

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARCUS DAVIS MACHADO BRAGA

Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno da
Bothrops insularis e de frações isoladas

Fortaleza
2006

MARCUS DAVIS MACHADO BRAGA

Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas.

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Alice Costa Martins

FORTALEZA
2006

B794a

Braga, Marcus Davis Machado

Avaliação dos efeitos vasculares e renais do veneno
da *Bothrops insularis* e de frações isoladas

Braga._ Fortaleza, 2006

238 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.

Faculdade de Medicina.

1. Venenos de cobra 2. *Bothrops* 3. Rim - efeito de drogas

4. Lectina 5. Trombina 6. Fosfolipases A 7. L-aminoácido oxidases

I. Monteiro, Helena Serra Azul (Orient.) II. Título

CDD 615.942

MARCUS DAVIS MACHADO BRAGA

**Avaliação dos efeitos sistêmicos, renais e vasculares do veneno da
Bothrops insularis e de frações isoladas.**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 07 de março de 2006

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.: Dr. Marcos Hikari Toyama

Prof.: Dr. Talapala Govindaswamy Naidu

Prof^a.: Dra. Nylane Maria Nunes Alencar

Prof^a.: Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Professora Helena Serra Azul Monteiro, pela orientação e exemplo que me tem dispensado ao longo da vida profissional, que transcende a atividade didática.
- Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pelo estímulo ao aprimoramento profissional.
- Professor Livino Virgínio Pinheiro Junior, pelo exemplo de mestre, apoio e colaboração, indispensáveis para a elaboração deste trabalho.
- Professor Paulo Roberto de Carvalho Almeida pelo estímulo, apoio, colaboração e exemplo de humildade.
- Professor Dalgimar Bezerra de Meneses pelo apoio nos exames histopatológicos.

AGRADECIMENTOS

- A todos os professores do curso de doutorado do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos a mim transmitidos.
- Ao Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.
- Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, ao Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu, à Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes Alencar e à Prof^a. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes, que prontamente aceitaram o convite para participarem da Banca Examinadora.
- Ao doutorando do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Paulo Sérgio Barbosa, pelo companheirismo na realização das análises laboratoriais e execução dos experimentos.
- À doutoranda do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Renata de Sousa Alves pelo prestimoso apoio na realização dos experimentos.
- Ao doutorando do Departamento de Fisiologia e Farmacologia René Duarte pelo prestimoso apoio nas análises estatísticas dos dados.
- Ao professor Josias Martins Vale pela orientação no ordenamento estatístico.
- Aos demais mestrandos, doutorandos, e estudantes de graduação do laboratório de fisiologia cardiorenal, pelo companheirismo na realização dos experimentos laboratoriais.
- À bibliotecária Norma de Carvalho Linhares pela competência na orientação das normas de citação das referências bibliográficas.
- A todos os técnicos do Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará, pelo profissionalismo no apoio à execução dos experimentos, em especial à funcionária Maria Silvia Helena Freire de França, que sempre atenta e cuidadosamente me acompanhou em todas as etapas dos experimentos.
- Ao Major BM Anderson Alves Viana pelo apoio e orientação no âmbito da informática.
- A toda minha família e amigos, que estiveram presentes e solidários na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	30
1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos.....	30
1.2 Classificação das Serpentes.....	32
1.3 Características Gerais dos Venenos das Serpentes.....	33
1.4 Características dos Venenos <i>Bothrops</i>	39
1.4.1 Atividades citotóxicas dos venenos <i>Bothrops</i>	39
1.4.2 Atividade lectina dos venenos <i>Bothrops</i>	40
1.4.3 Atividade L-aminoácido oxidase dos venenos <i>Bothrops</i>	43
1.4.4 Atividade trombina símile dos venenos <i>Bothrops</i>	46
1.4.5 Atividade fosfolipásica A ₂ dos venenos <i>Bothrops</i>	49
1.4.6 O papel das metaloproteinases dos venenos <i>Bothrops</i>	53
1.5 O Veneno da <i>Bothrops insularis</i>	54
1.6 Complicações dos Acidentes Ofídicos.....	60
1.7 Justificativa.....	66
2 OBJETIVOS.....	69
2.1 Objetivos Gerais.....	69
2.2 Objetivos Específicos.....	69
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1 Animais experimentais	71
3.2 Procedimentos com Veneno e Frações de <i>Bothrops insularis</i>	71
3.2.1 Purificação da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i>	72
3.2.2 Purificação da L-aminoácido oxidase do veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i>	73
3.2.3 Purificação da trombina símile do veneno da serpente <i>Bothrops</i> <i>insularis</i>	74
3.2.4 Purificação da fosfolipase A ₂ do veneno da serpente <i>Bothrops</i> <i>insularis</i>	76
3.3 Primeiro Modelo - Procedimentos de Perfusão Renal.....	77

3.3.1 Divisão dos grupos de animais.....	77
3.3.2 O Veneno e suas frações.....	78
3.3.3 Solução perfusora e seu preparo.....	78
3.3.4 O Sistema de perfusão renal.....	78
3.3.5 Preparo do sistema.....	81
3.3.6 Calibração do sistema.....	81
3.3.7 Técnica cirúrgica.....	83
3.3.8 Protocolo experimental.....	84
3.3.9 Avaliação bioquímica.....	85
3.3.10 Análise histológica.....	85
3.3.11 Cálculo dos parâmetros renais.....	86
3.4 Segundo Modelo - Procedimentos de Avaliação Pressórica Sistêmica na Artéria Aorta.....	87
3.4.1 O sistema de avaliação sistêmica na artéria aorta	87
3.4.2 Procedimento cirúrgico e protocolo do experimento.....	88
3.4.3 Análise histológica.....	89
3.5 Terceiro Modelo - Procedimentos de Perfusão no Leito Vascular Mesentérico.....	90
3.5.1 O sistema de perfusão no leito vascular mesentérico isolado.....	90
3.5.1 Protocolo da avaliação no leito vascular mesentérico.....	91
3.5.1 Técnica cirúrgica da perfusão do leito vascular mesentérico isolado.....	92
3.5.2 Análise histológica.....	93
4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	93
5 RESULTADOS.....	95
5.1 Resultados dos Experimentos com Perfusão Renal.....	95
5.1.1 Avaliação dos grupos controle.....	95
5.1.1.1 Avaliação das alterações fisiológicas renais dos grupos controle.....	95
5.1.1.2 Avaliação dos achados histopatológicos no grupo controle.....	95

5.1.2 Alterações induzidas pelo veneno da <i>Bothrops insularis</i> e de suas frações, em rim isolado perfundido de rato.....	97
5.1.2.1 Alterações induzidas pelo veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim isolado de rato.....	99
5.1.2.1.1 Alterações fisiológicas renais induzidas pelo veneno da <i>B. insularis</i> , em rim de rato.....	99
5.1.2.1.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pelo veneno da <i>Bothrops insularis</i> , em rim de rato.....	106
5.1.2.2 Alterações induzidas pela lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim de rato.....	107
5.1.2.2.1 Alterações fisiológicas induzidas pela lectina do veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i> no rim de rato.....	108
5.1.2.2.2 Alterações histopatológicas induzidas pela lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim de rato.....	114
5.1.2.3 Alterações induzidas pela L-aminoácido-oxidase (LAAO) do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim de rato.....	117
5.1.2.3.1 Alterações fisiológicas induzidas pela L-aminoácido-oxidase (LAAO)do veneno da <i>B. insularis</i> , no rim de rato.....	117
5.1.2.3.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>B. insularis</i> , em rim de rato.....	124
5.1.2.4 Alterações induzidas pela trombina símile do veneno da <i>B. insularis</i> , no rim de rato.....	126
5.1.2.4.1 Alterações fisiológicas induzidas pela trombina símile do veneno da <i>B. insularis</i> , no rim de rato.....	126

5.1.2.4.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela trombina símile do veneno da <i>B. insularis</i> , em rim de rato.....	133
5.1.2.5 Alterações induzidas pela fosfolipase A ₂ (PLA ₂) do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim de rato.....	135
5.1.2.5.1 Alterações fisiológicas induzidas pela fosfolipase A ₂ (PLA ₂) do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , no rim de rato.....	135
5.1.2.5.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela fosfolipase A ₂ (PLA ₂) do veneno da <i>Bothrops insularis</i> , em rim de rato.....	142
5.2 Efeitos do Veneno da <i>B. insularis</i> no Leito Vascular Sistêmico.....	144
5.2.1 Alterações fisiológicas sistêmicas do veneno	144
5.2.2 Alterações histopatológicas sistêmicas do veneno	146
5.3 Efeitos do Veneno da <i>B. insularis</i> no Leito Vascular Mesentérico.....	151
5.3.1 Alterações fisiológicas do veneno no leito vascular mesentérico..	151
5.3.2 Alterações histopatológicas.....	153
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	157
6.1 Efeitos no Rim Isolado de Rato.....	157
6.2 Efeitos do Veneno da <i>Bothrops insularis</i> no Leito Arterial Sistêmico.....	181
6.3 Efeitos do Veneno da <i>B. insularis</i> no Leito Arterial Mesentérico Isolado.....	186
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	193
8 CONCLUSÕES.....	197
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	199
10 ANEXOS.....	228

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMS – metaloproteinases envolvidas com a ativação e comunicação celular
BIT - fração trombina símile extraída do veneno bruto da *Bothrops insularis*
BILE - fração Lectina símile extraída do veneno bruto da *Bothrops insularis*
BiP - fração fosfolipase A₂ símile extraída do veneno bruto da *B. insularis*
BiLa - fração L-aminoácido oxidase extraída do veneno bruto da *B. insularis*
cAMP – adenosina monofosfato cíclica
cGMP – guanidina monofosfato cíclica
C osm. - clearance osmótico
COX - cicloxigenase
FU - fluxo urinário
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
LAAO – L-aminoácido oxidase
MMPs – proteinases da matriz extracelular
NO – óxido nítrico
PAF – fator de ativação plaquetária
PLA₂ – fosfolipase A₂
PP - pressão de perfusão
PPBs – peptídeos potenciadores da bradicinina
%TCI - percentual de cloro tubular total transportado
%pTCI - percentual de cloro tubular proximal transportado
%pTK - percentual de potássio tubular total transportado
%pTK - percentual de potássio tubular proximal transportado
%TNa – percentual de sódio tubular total transportado
%pTNa - percentual de sódio tubular proximal transportado
RAPs - Receptores ativados por proteinases
RFG - ritmo de filtração glomerular
RVR - resistência vascular renal
SVMPs – metaloproteinases dos venenos das serpentes
TNF α – fator de necrose tumoral α
VEGF – fator de crescimento vascular e endotelial
VWF – fator de von Willebrand
WEB 2086 - triazolobenzodiazepina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Principais características de diferenciação entre as serpentes peçonhentas e não peçonhentas.....	33
Figura 2:	Extração do veneno das serpentes.....	36
Figura 3:	A serpente <i>Bothrops insularis</i>	55
Figura 4:	Hábitos diurnos da serpente <i>Bothrops insularis</i>	46
Figura 5:	Ilha da Queimada Grande.....	58
Figura 6:	Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação.....	79
Figura 7:	Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação.....	80
Figura 8:	Valores registrados de pressão de perfusão (PP) durante a calibração do sistema (n = 6).....	82
Figura 9:	Valores registrados pelo fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).....	82
Figura 10:	Valores registrados de volume de salina (mL/min) durante a calibração do sistema (n = 6).....	83
Figura 11:	Técnica cirúrgica do isolamento do rim (A= veia femoral, B=ureter canulado e C= cânula arterial).....	84
Figura 12:	O sistema montado e registro pressórico.....	87
Figura 13:	Técnica Cirúrgica da avaliação pressórica sistêmica (canulação da aorta e jugular).....	88
Figura 14:	Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico.....	91
Figura 15:	Técnica cirúrgica no leito vascular mesentérico.....	92
Figura 16:	Fotografia de rim de rato, controle, perfundido com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Células de revestimento tubular com a borda em escova preservada....	96
Figura 17:	Fotografia de rim de rato, controle, perfundido com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células tubulares e discreta deposição proteinácea na luz.....	96

Figura 18:	Percentual de glomérulos afetados pelo aumento da permeabilidade e extravasamento proteináceo com cada fração perfundida.....	98
Figura 19:	Pressão de perfusão (PP), (mmHg) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	100
Figura 20:	Resistência vascular renal (RVR), (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>B. insularis</i> (10µg/mL).....	100
Figura 21:	Fluxo urinário (FU), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	101
Figura 22:	Ritmo de filtração glomerular (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	101
Figura 23:	Percentual de transporte total de sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	102
Figura 24:	Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	102
Figura 25:	Percentual de transporte total de potássio (%TK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	103
Figura 26:	Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>B. insularis</i> (10µg/mL).....	103
Figura 27:	Percentual de transporte total de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	104
Figura 28:	Percentual de transporte proximal de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>B. insularis</i> (10µg/mL).....	104

Figura 29:	Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	105
Figura 30:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Balonização de células tubulares proximais.....	106
Figura 31:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Necrose tubular aguda, de aspecto morfológico semelhante à apoptose, e depósito proteináceo intratubular	107
Figura 32:	Pressão de perfusão (PP), (mmHg) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>B. insularis</i> (10µg/mL).....	109
Figura 33:	Resistência vascular renal (RVR), (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>B.othrops insularis</i> (10µg/mL).....	109
Figura 34:	Fluxo urinário (FU), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fração lectina do veneno da <i>B.insularis</i> (10µg/mL).....	110
Figura 35:	Ritmo de filtração glomerular (RFG), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fração lectina do veneno da <i>B. insularis</i> (10µg/mL).....	110
Figura 36:	Percentual de transporte total de sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	111
Figura 37:	Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	111
Figura 38:	Percentual de transporte total de potássio (%TK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	112

Figura 39:	Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	112
Figura 40:	Percentual de transporte total de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	113
Figura 41:	Percentual de transporte proximal de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	113
Figura 42:	Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	114
Figura 43:	Rim de rato perfundido, na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Material proteináceo no espaço de Bowman, balonização das células tubulares e deposição proteinácea na luz.....	115
Figura 44:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Depósito proteináceo nos túbulos distais.	116
Figura 45:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Necrose tubular aguda..	116
Figura 46:	Pressão de perfusão (PP), (mmHg) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	118
Figura 47:	Resistência vascular renal (RVR), (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	118
Figura 48:	Fluxo urinário (FU), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	119

Figura 49:	Ritmo de filtração glomerular(RFG), ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	119
Figura 50:	Percentual de transporte total de sódio (% TNa^+) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	120
Figura 51:	Percentual de transporte proximal de sódio (% pTNa^+) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	120
Figura 52:	Percentual de transporte total de potássio (% TK^+) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	121
Figura 53:	Percentual de transporte proximal de potássio (% pTK^+) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	121
Figura 54:	Percentual de transporte total de cloro (% TCl^-) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>B. insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	122
Figura 55:	Percentual de transporte proximal de cloro (% TCl^-) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	122
Figura 56:	Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da LAAO do veneno da <i>B. insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$).....	123
Figura 57	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$). Focos de necrose tubular aguda e apoptose.....	124
Figura 58:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> ($10\mu\text{g/mL}$). Balonização de células tubulares e deposição proteinácea na luz.....	125

Figura 59:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da LAAO do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Deposição proteinácea no espaço de Bowman e balonização de células tubulares.....	125
Figura 60:	Pressão de perfusão (PP) (mmHg), em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	128
Figura 61:	Resistência vascular renal (RVR), (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	128
Figura 62:	Fluxo urinário (FU), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	129
Figura 63:	Ritmo de filtração glomerular (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	129
Figura 64:	Percentual de transporte total de sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	130
Figura 65:	Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	130
Figura 66:	Percentual de transporte total de potássio (%TK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	131
Figura 67:	Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	131
Figura 68:	Percentual de transporte total de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	132

Figura 69:	Percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	132
Figura 70:	Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	133
Figura 71:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Material proteináceo no espaço de Bowman, túbulos com o mesmo material na luz e balonização do epitélio.....	134
Figura 72:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Depósitos proteináceos na luz de túbulos proximais e distais, e balonização de células tubulares.....	134
Figura 73:	Pressão de perfusão (PP), (mmHg) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	137
Figura 74:	Resistência vascular renal (RVR), (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL)...	137
Figura 75:	Fluxo urinário (FU), (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	138
Figura 76:	Ritmo de filtração glomerular (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	138
Figura 77:	Percentual de transporte total de sódio (%TNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	139
Figura 78:	Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ extraída do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	139

Figura 79:	Percentual de transporte total de potássio (%TK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	140
Figura 80:	Percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL)...	140
Figura 81:	Percentual de transporte total de cloro (%TCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	141
Figura 82:	Percentual de transporte proximal de cloro (%pTCl ⁻) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	141
Figura 83:	Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	142
Figura 84:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Focos de necrose tubular aguda.....	143
Figura 85:	Fotografia de rim de rato perfundido, na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL). Espaço de Bowman e túbulos com material proteináceo, balonização de células tubulares.....	144
Figura 86:	Comportamento da pressão arterial sistêmica média dos ratos (n=6) com variação das doses do veneno da <i>Bothrops insularis</i>	145
Figura 87:	Queda da pressão arterial sistêmica média dos ratos (n=6) com variação das doses do veneno da <i>Bothrops insularis</i>	145
Figura 88:	Fotografia do coração de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão vascular.....	146
Figura 89:	Fotografia do fígado de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão portal.	147

Figura 90:	Fotografia do fígado de rato na presença de veneno da <i>B. insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Veia centrolobular congesta e esteatose em microgotas.....	147
Figura 91:	Fotografia do intestino de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão vascular.....	148
Figura 92:	Fotografia do rim de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão vascular e hemorragia intersticial.....	148
Figura 93:	Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão de grandes vasos e capilares intersticiais.....	149
Figura 94:	Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Congestão de pequenos vasos, hemorragia e infiltrado linfopolimorfonuclear.....	149
Figura 95	Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Intensa hemorragia difusa bronquioloalveolar.....	150
Figura 96:	Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300µg). Hemorragia macroscópica.....	150
Figura 97:	Ação do veneno da <i>B. insularis</i> no leito mesentérico, com redução significativa da pressão de perfusão basal.....	152
Figura 98:	Traçado da perfusão de leito vascular mesentérico obtido após infusão de Fenilefrina (5 µM/mL/min); de Fenilefrina (5 µM/mL/min) com o veneno da <i>B. Insularis</i> (BiV) (10µg/mL/min); e somente com o BiV (10µg/mL/min).....	153

Figura 99:	Mesentério de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL/min). Macroscopia.....	154
Figura 100:	Mesentério de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL/min). Adipócitos e artéria mesentérica preservados.....	154
Figura 101:	Mesentério de rato na presença de veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL/min). Tecido adiposo preservado.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Alterações vasculares, urinárias e eletrolíticas provocadas pelo veneno e suas frações em rim isolado de rato.....	97
Tabela 2:	Principais alterações histopatológicas observadas no rim perfundido com o veneno e suas frações.....	98
Tabela 3:	Percentual de glomérulos apresentando algum grau de extravasamento proteináceo para o espaço de Bowman, em rins perfundidos com o veneno e frações.....	98
Tabela 4:	Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	100
Tabela 5:	Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	101
Tabela 6:	Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio no rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	102
Tabela 7:	Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de potássio no rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	103
Tabela 8:	Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de cloro no rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	104
Tabela 9:	Parâmetros do clearance osmótico no rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).	105
Tabela 10:	Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	109
Tabela 11:	Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).	110

Tabela 12:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	111
Tabela 13:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	112
Tabela 14:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	113
Tabela 15:	Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	114
Tabela 16:	Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase (LAAO) do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	118
Tabela 17	Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	118
Tabela 18:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	120
Tabela 19:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	121
Tabela 20:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	122
Tabela 21:	Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	123
Tabela 22:	Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	128

Tabela 23:	Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	129
Tabela 24:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	130
Tabela 25:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	131
Tabela 26:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	132
Tabela 27:	Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da trombina símile do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	133
Tabela 28:	Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	137
Tabela 29:	Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	138
Tabela 30:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	139
Tabela 31:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	140
Tabela 32:	Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	141
Tabela 33:	Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fosfolipase A ₂ do veneno da <i>Bothrops insularis</i> (10µg/mL).....	142

Tabela 34:	Comportamento da pressão arterial sistêmica média com variação das doses de veneno da <i>Bothrops insularis</i> aplicadas sistemicamente em ratos Wistar (n=6).....	145
Tabela 35:	Pressão de leito mesentérico em ratos tratados (n=6) exclusivamente com Fenilefrina (5μM); com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> (BiV) (10μg/mL) e fenilefrina (5μM); e somente com BiV (10μg/mL).....	152
Tabela 36:	Alterações da pressão arterial mesentérica em ratos tratados (n = 6), exclusivamente com Fenilefrina (5 μM); com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> (BiV, 10μg/mL/min) e com Fenilefrina (5 μM); e somente com o veneno (10μg/mL/min).....	152
Tabela 37:	Prováveis mediadores liberados pelas células renais na presença das frações estudadas, no início e no final de cada experimento.....	157
Tabela 38:	Prováveis mediadores liberados e frações atuantes nos experimentos com o veneno, no leito arterial sistêmico.....	185
Tabela 39:	Prováveis mediadores liberados e frações atuantes nos experimentos com o veneno no leito arterial mesentérico isolado.....	190

ANEXO A - Equipamento utilizado.

ANEXO B - Substâncias utilizadas na perfusão renal e Solução de Krebs Henseleit

ANEXO C - Comportamento da Pressão Arterial do Leito Mesentérico de Ratos Perfundido com o Veneno Da *Bothrops insularis*, Pré-contraído com Fenilefrina, Combinado com fenilefrina e Isoladamente, na dose de 10µg/mL/min.

ANEXO D - Tabelas dos parâmetros renais do grupo controle com o rim isolado de rato.

ANEXO E - Alterações Renais Induzidas Pelo Veneno Da *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado no XXIII Encontro Universitário De Iniciação À Pesquisa da UFC Realizado em Fortaleza, Ceará, entre 01 a 02 de julho de 2004.

ANEXO F - Renal histopathological alterations inserted by the venom of the *Bothrops insularis* serpent. Trabalho Apresentado no VIII Congresso a Sociedade Brasileira de Toxinologia e Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology, realizado em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil de 19 a 23 de Setembro de 2004.

ANEXO G - Alterações Renais Induzidas Pelo Veneno Da *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado no XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), realizado em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil de 17 a 20 de outubro de 2004.

ANEXO H - Efeito Renal da Fração Trombina-Like do Veneno de *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado no XXIV Encontro Universitário De Iniciação à Pesquisa da UFC, realizado em Fortaleza, Ceará, entre 09 a 10 de junho de 2005.

ANEXO I - Alterações Renais Induzidas pela L-aminoáido-oxidase (LAAO) do veneno *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado na XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005) XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental XXX Congresso Brasileiro de Biofísica XL Congresso Brasileiro de Fisiologia XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento, realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

ANEXO J - Alterações Renais Induzidas Pela Trombina Like do Veneno da *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado na XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005) XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental XXX Congresso Brasileiro de Biofísica XL Congresso Brasileiro de Fisiologia XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento, realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

ANEXO K - Alterações Renais Induzidas pela Lectina do Veneno da *Bothrops insularis*. Trabalho Apresentado na XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005) XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental XXX Congresso Brasileiro de Biofísica XL Congresso Brasileiro de Fisiologia XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento, realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

ANEXO L - Trabalho aceito para publicação na revista Toxicon em 10 de fevereiro de 2006. "Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom".

RESUMO

Foram investigados os efeitos do veneno da serpente *Bothrops insularis* e de suas frações, lectina, L-aminoácido oxidase, trombina símile e fosfolipase A₂, no rim isolado e sistema vascular de rato. As frações foram purificadas a partir de uma combinação de procedimentos cromatográficos, usando colunas de HPLC de exclusão molecular, troca iônica, fase reversa e colunas de baixa pressão de afinidade. Foi utilizada a *perfusão de rim isolado de rato* e a solução de Krebs-Henseleit modificada (Bowman, 1970; Fonteles et al. 1998). Parâmetros selecionados da função renal foram avaliados durante as condições experimentais, com a infusão do veneno e suas frações, aos 60, 90, e 120 minutos. Os primeiros 30 minutos serviram de controle interno. No *leito arterial sistêmico de rato* (Ferreira, 1965) a pressão arterial foi avaliada por manômetro conectado por cânula à artéria carótida comum, e o veneno injetado na veia jugular. Os registros foram realizados a cada 10 minutos após a administração de doses crescentes do veneno, até a infusão da dose de 300µg, aos 60 minutos. Na *Perfusão do leito arterial mesentérico isolado de rato* (McGregor, 1965), utilizou-se a solução de Krebs-Henseleit em fluxo constante de 4mL/minuto. A pressão de perfusão foi registrada manometricamente. A avaliação estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, com nível de significância menor de 5%. No rim, o grupo tratado com o veneno apresentou redução em todos os parâmetros avaliados, com exceção da absorção de potássio. Com a lectina a pressão de perfusão aumentou inicialmente e caiu em seguida, juntamente com o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular. Houve aumento na reabsorção de sódio e potássio, com redução no clearance osmótico. Com a trombina-símile, ocorreu aumento inicial seguido de queda no final em quase todos os parâmetros, com exceção da resistência vascular renal. A reabsorção tubular do sódio e do cloro caiu; houve elevação inicial do transporte de potássio; com aumento seguido de queda do clearance osmótico. Com a L-aminoácido oxidase houve queda em todos os parâmetros avaliados. Com a fosfolipase A₂ houve elevação nos parâmetros fisiológicos e vasculares; no transporte tubular de potássio e no clearance osmótico; com queda na reabsorção de sódio e cloro. Todos os rins mostraram, no final, sinais de necrose tubular aguda, com exceção dos perfundidos com a trombina-símile. Excetuando os tratados com veneno, todos os rins apresentaram, ao final, extravasamento protéico para o espaço de Bowman. No *leito arterial sistêmico* o veneno produziu redução na pressão arterial sistêmica diretamente proporcional à quantidade de veneno administrada, excetuando a dose de 10µg, além de intensa hemorragia pulmonar com proliferação de neutrófilos e linfócitos nos alvéolos, hemorragia no rim e congestão generalizada. No *leito arterial mesentérico* se observou uma redução na pressão quando o veneno foi administrado em leito arterial pré-contráido com fenilefrina, como também isoladamente, na ausência de fenilefrina. O veneno da *Bothrops insularis* mostrou potencial hemorrágico e vasodilatador semelhante aos outros venenos de serpentes do gênero, com atividade necrotizante superior nos rins, onde provocou necrose tubular aguda, ao contrario do observado com outros venenos do mesmo gênero, em experimentos no rim isolado de rato.

Palavras chave: Veneno de cobra, *Bothrops insularis*, Rim-efeito de drogas, Lectinas, L-aminoácido oxidases, Trombina, Fosfolipases A.

ABSTRACT

We investigated the biochemical and biological effects of the whole venom from *Bothrops insularis* (popularly known as “golden lancet”), and four of its fractions, a thrombin-like enzyme, a lectin-like substance, an L-amino acid oxidase and a phospholipase A₂, in perfused rat kidneys and vascular system. The fractions were purified by a combination of Sephadex gel filtration in HPLC columns, and ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex in reverse phase, low-pressure affinity columns. We used a modified *isolated perfused rat kidney assay*, with Krebs-Henseleit solution as the perfusion fluid (Bowman, 1970; Fonteles et al., 1998). Selected parameters of renal function during stable experimental conditions were evaluated before and at 60, 90, and 120 minutes after infusion of venom and its fractions, with the first 30 minutes interval constituting the paired control. In the systemic vascular bed (Ferreira, 1965), the arterial pressure was evaluated by a manometer connected through a canule to carotid common artery and the venom was injected into the jugular vein, with registers made at every 10 minutes after administration in increasing doses, until an infusion of 300µg was reached at 60 minutes. In the *isolated rat mesenteric blood vessels method* (McGregor, 1965), the perfusions were done with Krebs-Henseleit solution, at a constant flow rate of 4mL/minute. The perfusion pressure was measured manometrically. Statistical evaluations were performed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test, at the 5% significance level. In *perfused kidney studies*, the group treated with the whole venom showed a fall in all physiological parameters, except in potassium transport. With the *lectin-like fraction*, the perfusion pressure rose initially, followed by a fall, along with urinary flow and glomerular filtration rate. Sodium and potassium tubular reabsorption increased, with a fall in the osmotic clearance. The *thrombin-like* fraction promoted an initial rise followed by a fall in the end, in almost all parameters except in the renal vascular resistance. The sodium and chloride tubular reabsorption fell. There was an initial rise in the potassium transport, and an initial rise followed by a fall in the osmotic clearance. With the *L-amino acid oxidase* fraction, there was a fall in all the parameters studied. The *Phospholipase A₂* fraction induced a rise in the physiological and vascular parameters, as also in the potassium transport and osmotic clearance; accompanied by a fall in sodium and chloride reabsorption. With the exception of the thrombin-like fraction, all the substances tested induced acute tubular necrosis in perfused kidneys in the end. Protein extravasation into the Bowman space was evidenced in all perfused kidneys except in those treated with the whole venom; but was more intense with the thrombin-like fraction. In the *systemic arterial bed*, the whole venom raised arterial pressure in a dose-dependant manner, except at the concentration of 10µg; in addition to causing intense pulmonary hemorrhage with neutrophils and alveolar lymphocyte proliferation, renal hemorrhage, and generalized vascular dilatation and congestion. In the *isolated mesenteric artery*, there was a marked fall in perfusion pressure when the whole venom was infused into the vessel pre-contracted with phenillephrine, as also in the isolated vessel without phenillephrine. We conclude that *Bothrops insularis* venom shows vasodilatation and hemorrhagic potential, like other venoms of the genus; but, different from other *Bothrops* venoms, it also reveals a significant necrotic activity when perfused into isolated rat kidney, causing acute tubular necrosis,

Key words: Snake venoms, *Bothrops insularis*, Kidney-drugs effects, Lectins, L-amino acid oxidase, Thrombin, Phospholipases A.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos

O valor global da incidência dos acidentes por picadas de serpentes e de sua severidade permanece desconhecido, seja por falta de registro ou por metodologia deficiente na captação dos dados (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Apesar das estatísticas incompletas, estima-se que ocorrem anualmente cinco milhões de casos, provocando 50.000 mortes, especialmente em áreas rurais dos trópicos, atingindo a África, a Ásia e a América do Sul (WARRELL, 1996; CHIPPAUX, 1998; CHIPPAUX; GOYFFON, 1998; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Além da mortalidade eles geram um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, na medida em que resultam em morbidades crônicas associadas com amputações, deformidades e falência renal, e suas conseqüências sócio-econômicas. (WHO, 1981; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Em nosso país, os primeiros cuidados historicamente dispensados a pessoas picadas por serpentes foram promovidos por Vital Brazil, registrando óbitos decorrentes de acidentes ofídicos na região de Botucatu, no estado de São Paulo, onde posteriormente se desenvolveram os maiores centros de criação de serpentes e produção de soro antiofídico, como o Instituto Butantan, em 1901 (BENCHIMOL; TEIXEIRA, 1993). A notificação tornou-se obrigatória em 1986, e condicionada a distribuição de soro aos estados (BOCHNER; STRUCHINER, 2002). Foram registrados, no Brasil de junho a dezembro de 1986, 8574 casos. Nos três anos seguintes, 1987, 1988 e 1989, respectivamente 21463, 19815 e 20947 casos (BARRAVIERA, 1997). Entretanto, apesar da obrigatoriedade da notificação, os dados são irregulares, em parte devido à existência de sistemas paralelos de captação de dados (BOCHNER; STRUCHINER, 2002). Apresentam maior precisão apenas em determinadas regiões, onde o assunto é mais estudado (CAIAFFA et al., 1997; RIBEIRO et al., 1993; RIBEIRO; JORGE; IVERSSON, 1995).

No Brasil, apesar das falhas nas notificações, o Ministério da Saúde calcula que ocorreram entre 1990 e 1993, 20.000 acidentes por ano, com 359 óbitos,

principalmente por serpentes do gênero *Bothrops spp.* (BRASIL, 1998; 2001; CHIPPAUX; 1998). A extensa maioria era relacionada às espécies do gênero *Bothrops*, 90,5%, vindo em segundo lugar o *Crotalus* com 7,7%, depois o *Lachesis* com 1,4% e finalmente o *Micrurus* com 0,4% (BRASIL, 1998; 2001). Em 314 desses óbitos o tempo decorrido entre a picada e o atendimento foi informado. Em 39,49% dos óbitos o tratamento ocorreu nas primeira 6 horas, enquanto na maioria, 60,51% o atendimento deu-se após esse tempo (BRASIL, 1998; 2001). Os acidentes eram mais comuns em indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária dos 15 aos 49 anos, atingindo principalmente os membros inferiores. (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Bochner e Struchiner (2003) realizaram um extenso levantamento na literatura, de casos registrados no Brasil entre 1901 e 2000, concluindo que as análises epidemiológicas realizadas nos últimos 100 anos são baseadas nas variáveis utilizadas por Vital Brazil no início do século passado, com todas as mesmas deficiências de subnotificação. Neste século, os registros mais recentes limitam-se a informes regionais (DA SILVA; JORGE; RIBEIRO, 2003; PINHO; OLIVEIRA; FALEIROS, 2004).

O Nordeste do Brasil aparece nos dados mais recentes do Ministério da Saúde, nos anos de 1990 a 1993, últimos dados disponíveis, com o menor coeficiente de incidência anual de acidentes ofídicos. Sendo uma das regiões mais pobres, tradicionalmente agrícola, e de localização geográfica equatorial, provavelmente tem sua situação subestimada em virtude de subnotificações, como se observa nos registros sanitários brasileiros relativos ao assunto (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). No Ceará, os acidentes ofídicos compreendem uma boa parte das ações dispensadas aos cuidados de saúde pública, seja na disponibilização do soro, ou nos cuidados especializados necessários. O registro de casos é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia. Guimarães e et al. (1989) verificaram, em dados da Divisão de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde do Estado, entre 1986 e 1988, a ocorrência de 1079 casos de acidentes por serpentes peçonhentas e não peçonhentas, com 7 óbitos e portanto uma letalidade de 1,6%.

A Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará registrou, entre 1987 e 1990, 1256 casos, com 18 óbitos e letalidade de 1,4% (CEARÁ, 1991). Feitosa et al.

(1997), observaram a notificação de 688 casos no período de 1992 a 1995, acometendo pessoas do sexo masculino em 75% dos casos, na faixa etária entre 10 e 49 anos em 72% das ocorrências, sendo atingidos principalmente os membros de trabalhadores agrícolas. Houve uma sazonalidade, com os acidentes ocorrendo nos meses de abril a setembro. A maioria dos acidentes foi provocada por serpentes do gênero *Bothrops*, 88,3%, seguida pelas do gênero *Crotalus*, 10,7%, *Micrurus*, 0,9% e *Lachesis*, 0,2%. A mortalidade foi de 0,7%, embora os casos sem informação tenham chegado a 33,6% do total (FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997). A maioria dos óbitos ocorreu entre pacientes que foram tratados nas primeiras 6 horas após a picada, fato que provavelmente deveu-se ao uso inadequado da dose ou do soro. Apesar da baixa incidência dos acidentes crotálicos (FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997), e da pobreza de dados disponíveis, o soro anticrotálico foi o mais utilizado no Estado do Ceará no período analisado (FEITOSA, 1996).

1.2 Classificação das Serpentes

Troiano (1991) classificou os ofídicos na classe *Reptilia*, subclasse *Lepidosauria*, ordem *Squamata*, subordem *Serpentes*. Calcula-se que existam cerca de 3000 espécies de serpentes no mundo, das quais 410 são venenosas e peçonhentas (BARRAVIERA, 1993), com a mortalidade dos acidentes variando segundo a região (WARREL, 1989), a incidência de animais peçonhentos e a capacidade de resposta do serviço de saúde (FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997; BRASIL, 1998; 2001).

As três principais famílias de serpentes existentes no Brasil, a *Colubridae*, *Elapidae* e *Viperidae*, são classificadas segundo dois aspectos principais. A localização das presas e a presença ou não de sulcos ou canais nestas, que permitam a drenagem do veneno a partir das glândulas produtoras supralabiais. Além disso, são estudadas suas características biológicas e a presença da fosseta loreal entre o olho e a narina [(Figura 1) (BARRAVIERA, 1997; INSTITUTO BUTANTAN, 1996)].

Adquirem verdadeira importância epidemiológica apenas as duas últimas famílias, *Elapidae* e *Viperidae* (BRASIL, 1998; 2001).

A família *Elapidae* é composta de 18 espécies, todas incluídas no gênero *Micrurus*. Seu veneno é fortemente neurotóxico, com ação pré e pós sináptica. A ação pre-sináptica, predominante na *M. corallinus*, mas também observada em algumas espécies de cascavel, consiste de atuação na junção neuromuscular pelo bloqueio da liberação de acetilcolina e impedimento da deflagração do potencial de ação, efeito que não responde aos anticolinesterásicos. A atividade pós-sináptica, mais intensa na *M. frontalis*, é produzida por uma neurotoxina de baixo peso molecular, que é rapidamente absorvida pela circulação sanguínea desencadeando sinais precoces. Ela resulta da competição com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos de modo semelhante ao curare. A neostigmina e o edrofônio, anticolinesterásicos, impedem a degradação da acetilcolina pela acetilcolinesterase, prolongando a sua meia vida e melhorando os sintomas (BRASIL, 1998; 2001).

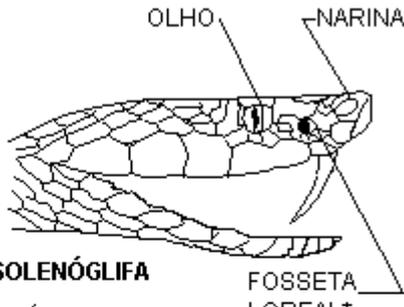
FOSETA* LOREAL PRESENTE	 <p>SOLENÓGLIFA</p> <p>* ORIFÍCIO ENTRE O OLHO E A NARINA, CONHECIDA COMO "COBRA DE 4 VENTAS"</p>	CAUDA NORMAL (LISA) GÊNERO BOTHROPS (JARARACA, JARARACUÇU, URUTU)	P E Ç O N H E N T A S
		CAUDA COM CHOCALHO OU GUIZO GÊNERO CROTALUS (CASCAVEL, BOICININGA)	
		CAUDA COM ESCAMAS ERIÇADAS OU ARREPIADAS GÊNERO LACHESIS (SURUCUCU, PICO-DE-JACA)	
FOSETA LOREAL AUSENTE	<p>COM PRESAS ANTERIORES</p> <p>SEM PRESAS ANTERIORES</p>	GÊNERO MICRURUS (CORAIS) PROTERÓGLIFA	P E Ç O N H E N T A S
		VÁRIOS GÊNEROS CANINANA, BOIPEVA, COBRA-CIPÓ, JIBÓIA ÁGLIFA	
		VÁRIOS GÊNEROS: COBRA-VERDE, MUÇURANA, PARELHEIRA OPISTÓGLIFA	N Ã O

FIGURA 1: Principais características de diferenciação entre as serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

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

À família *Viperidae*, pertencem os gêneros, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, dos quais apenas os três últimos adquirem importância

epidemiológica. Os gêneros *Bothriopsis* e *Porthidium* são resultados de nova classificação com revisão do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2001).

1.3 Características Gerais dos Venenos das Serpentes

Os venenos das serpentes são produzidos como um complexo enzimático de finalidades principalmente digestivas com atividades tóxicas que neutralizam e matam a presa durante a captura, acrescido de um efeito defensivo contra predadores (INSTITUTO BUTANTAN, 1996). Produzem três tipos de resultados integrados, a imobilização através de hipotensão, decorrente de vasodilatação generalizada e hemorragia, a imobilização por paralisia, bloqueando a placa neuromuscular, e a digestão dos tecidos da presa, através de seu efeito necrotizante (AIRD, 2002). Contêm uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características individuais variam com a espécie (VARANDA; GIANNINI, 1994).

