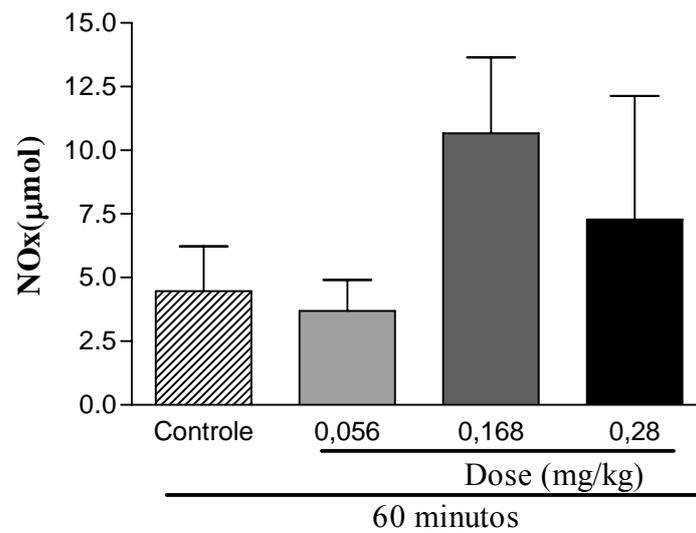


Figura 5: Dosagem de nitrito após inoculação do veneno bruto da *Bothrops atrox* (VBA) nos grupos experimentais, nas doses de 0.056, 0.168 e 0.28mg/kg. As dosagens foram realizadas 60 minutos após infusão do VBA. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Newman-Keuls) e teste *t* de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., comparando com o respectivo grupo controle em cada tempo de dosagem.