Dentre seus componentes orgânicos, entre 90 e 95% do seu peso seco é composto de proteínas (BON, 1997), incluindo ainda carboidratos, lipídios, especialmente fosfolipídios, e aminas biogênicas (VARANDA, GIANNINI, 1994). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados.

Desta forma, são encontrados entre aqueles com atividade enzimática, as fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes nas espécies botrópicas, que estão relacionadas à produção de derivados do ácido aracdônico (SIX; DENNIS, 2000), as metaloproteinases responsáveis pela proteólise das membranas basais dos vasos, as trombina símiles que ativam fatores da coagulação, transformam o fibrinogênio em fibrina e induzem a agregação plaquetária (SANTOS et al., 2000), e as flavoenzimas L-aminoácido oxidases que provocam ou inibem a agregação plaquetária além de induzirem apoptose (DU; CLEMETSON, 2002).

Sem atividade enzimática são observadas toxinas que afetam processos vitais como a função neuromuscular, as neurotoxinas de atividade pré e pós sináptica (HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979), as que atuam na membrana celular do músculo cardíaco, como as cardiotoxinas que despolarizam de modo

persistente a membrana das células excitáveis acarretando hemólise (REID, 1964), e as lectinas, como a botrocetina, que se ligam a glicoproteínas e interferem com a formação do coágulo e na agregação plaquetária (MONTEIRO et al., 2003).

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

Reconhecidos por sua complexidade bioquímica, os venenos de serpentes contêm milhares de proteínas cujo conhecimento dos mecanismos de ação e de seus alvos podem favorecer o desenvolvimento de drogas terapêuticas ou de ferramentas biológicas (FOX et al. apud TANJONI et al., 2003). Têm motivado uma série de pesquisas, as quais, na medida em que revelam detalhes funcionais permitem a formulação de medicamentos de uso disseminado. Desde que Rocha e Silva, em 1949, descobriu um dos elementos chave do processo inflamatório, a bradiginina, utilizando veneno da *Bothrops jararaca*, ficou claro a importância destas pesquisas. Importância econômica, inclusive, gerando questionamentos sobre o relacionamento da indústria farmacêutica e o meio acadêmico, deixado de fora no momento de obtenção do lucro (FERREIRA, 1994).

Medicamentos de uso generalizado foram produzidos nesta linha, como os inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina). Inicialmente identificado como um fator potenciador da bradiginina (BPF) presente no veneno da *Bothrops jararaca* (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965; FERREIRA, 1965; AMORIM et al., 1967), teve em seguida constatadas suas características de ação como inibidor das enzimas inativadoras da bradiginina (FERREIRA, 1965, FERREIRA, 1966; FERREIRA, VANE, 1967), posteriormente da conversão da angiotensina I em angiotensina II (BAHKLE, 1968; BAHKLE; REYNARD; VANE, 1969), sendo finalmente sintetizado artificialmente por pesquisadores da indústria de medicamentos (CUSHMAN et al., 1977), atualmente um dos antihipertensivos mais utilizados em todo o mundo (FERREIRA, 1998). Outras pesquisas vêm sendo desenvolvidas, na busca de medicamentos com propriedades semelhantes às características de frações do veneno de serpentes, como ativadores da protrombina que estimulam a coagulação (MASCI; WHITAKER; DE-JERSEY, 1988),

antimicrobianos (STABELI et al., 2004), peptídios natriuréticos (LISY et al, 1999), e no campo da oncologia (BODE et al., 1994).

Seus venenos, extraídos para estudo (Figura 2), demonstraram possuir em comuns características gerais como atividade proteolítica causando necrose; atividade coagulante e, portanto provocando hemorragia por consumo do fibrinogênio; ação neurotóxica (GUTIÉRREZ et al., 1981; BARRAVIERA, 1997). Gêneros específicos guardam predomínio de algumas destas atividades.

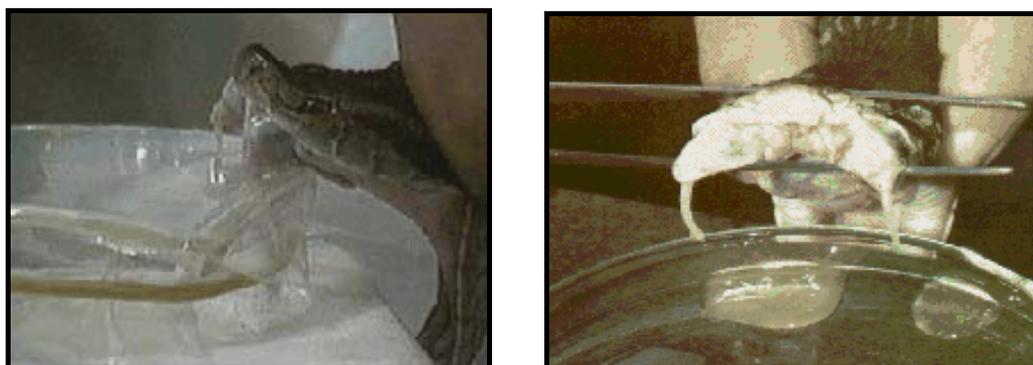


FIGURA 2: Extração do veneno das serpentes.

Fonte: INSTITUTO BUTANTAN. **O Butantan e as serpentes do Brasil.** São Paulo, 1996.

As serpentes do gênero *Bothrops* têm atividades proteolíticas e coagulantes acentuadas, sendo a ação neurotóxica mais evidente somente em algumas espécies (RODRIGUES-SIMIONI et al., 2004).

As serpentes do gênero *Crotalus* possuem atividade mista com forte predominância da ação neurotóxica (BARRAVIERA, 1997).

Nas serpentes do gênero *Lachesis* as ações predominantes são proteolíticas e coagulantes, com discreta ação neurotóxica (HAAD, 1981).

As serpentes do gênero *Crotalus* conhecidas como cascavéis, compreendem 26 espécies distribuídas por todo o continente americano. São encontradas nas regiões secas e pedregosas e pouco freqüentes nas florestas e matas úmidas. Na Amazônia, são vistas apenas nos lugares secos e elevados da região de Santarém, serra do Cachimbo e alguns serrados. Alimenta-se de pequenos roedores e sua agressividade é menor que as do gênero *Bothrops*, e maior que as do *Lachesis* e *Micrurus*. No Brasil encontramos uma única espécie, a *Crotalus durissus*, subdividida em 6 subespécies, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus terrificus*

e *Crotalus durissus trigonicus* (BARRAVIERA et al., 1989). Sua coloração é variável. Podemos encontrar as cores oliva-cinza, oliva, marrom-cinza até marrom, com manchas romboédricas pela linha dorsal, manchas com margens brancas e centro mais claro; lado ventral branco-amarelado até cinza-amarelado (GRANTSAU, 1990).

Seu veneno produz uma emergência médica, determinando, em alguns serviços, uma mortalidade de até 11% nos casos tratados com soro específico, e de 72% nos casos não tratados (ROSENFELDE, 1991). A *Crotalus durissus terrificus*, presente na América do Sul, contém inúmeras toxinas, incluindo crotoxina (VITAL BRAZIL; EXCELL, 1971), crotamina (LI et al., 1993; MANCIN et al., 1998), convulxina (PRADO-FRANCISHETTI, VITAL BRAZIL, 1980) e giroxina (ALEXANDER; GROTHUSEN; ZEPEDA; SCHW, 1988). Suas atividades biológicas compreendem miotoxicidade, neurotoxicidade, alterações hematológicas, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (BARRAVIERA, 1997).

A crotoxina é a fração com fisiopatologia mais conhecida, composta pela interação não covalente de duas subunidades, a fosfolipase A₂, uma proteína básica de 16.000 Dalton, e uma proteína ácida de 9.000 Dalton, a crotapotina (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; BARRAVIERA, 1997). A crotapotina potencializa a atividade miotóxica da fosfolipase A₂, promovendo lesões subsarcolêmicas, com edema intramitocondrial das células musculares esqueléticas, que se iniciam em 4 a 6 horas (GOPALAKRISHNAKONE; DEMPSTER; HAEGOOD, 1984). É responsável ainda pelos efeitos neurotóxicos, centrais, e periféricos, bloqueando a liberação pre-sináptica da acetilcolina. Na junção neuromuscular produz paralisia semelhante ao curare. Provoca ainda vômitos, salivação intensa, diarreia e convulsões (BARRAVIERA, 1997). A rabdomiólise produzida na necrose muscular é responsabilizada indiretamente pela lesão renal, através da formação de cilindros de mioglobina que obstruem os túbulos, como também por toxicidade direta do miopigmento nas células de revestimento tubular (AZEVEDO-MARQUES et al., 1998). Este mecanismo de ação da rabdomiólise ainda não é bem estabelecido, já que substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio renal parecem contribuir para a agressão tecidual (MARTINS et al., 1998). Além disso foi demonstrada a nefrotoxicidade direta da crotoxina (MONTEIRO et al., 2001), proposta como o principal agente do acometimento dos rins (MARTINS et al., 2002).

O Gênero *Lachesis* apresenta baixa incidência de acidentes, geralmente em regiões de baixa densidade populacional e com sistema de notificação muito deficiente, portanto também com poucos trabalhos publicados na literatura a seu respeito (BRASIL, 1998; 2001; HAAD, 1981). Estão distribuídas pelas grandes florestas tropicais brasileiras, como a Zona da Mata Atlântica e a floresta Amazônica, embora haja registro de acidentes e captura desta espécie em regiões serranas úmidas do Ceará (BRASIL, 1998; 2001; FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997). No Brasil é encontrada uma única espécie, *Lachesis muta*, subdivididas em duas subespécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctivaga* (BARRAVIERA, 1997). Tem um padrão de cor marrom amarelado, com grandes manchas triangulares pretas, as quais apresenta uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçado (GRANTSAU, 1990). São conhecidas como surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga, surucucu-de-fogo. É a serpente venenosa de maior tamanho em toda América Latina, chegando a um comprimento de quatro metros e a secretar 4,5mL de veneno (BARRAVIERA, 1997). Seu veneno causa lesão tecidual importante, provocada por proteases semelhantes às encontradas no veneno botrópico. Foi obtida uma fração com atividade semelhante à da trombina (BRASIL, 1998; 2001), que determina quadros hemorrágicos que podem ser sistêmicos, transformando, em excesso, o fibrinogênio em fibrina e levando a uma coagulopatia de consumo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Possui ação neurotóxica, representada por sinais de excitação vagal com bradicardia, diarreia, hipotensão arterial e choque (BARRAVIERA, 1997), embora a fração específica não tenha ainda sido determinada (BRASIL, 1998; 2001).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as responsáveis pelo maior número de acidentes no Brasil. Habitam preferencialmente ambientes úmidos, tais como as áreas cultivadas e circunjacências, onde abundam pequenos roedores que são a fonte de sua alimentação. Têm hábitos noturnos e são as mais agressivas do país, atacando em silêncio quando ameaçadas. Constitui o gênero, uma população de cerca de 32 espécies, com coloração enriquecida por desenhos variados, sobre um fundo que tende acompanhar a cor predominante do terreno, variando do verde, na *B. bilineatus*, ao cinza na *B. insularis*. Também muito variável são o tamanho e as denominações das várias espécies, bem como sua distribuição por toda a América Central, América do Sul, incluindo o território brasileiro (BARRAVIEIRA, 1997). Tal

diversidade de aspectos anatômicos possibilita que novas subespécies sejam constantemente descritas (LIMA, 2001).

1.4 Características dos Venenos *Bothrops*

Os venenos das *Bothrops* apresentam inúmeras frações protéicas, cujo mecanismo de ação não está bem definido. Cerca de 90% do seu peso seco é constituído de uma grande variedade de enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas, e o restante 10% compreende carboidratos, lipídios, metais, aminoácidos livres e amins biogênicas.

Estão definidas algumas das atividades primárias de frações citotóxicas, vasculotóxicas, necrotizantes e coagulantes, que parecem responsáveis por outras ações secundárias, como o choque e a insuficiência renal aguda (GUTIÉRREZ et al., 1981; BARRAVIERA, 1997), as quais ainda necessitam de maiores esclarecimentos sobre a patogenia.

Localmente provocam dor intensa, edema, hemorragia e necrose tissular, levando às vezes, a amputação do membro (ROSENFELDE, 1971; GUTIÉRREZ et al., 1981). Estes efeitos resultam da atividade de proteases (VITAL BRAZIL, 1982), fosfolipases (MEBS; SAMEJIMA, 1986), fatores hemorrágicos (HOUSSAY, 1930), com a liberação de agentes vasoativos levando ao edema (VILLARROEL et al., 1978) que é agravado pela isquemia (CHAPMAN, 1968). Várias proteínas hemorrágicas e miotóxicas foram isoladas de diferentes venenos originários de serpentes de vários gêneros (BJARNASON; TU, 1978; BJARNASON; FOX, 1994; MANDELBAUM; REICHL; ASSAKURA, 1982; MEBS; SAMEJIMA, 1986; SELISTRE; GIGLIO, 1987; AIRD, 2002; TANJONI et al., 2003; CASTRO et al., 2004); embora seus mecanismos de ação sejam ainda pouco compreendidos.

1.4.1 Atividades citotóxicas dos venenos *Bothrops*

A ação citotóxica é resultado da capacidade proteolítica dos venenos (GUTIÉRREZ; CERDAS, 1984), podendo provocar necrose adiposa, mionecrose e necrose do endotélio vascular, guardando relação direta com a quantidade do veneno inoculado. A patogênese é complexa, decorrendo da atividade de proteases,

hialuronidases e fosfolipases A₂ metaloproteases, presentes no veneno, provocando a liberação de mediadores inflamatórios do endotélio lesado pelas hemorraginas e pela ação coagulante do veneno. As lesões locais, rubor, edema, bolhas e necrose, acompanhados por dor intensa, podem ser agravadas por infecção bacteriana secundária, principalmente *Morganella morgagnii*, *Escherichia coli*, *Providentia sp* e *Streptococco* do grupo D (BRASIL, 2001). Podem surgir abscessos contendo germes provenientes da boca do animal, da pele do acidentado ou do uso de contaminantes, bacilos Gram-negativos, anaeróbios e cocos Gram-positivos D (BRASIL, 2001), provocando algumas vezes a amputação do membro afetado (MILANI et al., 1997). Quando a ação é generalizada, algumas toxinas podem provocar rabdomiólise que leva a mioglobinúria e agravando o quadro com insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985). A atividade necrotizante é mais intensa em alguns gêneros (BARRAVIERA, 1997). A *Bothrops moojeni* possui atividade necrosante local em cobaias mais intensa que outras do gênero (VILLARROEL et al. 1979), e a *Bothrops insularis* tem o veneno 14 vezes mais potente que a *Bothrops jararaca* (INSTITUTO BUTANTAN, 1996).

Harris e Cullen (1990), classificaram a atividade citotóxica dos venenos de serpentes pela sua capacidade de lesar irreversivelmente células musculares estriadas, e separaram suas toxinas em três grupos; a) as pequenas miotoxinas, mais estudadas nos venenos crotálicos; b) as cardiotoxinas; c) as miotoxinas fosfolipases A₂ (PLA₂) que formam o grupo mais extenso.

1.4.2 Atividade lectina dos venenos *Bothrops*

Ao mesmo tempo em que ativam a coagulação por um mecanismo trombina símile, o veneno possui certas frações capazes de se ligar à trombina, inibindo a atividade, em decorrência de sua capacidade de se ligarem a açúcares, sendo por isso classificadas entre as lectinas animais dependentes de cálcio (OGAWA et al., 2005).

Lectinas são definidas como proteínas não imunes com afinidade específica para moléculas de carboidrato, primeiramente reconhecidas por sua capacidade de aglutinas células (SHARON; LIS, 1972; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As lectinas de origem animal foram inicialmente classificadas de acordo com sua necessidade

de cálcio para atuar, chamadas, portanto, cálcio dependentes as do tipo-C, sendo reconhecidas hoje também as dependentes do radical sulfidril, denominadas tipo-S, sendo na sua maioria específicas para β -galactosídios (DRICKAMER, 1993). Um aspecto importante que diferencia as lectinas em geral das lectinas símiles do tipo C dos venenos das serpentes é que, enquanto as primeiras são exclusivamente homodímeros ou homooligômeros, as últimas são comumente heterodímeros constituídos de subunidades homólogas α e β (MONTEIRO et al., 2003).

Lectinas do tipo-C são proteínas não enzimáticas encontradas em muitos animais vertebrados, moluscos, vegetais, bactérias e cogumelos (KILPATRICK, 2002), que se ligam não covalentemente a mono ou oligossacarídeos de modo dependente de cálcio. São estruturalmente metaloproteínas com múltiplos domínios que contêm uma ou mais cópias de uma região altamente conservada que consiste de 115-130 resíduos de aminoácidos, denominados domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) (OGAWA et al., 2005).

Lectinas do tipo-C que perderam a capacidade de se ligar a carboidratos são encontradas somente em venenos de serpentes (OGAWA et al., 2005), como por exemplo, o fator X, ativador da coagulação sanguínea, do veneno da *Vipera russeli*. São denominadas lectinas símiles e tratam-se de metaloproteinases heterodímeras que contêm um domínio de lectina tipo-C com sua cadeia leve altamente homóloga a lectinas específicas para galactose, mas que ela mesma não se liga à galactose (TAKEYA et al., 1992). Elas mostram atividades contra fatores de coagulação, inibição da agregação plaquetária e da trombina, afetando a homeostase e trombose (OGAWA et al., 2005).

Aquelas lectinas encontradas nos venenos das serpentes apresentam características estruturais que se assemelham tanto com as do tipo-C como do tipo-S (HIRABAYASHI et al., 1991). De fato, a maioria das lectinas do tipo C isoladas dos venenos de serpentes não consegue se ligar a carboidrato e não podem ser consideradas verdadeiras lectinas (DRICKAMER, 1999; MORITA, 2004; MONTEIRO et al., 2003), sendo, portanto, denominadas lectinas símiles. Pertencem a uma vasta família de proteínas estruturalmente homólogas e funcionalmente distintas. Possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato por subunidade (DRC) ou apresentam um domínio do tipo de lectina cálcio dependente, que não se liga a carboidrato ou cálcio (SHARON et al., 2003).

Foram isoladas de venenos de diversas serpentes, como a *Crotalus atrox* (HIRABAYASHI et al., 1991), a *Lachesis muta stenophrys* (ARAGÓN-ORTIZ; BRENES-BRENES; GUBENSEK, 1990), a *Bothrops jararaca* (OZEKI et al., 1994), *Bothrops jararacussu* (DE CARVALHO et al., 2002), a *Bothrops godmani* (LOMONTE et al., 1990), *Dendroaspis jamesonii* (OGILVIE et al., 1986), a *Agkistrodon p. piscivorus* (KOMORI et al., 1999), e a *Bitis arietans* (NIKAI et al., 1995). Da *Bothrops insularis* Guimarães-Gomes et al. (2004) isolaram uma fração lectina, ainda sem caracterização de seus efeitos biológicos.

As estruturas primárias de mais de 80 tipos de lectinas e lectina do tipo C símile, isoladas de venenos de serpentes já foram determinadas. Elas são normalmente compostas por duas unidades idênticas ligadas covalentemente, consistindo de 135-141 aminoácidos ligados por ponte dissulfídrica (OGAWA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2003). Foram isoladas lectinas de vários venenos do gênero *Bothrops*, incluindo serpentes das espécies *B. jararaca* (FUJIMURA et al., 1995), *Bothrops godmani* (LOMONTE et al., 1990), *B. pirajai* (HAVT et al., 2005), *B. asper* (RUCAVADO et al., 2005), *B. jararacussu* (KASSAB et al., 2004).

Basicamente existem dois tipos de lectinas nos venenos das serpentes. O primeiro tipo tem pontes dissulfídricas ligando homodímeros α e β formados por dois peptídios homólogos de massa molecular por subunidade de aproximadamente 14kDa, com capacidade de aglutinar eritrócitos e de se ligar a carboidratos produzindo uma gama de efeitos patológicos necrotizantes, similares aos encontrados nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (HAVT et al., 2005). O segundo tipo tem um alto peso molecular, entre 50 e 100 kDa, correspondendo a múltiplos ligados por pontes dissulfídricas, que estão associados a de dois a quatro heterodímeros $\alpha\beta$, tal qual visto na convulxina, do veneno crotálico, que mostra outras importantes atividades como a agregação plaquetária, sem entretanto ação significativa na aglutinação de eritrócitos (TOYAMA et al., 2001).

Nos mamíferos as lectinas estão envolvidas na aderência celular a outras células e à matriz extracelular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). As dos venenos das serpentes, quando injetadas em outros animais, podem aglutinar hemácias *in vitro*, estimular mitose em linfócitos, determinar agregação plaquetária, induzir edema, liberar cálcio dos estoques intracelulares, e inibir a proliferação de algumas linhagens de células (MARCINKIEWICZ et al., 2000). Podem se ligar ao fator de von

Willebrand e induzir sua interação com a glicoproteína plaquetária Ib. Outras, ao contrário, ligam-se à glicoproteína plaquetária Ib impedindo o fator de von Willebrand de mediar a agregação plaquetária, ou inibem a coagulação por formar complexos não covalentes com os fatores IX e IXa, X e Xa, bloqueando sua participação na cascata da coagulação, e algumas interagem diretamente com a trombina inibindo suas funções de agregação de plaquetas, quebra do fibrinogênio e ativação da coagulação (MONTEIRO et al., 2003).

1.4.3 Atividade L-aminoácido oxidase dos venenos *Bothrops*

Recentemente, Stabeli et al. (2004) isolaram uma L-aminoácido oxidase (LAAO) do veneno da *B. alternatus*, demonstrado sua atividade na agregação plaquetária e efeito bactericida. Tempone et al. (2001) fracionaram outra LAAO do veneno da *Bothrops moojeni* que revelou atividade parasiticida contra a *Leishmania*, através de um mecanismo envolvendo a geração de peróxido de hidrogênio.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (DU, CLEMETSON, 2002). São enzimas largamente distribuídas em diferentes microorganismos tais como bactérias, fungos, algas verdes e venenos de serpentes. Nos microorganismos estão envolvidas na utilização de fontes de nitrogênio (STABELI et al., 2004). A *Neurospora crassa* que utiliza rotineiramente fontes de nitrogênio rapidamente metabolizáveis, como amônia, glutamina e glutamato, quando em condições ambientais desfavoráveis aumentam a produção de LAAO para passar a utilizar aminoácidos, purinas, nitrato, proteínas e peptídios (XIAO; MARZLUF, 1993; CALDERON et al., 1997).

Elas estão presentes nos venenos de serpentes e se supõe que sejam toxinas, ainda que seu modo de ação não esteja esclarecido (STABELI et al., 2004). A serpente *C. rhodostoma* apresenta 30% de seu veneno constituído de LAAO (PONNUDURAI et al., 1994). Se sua toxicidade está relacionada à atividade enzimática também não está claro, embora, muitos trabalhos recentes tenham descrito seus efeitos biológicos e as suas características farmacológicas. Neste sentido é citada sua ação sobre plaquetas, indução de apoptose, hemólise,

citotoxicidade e capacidade de provocar hemorragia através da lesão endotelial (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997; DU, CLEMETSON, 2002), formação de edema e efeito bactericida (STILES et al., 1991; LI et al., 1994; MASUDA et al., 1997; STABELI et al., 2004).

Estruturalmente são glicoproteínas formadas por homodímeros, que se ligam à Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD). Alguns tipos de venenos possuem mais de um tipo de LAAO. (DU, CLEMETSON, 2002). Nos venenos crotálicos elas se associam especificamente às células endoteliais de mamíferos, induzindo apoptose (SUHR; KIM, 1996).

Seus sítios ativos estão bem caracterizados estruturalmente, mostrando em geral distintas massas moleculares variando entre 110-150 kDa, se medida por filtração em gel, e entre 50-70kDa quando medida por SDS/PAGE, o que indica que são homodímeros associados não covalentemente. Seus substratos preferenciais incluem L-aminoácidos hidrofóbicos, como L-leucina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-metionina, L-isoleucina e L-norleucina, sendo as variações de afinidade explicadas pelos diferentes sítios de ligação, não abrangendo aminoácidos hidrofílicos ou D-aminoácidos (DU, CLEMETSON, 2002).

A maioria dos seus efeitos parece decorrer da produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SKARNES, 1970; TAKATSUKA et al., 2001; ALI et al., 2000; TEMPONE et al., 2001; DU; CLEMETSON, 2002). Com relação à função plaquetária seu efeito tem sido descrito como dúbio. Para Nathan et al. (1982), a LAAO da *Echis colorata* inibe a agregação das plaquetas induzida por ADP e Takatsuka et al., 2001, sugerem que esta atividade seria realizada através da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), já que ele é inibido pela catalase, enzima que reduz este efeito. Propõem que a atuação do peróxido de hidrogênio se deva à inibição da interação de uma integrina (GPIIb/IIIa), expressa na superfície da plaqueta ativada, com o fibrinogênio.

Outros autores observaram a ativação da agregação plaquetária humana (ALI et al., 2000), ação que é inibida pela indometacina e aspirina (LI et al., 1994), mas não pelo bloqueio da estimulação do ADP, decorrendo, portanto da produção de Tromboxane A_2 pela cicloxigenase. Também bloqueadores da adenilato ciclase e da guanilato ciclase, como a prostaglandina E_2 , inibem esta ação, juntamente com a catalase, agindo na eliminação de H_2O_2 . Sugere, então, que a LAAO induz a

agregação plaquetária pela produção de peróxido de hidrogênio, que por sua vez aumenta a produção de Tromboxane A₂ dependente de cálcio, mas independente de ADP (DU, CLEMETSON, 2002). A ativação das plaquetas pela trombina e pelo ADP não envolve o peróxido de hidrogênio, que está relacionado à ativação plaquetária pelo colágeno, a qual é também inibida pela catalase. O peróxido de hidrogênio é produzido pelas plaquetas estimuladas pelo colágeno, atuando como segundo mensageiro que ativa o metabolismo do ácido aracdônico e a fosfolipase C, embora ainda não esteja bem claro como se dá esta ação (PIGNATELLI et al., 1998). Entretanto, é possível que as LAAOs também ativem as plaquetas através de um receptor específico, já que Suhr e Kim (1996) demonstraram que a LAAO da *A. halys* promove efeitos citotóxicos diferentes em diferentes linhagens celulares (DU, CLEMETSON, 2002).

A citotoxicidade se apresenta como a indução da apoptose, relacionada pela primeira vez às LAAOs em células do endotélio vascular (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997), e posteriormente a outras células em cultura. Parece envolver também a produção de peróxido de hidrogênio, sendo inibida pela catalase. Muitas evidências sugerem que é desencadeada pelo mecanismo celular oxidativo, já que os agentes que a promovem são oxidantes ou estimulantes deste mecanismo (DU, CLEMETSON, 2002). O peróxido de hidrogênio e outros radicais livres de oxigênio promovem a peroxidação de ácidos graxos insaturados das membranas celulares, numa reação autocatalítica em cadeia, desestruturando estas membranas, ou provocam oxidação de resíduos de aminoácidos das pontes dissulfídricas que unem cadeias protéicas, fragmentando as proteínas celulares (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005), ambos levando à morte celular.

O peróxido de hidrogênio induz a expressão de Fas em células endoteliais, através de uma proteína tirosina quinase. Fas é uma proteína de membrana da família dos receptores do fator de necrose tumoral e do fator de crescimento neural, mediadores da morte celular, e intermedia a apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio (SUHARA et al., 1998). O H₂O₂ aumenta ainda a atividade da caspase 3, uma cisteína protease, bem reconhecida na indução da morte celular (DIPIETRANTONIO et al., 1999), fato que embora não esteja diretamente relacionado com a atividade das LAAOs, reforça o envolvimento do H₂O₂ no mecanismo da apoptose.

Dentre outros efeitos biológicos, Ali et al., 2000, estudando as LAAOs com o modelo da pata de rato, observou a formação de edema pronunciado após uma hora da injeção de LAAO do veneno da *E. macmahoni*. A hemorragia é um resultado final de uma série de eventos cujo principal elemento parece ser a apoptose das células endoteliais (DU, CLEMETSON, 2002). O edema pode ser decorrente da atividade do peróxido de hidrogênio na estimulação da óxido nítrico sintetase e liberação do óxido nítrico pelo endotélio (MITTAL, 1993).

O efeito bactericida foi primeiro determinado com a LAAO da *Crotalus adamanteus* (SKARNES, 1970), com posterior demonstração de eficácia sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas a partir do veneno da *Pseudechis australis* (STILES et al., 1991). Tempone et al. (2001) observaram a LAAO do veneno da *B. moojeni* matava a forma promastigota de *Leishmania* spp. *in vitro*, e possuía efeito terapêutico em pacientes infectados, bem como eliminava outros parasitas intracelulares, e novamente o peróxido de hidrogênio parece ter um papel chave, visto que esta ação também foi inibida pela catalase (SKARNES, 1970; STILES et al., 1991; TEMPONE et al., 2001).

Algumas LAAOs apresentam similaridade com uma proteína induzida pela interleucina 4 (CHU; PAUL, 1997), com adesinas como a proteína de adesão vascular (VAP-1) induzida pela inflamação, com aminooxidases séricas bovinas (SALMI; JALKANEN, 2001), e com proteínas indutoras de apoptose em peixes infectados por nematóides (PIA), que impedem a infecção (JUNG et al., 2000). Todas têm sítio de ligação com flavina adenina dinucleotídio (FAD) similares e são capazes de produzir H₂O₂. Como as LAAOs humanas estão envolvidas na inflamação, é possível que as LAAOs dos venenos das serpentes estejam relacionadas com a inflamação que se desenvolve após a agressão e inoculação do veneno (DU; CLEMETSON, 2002).

1.4.4 Atividade trombina símile dos venenos *Bothrops*

Uma das estratégias para a captura da presa das serpentes do gênero *Bothrops* é causar imobilização através de hipotensão e hemorragia (AIRD, 2002). A cascata da coagulação sanguínea é ativada por uma variedade de enzimas proteolíticas, glicoproteínas, dos venenos das serpentes, com mecanismo de ação

semelhante ao da trombina. São serinoproteases capazes de atuar, em mamíferos, de modo semelhante à trombina, sobre o fibrinogênio, gerando monômeros de fibrina (MEIER; STOCKER 1991; ZHANG et al., 1998; CASTRO et al 2004; MITCHELL, 2005; KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; KAMIGUTI et al., 1986). Várias enzimas com estas características foram descritas numa mesma espécie ou em espécies e mesmo gêneros diferentes. Seus genes pertencem à família das tripsinas/cininas, guardando similaridade com os genes das tripsinas, quimiotripsinas, e cininas de mamíferos.

Seu efeito na coagulação inclui trombose macrovascular e microvascular, aumento do tempo de protrombina e do tempo parcial de tromboplastina e redução do nível de fibrinogênio. A fração responsável, porém, atua com algumas diferenças em relação à trombina endógena. Não é inativada pela heparina, e não ativando o fator XIII (fator estabilizador da fibrina), tem como consequência a formação de um coágulo mais instável e facilmente removido da circulação, levando rapidamente ao esgotamento da capacidade coagulativa do indivíduo (MITCHELL, 2005). Raras são capazes de ativar esse fator XIII, (*Cerastes cerastes*), como também os fatores V (*Agkistrondon contortrix contortrix*) (KISIEL, 1979; TOKUNAGA et al., 1988), o fator VIII (*Bothrops jararaca* e *B. atrox*) e o fator X (*Cerastes cerastes*) (CASTRO et al, 2004).

Atuam de modo variável sobre o fibrinogênio. Algumas clivam ambas as cadeias A α e B β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeo A e B, mas a maioria cliva apenas uma delas, A ou B formando um complexo de fibrina facilmente degradável pela plasmina (SEEGERS; OUYANG, 1979; RUSSEL, 1983). A trombina age sempre nos dois tipos, A α e B β . A PA-Bj, da *Bothrops jararaca* não hidrolisa o fibrinogênio, mas sim outros substratos peptídicos contendo arginina ou lisina (SERRANO et al. 1995). As plaquetas são também ativadas, pelos fragmentos da fibrina degradada ou pela própria trombina símile (MITCHELL, 2005), e produzem tromboxane A₂, que promove agregação e ativação de mais plaquetas. Com a falta de ativação do fator XIII, o coágulo instável é rapidamente digerido pelo sistema fibrinolítico, retroalimentado por produtos de degradação da fibrina, levando à persistente formação de microtrombos e sua destruição. O resultado final é um quadro de coagulação intravascular disseminada, levando a coagulopatia por consumo do fibrinogênio (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; NIEWIAROWSKI et al.,

1979; WHITE, 2003). Os microtrombos se formam nos capilares renais, juntamente com a redução do fluxo renal, decorrente de vasoplegia e hipovolemia por hemorragia local, provocadas pelo veneno botrópico, contribuem para a insuficiência renal aguda e o choque hipovolêmico (MITCHELL, 2005).

Até o presente, mais de 30 enzimas com atividade semelhante à trombina tiveram sua estrutura primária conhecida, com sítio ativo mantendo uma seqüência altamente conservada (histidina 57, ácido aspártico 102, serina 195). O carboidrato da molécula pode variar em quantidade (0 a 30%) e em qualidade, sendo encontrados fucose, monose, hexose, galactose, dentre outros, e parece mais importante para estabilizar a proteína do que para seu efeito catalítico. Baseados na sua estrutura secundária e susceptibilidade aos inibidores clássicos de serinoproteases, estudos reconheceram sua relação evolutiva com a tripsina, quimiotripsina e calicreína de mamíferos, estando incluída na mesma família (CASTRO et al., 2004). Elas podem afetar muitos pontos da coagulação, desde a ativação dos fatores plasmáticos como a proteína C (KISIEL et al., 1987), a ativação da via alternativa do complemento (TAMBOURGI et al., 1994; YAMAMOTO et al., 2002) e da indução da agregação plaquetária (SANTOS, et al, 2000; TENG; KO, 1998). Os inibidores comuns da formação de trombina, como a heparina, não são capazes de inibir a maioria destas serinoproteases das serpentes, embora uma pequena parcela sofra a inibição da heparina e da antitrombina III. Como a trombina, também são insensíveis aos inibidores clássicos da tripsina, como a α 1-antitripsina (CASTRO et al., 2004).

Este componente de atividade trombina símile tem sido bem estudado com vistas ao entendimento de seu mecanismo de ação, para possível aplicação nas alterações de coagulação (RIZZA; CHAN; HENDERSON, 1965; HOWIE; PRENTICE; McNICOL, 1973; CHAN, 1969; CASTRO et al., 2004).

Estudos sobre os efeitos de outros componentes da família trombina símile, revelaram atividade na liberação de cininas, levando a um efeito hipotensor (MATSUI et al., 2000; KOMORI; NIKAI, 1997; MARKLAND, et al., 1982). Geralmente a cinina liberada a partir do cininogênio plasmático, pelas frações de veneno com atividade semelhante à trombina, é a bradiginina (PETRETSKI et al., 2000; KOMORI et al., 2001; SERRANO et al., 1998). A elegaxobina II do veneno da *Trimeresurus elegans* é única no sentido de ser capaz de liberar Lisil-bradiginina, como as

calicreínas teciduais. É bem conhecida a presença de calicreína em tecidos tais como o pâncreas, as glândulas salivares, a pele e o cólon, capaz de provocar a proteólise do cininogênio gerando lisil-bradicinina (RANG et al., 2004).

1.4.5 Atividade fosfolipásica A₂ dos venenos *Bothrops*

As fosfolipases A₂ compõem uma superfamília de enzimas definidas por sua habilidade de catalisar a hidrólise do éster ligado à posição central (sn-2) de glicerofosfolípidios de membrana celulares, liberando precursores de mediadores químicos relacionadas ao processo inflamatório. Foram descritas cerca de 19 enzimas com atividade fosfolipase em mamíferos, encontradas sob duas formas; intracelular, ou citosólica, e extracelular ou secretória (RANG et al., 2004).

A forma secretória compreende 10 isoenzimas de baixo peso molecular, dependentes de cálcio para atuação e implicadas em processos biológicos como a geração de eicosanóides, na inflamação e defesa do hospedeiro (KUDO; MURAKAMI, 2002). No processo fisiopatológico natural, a forma citosólica, é a principal implicada na liberação do ácido araquidônico (eicosatetraenóico) e, portanto, dos eicosanóides (prostaglandinas, tromboxano A₂ s, leucotrienos e lipoxinas), como também da lisogliceril-fosforilcolina, o precursor de outro mediador inflamatório, o fator de ativação plaquetária (PAF) (RANG et al., 2004). Uma cicloxigenase de ácidos graxos (COX) agindo em seguida à liberação do ácido araquidônico vai metaboliza-lo a prostanóides (prostaglandinas e Tromboxane A₂) e uma lipoxigenase dará origem aos leucotrienos e lipoxinas. O fator de ativação plaquetária (PAF) é originado de um fosfolípido, lisogliceril-fosforilcolina, que após sofrer a ação da fosfolipase A₂ é acetilado pela acetiltransferase (RANG et al., 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Compreende três enzimas, das quais a cPLA₂α é a mais implicada no mecanismo do ácido araquidônico, e com ativação finamente regulada pelo cálcio e fosforilação. A fosfolipase independente de cálcio iPLA2 compreende uma família de duas enzimas que participam do remodelamento dos fosfolípidios. A família da acetilhidrolase do fator de ativação plaquetária, PAR-AH, consiste de quatro enzimas cujo substrato específico são o PAF e fosfolípidios oxidados, os quais degrada para inibir o processo inflamatório (KUDO; MURAKAMI, 2002).

Foram classificadas segundo quatro critérios; a) a capacidade de catalisar a hidrólise do éster do substrato fosfolipídico; b) a seqüência completa de aminoácidos; c) a homologia de seqüências; d) a variação no segmento cataliticamente ativo (SIX; DENNIS, 2000).

Na classificação geral das enzimas fosfolipases, as miotoxinas dos venenos das serpentes foram as primeiras identificadas e estão incluídas principalmente no grupo IIA de Six e Dennis (KUDO; MURAKAMI, 2002). Em um mesmo veneno são encontradas uma variedade de PLA₂ que podem possuir atividade neurotóxica, citotóxica, cardiotóxica, miotóxica hipotensiva, proinflamatória, coagulantes ou agregantes de plaquetas, com características moleculares de estrutura quaternária monomérica ou multiméricas, homo ou heterodiméricas, ligadas por pontes dissulfídicas, tóxicos e não tóxicos, cataliticamente ativos ou não. Todas são dependentes de cálcio para atuar e os resíduos da alça de ligação ao cálcio são particularmente conservados.

As miotoxinas fosfolipases A₂, foram separadas conforme presença de atividade neurotóxica ou não (MEBS; OWNBY, 1990). Elas mantêm uma homologia estrutural que se mantém constante dentro de cada grupo. Dentre estas últimas existe uma clara distinção entre as que contêm um ácido aspártico na posição 49, "Asp49", e as com um resíduo de lisina nesta posição "Lys49" (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003). Um quarto grupo foi constituído pelas toxinas que indiretamente lesam os músculos, como as causadoras de hemorragia, que pela estase provocariam isquemia e necrose secundária (GUTIÉRREZ; CERDAS, 1984).

Aquelas fosfolipases neurotóxicas são comumente encontradas nos venenos elapídicos, sendo as responsáveis pelo seu efeito letal, agindo em doses muito baixas (baixa DL50) na junção neuromuscular, com atividade pre-sináptica (ROSEMBERG, 1990), podendo causar lesão muscular esquelética em doses mais baixas ainda, de 1-2µg (HARRIS; JOHNSON; KARLSSON, 1975). São também encontradas em venenos crotálicos, como a crotoxina, de serpentes sul americanas, (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; SALVINI et al., 2001), e em venenos de algumas serpentes botrópicas sendo encontrada no veneno da *B. insularis*. (COGO et al., 1998).

As miotoxinas fosfolipases A₂ não neurotóxicas são muito mais comuns em venenos crotálicos e botrópicos, onde também são mais abundantes, agindo em

doses maiores (alta DL50), (GUTIÉRREZ et al., 1986b; ROSEMBERG, 1990; SOARES, et al., 2000a; SOARES et al., 2001), e tendo menor participação na mortalidade direta destes venenos (LOMONTE; GUTIÉRREZ; MATA, 1985). Seu potencial mionecrótico também é mais fraco que aquelas PLA₂ com ação neurotóxica, embora, por serem encontradas em maiores quantidades nestes venenos tenham uma participação central na lesão e destruição tissular, causando mionecrose em doses de 25-100µg (LOMONTE et al., 1987, LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003; MOURA-DA-SILVA et al., 1991; MELO; OWNBY, 1999; TRENTO et al., 2001).

Estruturalmente são constituídas por 125 resíduos de aminoácidos, unidos por seis pontes dissulfídricas e contêm uma extensão C-terminal com cinco a sete resíduos. Dentre estas fosfolipases são reconhecidos três tipos diferentes; a) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49, que catalisa a hidrólise do éster ligado à posição *sn*-2 do glicerofosfolipídio (Asp49); b) as variantes, também denominadas proteínas semelhantes a PLA₂ (PLA₂ símile) por serem estruturalmente semelhantes, mas destituídas de atividade enzimática, contendo lisina em substituição ao ácido aspártico, (Lys49), (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003); c) variantes com serina ocupando a posição 49, (Ser49), (KRIZAJ et al., 1991; POLGÁR et al., 1996), as duas últimas enzimaticamente inativas (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003). Lee et al. (2001) propõem que as características estruturais destas impedem a liberação do ácido graxo produzido após a hidrólise inicial do fosfolipídio, interrompendo o ciclo catalítico. Seu efeito mionecrótico transcorre por uma via catalítica independente da atividade enzimática, sendo acompanhado, *in vivo*, por edema, hiperalgesia, liberação de citocinas proinflamatórias como interleucina 6 (IL 6), além de atividade letal quando injetada por via endovenosa ou intraperitoneal em camundongos (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

In vitro as fosfolipases A₂ apresentam efeitos na placa neuromuscular principalmente aquelas Lys49 de vários venenos, mas também a Asp49 no veneno da *Bothrops insularis* (COGO et al., 1998), atividade citolítica que se expressa pela ruptura de lipossomos compostos de fosfolipídios carregados negativamente (SOARES et al., 2000b), promoção da degranulação de mastócitos com conseqüente aumento da permeabilidade vascular e formação de edema

(LANDUCCI, et al., 1998), além de provocarem lesão renal em sistema de rim isolado de rato (BARBOSA et al., 2002).

Recentemente Barbosa et al. (2005) comprovaram atividade bactericida em miotoxinas fosfolipase A₂, Asp49 e Lys49, do veneno da *Bothrops jararacussu*. A Asp49 demonstrou atividade enzimática e destruiu a membrana e a parede celular do microorganismo *Xanthomonas axonopodis*, induzindo desorganização e perda de elementos citoplasmáticos, quando examinados por microscopia eletrônica.

A despeito de inúmeras pesquisas, as bases moleculares para a seletividade e especificidade farmacológica das PLA₂, não estão ainda claras. Basicamente o seu alvo primário está localizado no exterior da célula, e seu mecanismo de ação parece envolver três mecanismos. Em primeiro lugar sua atividade catalítica intrínseca que pode liberar ácidos graxos e lisofosfolipídios ativos com potente ação biológica. Em segundo lugar a ligação interfacial com as camadas lipídicas das membranas celulares, com ou sem hidrólise de fosfolipídios, podendo afetar as funções celulares ou integridade das membranas destas células. Finalmente a ligação a proteínas específicas nas superfícies celulares, que atuam como receptores ligados à membrana, já havendo sido identificados receptores específicos para fosfolipases A₂ de cadeia única. Nas células neurais de ratos os do tipo N, e tipo N símile, em células pulmonares, hepáticas, cardíacas e renais. Estes receptores se ligam com elevada afinidade a PLA₂ neurotóxicas. Em células musculares esqueléticas de coelhos foram observados receptores do tipo M, e do tipo M símile também em células pulmonares, hepáticas, cardíacas e renais. Estes últimos ligando-se principalmente a PLA₂ não tóxicas (VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

São receptores pertencentes à superfamília das lectinas do tipo C, que guardam pouca identidade nos resíduos de aminoácidos mas mantém uma região extracelular N-terminal rica em cisteína que se assemelha ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da fibronectina. Esta região, CRD, é zona de ligação da fosfolipase A₂ ao receptor, que se liga também à região de ligação ao cálcio, e com isto tem inibida sua atividade catalítica mas tem atividade endocitária e internaliza a fosfolipase (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A fosfolipase A₂ fracionada do veneno da *Bothrops insularis*, tem sua atividade tóxica essencialmente dependente de sua ação enzimática. Inicialmente produz contração muscular que se segue a uma inibição da transmissão neuromuscular. Este último efeito parece

resultar de alterações na cinética dos canais de potássio pré e pós sinápticos (COGO et al., 1998).

Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as fosfolipases A₂ desestabilizam os fosfolipídios das membranas celulares e induzem lesão da membrana celular e induzem lesão da membrana celular, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis culminantes com a morte celular (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

1.4.6 O papel das metaloproteinases dos venenos *Bothrops*

No homem, as metaloproteinases participam do remodelamento do tecido conectivo no processo de cicatrização das feridas (MITCHELL, 2005). Nos venenos das serpentes além de lesarem as células endoteliais, contribuindo para a hemorragia local ou sistêmica (RUIZ DE TORRENT et al., 1999), facilitam a disseminação do veneno a partir do local da injeção (ANAI et al., 2002), onde contribuem com a mionecrose, a dermonecrose, a formação de bolhas e a inflamação (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Ao destruir a membrana basal, expõem a matriz extracelular ao plasma, ativando secundariamente a cascata da coagulação e liberando mediadores químicos da inflamação (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). São decorrentes desta atividade muitas hemorragias sistêmicas, as vezes no sistema nervoso central (BARRAVIEIRA, 1997), coagulação, defibrinogenação, e inibição da agregação plaquetária (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996a) que provocam a morte de pacientes.

Estruturalmente, as metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) estão intimamente relacionadas às proteínas de mamíferos, desintegrinas e metaloproteinases envolvidas na ativação e comunicação celular (ADAMs), e com as metaloproteinases da matriz (MMPs) (RUCAVADO; ESCALANTE; GUTIÉRREZ, 2004). Pertencem à superfamília de metzincinas, encontradas também em crustáceos e bactérias, assim classificadas por conterem sítios idênticos de ligação com o zinco e uma conformação que determina uma base hidrofóbica para o íon zinco (BODE; GOMIS-RUTH; STOCKLER, 1993). São formadas a partir de precursores multidomínios que possuem um domínio catalítico e um domínio rico em

cisteína semelhante à desintegrina, guardando o domínio catalítico similaridade estrutural e funcional com o domínio das metaloproteinases da matriz (MMPs). Este mantém todos os resíduos de ligação com o zinco e constantes estruturais envolvidas em catálise. Ao contrário, o domínio rico em cisteína semelhante a desintegrina é encontrado nas ADAMs e substitui um domínio hemopexina C, muito encontrado nas MMPs secretadas (TANJONI et al., 2003).

A especificidade de substrato das metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) é muito semelhante ao das metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal da microvasculatura (TANJONI et al., 2003), a qual, quando rompida deixa extravasar sangue, constituindo o mecanismo fisiopatológico da hemorragia provocada pelas SVMPs (GUTIERREZ; RUICAVADO, 2000). A atividade catalítica das metaloproteinases envolvidas na ativação e comunicação celular (ADAMs) e das SVMPs está relacionada ao revestimento celular e, portanto, à comunicação entre as células e sua ativação (MOURA-DA –SILVA et al., 1996).

Uma das SVMPs bem estudada, a jararhagina, isolada do veneno da *B. jararaca*, é um dos principais componentes responsáveis pela hemorragia. Além de degradar a matriz extracelular também atua em proteínas plasmáticas da coagulação, importantes para a hemostasia (KAMIGUTI et al., 1996b). Seu domínio semelhante a desintegrina rico em cisteína, é capaz de antagonizar a ativação plaquetária induzida pelo colágeno (USAMI et al., 1994). Aparentemente os dois domínios agem sinergicamente inibindo a agregação plaquetária e destruindo a matriz extracelular, agravando a hemorragia (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996a).

1.5 O Veneno da *Bothrops insularis*

A serpente *Bothrops insularis* (Figura 3) é endêmica exclusivamente da Ilha da Queimada Grande situada a 30 km da costa sul do Estado de São Paulo, vizinha de Itanhaém e Peruíbe, recoberta em quase a totalidade de seus 430 mil metros quadrados por mata atlântica. Foi descrita em 1921 pelo herpetólogo Afrânio do Amaral (1894-1982), do Instituto Butantan. Diferenciou-se da *Bothrops jararaca* pelo processo conhecido como especiação alopática, que decorre da existência de uma barreira geográfica. Estima-se que o nível do mar variou no período Quaternário,

criando passagens para a ilha a partir do continente, há cerca de 11 mil anos, com o isolamento e a falta de predadores produzindo uma das maiores densidades populacionais de serpentes no mundo, com cerca de 2 a 4 mil indivíduos (MARQUES; MARTINS; SAZINA, 2002).



FIGURA 3: *Bothrops insularis* com sua cor amarelada.

Fonte: <http://www.bioterium.com.br>

O veneno da *Bothrops insularis* (Jararaca-Ilhoa), apresenta características semelhantes aos das outras serpentes do seu gênero com uma potência quatorze vezes maior (MEBS, 1970; INSTITUTO BUTANTAN, 1996). Atua com uma dose letal menor em aves que em mamíferos, com DL50 de 0,50 mg/kg em pintos e DL50 de 3,73 mg/kg em camundongos (COGO et al., 1993). As Jararaca-Ilhoas estão restritas à Ilha Queimada Grande e não entram na água salgada. Os indivíduos adultos têm hábitos diurnos, que não é comum nas jararacas em geral, e são arborícolas (Figura 4). Alimentam-se principalmente de aves migratórias como o sabiá-uma (*Platycichla favipes*), o tuque (*Elaenia mesoleuca*) e a coleirinha (*Sporophila caerulescens*), já que as aves residentes parecem ter aprendido a evitar seu ataque. Quando ocorre o bote ela costuma manter a ave capturada retida na boca, até a morte desta, para impedir sua fuga. Eventualmente come anfíbios, lagartos e a outra serpente endêmica da ilha conhecida como dormideira (*Dipsas albifrons*). Não há mamíferos terrestres na ilha e os únicos presentes são duas espécies de morcegos (*Nyctinomops laticaudatus* e *N. macrotis*).



FIGURA 4: *Bothrops insularis*, arborícola e diurna.

Fonte: <http://eco.ib.usp.br>

Seu veneno possui atividade coagulante, fibrinolítica (MEBS, 1970), atividade caseinolítica baixa, fosfolipase e esterase semelhante à trombina (LÔBO-ARAÚJO et al. apud COGO et al., 1993; SELISTRE; GIGLIO, 1987; SELISTRE et al., 1990), e potenciadora da bradicinina (CINTRA; VIEIRA; GIGLIO, 1990). Provoca em músculos de aves e mamíferos acentuada necrose, alterações vasculares e hemorragias, além de agir na placa neuromuscular (COGO et al., 1998), provocando perda do equilíbrio, paralisia e convulsões (COGO; RODRIGUES-SIMIONE; PRADO-FRANCISCHETTI, 1990).

Selistre e Giglio, (1987), isolaram deste veneno uma enzima com atividade semelhante à trombina (I-SII-R), com peso molecular de 45.000, composta de açúcar em 22% e o restante de aminoácidos, de pH 7,4. É relativamente estável frente à trombina a 45°C e 60°C, em pH 7,4. Ambas hidrolisam as cadeias α e β do fibrinogênio. É inibida pela heparina em títulos maiores que a trombina e, ao contrário desta, não ativa o fator XIII da coagulação.

Foram isoladas cinco toxinas com características mionecróticas, hemorrágicas e indutoras de edema (SELISTRE et al., 1990). Duas frações ativas foram purificadas por homogeneidade; a) SIII-SpI de peso molecular de cerca 32.000 Da, com resíduo de Valina na porção N-terminal, mostrava atividade esterase, indutora de edema e contrátil em músculo liso; b) SIII-SpVI, uma fosfolipase mionecrótica e indutora de edema, de peso molecular de cerca 29.000 Da, com resíduo de aminoácido pyro-Glu (pyroglutamato) na porção N-terminal,

consistindo de duas cadeias de peso molecular de aproximadamente 15.000 Da ligadas por pontes dissulfídicas, com capacidade indutora de edema inibida pela dexametasona, mas não por indometacina. Outras três frações altamente purificadas eram heterodímeros hemorrágicos, SIII-SpIII-3, SIII-SpIII-4 e SIII-SpIII-5, de peso molecular de 26.000, 29.000 e 26.000 Da e contendo na porção N-terminal resíduos de Asx (Glutamina/Ácido Glutâmico), Asx e Glicina, respectivamente, todas elas aumentando o tempo de recalcificação do plasma citratado de rato. Nenhuma das cinco demonstrou ação proteolítica na caseína ou cininogênica. A hemorragia, quando sistêmica, decorre do consumo de fibrinogênio.

A ação neurotóxica é acentuada na espécie *Bothrops insularis* (ZAMUNER; PRADO-FRANCISCHETTI; RODRIGUES-SIMIONE, 1996), sendo mais potente em aves que em camundongos (COGO, et al., 1993). Uma fosfolipase A₂ (PLA₂), de atividade caracteristicamente pre-sináptica, pois não afeta a resposta a acetilcolina ou ao potássio em experimentos “in vitro” com junções neuromusculares, é a maior responsável pela atividade paralisante do veneno (COGO, et al., 1998; RODRIGUES-SIMIONI et al., 2004). Desenvolveu-se, provavelmente, a partir de sua necessidade adaptativa. De existência limitada à ilha da Queimada Grande (Figura 5) que é povoada exclusivamente por aves, havia a necessidade de imobilizar a presa imediatamente para evitar sua fuga, não sendo este efeito paralisante uma atividade marcante nos venenos de outras espécies de *Bothrops* (COGO, et al., 1998; INSTITUTO BUTANTAN, 1966).

Cintra et al. (1990) descreveram peptídios potenciadores da bradicinina (PPB) que reforçavam sua atividade contrátil no íleo isolado de preá, e a atividade hipotensiva em ratos anestesiados, oito dos quais continham resíduos de aminoácidos na posição 3-13 com seqüência e estrutura primária demonstrando marcante homologia com PPBs de outros venenos.

Outras frações tipicamente encontradas em venenos do gênero *Bothrops* já foram isoladas do veneno da espécie *Bothrops insularis*. Guimarães-Gomes et al. (2004) isolaram uma lectina do tipo C deste veneno, sem contudo, caracterizar sua atividade biológica.



FIGURA 5: Ilha da queimada grande.

Fonte: <http://www.markoshea.tv>

Não se tem registro ainda, na literatura, do isolamento de frações com atividade L-aminoácido oxidase no veneno da *Bothrops insularis*, embora estejam presentes em venenos de outras espécies do seu gênero, como a *Bothrops moojeni* (TEMPONE et al., 2001), *Bothrops alternatus* (STABELI et al., 2004) e *Bothrops asper* (UMANA, 1982).

Mais recentemente Junqueira-de-Azevêdo et al. (2001) observaram a expressão de um gen em *Bothrops insularis* semelhante ao existente em vertebrados, responsável pela produção do fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) presente no seu veneno (sVEGF), responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, que acomete os primeiros estágios da lesão.

O veneno e suas frações atuam de forma mais agressiva em rins de aves que em mamíferos, em conformidade com as características alimentares da espécie, com dieta praticamente exclusiva de aves, fato que o torna mais específico para este tipo de presa. Ainda que estes efeitos não estejam bem esclarecidos em sua fisiopatologia, é provável que decorram de um mecanismo citotóxico direto potencializado por distúrbios relacionados à isquemia na hemodinâmica regional (DA CRUZ HOFLING et al., 2001).

Sua atividade nefrotóxica foi testada em pintos vivos com idade entre 5 e 12 dias, utilizando-se o veneno (20-80µg/mL) completo e a fração PLA₂ (10-40µg/mL), que eram injetados no músculo peitoral na quantidade de 0,1 mL. Observou-se, após 3 e 24 horas, que embora a ação do primeiro seja mais extensa, a fração PLA₂ determinava necrose tubular aguda mais acentuada, principalmente nos túbulos contornados proximais, onde se encontrava dilatação do espaço intercelular com

eventual descamação celular, vacuolização e contorno irregular da borda em escova. Havia acentuação da atividade endocitária, com vacúolos de conteúdo variado. Os glomérulos estavam freqüentemente congestionados e os podócitos com cisternas alargadas no retículo endotelial rugoso. Nos casos examinados em 24 horas em que se observava degeneração aguda, a barreira de filtração estava completamente destruída. O parênquima cortical estava mais afetado que o medular, se observando graus variáveis de alterações degenerativas ao longo de diferentes segmentos do néfron de um mesmo animal (D'ABREU, 1996; DA CRUZ HOFLING et al., 2001).

Vários trabalhos têm avaliado a capacidade mionecrotizante dos venenos de serpentes e suas frações. Alguns realizados *in vivo* incluem parâmetros bioquímicos voltados para os efeitos gerais, avaliando lesão celular através da creatinoquinase plasmática (CPK) (GUTIÉRREZ; LOMONTE; CERDAS, 1986a; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; SOARES et al., 2002). Outros são voltados para os efeitos locais secundários à mionecrose como o edema, avaliado pela técnica da pata do rato (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; SOARES et al., 2002), a hiperalgesia (CHACUR et al., 2003), a liberação de citocinas próinflamatórias como a interleucina 6 (IL6) (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993).

Também tem sido estudada a capacidade letal pela administração, *in vivo*, intraperitoneal ou intravenosa do veneno, já que a potência agressiva das miotoxinas PLA₂ não neurotóxica é muito baixa (GUTIÉRREZ et al., 1986b; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). O aspecto anatomopatológico foi observado inicialmente na tentativa de se estabelecer parâmetros comparativos do potencial necrotizante dos venenos completos (VILLARROEL et al., 1978/79 a,b,c, d; HARRIS; JOHNSON; KARLSSON, 1975).

Outros trabalhos procuram observar as respostas à ação do veneno e suas frações, seja através de técnicas histopatológicas e ultraestruturais (GUTIÉRREZ; LOMONTE; CERDAS, 1986a; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; HARRIS; CULLEN, 1990; TOYAMA et al., 1998; MELO; OWNBY, 1999), seja com microscopia intravital (LOMONTE et al., 1994).

Em relação à *Bothrops insularis*, alguns trabalhos foram realizados no sentido de se avaliar a mionecrose com o edema associado e letalidade de seu veneno e frações (SELISTRE; GIGLIO, 1987; SELISTRE et al., 1990; BARBOSA et al., 2003).

Outras observações referem-se principalmente a órgãos específicos como o rim, e o fígado de aves, que compõem sua alimentação básica (PARONETTO, 1996; DA CRUZ HOFLING et al., 2001), e muita atenção tem sido dada à atividade pre-sináptica de frações PLA₂ em estudos in vitro, fato que reflete a maior toxicidade deste veneno possuindo uma PLA₂ com atividade neurotóxica (COGO et al., 1998).

Como a insuficiência renal é uma das principais causas de morte nos acidentes ofídicos, são de fundamental importância as ações do veneno, sejam elas localizadas primariamente no rim ou generalizadas no organismo levando secundariamente ao sofrimento renal, tais como a rhabdomiólise ou a desidratação e a isquemia renal consequente.

1.6 Complicações dos Acidentes Ofídicos

Localmente os venenos botrópicos provocam edema hemorragia e inflamação, podendo levar ao quadro de síndrome compartimental no membro afetado (BRASIL, 2001).

Dentre as complicações sistêmicas, que surgem em 24 a 48 horas, o choque pode decorrer de hipovolemia devida à hemorragia e retenção de líquidos no membro afetado, da ativação de mediadores químicos da inflamação de atividade hipotensora, tais como prostaglandina, serotonina, histamina (WEN apud MENDES, 1995), bradicinina e os inibidores de sua inativação (FERREIRA; ROCHA-E-SILVA, 1965), de insuficiência respiratória devida a edema pulmonar e da coagulação intravascular disseminada pela alteração de parâmetros de homeostase sanguínea (BARRAVIEIRA, 1997). Os mediadores inflamatórios podem determinar sintomas gerais da fase aguda da inflamação, que são inespecíficos, tais como cefaléia, febre, vômitos ou diarreia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A insuficiência renal aguda, complicação mais comum nos acidentes ofídicos que vão a óbito em alguns serviços (RIBEIRO et al., 1998; SITPRIJA; CHAIYABUTR, 1999), pode ocorrer secundariamente ao choque (MITCHELL, 2005), ou por ação nefrotóxica direta do veneno (BOER-LIMA; GONTIJO, CRUZ-HÖFLING, 1999). Sua etiopatogenia, entretanto, não está bem definida, parecendo ser multifatorial (NANCY et al., 1991). Em relação ao acidente botrópico, os sintomas parecem decorrer, além da ação direta do veneno, de efeitos aditivos ou sinérgicos

das diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos com a liberação de substâncias vasoativas no rim (FERREIRA et al., 1992), de coagulação intravascular disseminada e da formação de microtrombos determinando isquemia renal (AMARAL et al., 1986). São agravados por alterações sistêmicas conseqüentes ao sangramento e hemólise, como a hipotensão e o colapso circulatório provocando isquemia (SOE-SOE; THAN-THAN; KHIN-EI-HAN, 1990). Foi identificado um peptídeo natriurético tipo C no veneno da *B. jararaca* que poderia agravar a desidratação (MURAYAMA et al., 1997).

Do ponto de vista anatomopatológico a lesão mais freqüente é a necrose tubular aguda (AMARAL et al., 1985), como a observada em acidentes crotálicos (AMORIM; MELO, 1954), mais acentuada no córtex renal (D'ABREU, 1996; DA-CRUZ-HOFLING et al., 2001; DATE; SHASTRY, 1981) sendo referida por alguns autores a ocorrência também de alterações glomerulares (RESENDE, 1989).

Aung-khin (1978) estudou a injeção letal do veneno da *Vipera russelli* em animais e em pacientes acidentados. Seu veneno tem potentes efeitos coagulantes e hematológicos, semelhantes ao da *Bothrops*. Observou alterações nos rins que eram mais marcantes naqueles que sobreviviam pelo menos 16 horas. Consistiam principalmente em hemorragia, deposição intraglomerular de fibrina e seus produtos de degradação coagulados, que, obstruindo os capilares levava à redução do fluxo sanguíneo nos glomérulos renais. A isquemia resultava em necrose tubular e subseqüente falência renal. A luz capilar glomerular estava congesta contendo polimorfonucleares e células que lembravam mastócitos. O tufo glomerular parecia sólido e preenchia o espaço de Bowman, onde era visível hemorragia, contendo células mesangiais edemaciadas com aumento da matriz. Nos mortos com em menos tempo as alterações surgiam apenas nos túbulos com vacuolização das células de revestimento, degeneração hialina e dilatação dos túbulos contornados proximais.

Após 24 horas aparecia típica necrose tubular, com túbulos dilatados revestidos por células achatadas e descamadas na luz, expondo a membrana basal em alguns pontos. Em alguns túbulos distais e canais coletores eram vistos restos celulares granulares hialinos, hemácias degeneradas e células de revestimento descamadas. No interstício renal havia hemorragia focal na cortical e difusa na medular, comprimindo e obstruindo os túbulos, com infiltrado mononuclear contendo

eosinófilos e mastócitos em meio a edema. Na microscopia eletrônica observou que muitas alças capilares glomerulares estavam ocluídas por trombos e fibrina, e a luz continha hemácias, leucócitos e abundante material granular, plaquetas degranuladas ou desintegradas com perda das organelas internas como mitocôndrias, vacúolos ligados à membrana e grânulos, que eram visíveis envoltas em fibrina amorfa e fibrilar. O espaço de Bowman era às vezes preenchido por fibrina, mas a membrana basal das alças capilares estava intacta. Nos que sobreviveram até quatro dias ainda se observava debris plaquetários envoltos em fibrina, e fusão de processos podais das células epiteliais nas regiões adjacentes aos trombos. Havia edema citoplasmático no endotélio com aumento da densidade eletrônica e perda dos detalhes estruturais, com descamação em muitos pontos, expondo a membrana basal interna. No mesangio as células estavam vacuoladas e degeneradas em matriz rarefeita contendo massas de fibrina (AUNG-KHIN, 1978).

Observações histopatológicas renais mais recentes, relativas à *Bothrops moojeni*, constataram picnose com condensação da cromatina, nos núcleos de células de vários túbulos proximais, descontinuidade da borda em escova, vacuolização citoplasmática e, em alguns túbulos, degeneração e descamação de células necróticas, sendo sugerido que essas alterações teriam sido provocadas pela atividade proteolítica de fosfolipases A₂ (PLA₂) do veneno (BOER-LIMA; GONTIJO; CRUZ-HÖFLING, 1999). Foi identificado um peptídeo natriurético tipo C no veneno da *B. jararaca* (MURAYAMA et al., 1997), e recentemente outros peptídeos natriuréticos têm sido descritos na literatura (LISY et al., 1999) que poderiam agravar o quadro renal provocando desidratação.

O veneno da *Bothrops jararacussu* tem uma atividade miotóxica muito intensa, sendo a rabdomiólise capaz de determinar mioglobinúria com efeitos deletérios adicionais para o rim (MILANI et al., 1997). A mioglobinúria é uma condição clínica freqüente no envenenamento ofídico e pode ser uma das causas da Insuficiência Renal Aguda (IRA), (ZAGER, 1996). Parece ser proeminente nas primeiras 24 horas após o envenenamento, sendo freqüente no acidente causado por diversas serpentes.

Ponraj e Gopalakrishnakone (1997), estudando a serpente *Pseudechis australis*, observaram que a extensão dos danos musculares causados pela miotoxina determinava a quantidade de mioglobina que penetrava na circulação

renal, preenchendo dos túbulos proximais até os distais, com a estase na luz do túbulo aumentando o contato e a citotoxicidade. A insuficiência renal aguda (IRA) era agravada pelo pH ácido da urina enquanto o alcalino conferia significativa proteção morfológica e funcional, e a desidratação potencializava vasoconstrição e diminuía o ritmo de filtração glomerular. Foi sugerido que a miotoxina da *B. moojeni* penetra na bicamada lipídica da membrana por interação hidrofóbica, causando sua desestabilização com prejuízo na permeabilidade de íons e macromoléculas, ocorrendo influxo de cálcio com alteração do citoesqueleto, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de cálcio (BOER-LIMA; GONTIJO; CRUZ-HÖFLING, 1999).

Outros autores observaram que as células renais, sob o estímulo do veneno de algumas serpentes, poderiam liberar, além de PAF, prostaglandinas, citocinas, frações do complemento, e bradicinina (BARRAVIERA; LOMONTE; TARKOWSKI, 1995), esta última estimulando a liberação de óxido nítrico pelo endotélio o qual provocaria aumento da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) (KOEPPEN; STANTON, 1997).

O PAF promove uma vasoconstrição renal com diminuição do fluxo sanguíneo, reduz a taxa de filtração glomerular, determina a excreção reduzida de sódio pela urina, produz oligúria e retenção hidroeletrólítica apresenta um efeito compensador que é a liberação de prostaglandinas vasodilatadoras no rim (DOUGLAS, 2000).

As prostaglandinas vasodilatadoras renais, PGE_1 , PGE_2 , PGA_1 , PGA_2 , PGH_2 , PGI_2 e PGG_2 , principalmente PGI_2 e PGE_2 , são responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e o Tromboxane A_2 (TXA_2) têm ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI, 2000).

O óxido nítrico (NO) é um gás de radical livre, formado numa reação, catalisada por enzimas, entre o oxigênio molecular e a L-arginina, de forma fisiológica ou em resposta a estímulos patológicos. Neste caso, a enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), atua mesmo com níveis muito baixos de cálcio, estimulada por fatores agressivos tóxicos, por vasodilatadores como a acetilcolina e a bradicinina, e por citocinas como o interferon γ em sinergia com o fator de necrose tumoral (TNF α) e a interleucina 1 (IL-1). O ON é produzido pelas células endoteliais,

agindo como ativador endógeno da guanilato ciclase, resultando na formação do GMP cíclico, um segundo mensageiro que relaxa o músculo liso dos vasos dilatando-os (RANG et al., 2004). Juntamente com a endotelina é um dos principais responsáveis pela lesão glomerular nos processos patológicos renais (MITCHELL, 2005).

A endotelina (ET) é um peptídeos de 21 aminoácidos encontrado em três isoformas, das quais a ET1 e ET2 estão presentes no rim, onde também é envolvida nas alterações hemodinâmicas reativas a fatores agressivos (MITCHELL, 2005). Apresenta uma ação vasoconstritora renal, sendo secretada no compartimento basolateral do endotélio por células mesangiais e tubulares renais. Numerosos estímulos podem modular a transcrição dos genes da endotelina, incluindo substâncias vasoativas, fatores de crescimento citocinas, agonistas de receptores acoplados a proteína G e radicais livres de oxigênio. São estimulantes a própria endotelina, a angiotensina, a trombina, o fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de necrose tumoral, a interleucina 1 e o tromboxano A2, dentre outros. Inibem a transcrição o peptídeos atrial natriurético, a heparina, o inibidor da enzima conversora da angiotensina, a guanidina monofosfato cíclica (cGMP) e a adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Atua principalmente como um mediador autócrino e parácrino, estimulando, entretanto, a liberação de outros hormônios, incluindo a aldosterona, a adrenalina, o peptídeos atrial natriurético, hormônios hipotalâmicos e hipofisários (RANG et al., 2004; SOROKIN; KOHAN, 2003). Tem meia vida curta devido ao limitado estoque celular.

Os receptores da endotelina são membros da família de receptores acoplados à proteína G, cujos tipos A (RET-A) e B (RET-B) e são encontrados nas células endoteliais. Ao serem estimulados são capazes de modular uma variedade de cascatas intracelulares, regulando a produção de cicloxigenases, tirosinoquinases, e óxido nítrico sintetase. Seu mecanismo de ação envolve a ativação de fosfolipase C, e proteinoquinase C. A endotelina pode induzir a formação de fibrina (DOUGLAS, 2001) que, no rim, é uma das conseqüências comuns dos acidentes ofídicos (PONRAJ; GOPALAKRISHNAKONE, 1997; AUNG-KHIN, 1978; BOER-LIMA; GONTIJO; CRUZ-HÖFLING, 1999).

Usando o modelo de rim isolado perfundido de rato, Monteiro e Fonteles, 1999, demonstraram que o veneno da *Bothrops jararaca* provocava nefrotoxicidade

direta. Eles registraram que ele promovia a redução da pressão de perfusão, do fluxo urinário, da taxa de filtração glomerular, e do transporte tubular de sódio e potássio. Propôs o envolvimento do fator de ativação plaquetária (PAF), baseado em observações anteriores de que o rim, no mesmo modelo, era capaz de produzir PAF, além de histamina e serotonina (PIROTZKY et al, 1984).

Havt et al. (2001) utilizando o mesmo modelo observou que este veneno, da *Bothrops jararaca*, também reduzia a pressão de perfusão, a resistência vascular renal e o transporte tubular de sódio e potássio, mas aumentava o fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular. Alguns autores afirmaram que praticamente todas as serpentes possuem fosfolipase A₂ (PLA₂) em seu veneno (BON, 1997).

Homs-Brandeburgo et al. em 1988, quando fracionaram o veneno da *B. jararacussu* registraram a existência de uma fração com atividade PLA₂ da qual isolaram 5 subfrações. Uma delas sem atividade PLA₂ apresentava intensa atividade miotóxica. Nas demais, onde foi detectada atividade enzimática PLA₂, não foi observada atividade miotóxica. Pelo bloqueio com dexametasona, Havt et al. (2001) constataram que os efeitos renais do mesmo veneno, da *B. jararacussu*, não foram alterados pela mesma quantidade desta droga, que bloqueava a atividade PLA₂ do veneno da *Crotalus durissus cascavella* (MARTINS et al., 1998). Concluíram que, ou a atividade PLA₂ foi mais intensa que a capacidade inibitória da dexametasona sobre a PLA₂ (BARNES, 1995), ou os efeitos renais seriam promovidos por uma miotoxina, que não tinha atividade PLA₂. Utilizando triazolobenzodiazepina (WEB 2086), um antagonista do fator de ativação plaquetária (PAF), Havt, et al., (2001) sugeriram que, com o veneno da *Bothrops jararacussu*, o envolvimento do PAF no aumento da Taxa de Filtração Glomerular e no fluxo urinário, independe dos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal.

O veneno da *Bothrops moojeni* altera mais intensamente os parâmetros da função renal que o da *Bothrops jararaca*, produzindo uma diurese intensa, que não é observada na perfusão em rim isolado de rato com o veneno desta última. Barbosa e et al., 2002, fracionaram o veneno da *Bothrops moojeni*, estudando a atividade de fosfolipases A₂ (PLA₂) de duas frações miotóxicas, nos rins, constatando que possuíam atividade enzimática menos intensa que a do veneno completo. Uma delas, principalmente, possuía atividade quase nula nos rins isolados de ratos. Arni e Ward (1996) e Gutiérrez e Lomonte (1997) demonstraram que uma fosfolipases A₂

(PLA₂) com uma região C-terminal rica em Lisina era responsável pela atividade citotóxica de miotoxinas de serpentes *Bothrops*, característica ausente nesta última miotoxina. Entretanto Kini e Iwanaga (1986), comparando seqüências de miotoxinas e fosfolipases de venenos de serpentes, sugeriram que um sítio catiônico associado a uma região hidrofóbica seria responsável pela atividade miotóxica, independente da atividade fosfolipases A₂ (PLA₂), podendo determinar lesão celular pela desorganização da barreira lipídica, afetando em conseqüência, o influxo de cálcio e causando necrose.

1.7 Justificativa

A *Bothrops insularis* é uma espécie de serpente de vida isolada, encontrada somente na ilha da Queimada Grande, localizada a cerca de 30 quilômetros da costa do Estado de São Paulo, no Brasil. Esta restrição geográfica a sujeita a possíveis desastres naturais ou mesmo artificiais, como queimadas e capturas ilegais para o mercado negro de animais. Embora sua densidade populacional seja grande, há sempre o risco de eliminação completa destes animais, fazendo com que seja considerada uma espécie ameaçada de extinção (MARQUES; MARTINS; SAZINA, 2002). Em virtude disso a União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN) a incluiu na categoria “criticamente ameaçada” na edição de 2000 da *Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas* (www.redlist.org).

Diferentemente de outras espécies do gênero *Bothrops*, ela se alimenta principalmente de aves e poucos invertebrados, os limitados alimentos disponíveis no local (DUARTE; PUORTO; FRANCO, 1995). Sua toxinologia é pouco esclarecida se comparada com a de outras *Bothrops*. Seu veneno é cinco vezes mais potente em aves que a jararaca comum (MARQUES; MARTINS; SAZINA, 2002). Dentre os componentes isolados de seu veneno se incluem esterases (SELISTRE et al., 1990), a fosfolipase A₂ (PLA₂) (SELISTRE et al., 1990), proteínas que estimulam o crescimento endotelial vascular (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2001), lectinas (GIUMARÃES-GOMES et al., 2004), e peptídios potenciadores da bradicinina (CINTRA; VIEIRA; GIGLIO, 1990). Mais recentemente foi descrita uma variedade de atividade peptidase em venenos deste gênero, incluindo o da *Bothrops insularis* (GASPARELLO-CLEMENTE et al., 2002). Ele inibe irreversivelmente a transmissão

neuromuscular em camundongos e em pintos, onde a ação é mais eficaz, sendo a atividade enzimática essencial para o efeito neurotóxico (COGO et al., 1998). Fração com atividade L-aminoácido oxidase ainda não foi isolada deste veneno, embora seja bem estabelecida sua presença em outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (TEMPONE et al., 2001; STABELI et al., 2004).

A despeito da importância biológica e toxicológica deste veneno, existem poucos estudos sobre o efeito do veneno e suas frações, se comparados aos venenos de outras espécies do gênero *Bothrops* ou mesmo de outros gêneros da família *Viperidae*, como o *Crotalus*. Mais raros ainda são estudos relativos à atividade biológica de suas frações, especialmente no sistema de rim isolado com responsividade limitada ao leito vascular renal, ou mesmo da atividade vascular do veneno, seja sistêmica, com interferência de todos os fatores comumente liberados em reações generalizadas, ou limitada ao leito mesentérico isolado onde as respostas são imediatas e diretas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade vascular e renal direta aguda, do veneno da *Bothrops insularis* e suas frações estudadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do veneno sobre parâmetros funcionais renais em rato, do veneno e de suas frações, fosfolipase A₂, lectina, trombina símile e L-aminoácido oxidase, liofilizados.
- Avaliar as alterações renais histopatológicas provocadas pelo veneno e suas frações, fosfolipase A₂, lectina, trombina símile e L-aminoácido-oxidase, liofilizados, *in vitro*, em ratos.
- Avaliar as alterações provocadas na pressão arterial de ratos pelo veneno liofilizado.
- Avaliar as alterações histopatológicas provocadas pelo veneno em ratos, no coração, pulmões, rins, fígado, e intestino.
- Avaliar as alterações vasculares diretas provocadas na pressão arterial do leito mesentérico de ratos, pelo veneno.
- Avaliar as alterações histopatológicas provocadas pelo veneno, *in vitro*, no leito vascular mesentérico de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com peso entre 270 e 300g, oriundos do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 24 horas antes do experimento com o fornecimento de água "ad libitum". Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg intraperitoneal. Foram seguidos todos os protocolos éticos de pesquisa em animais.

3.2 Procedimentos com Veneno e Frações de *Bothrops insularis*

O veneno da *Bothrops insularis* foi uma cortesia do Instituto Butantan. Inicialmente o veneno foi liofilizado. As purificações das frações do veneno da *B. insularis* foram realizadas utilizando uma combinação de filtração em gel Sephadex e cromatografia de fase reversa (HPLC) com produtos químicos analíticos da Sigma and Aldrich Chemical, Waters, Applied Biosystems, Pierce and Bio Rad, conforme descrito por Toyama et al., (1995). O fracionamento foi realizado com as técnicas completas descritas a seguir, no laboratório do Departamento de Bioquímica da UNICAMP-SP (Universidade de Campinas) pelo Doutor Marcos Hikari Toyama, que gentilmente cedeu o veneno total liofilizado e as frações estudadas.

Com a finalidade de se avaliar a possível atividade citotóxica direta, o veneno total, uma fração fosfolipase (PLA₂), uma lectina, uma fração com atividade trombina símile, e uma com atividade L-aminoácido-oxidase, dele extraídas, se propõe o estudo destas frações em um sistema com perfusão de rim isolado de rato, excluindo atividades sistêmicas "in vivo". Foi utilizado o modelo inicialmente descrito por Bowman em 1970, modificado em nosso laboratório pela adição de um pulmão artificial para melhor oxigenação (FONTELES et al., 1998). Neste modelo a substância perfusora recircula, permitindo a atuação de mediadores liberados pela células renais.

Paralelamente a atividade sistêmica do veneno foi analisada através da administração endovenosa em ratos, com a pressão arterial controlada em modelo adaptado do descrito por Ferreira (1965). Neste sistema ocorre a interferência de mediadores liberados por células de todo o organismo. O exame histológico do coração, pulmões, rins, fígado, baço, e intestino, foi realizado após o sacrifício dos animais, no final do experimento.

Complementando a avaliação vascular, o veneno foi estudado no modelo de circulação em leito mesentérico isolado perfundido, segundo o modelo descrito por McGregor (1965). Neste sistema é avaliada a resposta vascular, visto que não há circulação do líquido perfusor.

3.2.1 Purificação da lectina do veneno da serpente *Bothrops insularis*

A lectina do tipo C do veneno da *Bothrops insularis* foi purificada depois da cromatografia em dois passos, primeiramente com o veneno submetido a cromatografia de exclusão molecular (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC) seguida por uma segunda purificação em cromatografia de alta afinidade. No primeiro momento o veneno (30 mg) foi dissolvido em 400µl de bicarbonato de amônia tamponado (0,3M; pH 7,8) e após a dissolução completa foi homogeneizado e clarificado por ultracentrifugação mantida a 4.300xg por 5 minutos para obtenção do extrato. Previamente a exclusão molecular por HPLC carregada por Superdex 75 (Pharmacia; 1 x 60 cm) foi equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a homogeneização durante 2 horas, antes da injeção do extrato do veneno. A purificação da fração de protéica do veneno foi realizada com manutenção em fluxo constante na taxa de 0,3mL/minuto, com o desenvolvimento da cromatografia monitorado a 280nm, e o perfil da hemaglutinação foi obtido com o uso de suspensão de hemácias a 2%. Após esta primeira purificação, a fração lectina símile foi submetida a novo procedimento cromatográfico, realizado em cromatografia de alta afinidade. Inicialmente aproximadamente 10mg da fração lectina símile completa foi dissolvida em 1mL de salina Tris-base de cálcio (CTBS; Tris, 20mM, NaCl, 150mM, CaCl₂ 5mM, pH 7.5). Após a dissolução completa da fração, a solução foi então clarificada por ultracentrifugação a 4500xg por 5 minutos. A cromatografia de afinidade absorvida com lactose (0,8 x 5cm) foi previamente equilibrada com CTBS

por 40 minutos, seguida pela injeção da solução do veneno. A lectina foi eluída usando um gradiente de 0.1-0.3M de lactose em CTBS. A fração lectina símile foi extensivamente dializada em bicarbonato de amônia tamponado (0.1M, pH 8.0) e liofilizada. A homogeneidade molecular da proteína do eluato na cromatografia de afinidade foi avaliada por HPLC de fase reversa (coluna de 0,1x 30cm de μ -Bondapack C18, Waters) utilizando um gradiente linear e descontínuo 0-100% de acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoroacético (v/v). Rapidamente, três miligramas da fração lectina obtida da cromatografia de afinidade foi dissolvida em 250 μ l de tampão A e centrifugado a 4500xg por 2 minutos e o sobrenadante foi então aplicado em HPLC de fase reversa analítica, previamente equilibrada com tampão A [0.1% ácido acético trifluoroacético (TFA)] por 15 minutos. A eluição da proteína foi então conduzida usando um gradiente linear de tampão B (66.6% Acetonitrila em tampão A) e a corrida cromatográfica monitorada a 214nm de absorvância. Depois da eluição a fração foi liofilizada e estocada a -40°C. SDS-PAGE usando gel Tricina acrilamida a 12% confirmou a homogeneidade molecular da fração.

3.2.2 Purificação da L-aminoácido oxidase do veneno da serpente *Bothrops insularis*

Uma amostra de 30mg do veneno foi dissolvida em 0,3M de bicarbonato de amônia, com ph 7,9 e clarificado por ultracentrifugação a 4500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi aplicado e fracionado em uma coluna (1 x 60cm) de Superdex 75 (Pharmacia) que foi pré-incubada com o mesmo tampão utilizado na diluição do veneno. A taxa do fluxo foi de 0,2mL/min e o perfil da eluição foi monitorado a 280nm de absorvância. A atividade L-aminoácido oxidase (LAAO) foi mensurada por ensaio em microplacas. A principal fração LAAO (10mg) foi dissolvida em 400 μ l de bicarbonato de amônia a 0,3 M, ph 7,9 e clarificada por ultracentrifugação a 4500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi aplicado e fracionado em coluna (1x30cm) de Superdex 200 (Pharmacia). A principal fração LAAO foi estocada e dessalinizada usando unidade de ultrafiltração em miliporo, com ponto de corte do peso molecular de 30kDa. A fração concentrada foi então recuperada e estocada a -20°C. Após esta primeira cromatografia de exclusão molecular a fração LAAO foi submetida a novo procedimento cromatográfico. A principal fração LAAO (10mg) foi então dissolvida

em 400 μ l de tampão bicarbonato de amônia 0.05M, pH 7.8 até a dissolução completa. A amostra foi clarificada em centrifugação de alta velocidade e o sobrenadante aplicado em Protein Pack DEAE 5PW previamente equilibrado com o mesmo tampão usado na diluição do veneno. As proteínas foram eluídas em fluxo constante na taxa de 1,0mL/min, utilizando um gradiente linear (0.05-1.0 M) de bicarbonato de amônia e o perfil da eluição foi monitorado a 280nm. Frações contendo proteína LAAO símile foram separadas e estocadas a -20°C. A homogeneidade molecular foi avaliada por cromatografia de fase reversa HPLC (0.1x 30cm column of μ -Bondapak C18, Waters) usando um gradiente linear e descontínuo 0-100% de acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoracético (v/v). Rapidamente três miligramas de proteína LAAO resultante da troca iônica foi dissolvida em 250 μ l de tampão A e centrifugada a 4500 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi então aplicado em cromatografia analítica de fase reversa HPLC, previamente equilibrada com tampão A [0.1% de ácido acético trifluoracético (TFA)] por 15 minutos. A eluição da proteína foi então conduzida usando um gradiente linear de tampão B (66.6% Acetonitrila em tampão A) e a corrida cromatográfica monitorada a 280nm de absorvância. Depois da eluição a fração foi liofilizada e estocada a -40°C. O grau de purificação da LAAO símile também foi avaliado, utilizando eletroforese PAGE-SDS.

3.2.3 Purificação da trombina símile do veneno da serpente *Bothrops insularis*

A trombina símile da *Bothrops insularis* foi purificada depois de três passos em cromatografia, primeiramente o veneno foi submetido a cromatografia de exclusão molecular HPLC (Superdex 75) seguido de uma segunda purificação em DEAE 5PW e Hi Trap Benzamidina FF (Pharmacia). Num primeiro tempo o veneno (30mg) foi dissolvido em 400 μ L de bicarbonato de amônia tamponado (0.3M; pH 7,8) e após a dissolução completa o veneno foi homogeneizado e clarificado por ultracentrifugação realizada a 4.300xg por 5 minutos para se obter o extrato do veneno. Previamente a exclusão molecular por HPLC carregada por Superdex 75 (Pharmacia; 1 x 60cm) foi equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a homogeneização durante 2 horas, antes da injeção do extrato do veneno. A

purificação da fração protéica do veneno foi realizada com manutenção em fluxo constante na taxa de 0,3mL/minuto, com o desenvolvimento da cromatografia monitorado a 280nm, e a serinoprotease e coagulação do fibrinogênio monitorados no transcorrer da cromatografia. Após esta primeira purificação, a fração trombina símile foi submetida a novo procedimento cromatográfico, realizado em cromatografia (0.78 x 8cm, Waters) DEAE 5PW. Inicialmente aproximadamente 5mg da fração trombina símile do veneno foi dissolvida em 400µl de bicarbonato de amônia tamponado (50mM, pH 7.8), após completa homogeneização a solução do veneno foi então clarificada por centrifugação em alta velocidade durante um minuto (4500 x g). Antes da aplicação do extrato da fração, a coluna cromatográfica foi equilibrada durante 20 minutos com tampão A (bicarbonato de amônia tamponado, 50mM, pH 7.8). A cromatografia foi realizada usando uma concentração linear do tampão B (bicarbonato de amônia, 1M, pH 7.9). A cromatografia foi conduzida em fluxo constante na taxa de 1mL/min, a purificação da fração foi monitorada a 280nm e as atividades enzimáticas foram simultaneamente monitoradas. Finalmente a proteína trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* foi purificada em coluna Hi Trap Benzamidine FF. Neste último procedimento, previamente a coluna foi equilibrada em solução de bicarbonato de amônia a 0.2M, que foi usado para homogeneização da amostra e a eluição da trombina símile foi realizada usando um gradiente de eluição de curto passo de tampão B (tampão bicarbonato de amônia, 2M, pH 8.0). A cromatografia transcorreu monitorada a 280nm a fração foi coletada e a apropriada caracterização foi realizada. A fração trombina símile foi coletada e extensivamente dializada em bicarbonato de amônia tamponado (0.1M, pH 8.0) e em seguida liofilizada. A homogeneidade molecular da proteína eluída em cromatografia de afinidade foi avaliada por HPLC de fase reversa (coluna de 0.1x 30cm de µ-Bondapack C18, Waters) usando um gradiente linear e descontínuo 0-100% de acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoroacético (v/v). Rapidamente, três miligramas do pico de trombina símile obtido com a purificação foi dissolvido em 250µl de tampão A e centrifugado a 4500xg por 2 minutos e o sobrenadante foi então aplicado em HPLC de fase reversa analítico, previamente equilibrado com tampão A [0.1% de ácido acético trifluoroacético (TFA)] por 15 minutos. A eluição da proteína foi então conduzida usando um gradiente linear de tampão B (66.6% acetonitrila no tampão A) e a corrida cromatográfica foi monitorada a 214nm de absorvância. Depois da

eluição a fração foi liofilizada e estocada a -40°C . SDS-PAGE usando gel Tricina acrylamida a 12% confirmou a homogeneidade molecular da fração.

3.2.4 Purificação da fosfolipase A_2 do veneno da serpente *Bothrops insularis*

O veneno da *Bothrops insularis* (25mg) foi dissolvido em 0,3M de bicarbonato de amônia, pH 7,9, e clarificado por ultracentrifugação a $4500 \times g$ por 2 minutos. O sobrenadante foi empregado e fracionado em uma coluna (1 x 60cm) de Superdex 75 (Pharmacia) que foi pré-incubada com o mesmo tampão utilizado na diluição do veneno. A taxa de fluxo foi de 0,2mL/minuto e o perfil da eluição foi monitorado a 280nm de absorvância. A atividade enzimática foi monitorada usando 4N3OBA e a mionecrose foi avaliada pela detecção do nível de CK no soro durante a exclusão molecular por HPLC. A principal fração PLA_2 mionecrótica (7.5mg) foi dissolvida em 400 μ l de bicarbonato de amônia tamponado 0.05M, pH 7.8 ate a dissolução completa. As amostras foram clarificadas em centrifugação de alta velocidade e o sobrenadante foi aplicado a Protein Pack SP 5PW previamente equilibrado com o mesmo tampão utilizado na diluição do veneno. As proteínas foram eluídas em fluxo constante na taxa de 1,0 mL/ minuto, usando um gradiente linear (0.05-1.0 M) de bicarbonato de amônio e o perfil da eluição foi monitorado 280 nm. As frações contendo miotoxinas PLA_2 símile foram coletadas, liofilizadas e estocadas a -40°C . A massa molecular e a homogeneidade do homogenato do eluato de proteínas foram avaliados por HPLC de fase reversa (0.1x 30cm coluna de μ -Bondapack C18, Waters) usando um gradiente linear e descontínuo 0-100% de acetonitrila em 0.1% de ácido trifluoroacetico (v/v). Imediatamente, três miligramas de proteína PLA_2 miotóxica da troca iônica foram dissolvidas em 250 μ l de tampão A e centrifugados a $4500 \times g$ por 2 minutos e o sobrenadante foi então aplicado em HPLC de fase reversa analítica, previamente equilibrado com tampão A [0,1% de ácido acético trifluoroacetico (TFA)] por 15 minutos. A eluição da proteína foi então realizada usando um gradiente linear do tampão B (66.6% de acetonitrila em tampão A) e a corrida cromatográfica monitorada a 280nm de absorvância. Após eluição a fração foi liofilizada e estocada a -40°C . O grau de pureza da PLA_2 avaliado usando duas eletroforeses dimensionais (2D) e espectrometria de massa MALDI TOF. A

eletroforese 2D foi conduzida como descrito por Anderson e Anderson (1991). A espectrometria utilizou proteínas purificadas por HPLC, no qual a proteína foi colocada em uma placa de amostra e introduzida espectrofotômetro de massa MALDI TOF.

3.3 Primeiro Modelo

Procedimentos de Perfusão Renal

Este ensaio foi utilizado para teste das ações do veneno puro e suas frações isoladas em perfusão renal, permitindo acompanhar a atividade também de mediadores liberados pelas células renais estimuladas pelo veneno e frações, pois a substância perfusora recircula no sistema, permitindo demonstrar a atividade destes mediadores. Todos os modelos utilizaram os mesmos equipamentos para observação histológica (Anexo A).

3.3.1 Divisão dos grupos de animais

Com a finalidade de avaliar os efeitos do veneno da *Bothrops insularis*, como também de quatro de suas frações, uma lectina, uma L-aminoácido oxidase, uma com atividade trombina símile e uma fosfolipase (PLA₂), os animais foram dividido em seis grupos com 6 animais cada. No grupo controle, os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Nos demais grupos foram utilizados os mesmos procedimentos do grupo controle até os 30 minutos de perfusão. Os dados obtidos aos 30 minutos foram utilizados como controle interno do experimento. Após este período foi adicionado 1mg de veneno total liofilizado e a mesma dose de cada uma das suas frações, também liofilizadas, diluídas em 1 ml de solução salina (0,9%), e a seguir em 99 mL da solução perfusora (10 µg/mL.)

3.3.2 O Veneno e suas frações

O veneno foi dividido em quatro frações, com atividades distintas. Uma lectina, uma L-aminoácido oxidase, uma trombina símile e uma fosfolipase (PLA₂). O veneno e as frações foram todos liofilizados, e gentilmente cedidos pelo Doutor Marcos Toyama da Universidade de Campinas.

3.3.3 Solução perfusora e seu preparo

A solução empregada nas experiências foi a de Krebs-Henseleit (Anexo B), modificada, contendo albumina bovina a 6 g%

A solução de Krebs-Henseleit modificada (Fonteles, 1998), concentrada a 20%, continha NaCl = 138g, KCl = 7g, NaH₂PO₄.H₂O = 3,2g, MgSO₄. 7 H₂O = 5,8g e Uréia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO₃ = 4,2g , CaCl₂ . 2 H₂O = 0,74g, glicose = 2g, e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, aos qual se adicionou albumina bovina (6g%). Em seguida, solução foi dializada com albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (HANSON; BALLARD, 1968; COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

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

3.3.4 O sistema de perfusão renal

Nos nossos experimentos foi utilizado o sistema de perfusão de rim isolado com recirculação (Figura 6, 7), também conhecido como sistema de perfusão de rim isolado fechado. No Ensaio de *Perfusão do rim isolado de rato* foi usado o método inicialmente descrito por Bowman (1970), e depois modificado por Pegg (1971), e em 1983 por Fonteles et al., que adicionaram um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton et al. (1974).

Neste sistema o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Henseleit modificada por Fonteles et al., (1998) e a oxigenação é adaptada ao sistema (MONTEIRO, 1990).



FIGURA 6: Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação.

O sistema de perfusão de rim isolado com recirculação (Figuras 10; 11) é composto por um conjunto de equipamentos cada um deles desempenha uma determinada função.

- 1) Condensador: Mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
- 2) Coletor de urina: Frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocados em intervalos de 10 minutos;
- 3) Seringa coletora de perfusão: Coletor da solução de perfusão no sistema feita em intervalos de 10 minutos;

- 4) Bomba de perfusão (Watson): Bombeia a solução de perfusão no sistema, apresenta cinco velocidades;
- 5) Filtro de millipore ($8\mu\text{m}$): Filtra a solução perfusora;

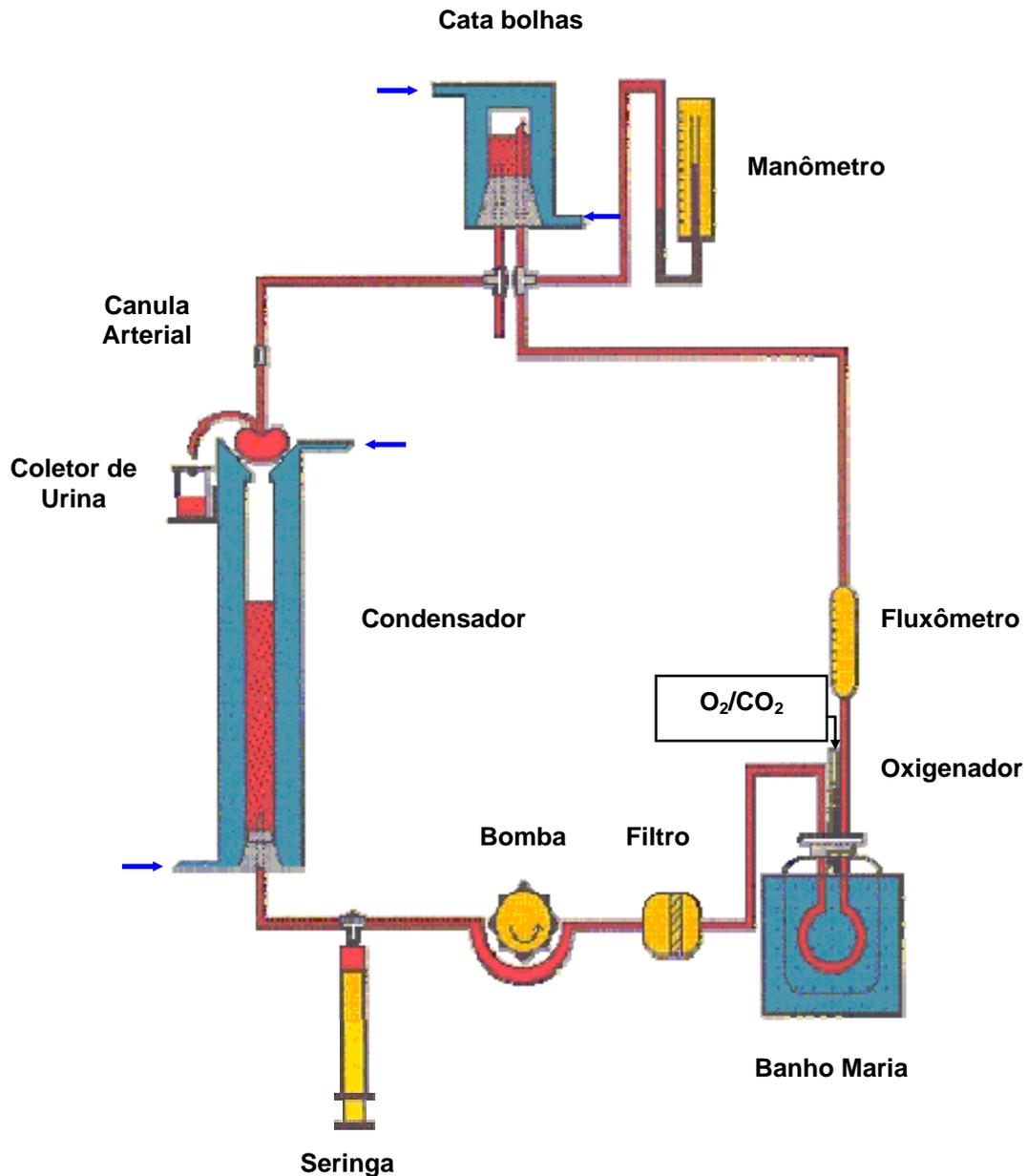


FIGURA 7: Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação.

- 6) Banho Maria: aquece o oxigenador ou o pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre 37°C ;
- 7) Fluxômetro: Mede o fluxo da solução;
- 8) Manômetro de mercúrio: Mede a pressão do perfusato;

- 9) Catabolhas: Retira as bolhas formadas evitando assim embolia no rim;
- 10) Oxigenador ou pulmão artificial: Promove as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂);
- 11) Bomba aquecedora com termostato: mantém o perfusato na temperatura de 37°C.

3.3.5 Preparo do sistema

Antes de cada experimento o sistema foi lavado com detergente e depois calibrado.

A calibração foi sempre feita com o sistema em funcionamento na presença de solução fisiológica a 0,9%, aquecida na temperatura de 37°C. A cada unidade da bomba de perfusão (1,2,3,4 e 5), foi coletada a solução salina por 1 minuto em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula arterial), e anotada a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão, através do manômetro de mercúrio ligado ao sistema. Para melhor adaptação do sistema às unidades de bomba, foram estabelecidos 3 minutos de intervalos entre cada coleta.

A calibração foi feita com o objetivo de se conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula arterial. Para tanto, os resultados de calibração obtidos nos quatro grupos tratados foram compilados em curvas, onde foi plotada a velocidade da bomba no eixo das abscissas contra a pressão de perfusão, volume de salina coletado (fluxo) e o valor obtido no fluxômetro no eixo das ordenadas.

3.3.6 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. Foi avaliada em cada uma das unidades da bomba (1, 2, 3, 4, e 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/h) e o volume de salina coletado em um minuto (mL/min) (Figura 8, 9, 10).

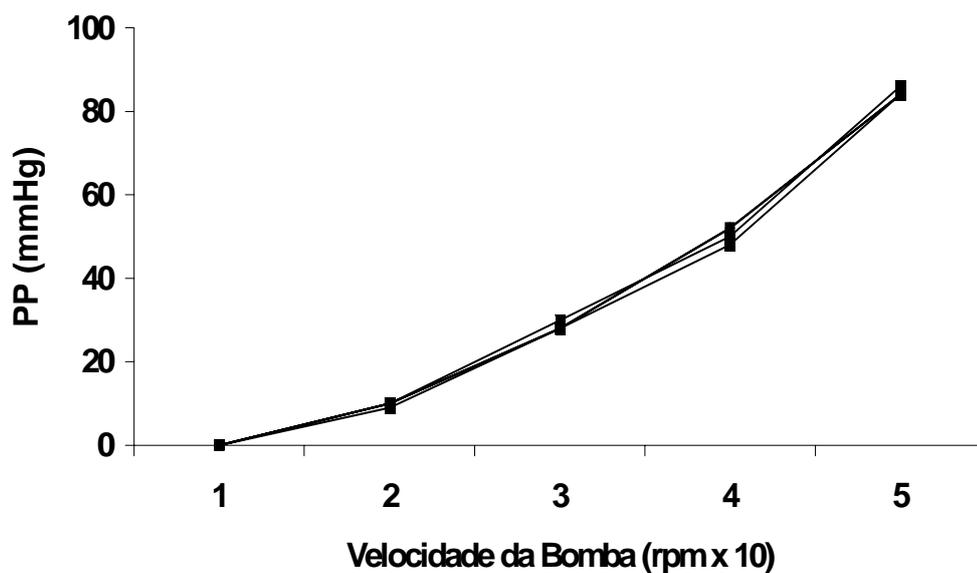


FIGURA 8: Valores registrados de pressão de perfusão (PP) durante a calibração do sistema (n = 6)

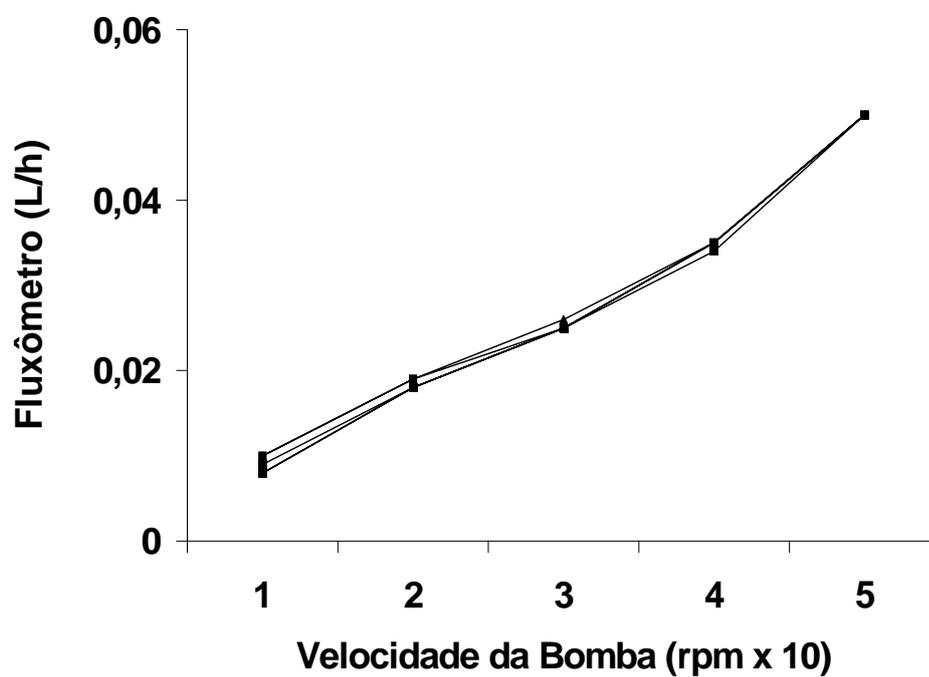


FIGURA 9: Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).

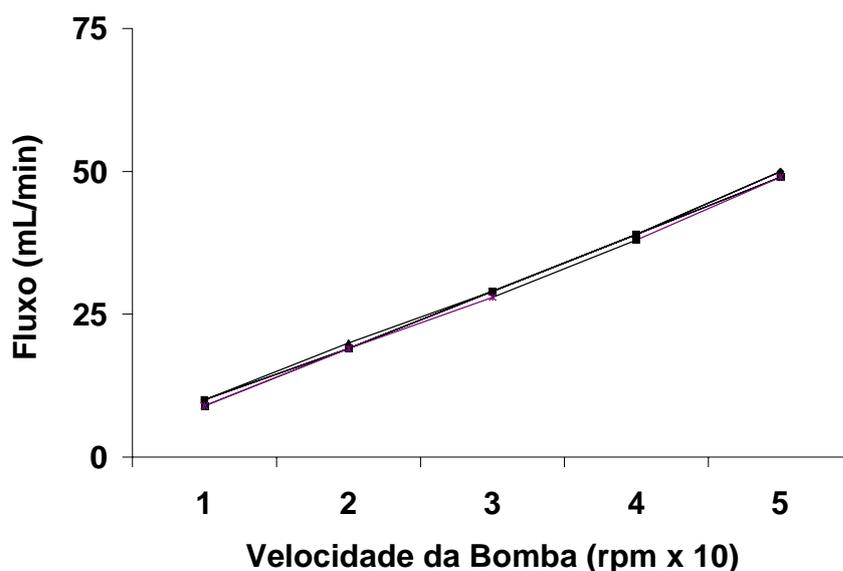


FIGURA 10: Valores registrados de volume de salina (mL/min) durante a calibração do sistema (n = 6)

3.3.7 Técnica cirúrgica

Após a anestesia do animal com Pentobarbital Sódico na dose de 50 mg/Kg intraperitoneal (IP), foram injetados na veia femoral devidamente identificada, 3 mL de manitol a 20 %, com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter.

Após assepsia do abdômen, foi realizada uma incisão da parede abdominal com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, no meio da parede, para aumentar o campo cirúrgico (Figura 11). Rebatidas às vísceras para o lado esquerdo para visualização do rim direito e conseqüente limpeza dos tecidos presentes na área. Em seguida, o ureter foi isolado e canulado com tubo de polietileno (PE₅₀). Com o intuito de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para com isso providenciar a descapsulação do rim. Cumpridos estes procedimentos, a artéria renal foi canulada a partir da artéria mesentérica superior. Após sua identificação, a artéria mesentérica superior foi ocluída em seu lado direito e pinçada no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido introduzimos a cânula por 3 a 5 mm e fixamos cânula e artéria. Logo a seguir, o órgão foi isolado com pinças e seccionado, promovendo a retirada do rim e ureter. Devidamente liberado, o rim já acoplado ao

sistema, passa por um período de adaptação *in vitro* de aproximadamente 30 minutos (Figura 6).

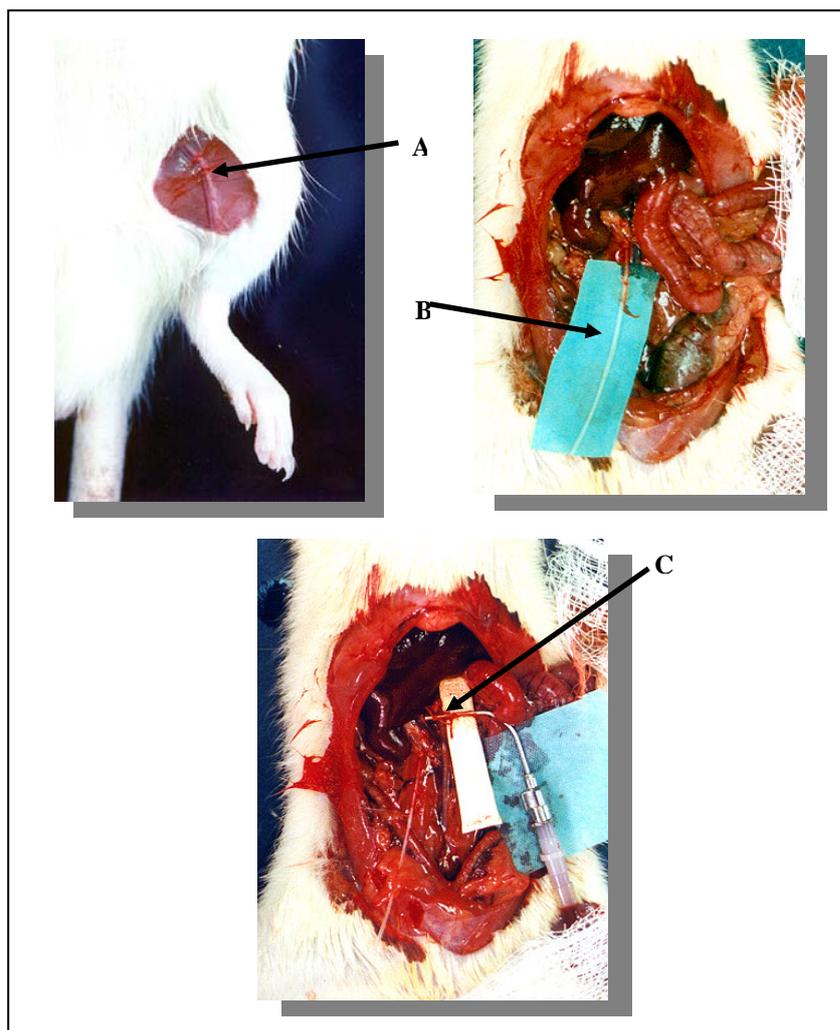


FIGURA 11: Técnica cirúrgica do isolamento do rim (A= veia femoral, B= ureter canulado e C= cânula arterial).

3.3.8 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a adaptação do órgão ao sistema num tempo de aproximadamente 30 minutos. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, foram coletados a cada 5 minutos as medidas do fluxômetro e a pressão do perfusato. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, foram coletados a urina e o perfusato. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os frascos de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloreto, inulina e

osmolaridade. Sempre aos 30 minutos do início do experimento, administramos veneno da *Bothrops insularis* ou suas frações.

Com o rim direito montado no sistema, o rim esquerdo foi coletado para controle interno, o qual foi pesado e retirado um fragmento para posterior exame histopatológico. Após o fim do experimento, foi realizado o mesmo procedimento com o rim direito.

3.3.9 Avaliação bioquímica

Perfusatos e urinas foram coletados em intervalos de 10 minutos, de forma intercalada, conforme o protocolo experimental acima descrito. Com este material foram realizados testes bioquímicos. O clearance foi mensurado de acordo com Pitts (1971), e Martinez-Maldonado e Opava-Stitzer (1978). A dosagem de sódio e potássio, foi realizada pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443IL). As dosagens de cloreto foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta, como descrito por Walser et al. (1955), e modificada por Fonteles e Leibach (1982). Finalmente foi medida a osmolaridade das amostras com um osmômetro (vapor Pressur osmometer - modelo 5100c ESCOR). Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

3.3.10 Análise histológica

Após cada experimento, fragmentos dos dois rins e dos rins do grupo controle foram retirados e acondicionados em frasco de formol 10% para proceder à análise histológica. Fragmentos de mesentério foram coletados para controle nos experimentos do segundo modelo. Estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5 μ m. Procedeu-se à coloração do material por hematoxilina-eosina e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico. Todas as lâminas dos rins submetidos à perfusão foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica - Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

3.3.11 Cálculo dos parâmetros renais

Foram utilizadas as fórmulas abaixo para determinação dos parâmetros funcionais renais (PITTS, 1971; MARTINEZ-MALDONADO; OPAVA-STITZER, 1978; FONTELES et al., 1993).

1. PP (mmHg) = Pressão de perfusão. Leitura em manômetro
2. RVR (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Resistência vascular renal = PP (mmHg) / FPR
3. FPR (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Fluxo de perfusão renal (registrado a cada 10 min/ intervalo de tempo x peso do rim x)
4. FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Fluxo urinário = Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo x 10 (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)
5. RFG = Ritmo de filtração glomerular = (DOU in / DOP in x FU = sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato)
6. %TNa ⁺ = Percentual de sódio transportado = TNa ⁺ x 100 / FNa ⁺
7. TNa ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Sódio transportado = FNa ⁺ - ENa ⁺
8. FNa ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Sódio filtrado = RFG x PNa ⁺ (PNa ⁺ = Concentração de sódio no perfusato)
9. ENa ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Sódio excretado = FU x UNa ⁺ (UNa ⁺ = Concentração de sódio na urina)
10. %pTNa ⁺ - Percentual de transporte proximal de sódio = pTNa ⁺ x 100 / FNa ⁺
11. pTNa ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Transporte proximal de sódio = FNa ⁺ x AdNa ⁺
12. AdNa ⁺ - Aporte distal de sódio (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = dTNa ⁺ + ENa ⁺
13. dTNa ⁺ - Transporte distal de sódio (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹) = CH ₂ O x PNa ⁺
14. C. H ₂ O - clearance de água livre (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹) = FU - C. osm
15. Cosm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Clearance osmótico = [Uosm / Posm] x FU (onde Uosm = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)
16. %TK ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Percentual de potássio transportado = TK ⁺ x 100 / FK
17. %pTK ⁺ = percentual de transporte proximal de potássio = pTK ⁺ x 100 / FK
18. % TCl ⁻ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹) = Percentual de cloreto transportado = TCl ⁻ x 100 / F TCl ⁻
19. %pTCl ⁻ = percentual de transporte proximal de cloreto = p TCl ⁻ x 100 / F TCl ⁻

Todos os cálculos realizados para a determinação dos parâmetros do sódio, acima citados, foram repetidos para o potássio e cloreto.

3.4 Segundo Modelo

Procedimentos de Avaliação Sistêmica na Artéria Aorta

Este ensaio foi utilizado para teste das ações do veneno puro no leito vascular sistêmico, abrangendo grandes e pequenos vasos (FURCHGOTT, ZAWADSKI, 1980), expressando também a reatividade de todas as células do animal, capazes de liberar mediadores, já que este permanece vivo enquanto dura o experimento, com o veneno em sua circulação sanguínea.

3.4.1 O sistema de avaliação sistêmica na artéria aorta

A atividade sistêmica do veneno foi analisada através da administração endovenosa em ratos, com a pressão arterial controlada em modelo descrito por Ferreira (1965), no qual a cânula da carótida media a pressão e o veneno era injetado na jugular, utilizando fisiógrafo, sendo a variação de pressão medida a partir da queda da linha determinada no início do experimento, dez minutos após a administração de doses crescentes do veneno (Figura 12).

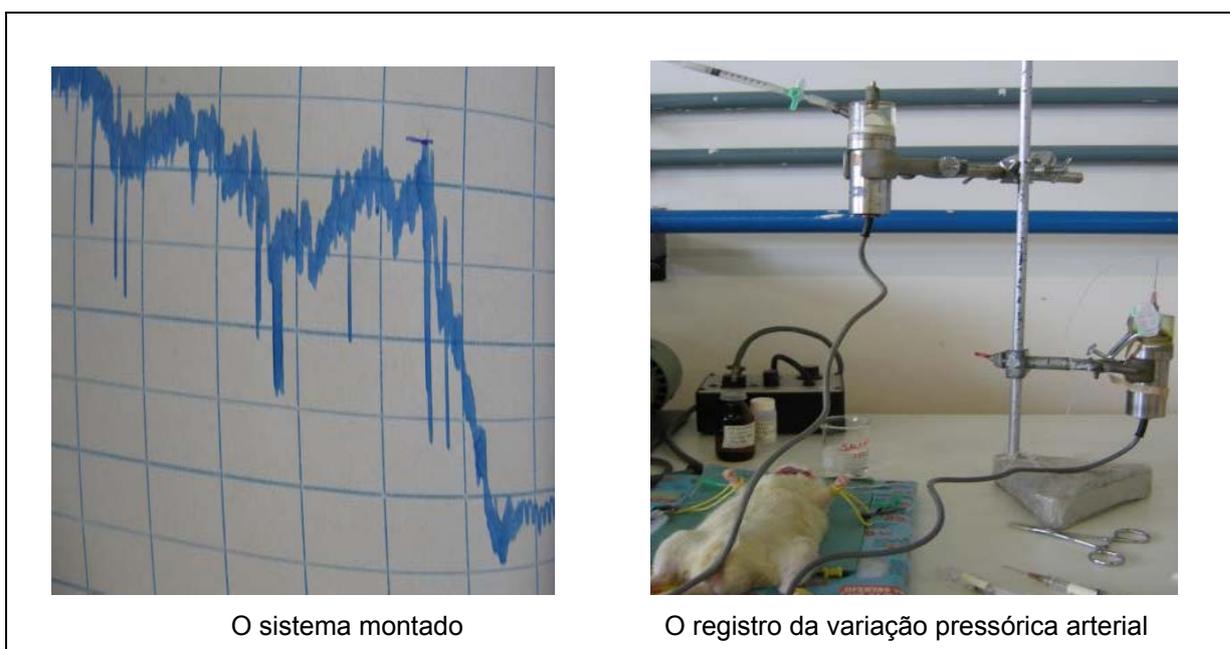


FIGURA 12: O sistema montado e exemplo de registro pressórico.

3.4.2 Procedimento cirúrgico e protocolo do experimento

Após rebatimento das glândulas parótidas, direita e esquerda, foi aprofundada a incisão até a traquéia, onde foi realizada traqueostomia, com a finalidade de garantir o fluxo respiratório. Após divulsão marginal deste órgão, foi identificado o feixe vasculonervoso de onde se isolou a artéria carótida esquerda, com muito cuidado para não lesar o nervo vago. Foi procedida, então, a canulação desta artéria para registro da pressão arterial média. Igual manobra foi realizada com vistas à canulação da veia jugular externa com o propósito de injetar as substâncias testes e os padrões (Figura 13).

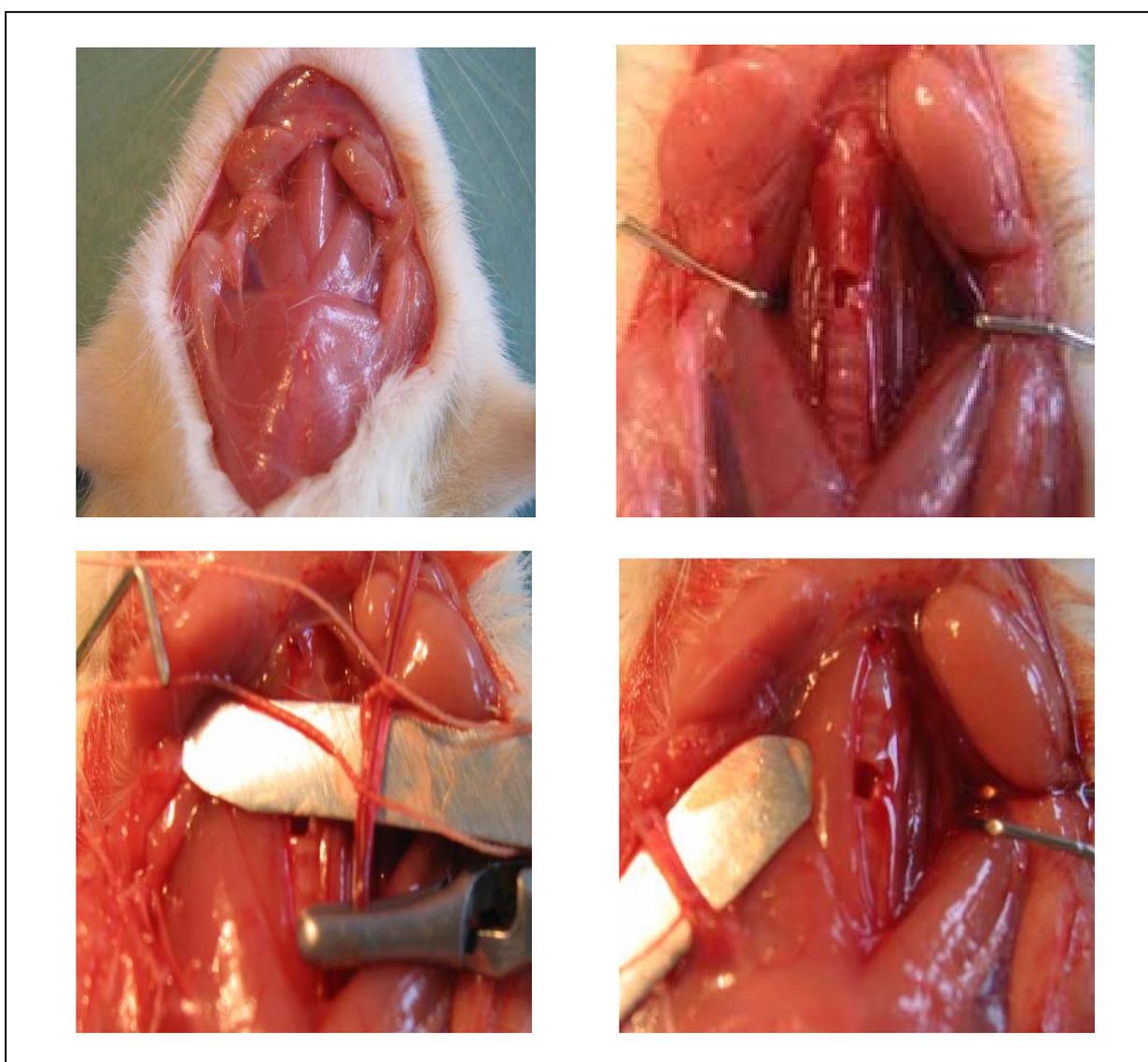


FIGURA 13: Técnica Cirúrgica da avaliação pressórica sistêmica (canulação da artéria aorta e veia jugular).

Os registros das experiências foram realizados com transdutores acoplados a um fisiógrafo (Anexo A). Antes do início das experiências o instrumento era calibrado, se utilizado como padrão um manômetro de mercúrio numa escala de 20 a 250 mmHg.

As doses do veneno se iniciaram com 0,1µg, seguidos de 0,3µg, 10µg, 30µg, 100µg e finalizando com 300µg, conforme a sobrevivência do animal, diluídos em 0,1mL de solução salina. O controle foi obtido com a administração de solução salina, anterior ao início da injeção do veneno. O exame histológico do coração, pulmões, rins, fígado, e intestino, foi realizado após o sacrifício dos animais, no final do experimento.

3.4.3 Análise histológica

Após cada experimento, fragmentos do coração, pulmões, rins, fígado e intestino foram retirados e acondicionados em frasco de formol 10% para proceder à análise histológica.

O controle foi coletado do grupo utilizado para o experimento do segundo modelo, do leito mesentérico isolado perfundido, no qual se utiliza apenas o mesentério. Deste grupo foram retirados os outros órgãos, coração, pulmões, fígado, rins e intestino, buscando-se evitar desperdício de animais.

Estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5µm. Procedeu-se à coloração do material por hematoxilina-eosina e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica - Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

3.5 Terceiro Modelo

Procedimentos de Perfusão no Leito Vascular Mesentérico

O objetivo deste sistema foi avaliar a resposta pressórica vascular ao veneno da *Bothrops insularis*. Para tanto ele foi inicialmente injetado na artéria mesentérica pré-contraída, visando-se observar uma possível atividade inibitória da vasoconstrução, sendo, em seguida injetados em no leito arterial com pressão basal fisiológica, visando observar uma possível atividade vasodilatadora. Como não há recirculação do perfusato neste sistema, qualquer atividade detectada se deveria ao efeito direto do veneno nas paredes dos vasos, ou exclusivamente da atuação de mediadores autócrinos e parácrinos.

3.5.1 O sistema de perfusão no leito vascular mesentérico isolado.

A perfusão foi realizada segundo o modelo descrito por McGregor (1965). O leito mesentérico isolado tinha a artéria mesentérica canulada e era perfundido com a solução de Krebs-Henseleit (Anexo B). A solução de perfusão oxigenada com fluxo contínuo de oxigênio a 95% e CO₂ a 5%, e mantida em temperatura constante de 37°C com o fluxo mantido constante (4 mL/min) (Figura 14). As alterações de pressão foram registradas em um manômetro de mercúrio, numa escala de 10 a 250 mmHg, conectado ao sistema perfusor. Foram examinados os efeitos vasculares diretos do veneno da *B. insularis* na concentração de 100 µg/mL (n = 6), após contração dos vasos produzida por fenilefrina (5 µM; n=6) e isoladamente sem a atuação da fenilefrina. Os experimentos foram iniciados com uma pressão basal entre 30 e 50 mmHg. O tempo de infusão das substâncias testadas foi sempre de 20 minutos em um fluxo constante de 0,1 mL/min.

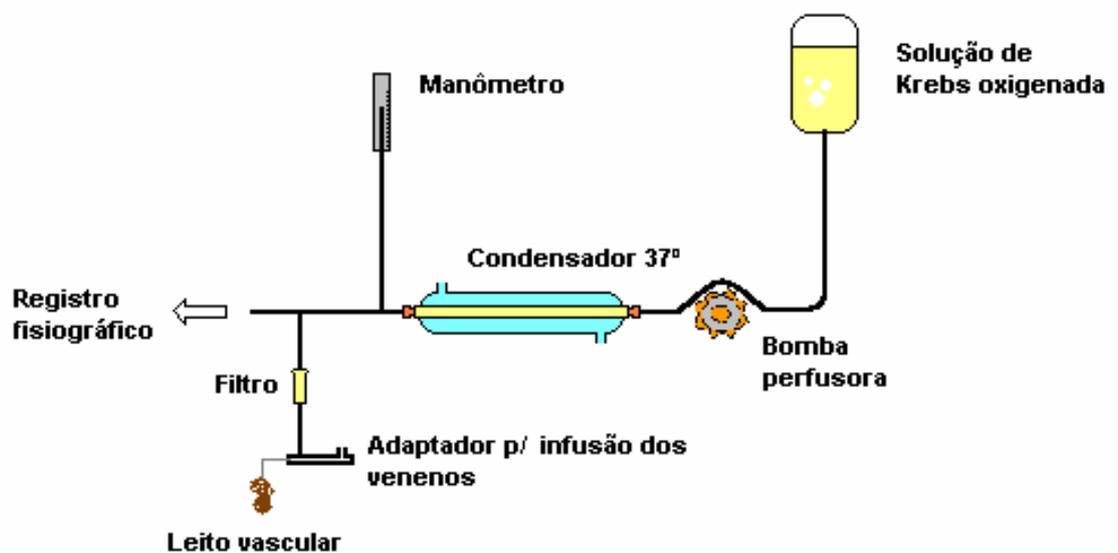


FIGURA 14: Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico.

3.5.2 Protocolo da avaliação no leito vascular mesentérico

Dois protocolos foram estabelecidos. No primeiro passo o veneno foi infundido em leitos mesentéricos isolados pré-contraídos submaximamente (\cong 80 – 90 %) com fenilefrina, para simular as condições de pressão do leito *in vivo*, sendo possível verificar efeitos vasodilatadores e vasoconstritores. No segundo, depois de estabilizada uma pressão de perfusão basal (30 – 50 mmHg) o veneno da serpente *Bothrops insularis* foi infundido para se avaliar a variação da pressão de perfusão, independentemente da vasoconstrição determinada pela fenilefrina.

O controle foi obtido dos níveis pressóricos basais, com o mesentério perfundido exclusivamente com a solução de Krebs-Henseleit, no início dos experimentos.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram de padrão analítico, obtidas das companhias Sigma (St. Louis, MO, E.U.A.), Merck (Darmstadt, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

3.5.3 Técnica cirúrgica da perfusão do leito vascular mesentérico isolado

Inicialmente, foi feita uma incisão da cavidade abdominal, paralelamente a linha Alba, e dois cortes perpendiculares ao primeiro, para ampliar o campo cirúrgico.

Após a abertura do abdome, a artéria mesentérica superior era identificada para que seus ramos, pancreático-duodenal, ileocecal e cecal fossem ligados. Em seguida, a artéria mesentérica superior era isolada, cuidadosamente dissecada do conjuntivo adjacente e canulada na sua porção distal, próxima à aorta, com tubo de polietileno (PE20). O animal era sacrificado pela abertura do tórax. O intestino era então separado por dissecação junto ao bordo intestinal do mesentério e este imediatamente levado ao sistema de perfusão (Figura 15).

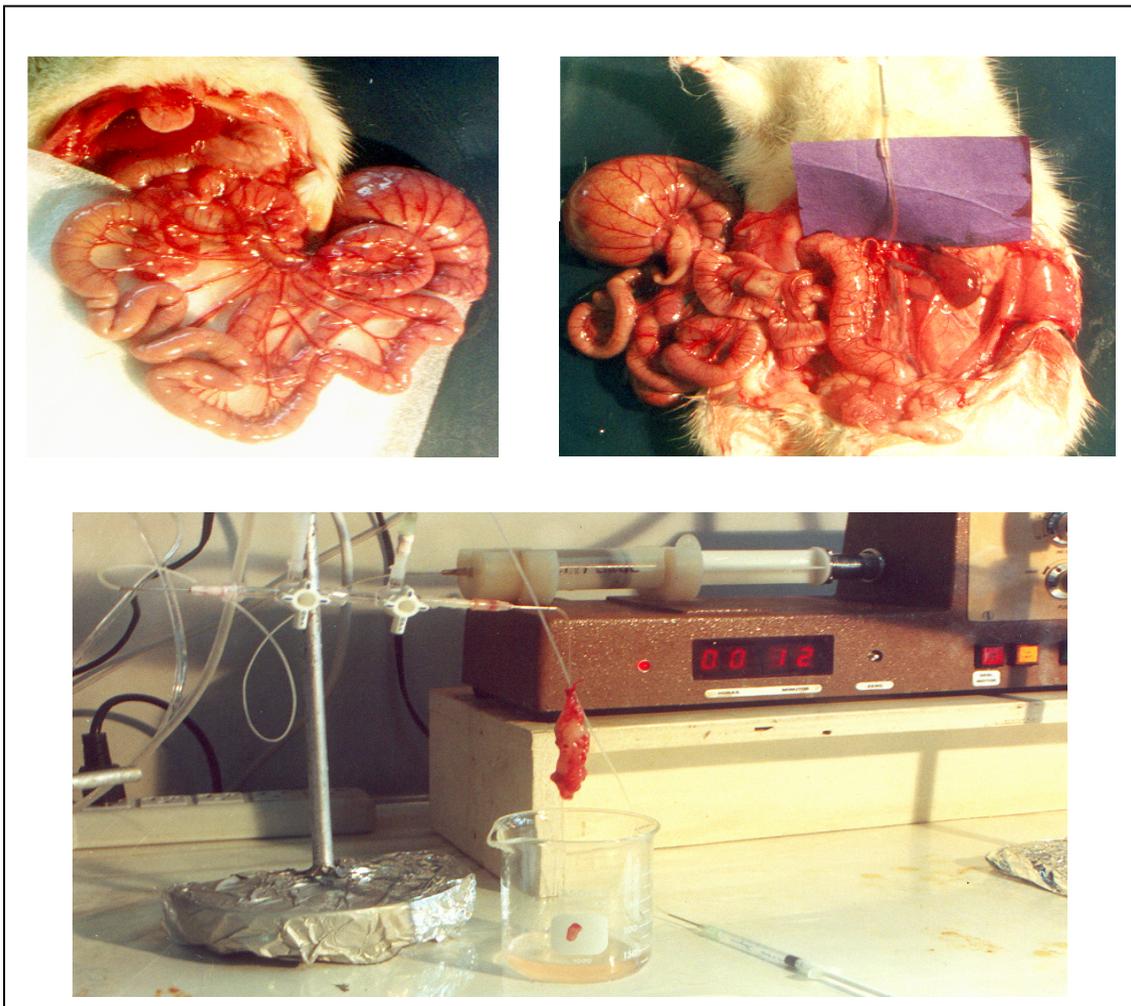


FIGURA 15: Técnica cirúrgica da avaliação no leito vascular mesentérico. A) intestino delgado e mesentério; B) Artéria mesentérica superior canulada com tubo de polietileno (PE20); C – Leito mesentérico conectado ao sistema de perfusão.

3.5.4 Análise histológica

Após cada experimento, fragmentos do mesentério, incluindo a artéria, foram retirados e acondicionados em frasco de formol 10% para proceder à análise histológica. O controle foi obtido com mesentério dos animais do segundo modelo.

Fragmentos dos demais órgãos, coração, pulmões, rins, fígado e intestino, foram utilizados como controle no segundo modelo, de avaliação sistêmica da ação do veneno.

Estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5 μ m. Procedeu-se à coloração do material por hematoxilina-eosina e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica - Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Utilizou-se um computador PC Pentium (333 Hz) e programas Prisma 3.0 e Microsoft Excel para análise estatística dos dados, e elaboração de gráficos e tabelas. Os dados foram expressos por média \pm EPM e comparados com o grupo controle.

A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste t-Bonferroni, e o teste t-Student's foi utilizado para comparar amostras não pareadas, sempre com significância de * $p < 0,05$.

Todas as tabelas e gráficos dos parâmetros renais foram avaliados e estudados de acordo com a variável de tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos, utilizando-se o programa Prism 3.0 e Microsoft Excel.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados dos Experimentos com Perfusão Renal

5.1.1 Avaliação dos grupos controle

Foram realizadas avaliações das alterações fisiológicas, na pressão arterial, e histopatológicas renais, nos grupos controle.

5.1.1.1 Avaliação das alterações fisiológicas renais dos grupos controle

Foram realizados seis experimentos controle para avaliação dos parâmetros funcionais e histopatológicos renais, sob a influência apenas da solução perfusora de Krebs-Henseleit modificada, para posterior comparação com os grupos tratados com o veneno da serpente *Bothrops insularis* e suas frações. Todos os parâmetros mantiveram-se estáveis durante os 120 minutos de experimento (Anexo D).

5.1.1.2 Avaliação histológica do grupo controle

No grupo controle, os rins apresentavam a maioria das células de revestimento tubular proximal preservadas com a borda em escova bem visualizada (Figura 16); focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar destas células no córtex renal, discreta deposição intratubular de material proteináceo (Figura 17); glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades.



FIGURA 16: Fotografia do rim de rato, controle, perfundido com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Células de revestimento tubular com a borda em escova preservada. (HE), (40x).

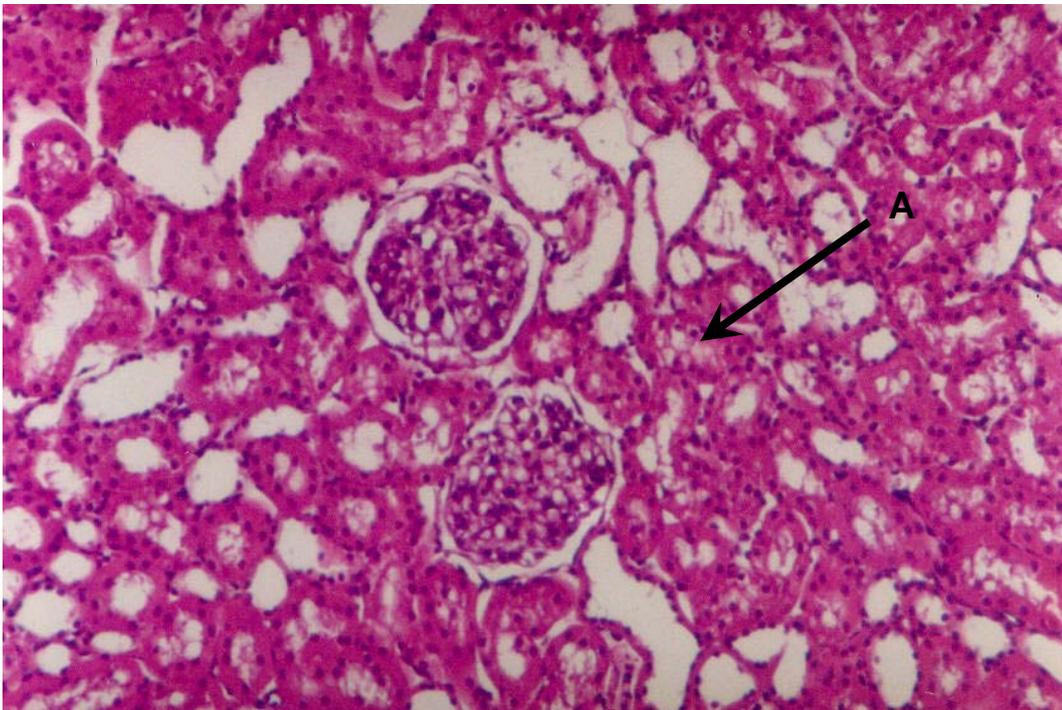


FIGURA 17: Fotografia do rim de rato, controle, perfundido com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar de células tubulares e discreta deposição proteínácea na luz. (HE), (20x).

5.1.2 Alterações induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops insularis* e de suas frações, em sistema de rim isolado perfundido de rato

Foram examinadas as alterações fisiológicas e histopatológicas. As alterações fisiológicas mostraram características particulares do veneno e de cada uma de suas frações, em parâmetros renais vasculares, funcionais e eletrolíticos que variaram muito (Tabela 4).

TABELA 1: Alterações vasculares, urinárias e eletrolíticas apresentadas pelo veneno e suas frações no sistema de perfusão em rim isolado de rato.

Ação/	Veneno			Lectina			LAAO			Trombina			PLA2		
Tempo	60	90	120	60	90	120	60	90	120	60	90	120	60	90	120
PP	↓	↓	↓	↑		↓		↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
RVR	↓	↓	↓						↓	↑			↑	↑	↑
FU	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↑		↓	↑	↑	↑
RGF	↓	↓	↓			↓		↓	↓	↑		↓		↑	↑
%TNa	↓	↓	↓		↑				↓			↓	↓		↓
%pTNa	↓	↓	↓	↑	↑				↓			↓	↓		
%TK						↑		↓	↓	↑					
%pTK						↑		↓	↓	↑					↑
%TCI	↓	↓	↓						↓			↓	↓		↓
%pTCI	↓	↓	↓						↓		↓	↓	↓		↓
C. osm	↓	↓	↓		↓	↓		↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑

PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal; FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular; %TNa⁺= percentual de transporte de sódio; %pTNa⁺= percentual de transporte proximal de sódio; %TK⁺= percentual de transporte de potássio; %pTK⁺= percentual de transporte proximal de potássio; %TCI= percentual de transporte de cloro; %pTCI= percentual de transporte proximal de cloro; C osm= clearance osmótico. ↓ Redução do parâmetro. ↑ Elevação do parâmetro.

As alterações histopatológicas se repetiram em quase todos os exames, que se diferenciaram do controle em duas evidências principais, necrose tubular aguda e extravasamento de proteínas para o espaço de Bowman. A necrose tubular aguda foi mais intensa com a aplicação da fração lectina e com o veneno, e não foi vista com o uso da fração trombina símile (Tabela 5). O extravasamento proteináceo para espaço de Bowman foi mais marcante com a aplicação da fração trombina símile e não foi visto quando foi utilizado o veneno (Tabela 5; 6; Figura 18).

TABELA 2: Principais alterações histopatológicas observadas com a aplicação do veneno e de suas frações.

Veneno/Fração	Extravasamento Proteináceo glomerular	Necrose Tubular Aguda
Controle	-	-
Veneno	-	+++
Lectina	36%	+++
LAAO	40%	++
Trombina símile	73%	-
Fosfolipase A ₂	47%	++

Extravasamento proteináceo: % de glomérulos com algum grau de extravasamento.

+ = Pouca intensidade; ++ = Moderada intensidade; +++ = Grande intensidade.

TABELA 3: Percentual de glomérulos apresentando algum grau de extravasamento proteináceo para o espaço de Bowman. Erro! Vínculo não válido. Número de Glomérulos = Contados em 10 campos de maior aumento (40x).

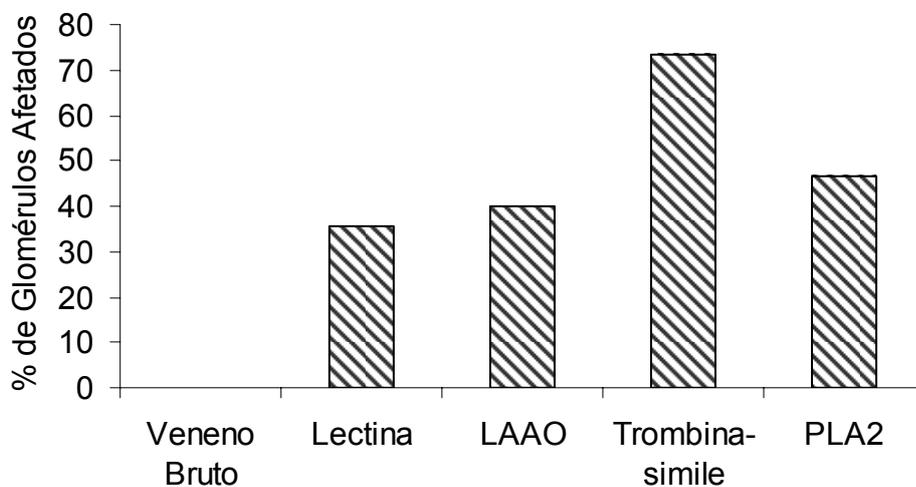


FIGURA 18: Percentual de glomérulos apresentando algum grau de extravasamento proteináceo para o espaço de Bowman.

5.1.2.1 Alterações induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Foram estudados dois aspectos das alterações renais provocadas pelo veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato, as alterações fisiológicas e as alterações histopatológicas.

5.1.2.1.1 Alterações fisiológicas renais induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

O grupo em que o rim foi tratado com o veneno da *Bothrops insularis* (BiV) apresentou intensas alterações da função renal após sua aplicação. Houve queda nos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal (Tabela 7); nos parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular (Tabela 8); nos parâmetros eletrolíticos relativos ao sódio (Tabela 9) e ao cloreto (Tabela 10), sem alteração significativa nos de potássio (Tabela 11); e queda no clearance osmótico (Tabela 12).

Uma vez comparados o grupo controle e o tratado, observou-se queda da pressão de perfusão do início ao final do experimento, aos 120 minutos ($C_{120}=110,28\pm 3,69$; $BiVb_{120}=71,8\pm 7,6$ mmHg) (Tabela 7; Figura 19); a resistência vascular renal também caiu a partir dos 60 minutos, até o final do experimento ($C_{120}=5,48\pm 0,53$; $BiVb_{120}=3,65\pm 0,53$ mmHg/ml.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 7; Figura 20); o fluxo urinário caiu progressivamente a partir dos 60 minutos, nos 90 minutos e ao final ($C_{120}=0,160\pm 0,020$; $BiVb_{120}=0,104\pm 0,023$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 8; Figura 21); o ritmo de filtração glomerular também caiu a partir dos 60 minutos, até o final ($C_{120}=0,697\pm 0,084$; $BiVb_{120}=0,478\pm 0,135$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 8; Figura 22); o percentual de transporte tubular total de sódio caiu a partir dos 60 minutos até o final ($C_{120}=79,76\pm 0,56$; $BiVb_{120}=69,57\pm 4,05\%$) (Tabela 9; Figura 23); como também o percentual de transporte proximal de sódio no mesmo período, ($C_{120}=74,94\pm 3,41$; $BiVb_{120}=62,34\pm 4,52\%$) (Tabela 9; Figura 24); a absorção de potássio não sofreu alterações significativas (Tabela 10; Figura 25; 26).

TABELA 4: Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Tempo	Controle		Veneno		Controle		Veneno	
	PP (mmHg)		PP (mmHg)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	108,40	5,70	5,39	0,48	5,50	0,59
60	108,27	4,88	86,70*	7,50	5,57	0,49	4,30*	0,50
90	108,69	5,09	51,10 *	5,50	5,32	0,57	2,61 *	0,40
120	110,28	3,69	71,80*	7,60	5,48	0,53	3,65 *	0,53

Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal.

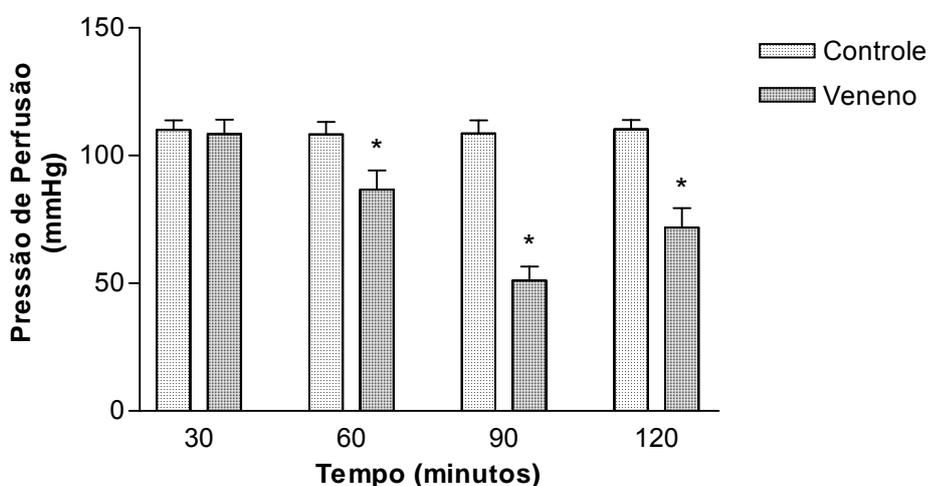


FIGURA 19: Pressão de perfusão, em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Dados em média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

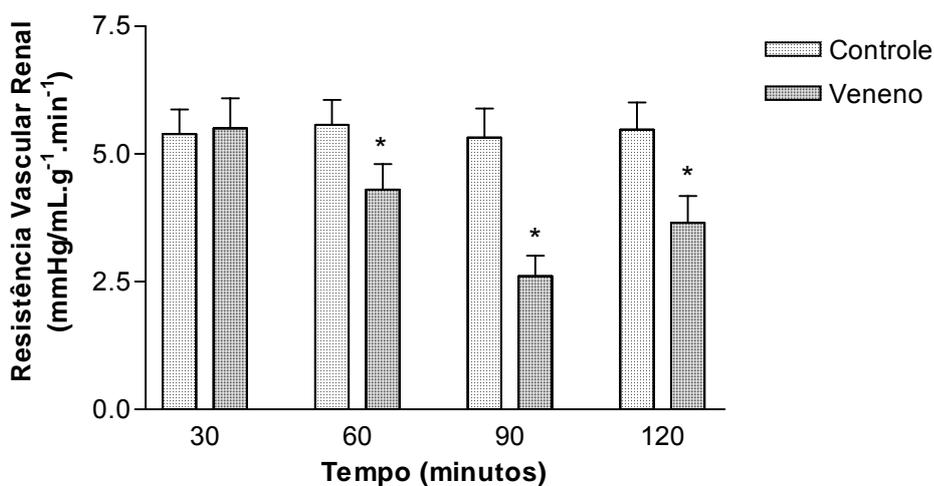


FIGURA 20: Resistência vascular renal, em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Dados em média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 5: Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Tempo	Controle		Veneno		Controle		Veneno	
	F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	Média	e.p.m.	Média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,139	0,009	0,148	0,004	0,701	0,073	0,654	0,043
60	0,158	0,015	0,064 *	0,015	0,707	0,051	0,287 *	0,077
90	0,164	0,024	0,042 *	0,008	0,633	0,051	0,147 *	0,031
120	0,160	0,020	0,104 *	0,023	0,697	0,084	0,478 *	0,135

Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). * = Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

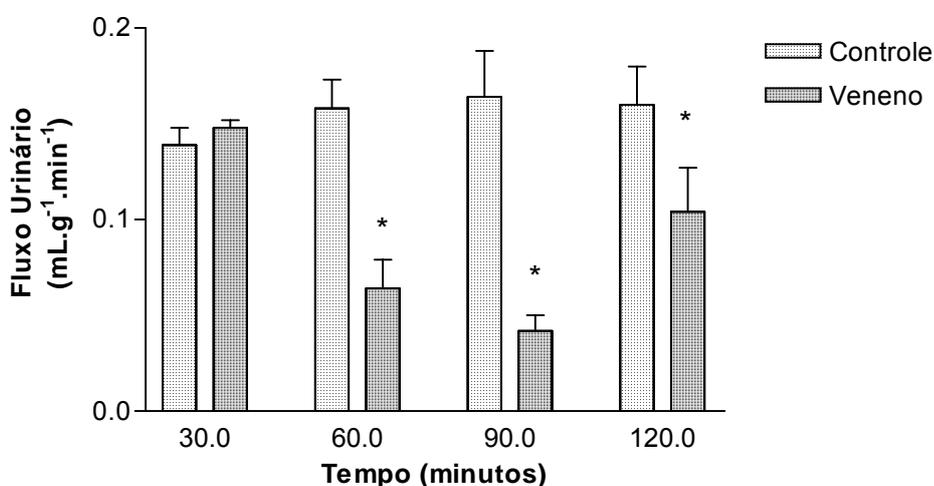


FIGURA 21: Fluxo urinário, em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Dados em média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

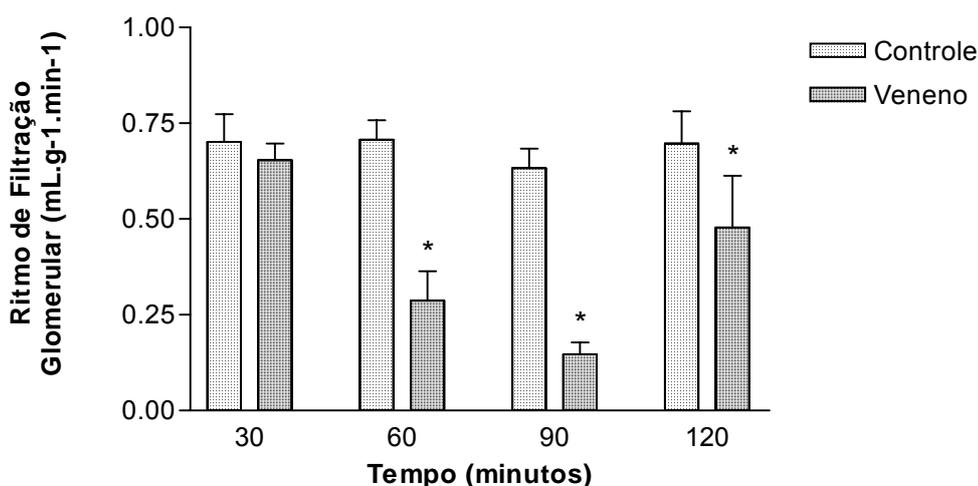


FIGURA 22: Ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL).

Dados em média \pm EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 6: Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio no rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % T Na ⁺		Veneno % T Na ⁺		Controle % pT Na ⁺		Veneno % pT Na ⁺	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	82,27	0,99	75,65	1,42	77,57	0,96
60	81,11	1,52	76,28*	3,19	74,69	0,99	69,09*	3,73
90	79,26	0,90	72,52 *	2,91	73,84	2,64	64,66 *	3,22
120	79,76	0,56	69,57 *	4,05	74,94	3,41	62,34 *	4,52

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TNa⁺=percentual de transporte total de sódio; %pTNa⁺=percentual de transporte proximal de sódio.

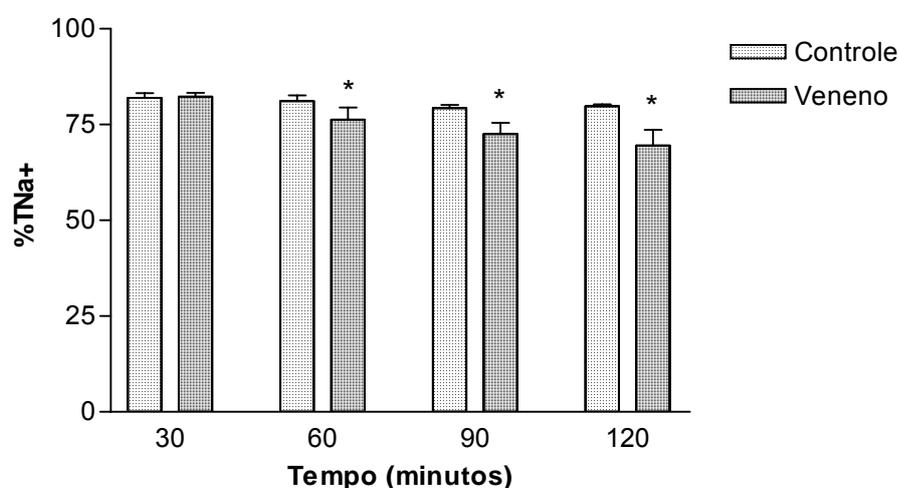


FIGURA 23: Percentual de transporte total de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

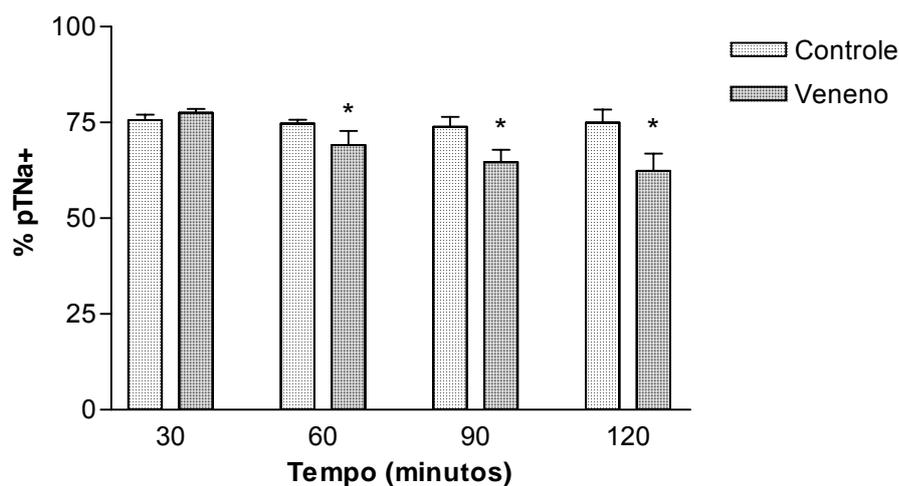


FIGURA 24: Percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 7: Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de potássio no rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Veneno		Controle		Veneno	
	% TK ⁺		% TK ⁺		%pTK ⁺		%pTK ⁺	
min.	Média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	69,13	4,14	69,64	1,42	64,50	4,74	67,94	2,01
60	69,04	5,68	64,88	3,99	62,71	4,08	61,69	4,60
90	71,84	4,21	67,67	2,34	64,27	6,12	63,81	2,75
120	69,94	6,86	67,76	3,93	61,83	5,62	64,53	4,43

Dados apresentados por média±EPM(p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TK⁺=percentual de transporte total, potássio; %pTK⁺=percentual de transporte proximal de potássio.

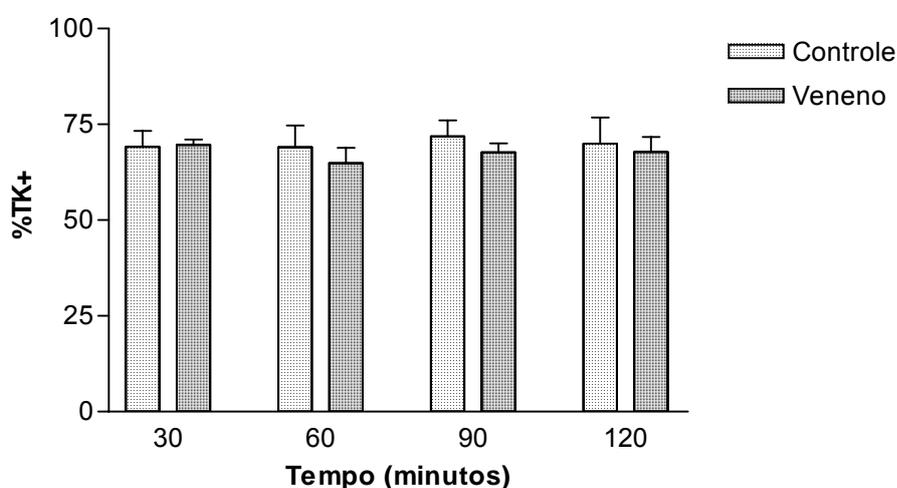


FIGURA 25: Percentual de transporte total de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05).

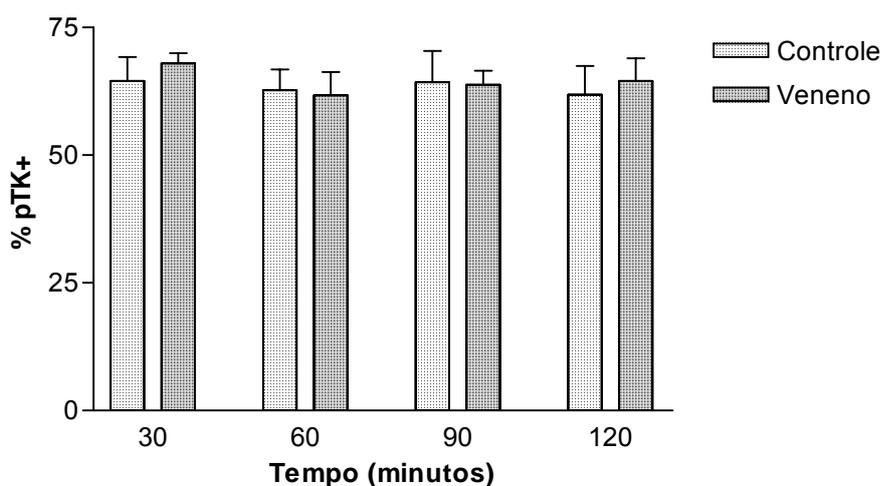


FIGURA 26: Percentual de transporte proximal de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05).

TABELA 8: Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de cloreto no rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Veneno		Controle		Veneno	
	% T Cl ⁻		% T Cl ⁻		% pT Cl ⁻		% pT Cl ⁻	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	79,90	1,03	78,87	1,36	76,81	1,25	76,17	1,13
60	81,25	2,44	73,71*	3,41	78,49	2,90	68,52*	4,05
90	77,32	2,22	64,49 *	4,87	76,58	1,20	58,63 *	5,21
120	78,53	2,33	68,98 *	4,14	76,36	2,47	63,75 *	4,61

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TCl⁻= percentual de transporte total de cloreto; %pTCl⁻= percentual de transporte proximal de cloreto.

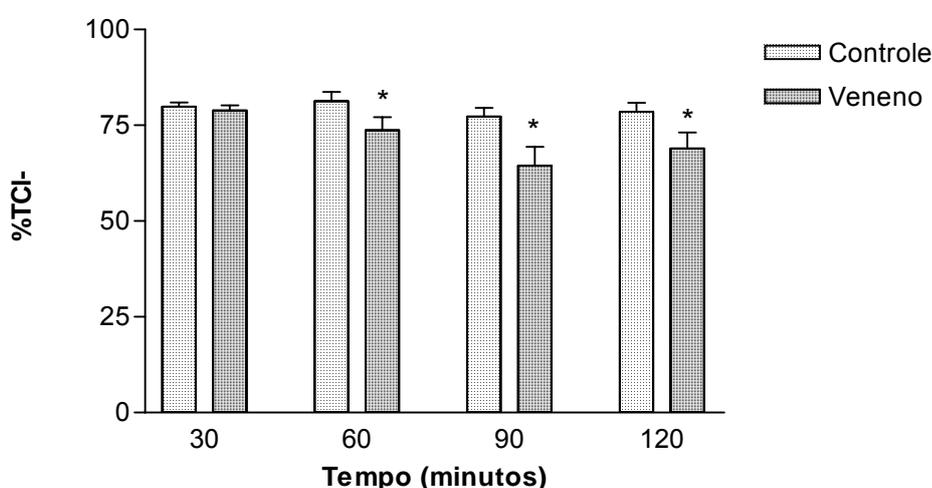


FIGURA 27: Percentual de transporte total de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis*, na concentração de 10µg/mL.

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

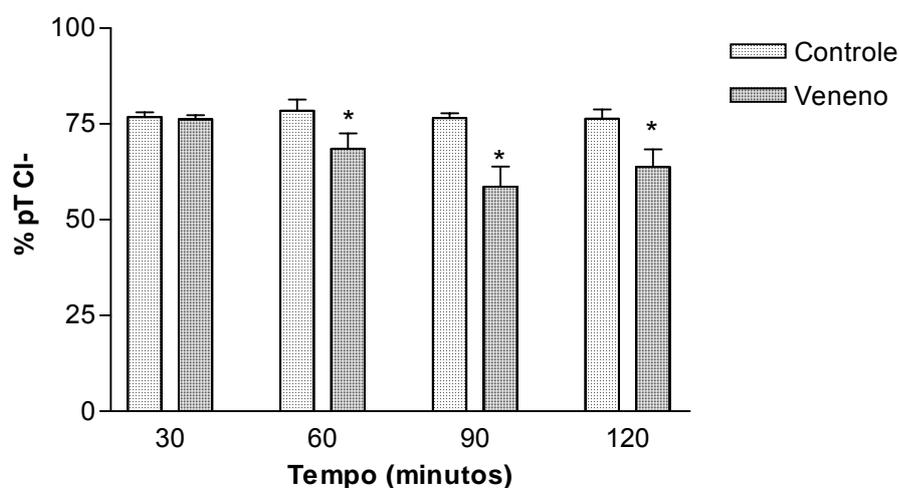


FIGURA 28: Percentual de transporte proximal de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 9: Parâmetros do clearance osmótico no rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Veneno	
	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	Epm	média	e.p.m.
30	0,120	0,02	0,136	0,01
60	0,121	0,02	0,056*	0,02
90	0,142	0,01	0,036*	0,01
120	0,125	0,01	0,090*	0,02

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. C. osm= Clearance osmótico.

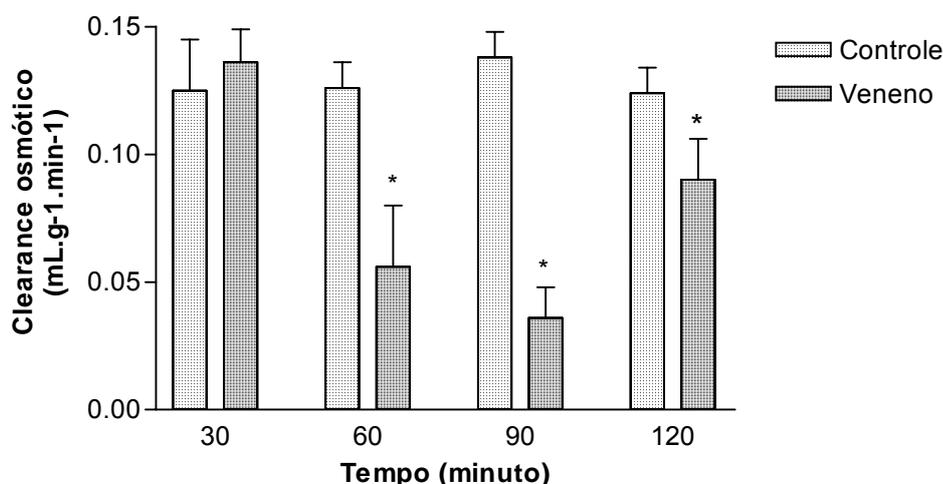


FIGURA 29: Parâmetros do clearance osmótico em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

O percentual de cloreto total transportado foi reduzido a partir dos 60 minutos, até o final aos 120 minutos ($C_{120}=78,53\pm 2,33$; $BiVb_{120}=68,98\pm 4,14\%$) (Tabela 11; Figura 27); o percentual de cloreto proximal transportado também foi reduzido progressivamente a partir dos 60 até os 120 minutos ($C_{120}=76,36\pm 2,47$; $BiVb_{120}=63,75\pm 4,61\%$) (Tabela 11; Figura 28); e o clearance osmótico foi reduzido aos 60 e 90 minutos ($C_{90}=0,14\pm 0,01$; $BiVb_{90}=0,04\pm 0,01\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (Tabela 12; Figura 29).

5.1.2.1.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

No grupo controle, os rins apresentavam focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células de revestimento tubular no córtex renal, discreta deposição intratubular de material proteináceo; glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades (Figura 17).

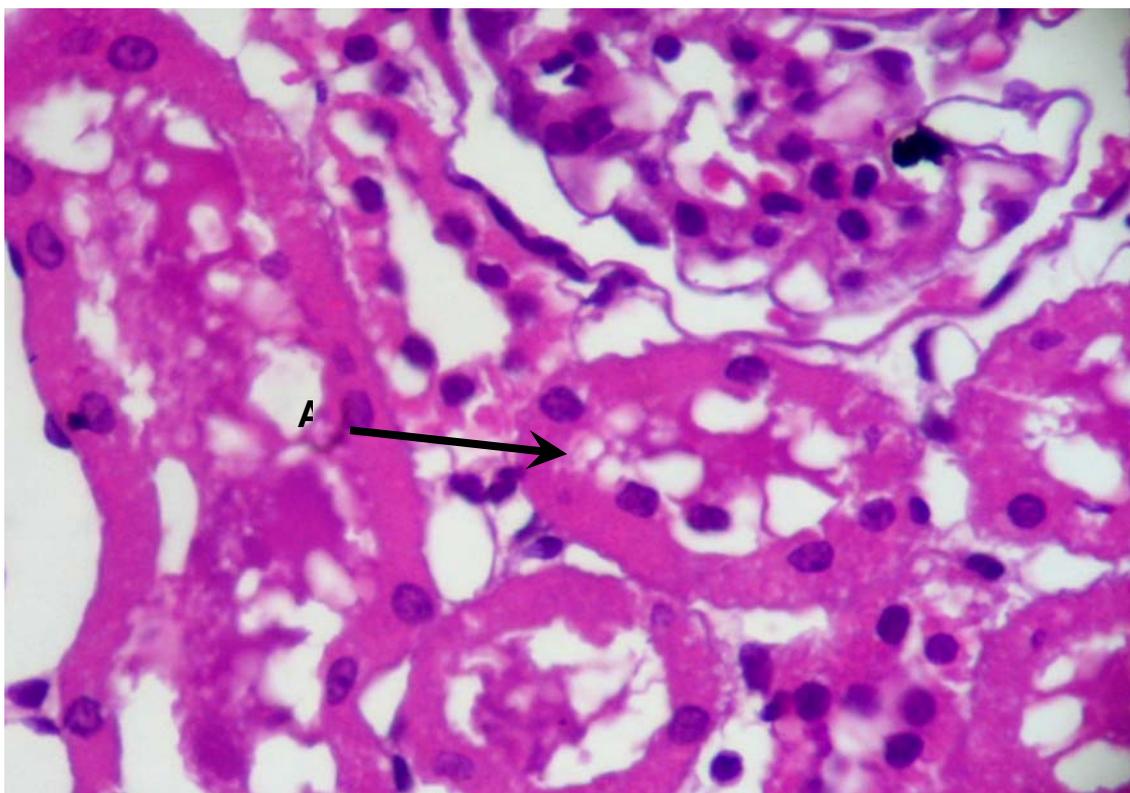


FIGURA 30: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). (A) Balonização de células tubulares proximais. (HE), (20x).

No grupo tratado com o veneno da serpente *Bothrops insularis* foram observados extensos fenômenos degenerativos representados por balonização hidrópica com vacuolização citoplasmática das células de revestimento tubular proximal e descontinuidade de sua borda em escova (Figura 30); áreas focais corticais apresentando células de núcleos picnóticos com condensação da cromatina e fragmentados característicos de necrose tubular aguda, que apresenta o mesmo aspecto morfológico de apoptose (Figura 31); deposição proteinácea acentuada nos túbulos. Glomérulos, interstício e vasos normais.

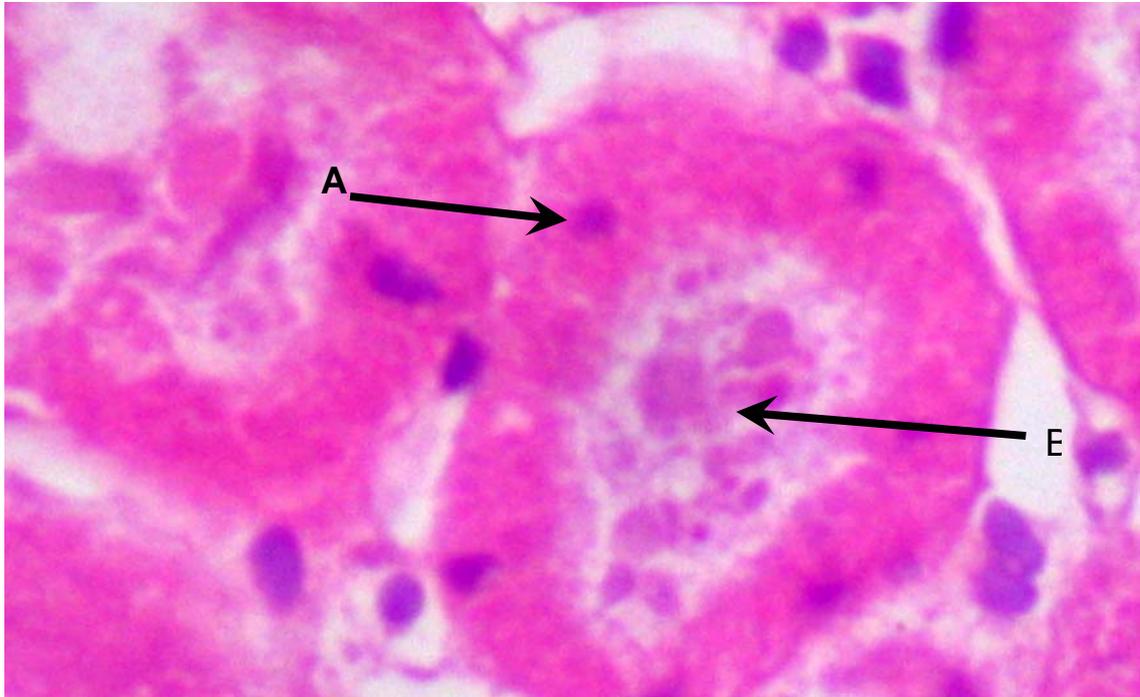


FIGURA 31: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Necrose tubular aguda, com aspecto morfológico igual ao da apoptose (A), e depósito proteináceo intratubular (B). (HE). (40x).

5.1.2.2 Alterações induzidas pela fração lectina extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Foram estudados dois aspectos das alterações renais provocadas pela fração lectina extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato, as alterações fisiológicas e as alterações histopatológicas.

5.1.2.2.1 Alterações fisiológicas induzidas pela fração lectina extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de Rato

Os rins tratados com a fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (BiL), apresentaram uma resposta marcante, porém variada. A pressão de perfusão sofreu uma elevação inicial com queda posterior (Tabela 13); os parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, caíram progressivamente (Tabela 14). Aumentou a reabsorção eletrólitos como o sódio (Tabela 15) e o potássio (Tabela 16), mas a do cloreto não se alterou significativamente (Tabela 17), e diminuiu o clearance osmótico (Tabela 18).

O grupo em que o rim foi tratado com a lectina apresentou um aumento inicial da pressão de perfusão ($C_{60}=108,27\pm 4,9$; $BiLc_{60}=112,9\pm 5,4$ mmHg) com queda aos 120 minutos ($C_{120}=110,28 \pm 3,69$; $BiLc_{120}=100,03\pm 5,19$ mmHg), (Tabela 13; Figura 32); a resistência vascular renal aumentou aos 60 minutos mas sem significância estatística (Tabela 13; Figura 33); o fluxo urinário caiu progressivamente a partir dos 90 minutos ($C_{120}=0,160\pm 0,020$; $BiLc_{120}=0,082\pm 0,008$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 14; Figura 34); o ritmo de filtração glomerular caiu no final ($C_{120}=0,697\pm 0,084$; $BiLc_{120}=0,394\pm 0,063$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 14; Figura 35); o percentual de transporte tubular total de sódio aumentou aos 90 minutos ($C_{90}=79,26\pm 0,90$; $BiLc_{90}=83,08\pm 2,04\%$) (Tabela 15; Figura 36); o percentual de transporte proximal de sódio aumentou aos 60 e 90 minutos ($C_{90}=73,84\pm 2,64$; $BiLc_{90}=79,75\pm 2,42\%$) (Tabela 15; Figura 37); o transporte total de potássio ($C_{120}=69,94\pm 3,16$; $BiLc_{120}=74,91\pm 1,74$ %) (Tabela 16; Figura 38) e o percentual de potássio proximal reabsorvido ($C_{120}=61,83\pm 5,62$; $BiLc_{120}=70,99\pm 3,06\%$) aumentaram ao final do experimento (Tabela 16; Figura 39); e houve diminuição do clearance osmótico aos 120 min ($C_{120}=0,13\pm 0,01$; $BiLc_{120}=0,07 \pm 0,01$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 18; Figura 42). O transporte de cloreto não sofreu alterações (Tabela 17; Figura 40, 41).

TABELA 10: Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Lectina		Controle		Lectina	
	PP (mmHg)		PP (mmHg)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	110,53	3,82	5,15	0,49	5,29	0,47
60	108,27	4,88	122,03*	5,24	5,38	0,51	6,01	0,57
90	108,69	5,09	112,87	5,41	5,36	0,59	5,57	0,54
120	110,28	3,69	100,03*	5,19	5,20	0,47	5,08	0,63

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal.

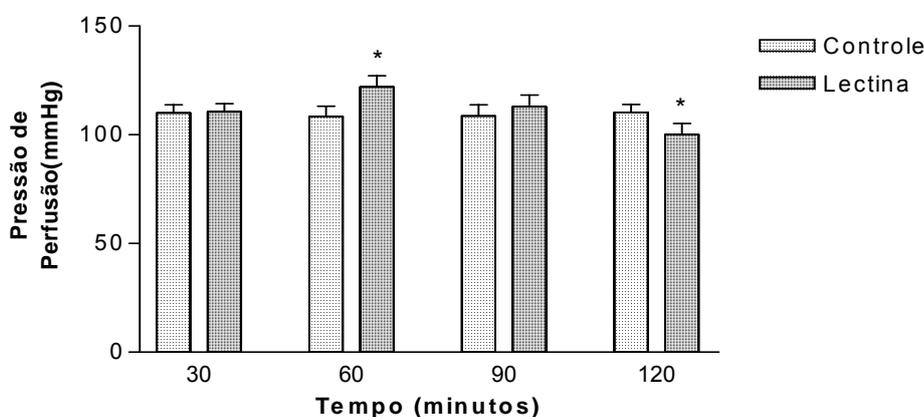


FIGURA 32: Pressão de perfusão em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

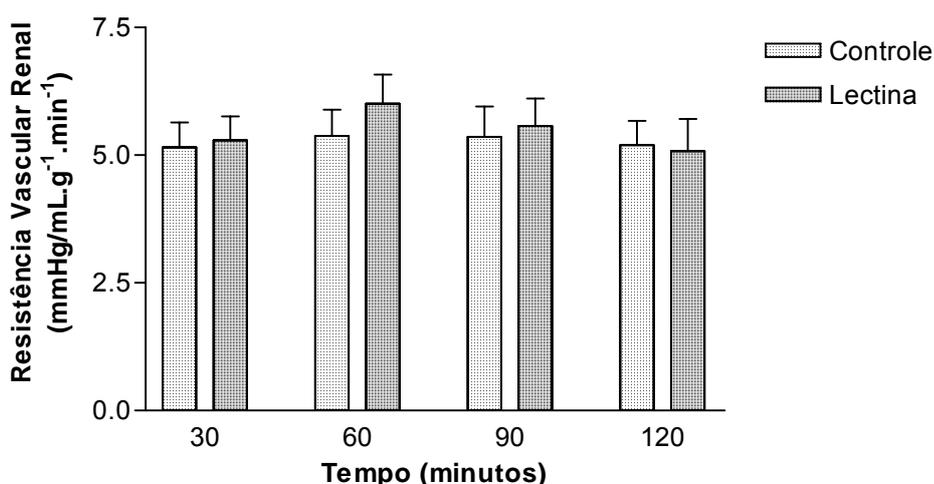


FIGURA 33: Resistência vascular renal em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05).

TABELA 11: Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle F.U		Lectina F.U		Controle R.F.G		Lectina R.F.G.	
	(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,139	0,009	0,145	0,006	0,701	0,073	0,662	0,061
60	0,158	0,015	0,154	0,011	0,707	0,051	0,694	0,057
90	0,164	0,024	0,129 *	0,007	0,633	0,051	0,594	0,038
120	0,160	0,020	0,082 *	0,008	0,697	0,084	0,394 *	0,063

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

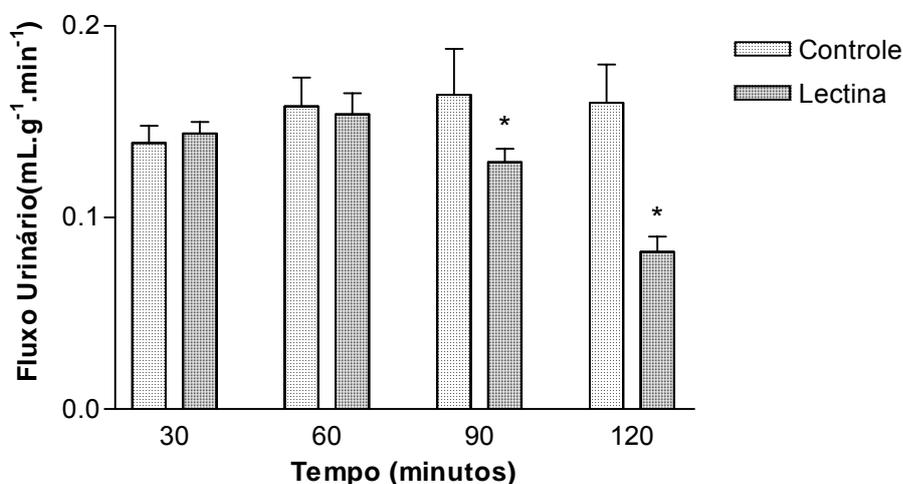


FIGURA 34: Fluxo urinário em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina extraída do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

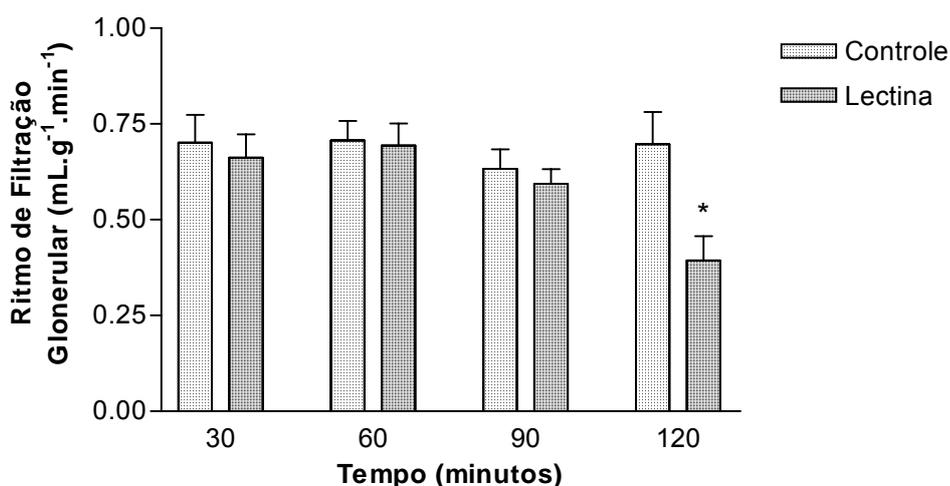


FIGURA 35: Ritmo de filtração glomerular em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 12: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % TNa		Lectina % T Na+		Controle %pTNa		Lectina % pT Na+	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	81,84	1,91	75,65	1,42	78,04	2,45
60	81,11	1,52	82,84	2,01	74,69	0,99	79,41 *	2,47
90	79,26	0,90	83,08 *	2,04	73,84	2,64	79,75 *	2,42
120	79,76	0,56	81,16	2,26	74,94	3,41	77,24	2,50

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TNa⁺= percentual de transporte total de sódio; %pTNa⁺=percentual de transporte proximal de sódio.

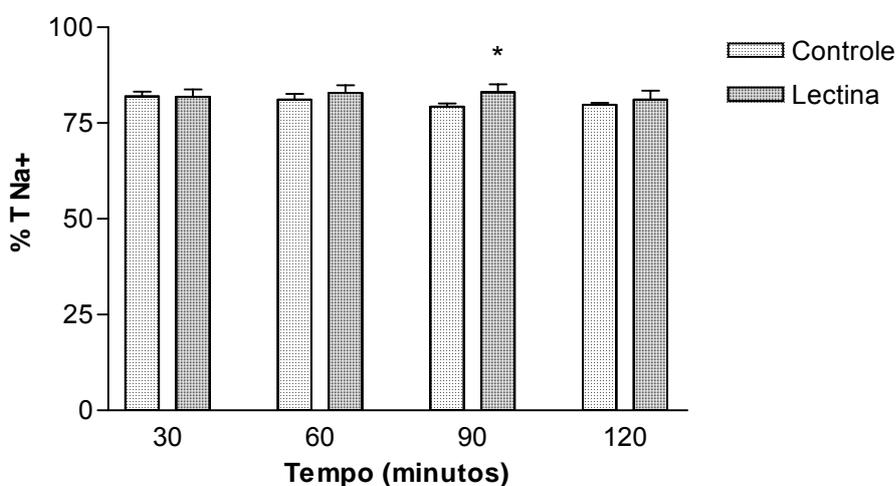


FIGURA 36: Percentual de transporte total de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

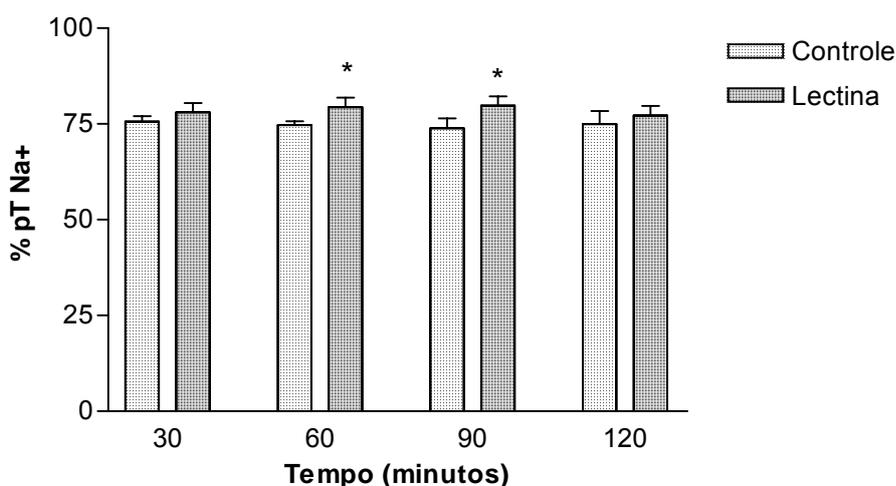


FIGURA 37: Percentual de transporte proximal de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 13: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina extraída do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle %TK		Lectina % T K+		Controle %pTK		Lectina % pT K+	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	69,13	4,14	67,34	3,03	64,50	4,74	63,54	3,51
60	69,04	5,68	70,52	2,24	62,71	4,08	67,09	2,74
90	71,84	4,21	72,37	2,14	64,27	6,12	69,04	2,49
120	69,94	3,16	74,91*	1,74	61,83	5,62	70,99 *	3,06

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TK⁺=percentual de transporte total potássio; %pTK⁺=percentual de transporte proximal de potássio.

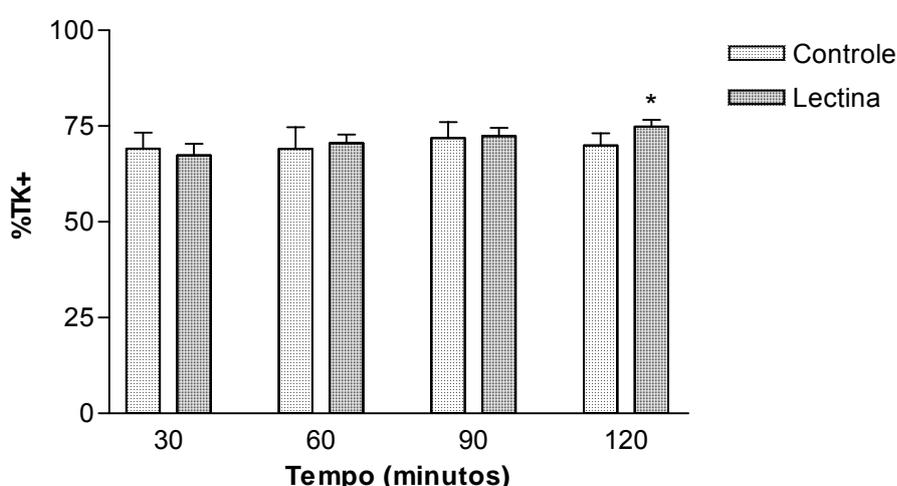


FIGURA 38: Percentual de transporte total de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

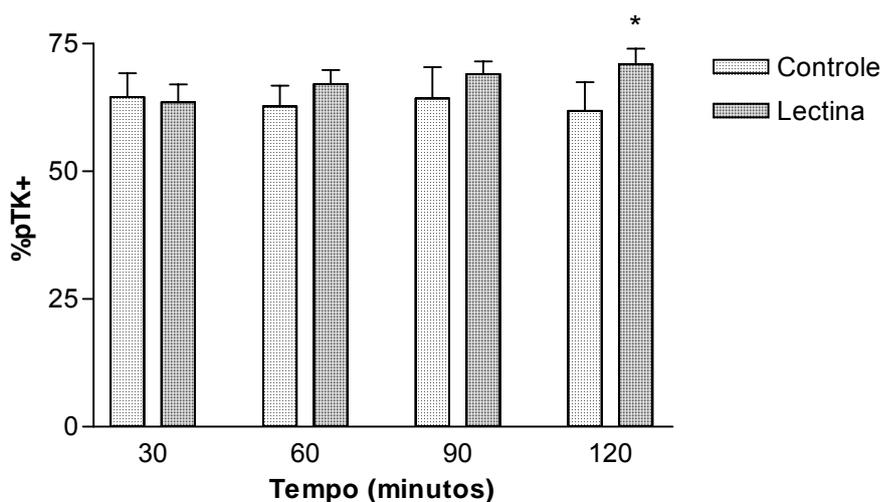


FIGURA 39: Percentual de transporte proximal de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis*, na concentração de 10µg/mL.

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 14: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Lectina		Controle		Lectina	
	%TCI		% T Cl-		%pTCI		% pT Cl-	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	79,90	1,03	78,61	2,20	76,81	1,25	74,82	2,76
60	81,25	2,44	79,84	2,18	78,49	2,90	76,41	2,66
90	77,32	2,22	80,09	2,16	76,58	1,20	76,76	2,54
120	78,53	2,33	78,72	2,35	76,36	2,47	74,80	2,80

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05.
%TCI= percentual de transporte total de cloreto; %pTCI= percentual de transporte proximal de cloreto.

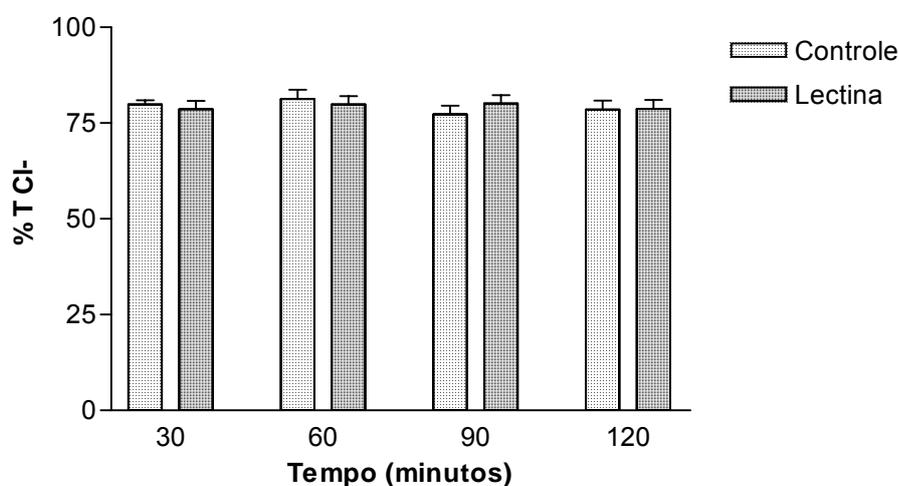


FIGURA 40: Percentual de transporte total de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05).

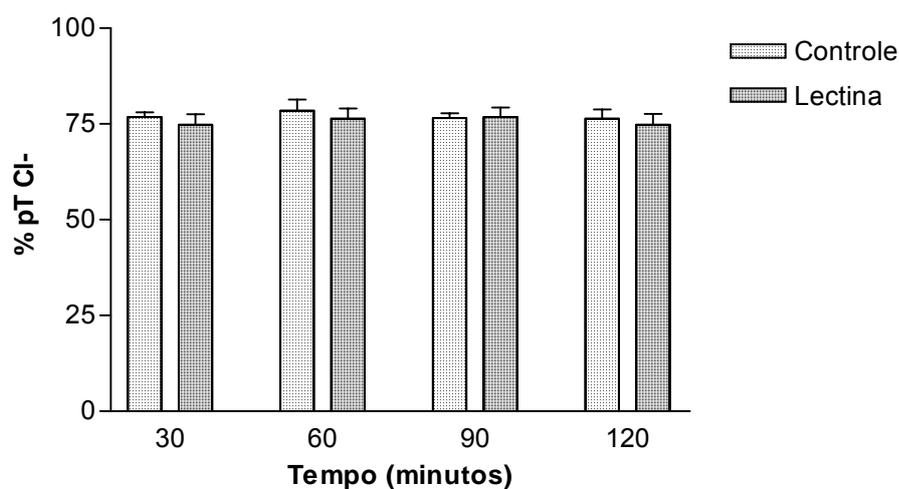


FIGURA 41: Percentual de transporte proximal de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração lectina do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05).

TABELA 15: Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6) sob efeito da fração lectina extraída do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL), aos 30, 60, 90 e 120 minutos.

Tempo	Controle		Lectina	
	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	Média	e.p.m.
30	0,12	0,02	0,12	0,01
60	0,12	0,01	0,13	0,01
90	0,14	0,01	0,10	0,01
120	0,13	0,01	0,07 *	0,01

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).

* = Diferença estatisticamente significativa para p<0,05.

C. osm.= Clearance osmótico.

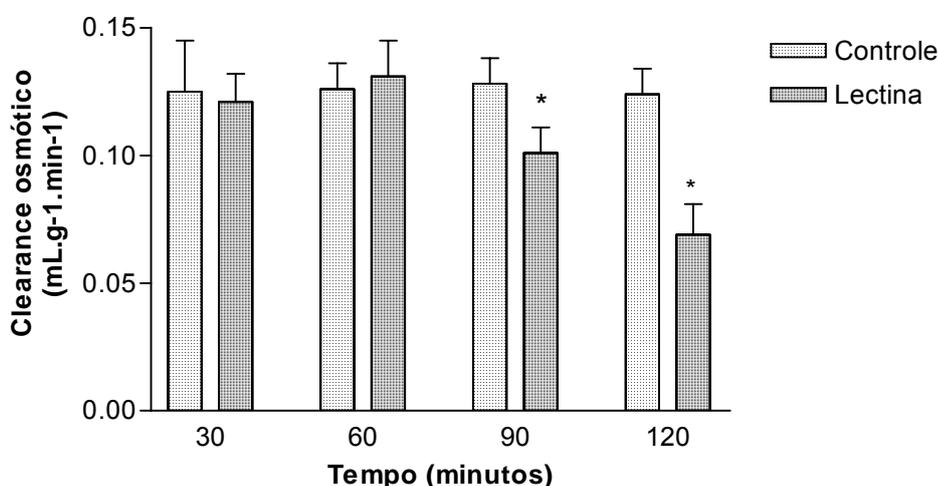


FIGURA 42: Parâmetros do clearance osmótico (C. osm.) em rim isolado de ratos Wistar (n=6) na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis*, na concentração de 10µg/mL.

Dados apresentados por média ± EPM (p<0,05). *=diferença estatisticamente significativa do controle.

5.1.2.2.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela fração lectina extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

No grupo controle, os rins apresentavam focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células de revestimento tubular, discreta deposição intratubular proximal de material proteináceo; glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades (Figura 17).

No grupo tratado com a fração lectina extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis* foram observados fenômenos degenerativos representados por balonização hidrópica com vacuolização citoplasmática extensa e descontinuidade da borda em escova das células de revestimento tubular proximal (Figura 43); descamação necróticas de células de revestimento tubular proximal para a luz; deposição proteinácea acentuada nos túbulos proximais e distais (Figura 44); áreas focais corticais apresentando células de núcleos fragmentados sugestivos de necrose tubular aguda (Figura 45); extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman dos glomérulos de aspecto crescêntico (Figura 43). Algum grau de extravasamento foi observado em 36% dos 129 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40x) por lâmina. Interstício e vasos normais.

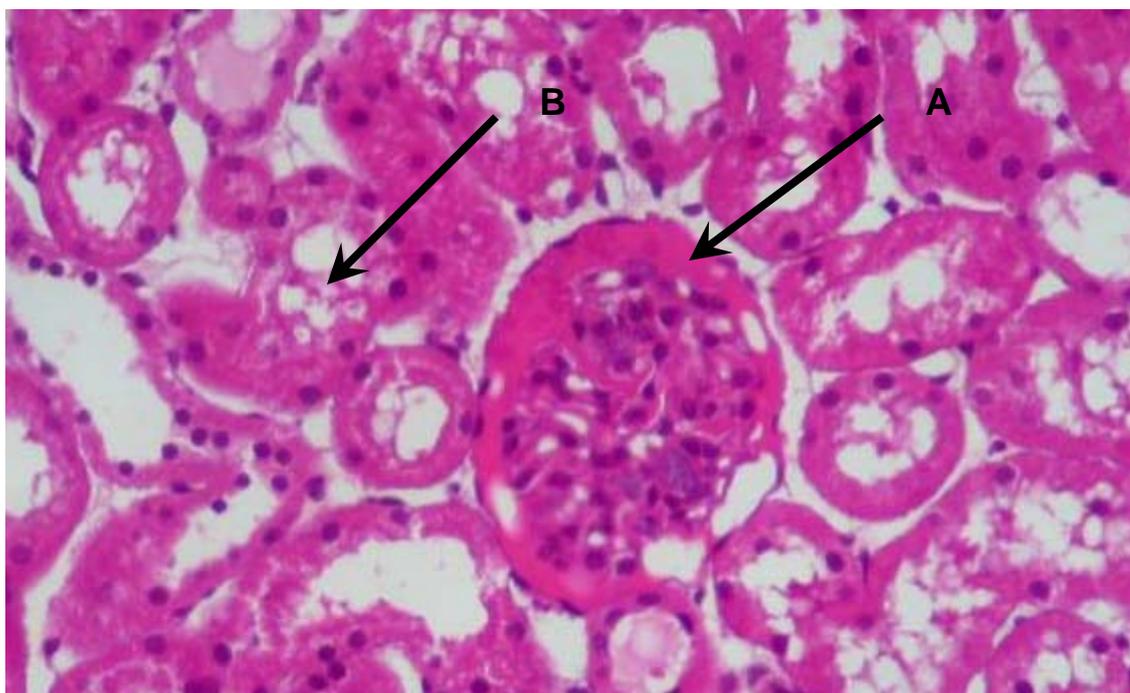


FIGURA 43: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Material proteináceo no espaço de Bowman (A), balonização das células tubulares e deposição proteinácea na luz (B). (HE), (20x).

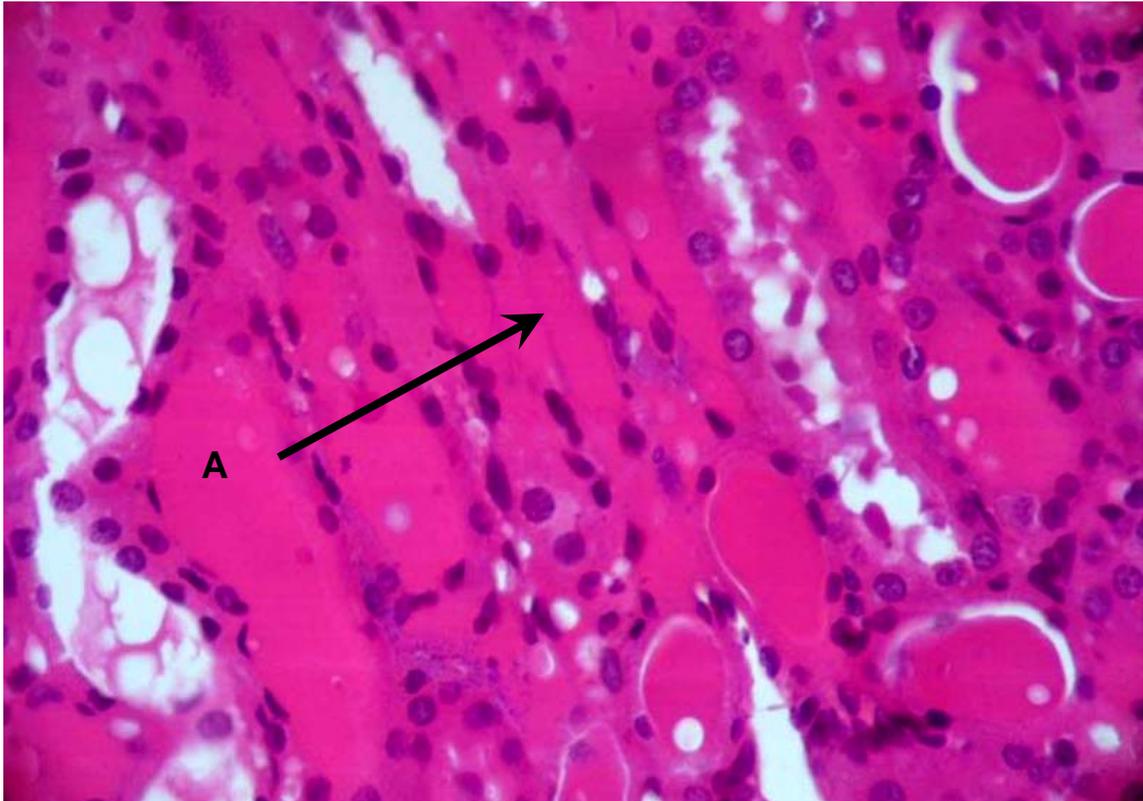


FIGURA 44: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Depósito proteináceo nos túbulos distais (A). (HE), (40x).

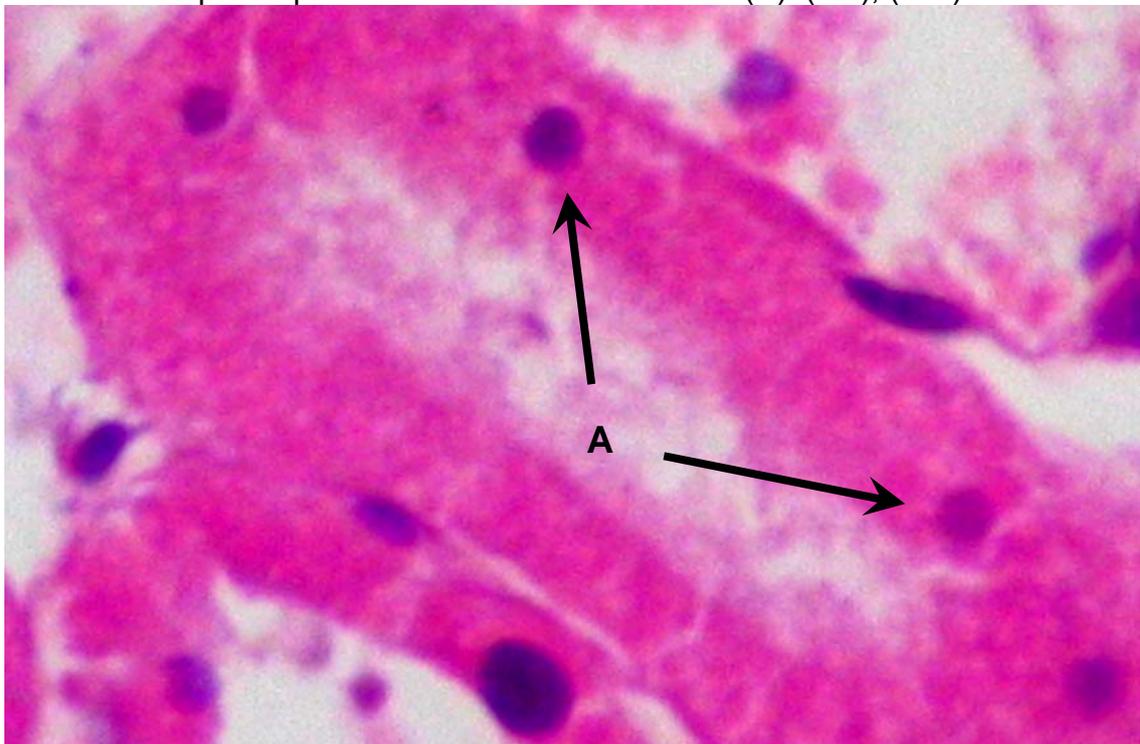


FIGURA 45: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da lectina do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Necrose tubular aguda (A). (HE), (40x).

5.1.2.3 Alterações induzidas pela fração L-aminoácido-oxidase (LAAO) extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Foram estudados dois aspectos das alterações renais provocadas pela fração com atividade L-aminoácido-oxidase extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato; as alterações fisiológicas e as alterações histopatológicas.

5.1.2.3.1 Alterações fisiológicas induzidas pela fração L-aminoácido-oxidase (LAAO) extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Os rins foram tratados com a L-aminoácido-oxidase extraída do veneno de *Bothrops insularis* (BiLA) apresentaram queda em todos os parâmetros avaliados. Na pressão de perfusão e resistência vascular renal (Tabela 19); no fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular (Tabela 20). No transporte sódio (Tabela 21); de potássio, (Tabela 22); de cloreto (Tabela 23); e no clearance osmótico (Tabela 24).

O grupo em que o rim foi tratado com a BiLA apresentou um diminuição da pressão de perfusão aos 90 e aos 120 minutos ($C_{120}=110,28\pm 3,69$; $BiLA_{120}=82,2\pm 5,6$ mmHg) (Tabela 19; Figura 46); da resistência vascular renal no final ($C_{120}=5,48\pm 0,53$; $BiLA_{120}=4,12\pm 0,42$ mmHg/ml.g⁻¹.min⁻¹), (Tabela 19; Figura 47); o fluxo urinário caiu progressivamente a partir dos 60 minutos até o final ($C_{120}=0,160\pm 0,020$; $BiLA_{120}=0,064\pm 0,012$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 20; Figura 48); o ritmo de filtração glomerular caiu a partir dos 90 minutos até o final ($C_{120}=0,697\pm 0,084$; $BiLA_{120}=0,176\pm 0,017$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 20; Figura 49); o percentual de transporte tubular total de sódio caiu aos 120 minutos ($C_{120}=79,76\pm 0,56$; $BiLA_{120}=65,39\pm 6,19\%$) (Tabela 21; Figura 50).

TABELA 16: Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase (LAAO) do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		LAAO		Controle RVR- mmHg/.mL.g ⁻¹ .min ⁻¹		LAAO RVR- mmHg/.mL.g ⁻¹ .min ⁻¹	
	PP (mmHg)		PP (mmHg)					
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	108,02	1,56	5,15	0,49	5,27	0,35
60	108,27	4,88	107,19	3,08	5,38	0,51	5,20	0,29
90	108,69	5,09	97,10*	1,70	5,36	0,59	4,72	0,29
120	110,28	3,69	82,19*	5,58	5,20	0,47	4,02*	0,42

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal.

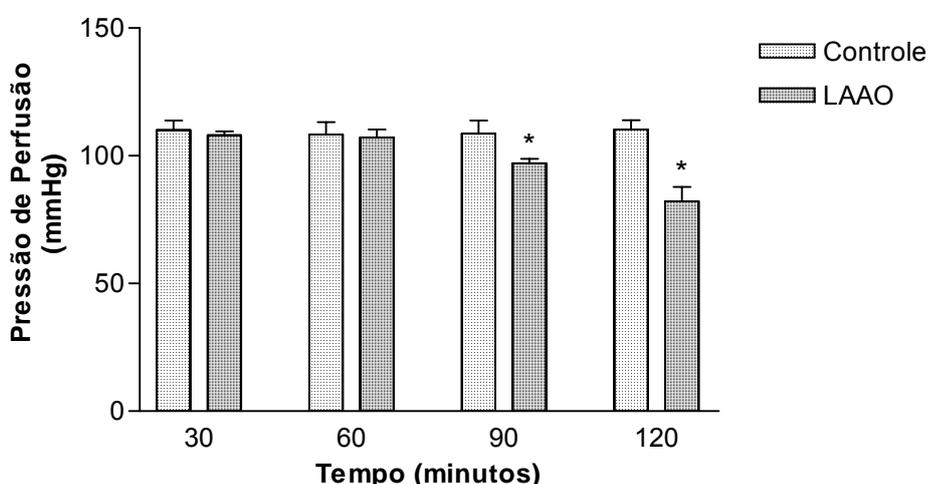


FIGURA 46: Pressão de perfusão em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

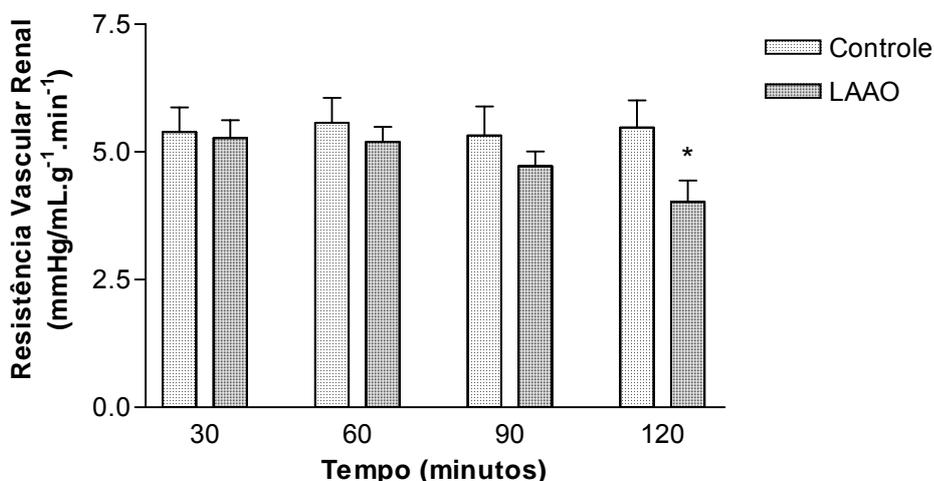


FIGURA 47: Resistência vascular renal em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 17: Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		LAAO		Controle		LAAO	
	F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,139	0,009	0,146	0,007	0,701	0,073	0,658	0,070
60	0,158	0,015	0,129*	0,005	0,707	0,051	0,678	0,083
90	0,164	0,024	0,087*	0,012	0,633	0,051	0,337*	0,057
120	0,160	0,020	0,064*	0,012	0,697	0,084	0,176*	0,017

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

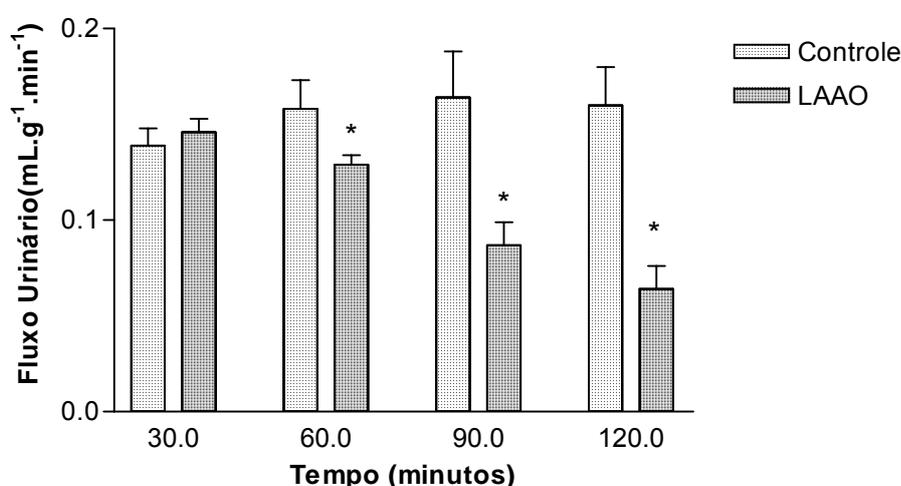


FIGURA 48: Fluxo urinário em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

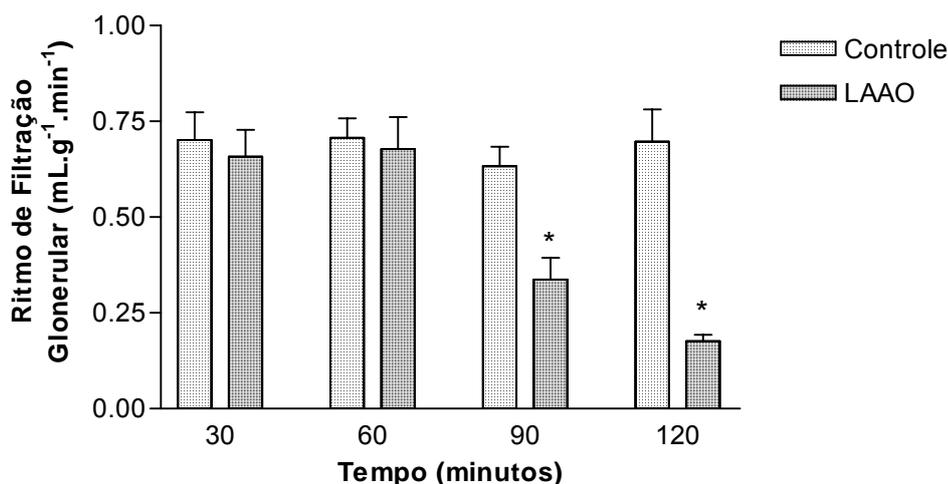


FIGURA 49: Ritmo de filtração glomerular em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 18: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % T Na ⁺		LAAO % T Na ⁺		Controle % pT Na ⁺		LAAO % pT Na ⁺	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	83,71	1,97	75,65	1,42	77,90	2,47
60	81,11	1,52	86,15	3,54	74,69	2,99	81,32	4,19
90	79,26	0,90	74,99	5,55	73,84	2,64	68,35	6,52
120	79,76	0,56	65,39*	6,19	74,94	3,41	58,62*	6,86

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TNa⁺= percentual de transporte total de sódio; %pTNa⁺=percentual de transporte proximal de sódio.

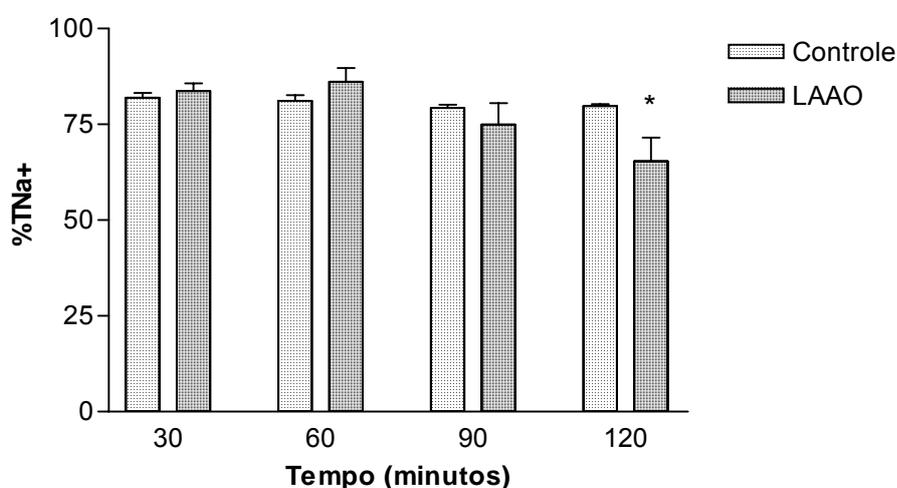


FIGURA 50: Percentual de transporte total de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

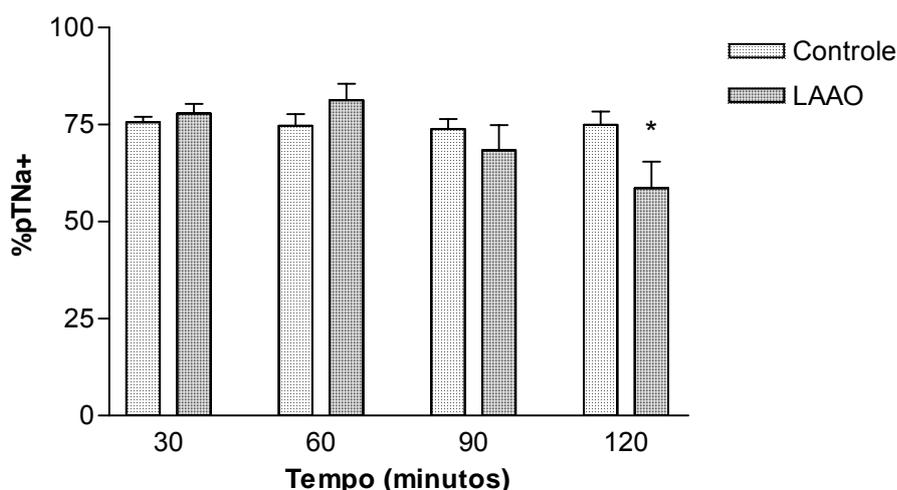


FIGURA 51: Percentual de transporte proximal de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 19 - Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		LAAO		Controle		LAAO	
	% TK ⁺		% TK ⁺		%pTK ⁺		% pT K ⁺	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	69,13	4,14	72,96	2,26	64,50	4,74	69,14	2,76
60	69,04	5,68	70,78	2,50	62,71	4,08	67,95	2,66
90	71,84	4,21	57,17*	5,79	64,27	6,12	49,39*	4,75
120	69,94	6,86	60,26*	2,24	61,83	5,62	51,59*	2,97

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TK⁺=percentual de transporte total, potássio; %pTK⁺=percentual de transporte proximal de potássio.

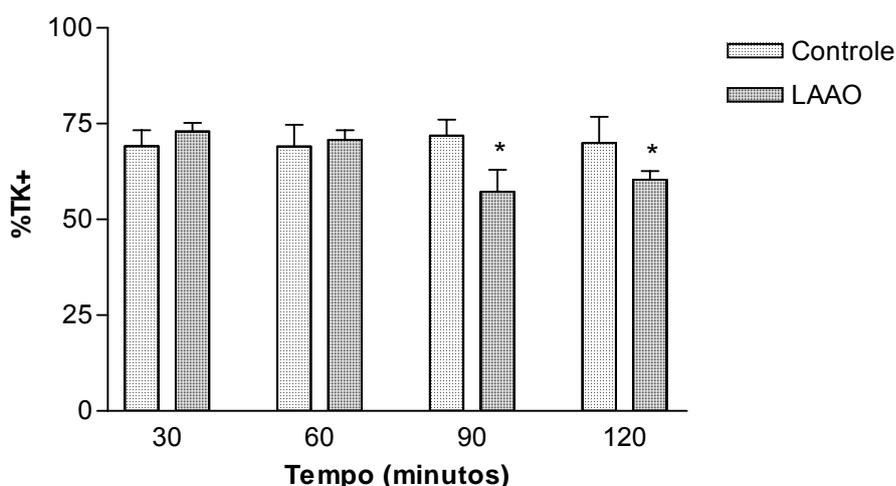


FIGURA 52: Percentual de transporte total de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

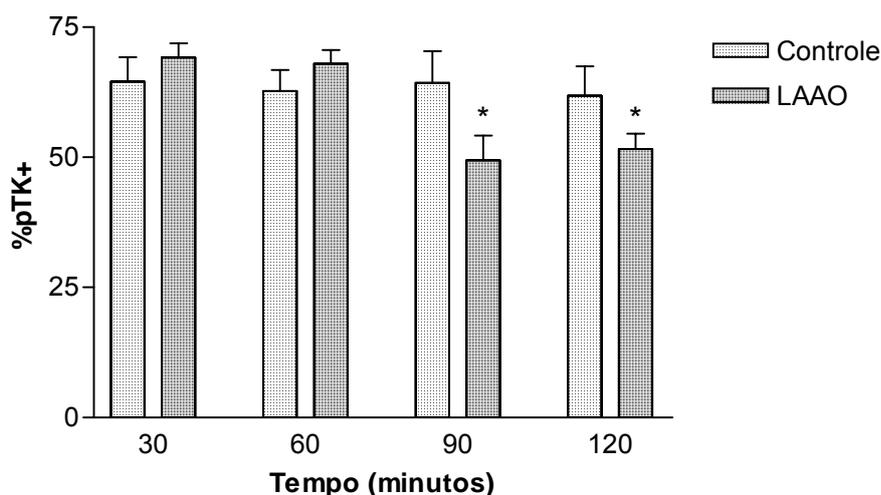


FIGURA 53: Percentual de transporte proximal de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 20: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle %TCI ⁻		LAAO % T Cl ⁻		Controle %pTCI ⁻		LAAO % pT Cl ⁻	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	79,90	1,03	81,60	2,17	76,81	1,25	77,79	2,67
60	81,25	2,44	84,24	1,12	78,49	2,90	81,40	1,34
90	77,32	2,22	72,98	6,04	76,58	1,20	68,34	7,00
120	78,53	2,33	64,58*	6,68	76,36	2,47	59,81*	7,36

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TCI⁻= percentual de transporte total de cloreto; %pTCI⁻= percentual de transporte proximal de cloreto.

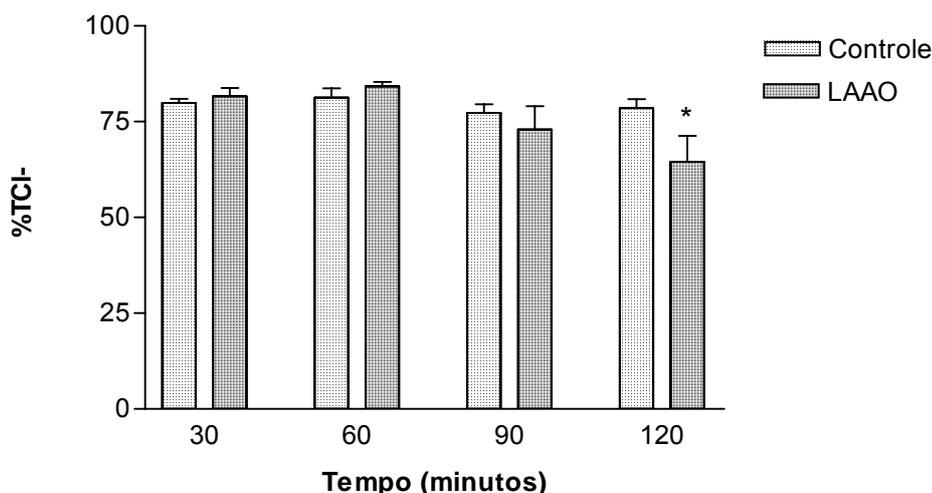


FIGURA 54: Percentual de transporte total de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

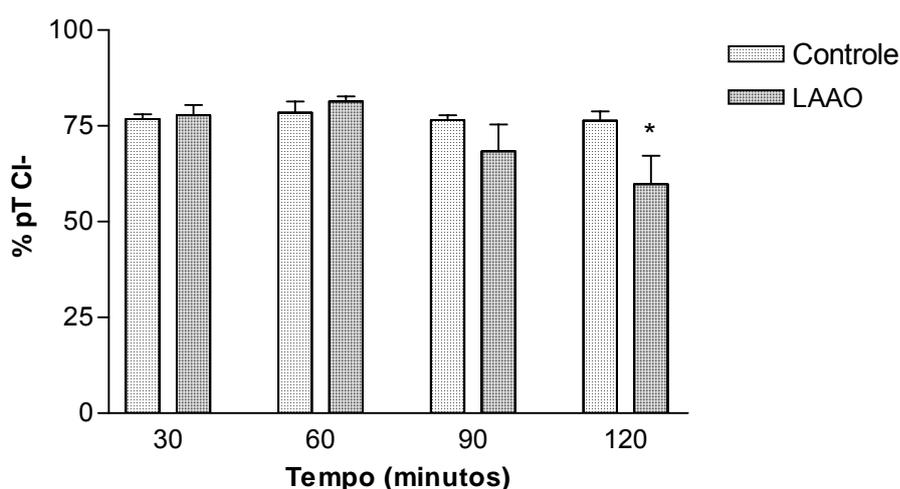


FIGURA 55: Percentual de transporte proximal de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 21: Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da L-aminoácido-oxidase do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		LAAO	
	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	Média	e.p.m.
30	0,120	0,02	0,124	0,01
60	0,121	0,02	0,111	0,01
90	0,142	0,01	0,074*	0,02
120	0,125	0,02	0,056*	0,02

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. C. osm.= Clearance osmótico

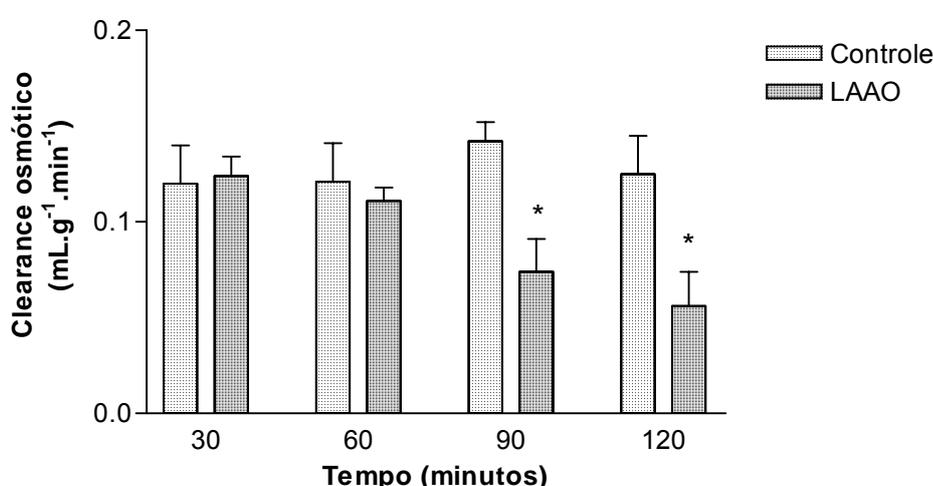


FIGURA 56: Parâmetros do clearance osmótico em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

O percentual de transporte proximal de sódio também caiu aos 120 minutos ($C_{120}=74,94\pm 3,41$; $BiLA_{120}=58,62\pm 6,86\%$) (Tabela 21; Figura 51); ocorreu diminuição do transporte total de potássio a partir dos 90 minutos até o final ($C_{120}= 69,94\pm 6,86$; $BiLA_{120}=60,26\pm 2,24\%$) (Tabela 22; Figura 54), como também do percentual do transporte proximal de potássio ($C_{120}= 61,83\pm 5,62$; $BiLA_{120}=51,59\pm 2,97\%$), (Tabela 22; Figura 55); diminuiu o percentual de cloreto total transportado ao final do experimento ($C_{120}=78,53\pm 2,33$; $BiLA_{120}=64,58\pm 6,68\%$) (Tabela 23; Figura 52), e o percentual de cloreto proximal transportado, também aos 120 minutos ($C_{120}=76,36\pm 2,47$; $BiLA_{120}=59,81\pm 7,36\%$) (Tabela 23; Figura 53); e o clearance osmótico caiu a partir dos 90 minutos até o final ($C_{120}=0,13\pm 0,02$; $BiLA_{120}=0,06\pm 0,02$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 24; Figura 56).

5.1.2.3.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela fração com atividade L-aminoácido-oxidase extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

No grupo controle, os rins apresentavam focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células de revestimento tubular; discreta deposição intratubular proximal de material proteináceo; glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades (Tabela 21).

No grupo tratado com a fração LAAO do veneno da serpente *Bothrops insularis* foram observados focos de necrose tubular aguda, que tem o mesmo aspecto morfológico de apoptose, mais evidentes na cortical, com núcleos picnóticos de cromatina condensada e fragmentada (Figura 57); fenômenos degenerativos reversíveis representados por balonização hidrópica com vacuolização citoplasmática extensa e descontinuidade da borda em escova das células do revestimento tubular proximal com descamação necrótica destas células para a luz tubular; deposição proteinácea acentuada nos túbulos proximais e distais (Figura 58).

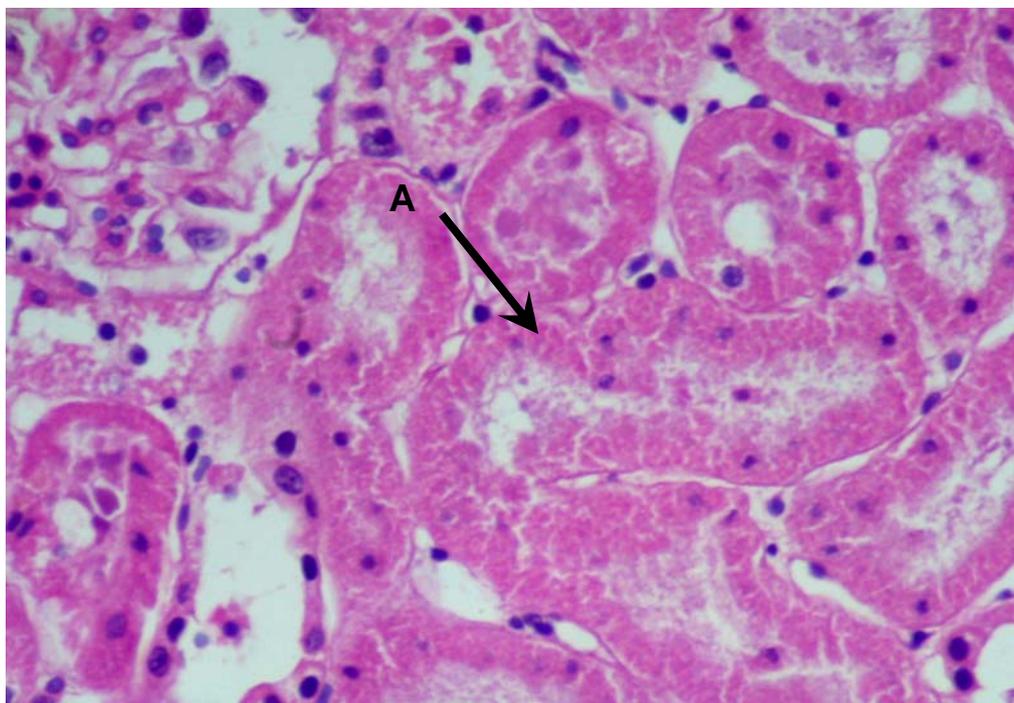


FIGURA 57: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Focos de necrose tubular aguda e apoptose (A). (HE), (20x).

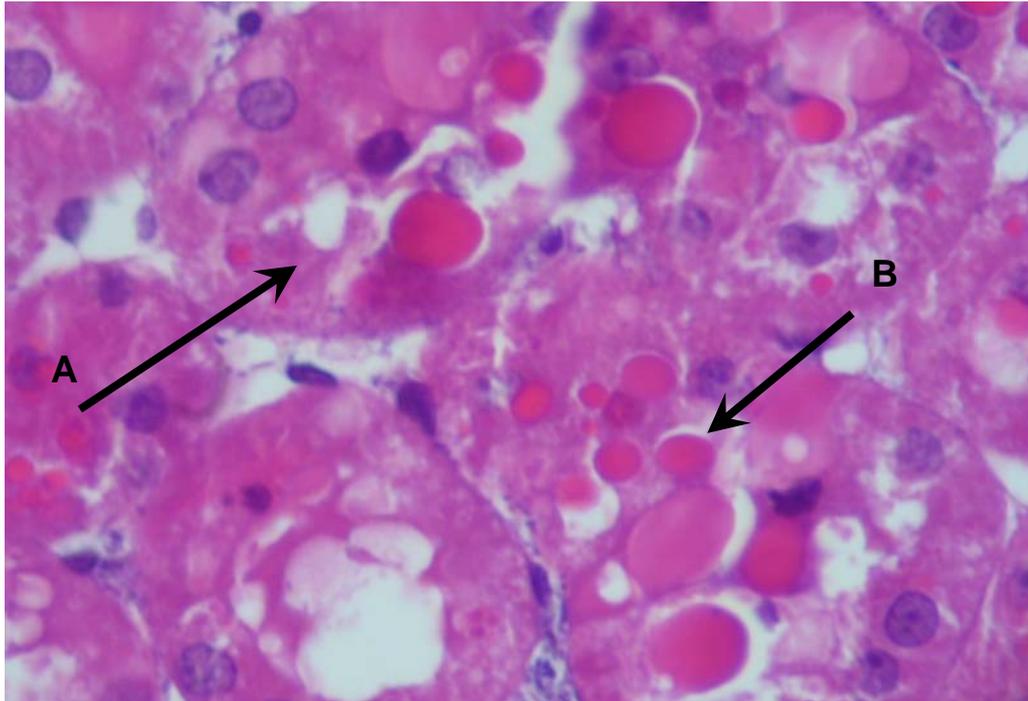


FIGURA 58: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). (A) Balonização de células tubulares e deposição proteínácea na luz (B). (HE), (40x).

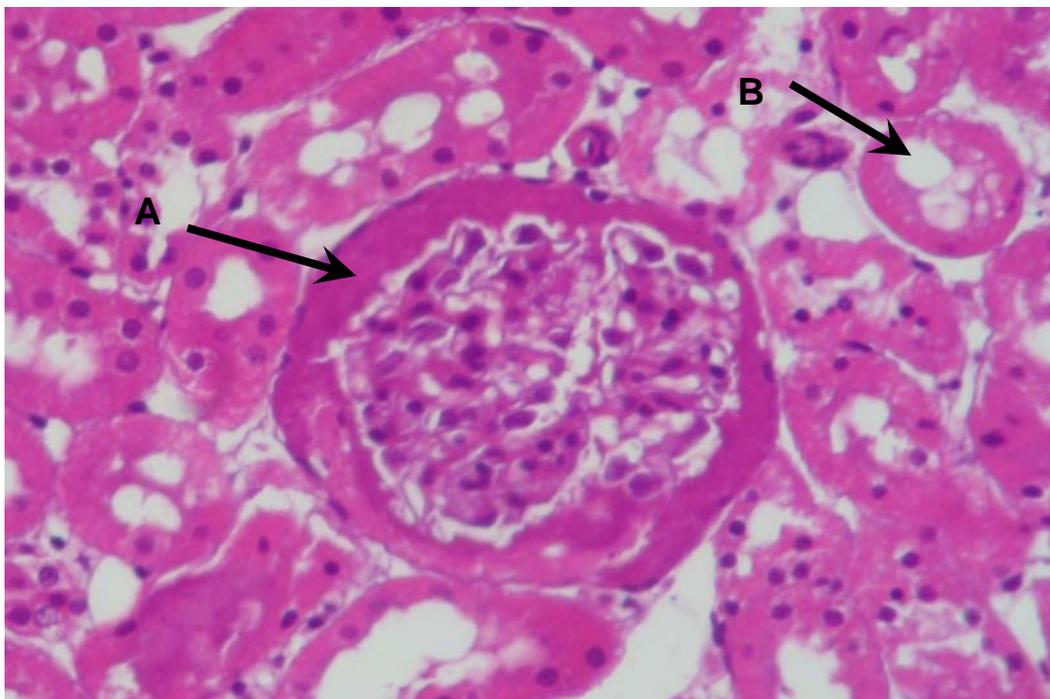


FIGURA 59: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Deposição proteínácea no espaço de Bowman (A) e balonização de células tubulares (B). (HE), (20x).

Houve extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman dos glomérulos de aspecto crescêntico (Figura 59). Algum grau de extravasamento foi observado em 40% dos 108 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40x) por lâmina. Interstício e vasos normais.

5.1.2.4 Alterações induzidas pela fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Foram estudados dois aspectos das alterações renais provocadas pela fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado perfundido de rato; as alterações fisiológicas e as alterações histopatológicas.

5.1.2.4.1 Alterações fisiológicas induzidas pela fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Os rins tratados com a fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, (BiT) apresentaram intensas e variadas alterações da função renal no transcorrer do experimento. Observou-se elevação inicial dos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal (Tabela 25), dos padrões funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, (Tabela 26), com queda de todos eles ao final. Houve também redução do transporte de eletrólitos, como o sódio (Tabela 27) e o cloreto (Tabela 28), com aumento inicial do transporte de potássio (Tabela 29), e aumento inicial do clearance osmótico com diminuição final (Tabela 30).

O grupo em que o rim foi tratado com a trombina s milde apresentou um aumento da pressão de perfusão aos 60 ($C_{60}=108,27\pm 4,88$; $BiT_{60}=193,2\pm 7,1$ mmHg) que se seguiu de queda ao final do experimento, aos 120 minutos ($C_{120}=110,28\pm 3,69$; $BiT_{120}=99,5\pm 4,52$ mmHg) (Tabela 25; Figura 60); a resistência vascular renal aumentou aos 60 minutos ($C_{60}=5,38\pm 0,51$; $BiT_{60}=9,63\pm 1,28$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹), voltando em seguida ao nível basal (Tabela 25; Figura 61); o fluxo urinário aumentou aos 60 minutos ($C_{60}=0,158\pm 0,015$; $BiT_{60}=0,307\pm 0,034$ mL.g⁻¹.min⁻¹) e caiu aos 120 minutos ($C_{120}=0,160\pm 0,020$; $BiT_{120}=0,039\pm 0,005$ mL.g⁻¹.min⁻¹), (Tabela 26; Figura 62); o ritmo de filtra o glomerular subiu aos 60 minutos ($C_{60}=0,707\pm 0,051$; $BiT_{60}=1,839\pm 0,396$ mL.g⁻¹.min⁻¹) e caiu aos 120 minutos ($C_{120}=0,697\pm 0,084$; $BiT_{120}=0,151\pm 0,022$ mL.g⁻¹.min⁻¹), (Tabela 26; Figura 63); o percentual de transporte tubular total de sódio caiu aos 120 minutos ($C_{120}=79,76\pm 0,56$; $BiT_{120}=72,63\pm 1,76\%$) (Tabela 27; Figura 64); o percentual de transporte proximal de sódio também caiu aos 120 minutos ($C_{120}=74,94\pm 3,41$; $BiT_{120}=67,89\pm 3,08\%$) (Tabela 27; Figura 65); aumentou o transporte total de potássio no início do experimento ($C_{60}=69,04\pm 3,68$; $BiT_{60}=75,84\pm 3,02\%$), (Tabela 28; Figura 66) como também o percentual de potássio proximal transportado, aos 60 minutos ($C_{60}=62,71\pm 4,08$; $BiT_{60}=73,80\pm 3,87\%$), (Tabela 28; Figura 67); diminuiu o percentual de cloreto tubular total transportado ao final do experimento ($C_{120}=78,53\pm 2,33$; $BiT_{120}=74,48\pm 1,08\%$) (Tabela 29; Figura 68); como também percentual de cloreto proximal transportado a partir dos 90 minutos até o final, aos 120 minutos ($C_{120}=76,36\pm 2,47$; $BiT_{120}=68,74\pm 3,39\%$) (Tabela 29; Figura 69); o clearance osmótico aumentou aos 60 min ($C_{60}=0,12\pm 0,02$; $BiT_{60}=0,26\pm 0,051\%$) e diminuiu dos 90 aos 120 min ($C_{120}=0,12\pm 0,02$; $BiT_{120}=0,03\pm 0,01\%$) (Tabela 30; Figura 70).

TABELA 22: Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Trombina símile		Controle		Trombina símile	
	PP (mmHg)		PP (mmHg)		RVR-mmHg/.mL. g ⁻¹ .min ⁻¹		RVR-mmHg/.mL. g ⁻¹ .min ⁻¹	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	Média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	108,71	4,14	5,15	0,49	5,56	0,85
60	108,27	4,88	193,21*	7,07	5,38	0,51	9,63*	1,28
90	108,69	5,09	134,87*	8,37	5,36	0,59	6,83 ?	1,06
120	110,28	3,69	99,54*	4,52	5,20	0,47	5,05	0,77

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. PP=pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal.

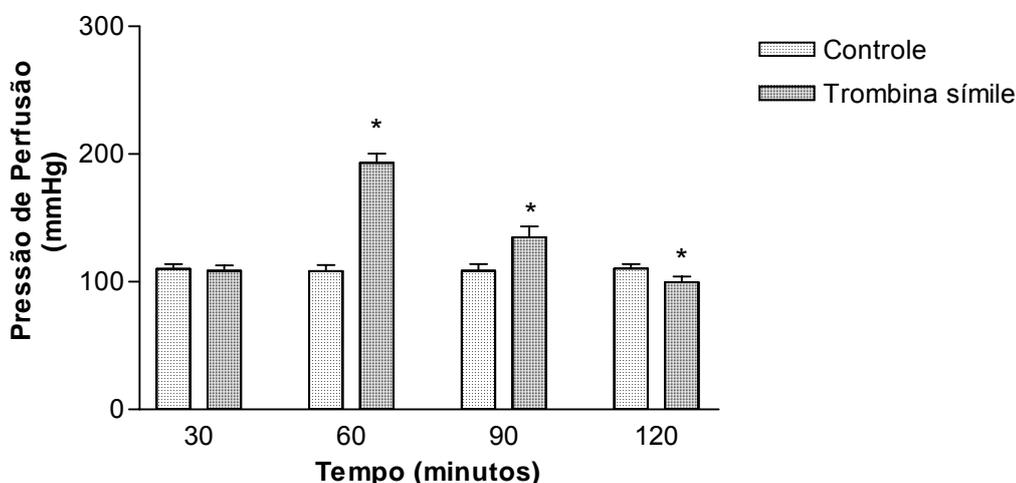


FIGURA 60: Pressão de perfusão em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

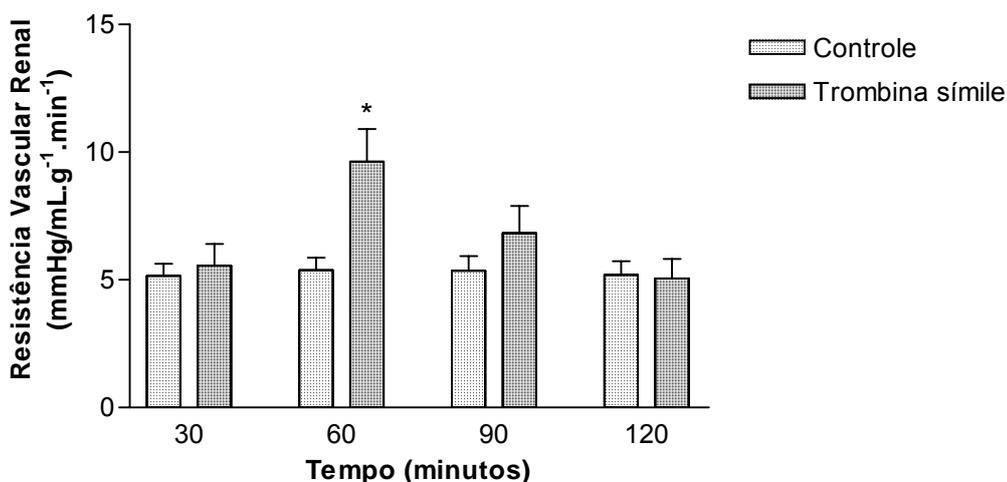


FIGURA 61: Resistência vascular renal em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 23: Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Trombina símile		Controle		Trombina símile	
	F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,14	0,009	0,13	0,014	0,70	0,07	0,79	0,15
60	0,158	0,015	0,31*	0,034	0,71	0,05	1,84*	0,40
90	0,16	0,024	0,11	0,026	0,63	0,05	0,75	0,24
120	0,16	0,020	0,04*	0,005	0,70	0,08	0,15*	0,02

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

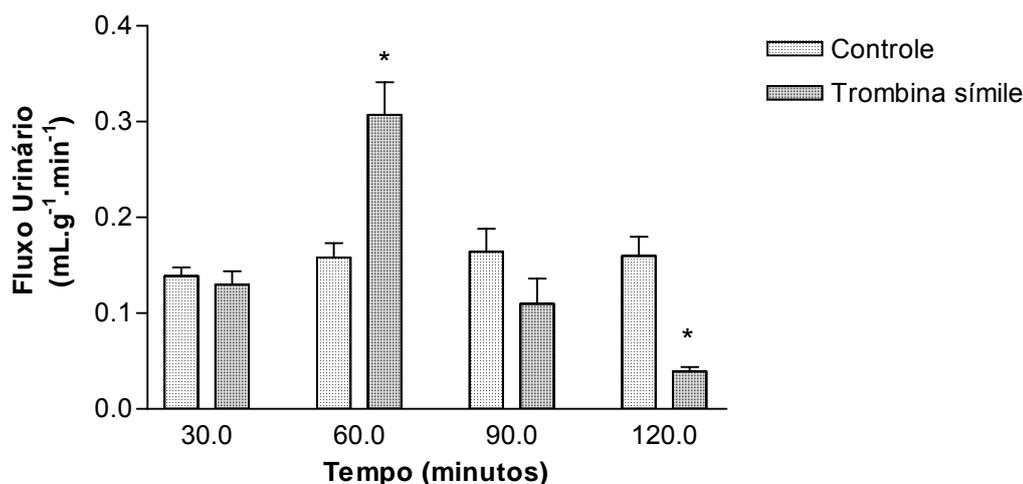


FIGURA 62: Fluxo urinário em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

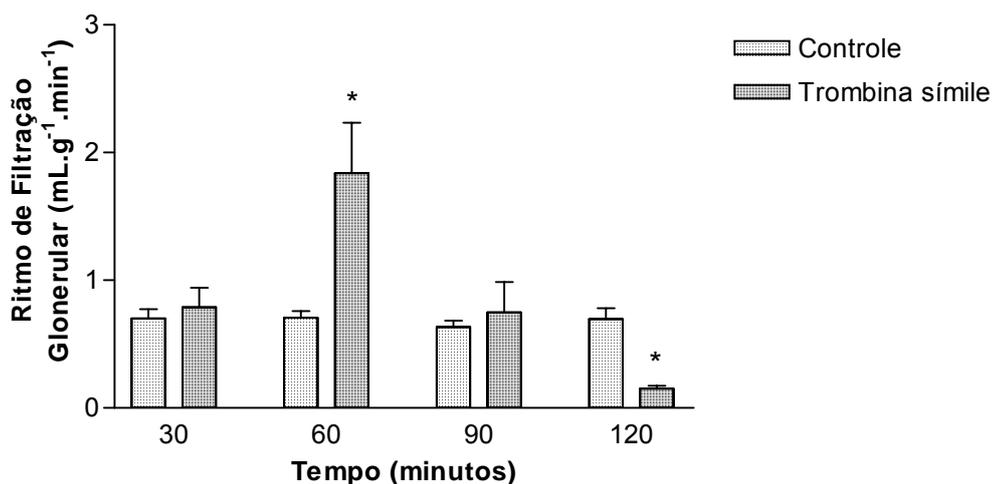


FIGURA 63: Ritmo de filtração glomerular em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 24: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Trombina símile		Controle		Trombina símile	
	% T Na ⁺		% T Na ⁺		% pT Na ⁺		% pT Na ⁺	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	82,61	2,75	75,65	1,42	77,68	4,68
60	81,11	1,52	80,17	2,32	74,69	0,99	77,13	3,38
90	79,26	0,90	76,56	4,41	73,84	2,64	71,07	6,78
120	79,76	0,56	72,63*	1,76	74,94	3,41	67,89*	3,08

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TNa⁺= percentual de transporte total de sódio; %pTNa⁺=percentual de transporte proximal de sódio.

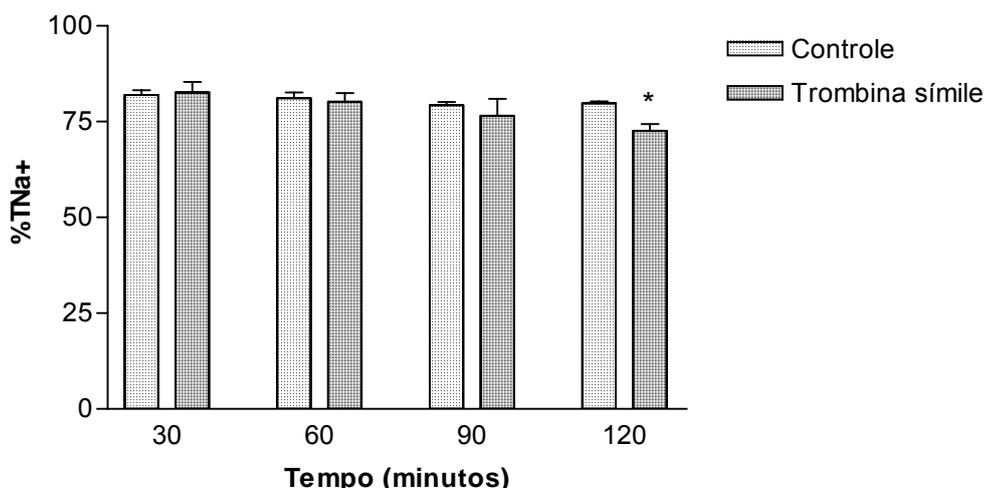


FIGURA 64: Percentual de transporte total de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

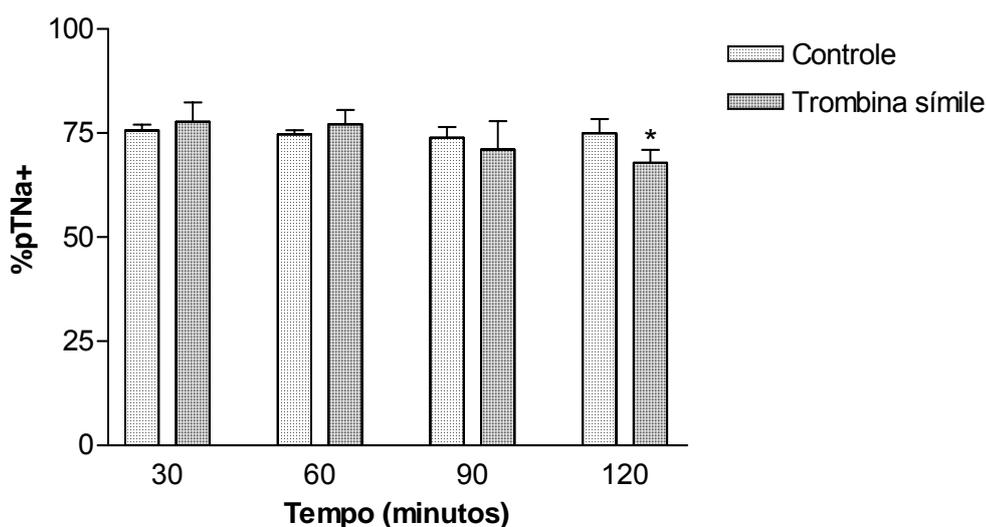


FIGURA 65: Percentual de transporte proximal de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 25: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % TK ⁺		Trombina símile % TK ⁺		Controle %pTK ⁺		Trombina símile %pTK ⁺	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	69,13	4,14	67,37	4,36	64,50	4,74	63,44	5,67
60	69,04	3,68	75,84*	3,02	62,71	4,08	73,80*	3,87
90	71,84	4,21	69,47	5,27	64,27	6,12	64,98	7,36
120	69,94	6,86	71,80	1,49	61,83	5,62	68,06	2,61

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TK⁺=percentual de transporte total, potássio; %pTK⁺=percentual de transporte proximal de potássio.

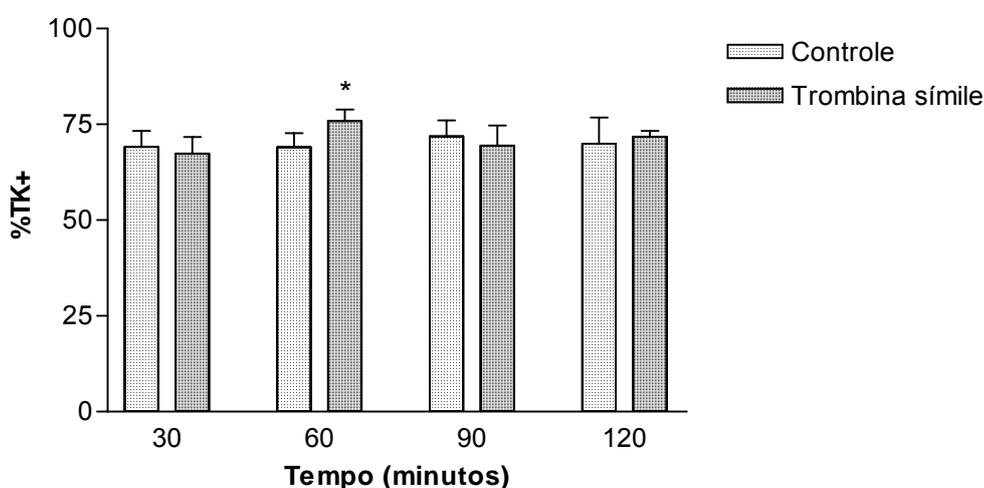


FIGURA 66: Percentual de transporte total de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

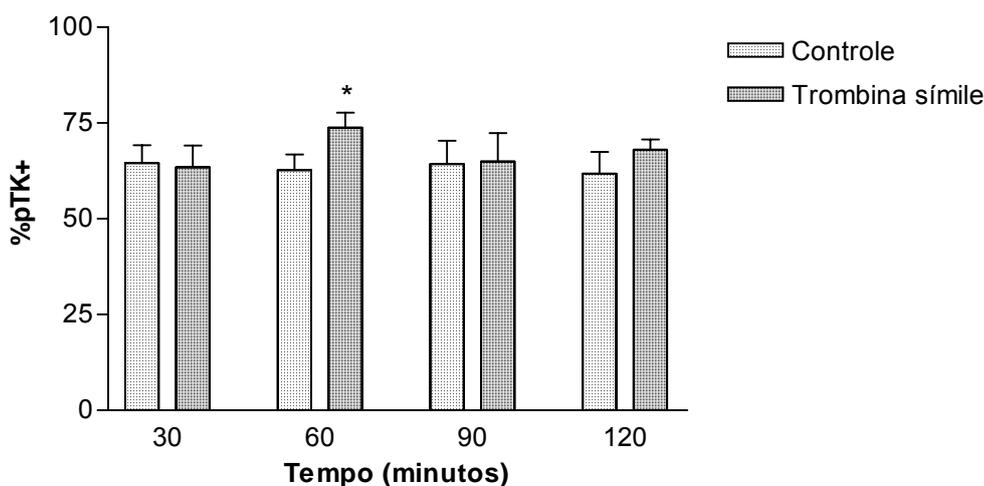


FIGURA 67: Percentual de transporte proximal de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 26: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Trombina símile		Controle		Trombina símile	
	%TCI ⁻		%TCI ⁻		%pTCI ⁻		%pTCI ⁻	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	79,90	1,03	81,17	2,46	76,81	1,25	75,24	2,33
60	81,25	2,44	76,60	2,59	78,49	2,90	72,56	3,57
90	77,32	2,22	75,54	4,74	76,58	1,20	69,05*	3,11
120	78,53	2,33	74,48*	1,08	76,36	2,47	68,74*	3,39

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). * =Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TCI⁻ = percentual de transporte total de cloreto; %pTCI⁻ = percentual de transporte proximal de cloreto.

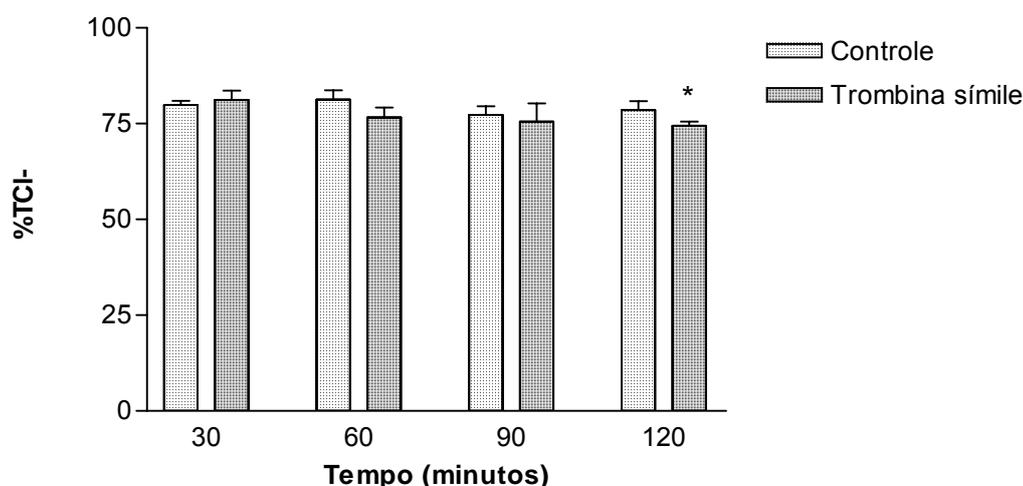


FIGURA 68: Percentual de transporte total de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

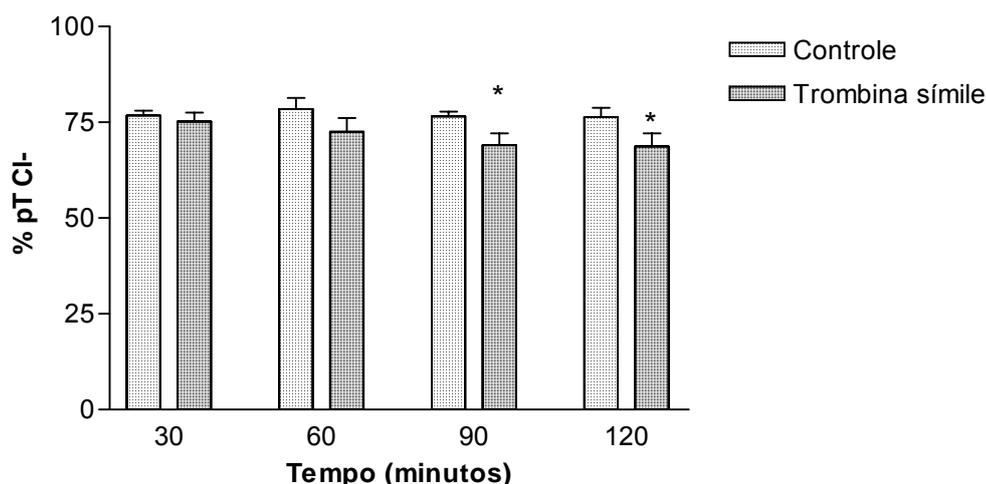


FIGURA 69: Percentual de transporte proximal de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 27: Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração trombina símile do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		Trombina símile	
	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	Média	e.p.m.
30	0,120	0,02	0,103	0,02
60	0,121	0,02	0,257*	0,05
90	0,142	0,01	0,084*	0,02
120	0,125	0,02	0,032*	0,01

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. Cosm= clearance osmótico.

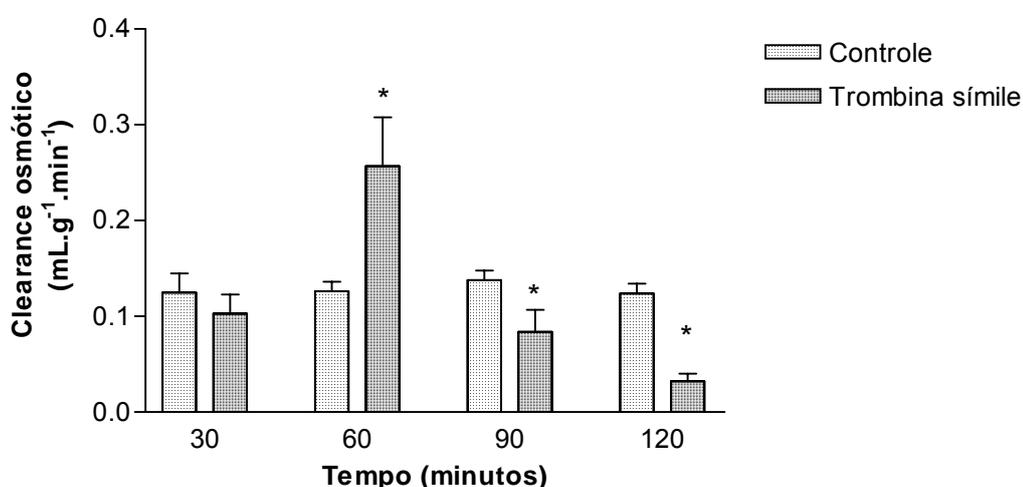


FIGURA 70: Parâmetros do clearance osmótico em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

5.1.2.4.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

No grupo controle, os rins apresentavam focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células de revestimento tubular, discreta deposição intratubular proximal de material proteináceo; glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades (Tabela 21).

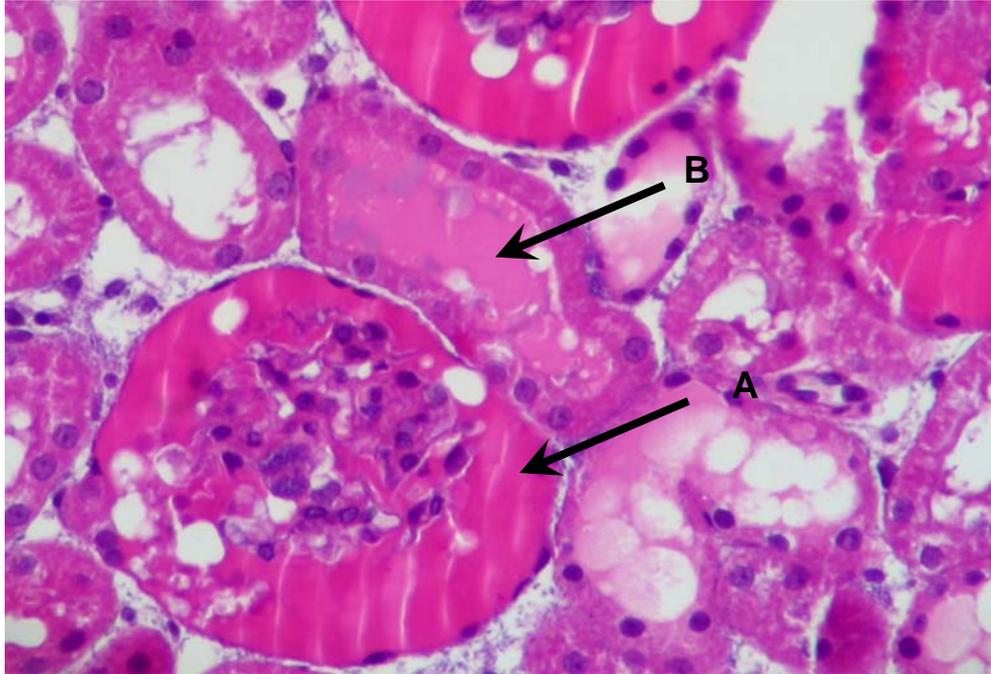


FIGURA 71: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Material proteináceo no espaço de Bowman (A), túbulos com o mesmo material na luz e balonização do epitélio (B). (HE), (40x).

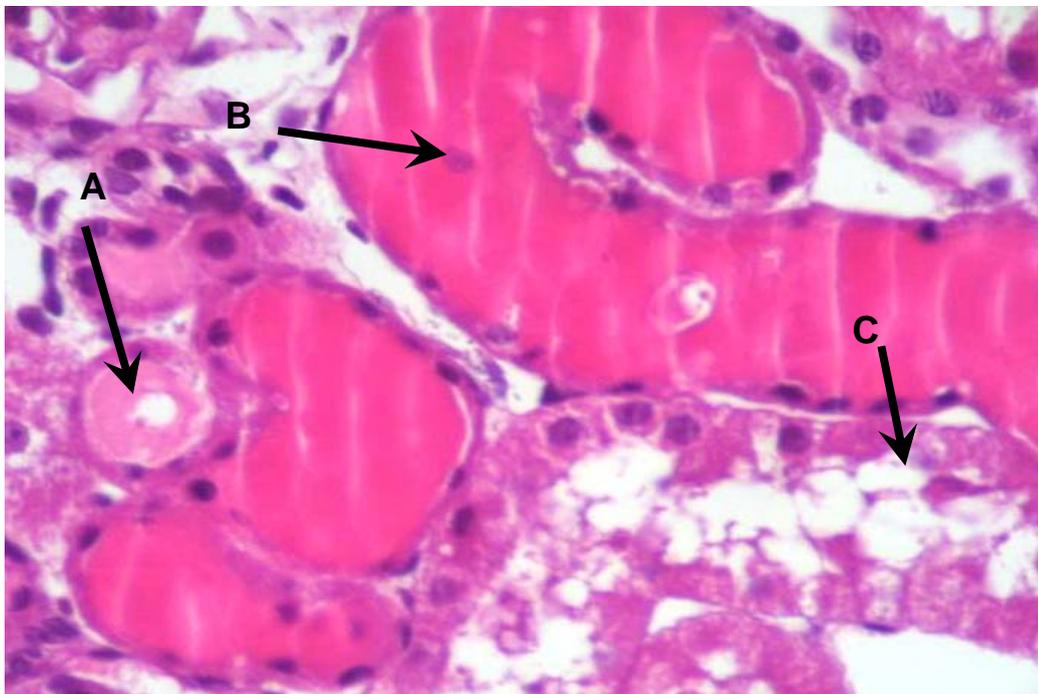


FIGURA 72: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* (10 μ g/mL). Depósitos proteináceos na luz de túbulos proximais (A) e distais (B), e balonização de células tubulares (C). (HE), (40x).

No grupo tratado com a trombina símile foram observados fenômenos degenerativos reversíveis representados por balonização hidrópica com vacuolização citoplasmática extensa e descontinuidade da borda em escova das células de revestimento tubular proximal (Figura 71); descamação destas células para a luz tubular; deposição proteinácea acentuada nos túbulos proximais e distais (Figura 72); acentuado extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman, de aspecto crescêntico (Figura 71). Algum grau de extravasamento foi observado em 73% dos 97 glomérulos examinados em 10 campos de grande aumento (40x) por lâmina. Interstício e vasos normais.

5.1.2.5 Alterações induzidas pela fração fosfolipase A₂ (PLA₂) extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado de rato

Foram estudados dois aspectos das alterações renais provocadas pela fração com atividade fosfolipase A₂ extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado perfundido de rato; as alterações fisiológicas e as alterações histopatológicas.

5.1.2.5.1 Alterações fisiológicas induzidas pela fração com atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, no rim isolado perfundido de rato

Os efeitos causados nos rins perfundidos pela Fosfolipase A₂ extraída do veneno de *Bothrops insularis* (BiF) incluem elevação dos parâmetros vasculares (Tabela 31) e funcionais renais (Tabela 32), do início ao final do experimento. Houve também queda no transporte de sódio (Tabela 33) e cloreto (Tabela 35), e aumento na reabsorção de potássio proximal no final do experimento (Tabela 34), com aumento do clearance osmolar (C_{osm.}) do início ao final do ensaio (Tabela 36).

O grupo em que o rim foi tratado com a BiF apresentou um aumento da pressão de perfusão aos 60 ($C_{60}=108,27\pm 4,88$; $BiF_{60}=141,57\pm 3,96$ mmHg) que se manteve em menor escala dos 90 até o final do experimento (Tabela 31; Figura 73); a resistência vascular renal aumentou a partir dos 60 minutos ($C_{60}=5,00\pm 0,39$; $BiF_{60}=7,35\pm 0,25$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹), mantendo o nível até o final (Tabela 31; Figura 74); o fluxo urinário aumentou de modo crescente a partir dos 60 até os 120 minutos ($C_{120}=0,160\pm 0,020$; $BiF_{120}=0,202\pm 0,028$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 32; Figura 75); o ritmo de filtração glomerular subiu aos 90 minutos ($C_{90}=0,63\pm 0,05$; $BiT_{90}=1,07\pm 0,24$ mL.g⁻¹.min⁻¹) e manteve-se elevado em menores níveis (Tabela 32; Figura 76); o percentual de transporte tubular total de sódio caiu aos 60 minutos ($C_{60}=81,11\pm 1,52$; $BiF_{60}=75,94\pm 2,59\%$) e manteve-se baixo (Tabela 33; Figura 77); o transporte proximal de sódio foi reduzido aos 60 min ($C_{60}=74,69\pm 0,99$; $BiF_{60}=72,59\pm 1,06\%$) (Tabela 33; Figura 78); não variou o transporte total de potássio (Tabela 34; Figura 79), mas aumentou o percentual de potássio proximal transportado aos 120 minutos ($C_{120}=61,83\pm 5,62$; $BiF_{120}=70,84\pm 2,67\%$) (Tabela 34; Figura 80); diminuiu o percentual de cloreto total transportado do início ao final do experimento ($C_{120}=78,53\pm 2,33$; $BiF_{120}=70,97\pm 2,86\%$) (Tabela 35; Figura 81); como também diminuiu o percentual de cloreto proximal transportado a partir dos 60 minutos ($C_{60}=78,49\pm 2,90$; $BiF_{60}=68,23\pm 2,03\%$) (Tabela 35; Figura 82); o clearance osmótico aumentou a partir dos 60 min até o final ($C_{120}=0,125\pm 0,020$; $BiF_{120}=0,195\pm 0,052$ mL.g⁻¹.min⁻¹) (Tabela 36; Figura 83).

TABELA 28: Parâmetros vasculares do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		PLA ₂		Controle		PLA ₂	
	PP (mmHg)		PP (mmHg)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		RVR(mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	107,82	1,18	5,15	0,49	5,64	0,24
60	108,27	4,88	141,57*	3,96	5,38	0,51	7,35*	0,25
90	108,69	5,09	141,07*	1,42	5,36	0,59	7,36*	0,27
120	110,28	3,69	134,23*	5,49	5,20	0,47	7,09*	0,53

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05). *=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal.

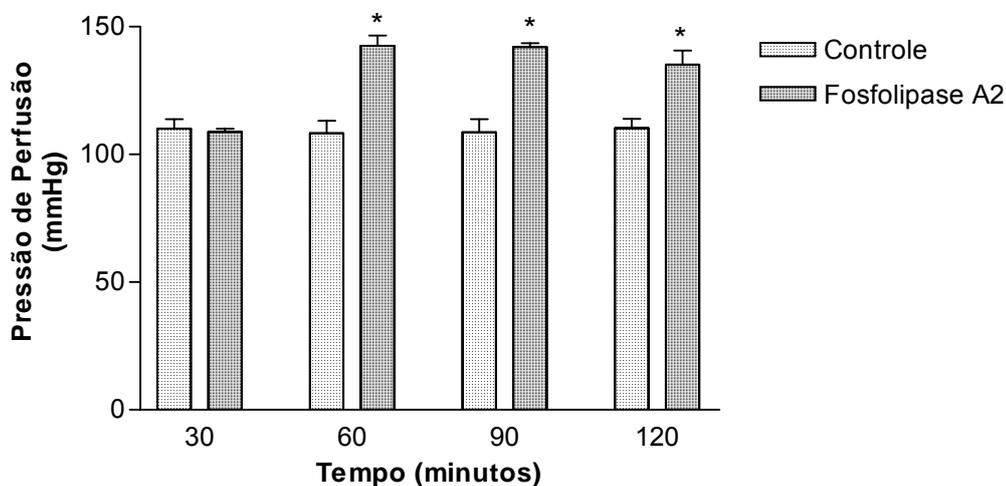


FIGURA 73: Pressão de perfusão em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

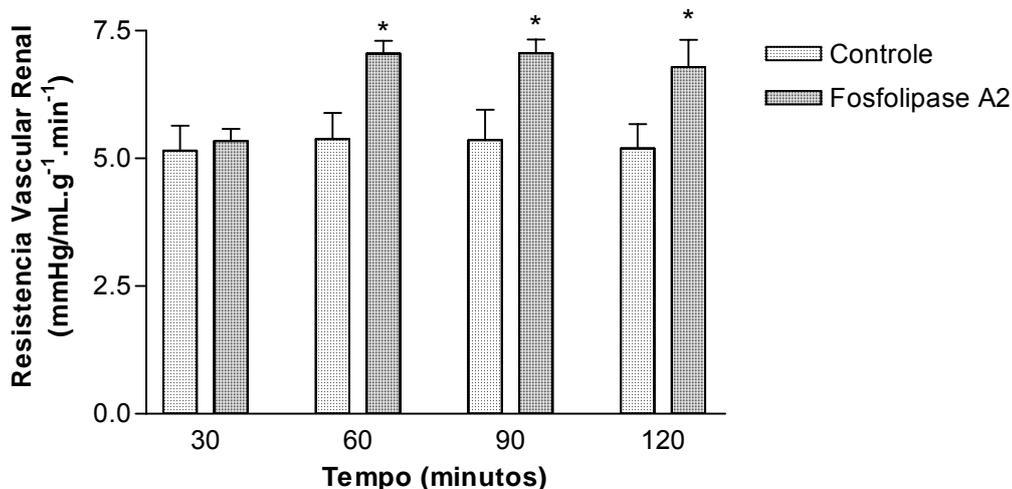


FIGURA 74: Resistência vascular renal em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 29: Parâmetros fisiológicos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração fosfolipase A₂, do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		PLA ₂		Controle		PLA ₂	
	F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		F.U.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		R.F.G.(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,139	0,009	0,148	0,008	0,70	0,07	0,77	0,05
60	0,158	0,015	0,188*	0,010	0,71	0,05	0,73	0,07
90	0,164	0,024	0,203*	0,019	0,63	0,05	1,07*	0,24
120	0,160	0,020	0,202*	0,028	0,70	0,08	0,90*	0,05

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

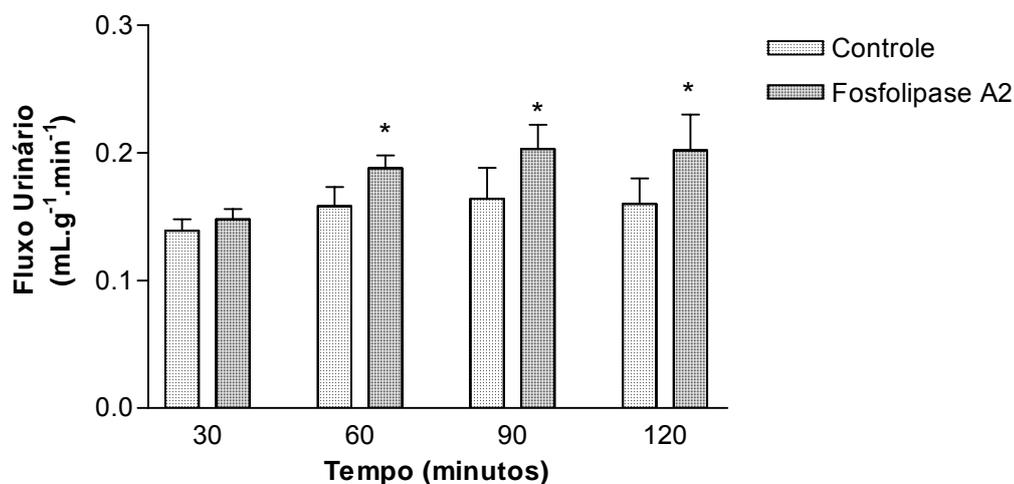


FIGURA 75: Fluxo urinário em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

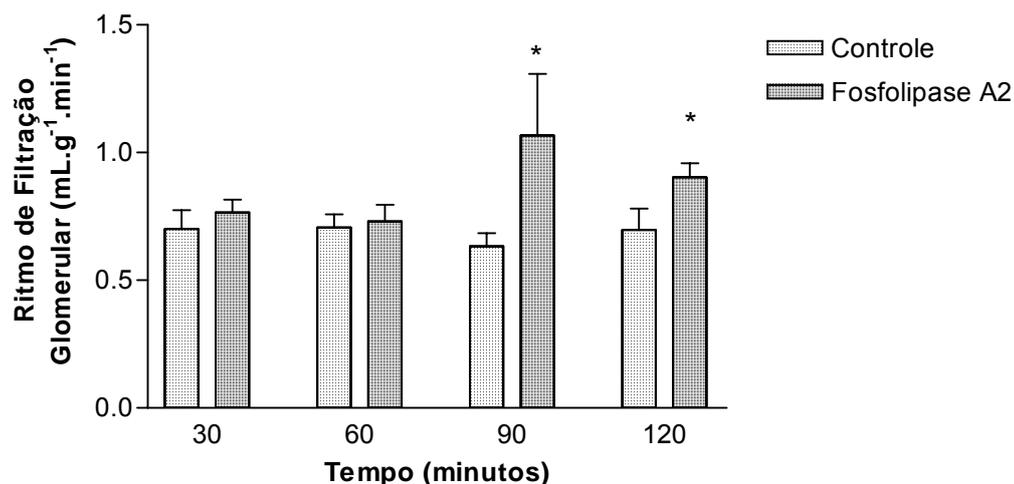


FIGURA 76: Ritmo de filtração glomerular em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 30: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % T Na ⁺		PLA ₂ % T Na ⁺		Controle % pT Na ⁺		PLA ₂ % pT Na ⁺	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	81,84	2,13	75,65	1,42	76,47	1,98
60	81,11	1,52	75,94*	2,59	74,69	0,99	72,59*	1,06
90	79,26	0,90	78,21	2,46	73,84	2,64	74,98	2,51
120	79,76	0,56	76,68*	2,18	74,94	3,41	73,59	2,26

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TNa⁺= percentual de transporte total de sódio; %pTNa⁺=percentual de transporte proximal de sódio.

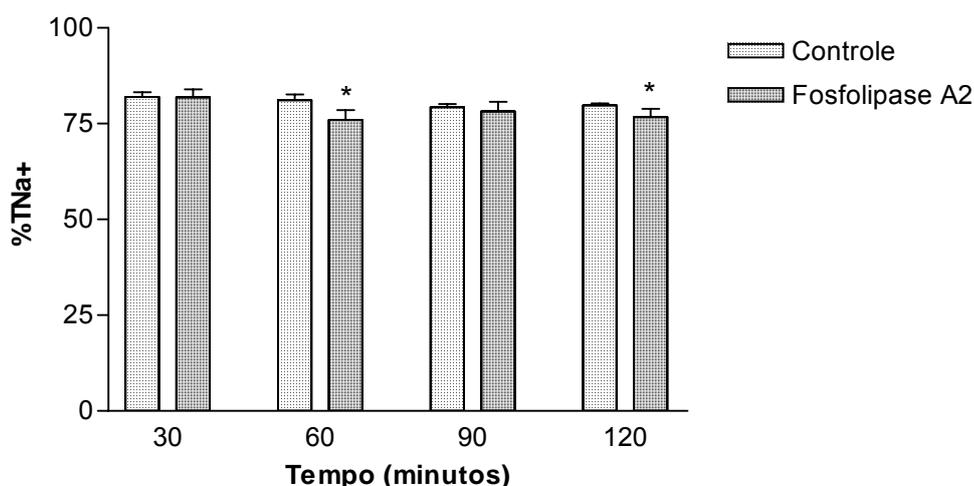


FIGURA 77: Percentual de transporte total de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

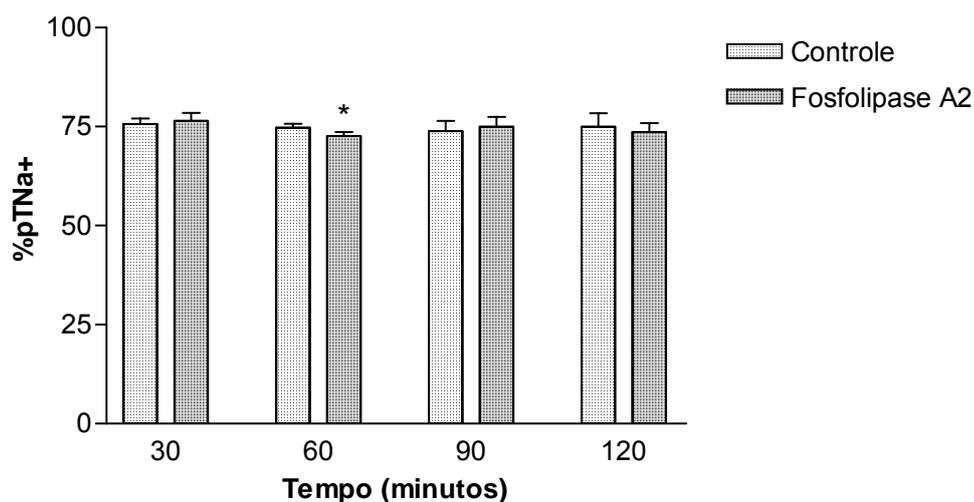


FIGURA 78: Percentual de transporte proximal de sódio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *B. insularis* 10µg/mL.

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 31: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle % TK ⁺		PLA ₂ % T K ⁺		Controle %pTK ⁺		PLA ₂ %pTK ⁺	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	69,13	4,14	66,43	3,60	64,50	4,74	65,05	3,28
60	69,04	5,68	64,29	3,19	62,71	4,08	62,94	3,08
90	71,84	4,21	72,83	2,80	64,27	6,12	71,60	2,94
120	69,94	6,86	71,93	2,59	61,83	5,62	70,84*	2,67

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TK⁺=percentual de transporte total, potássio; %pTK⁺=percentual de transporte proximal de potássio.

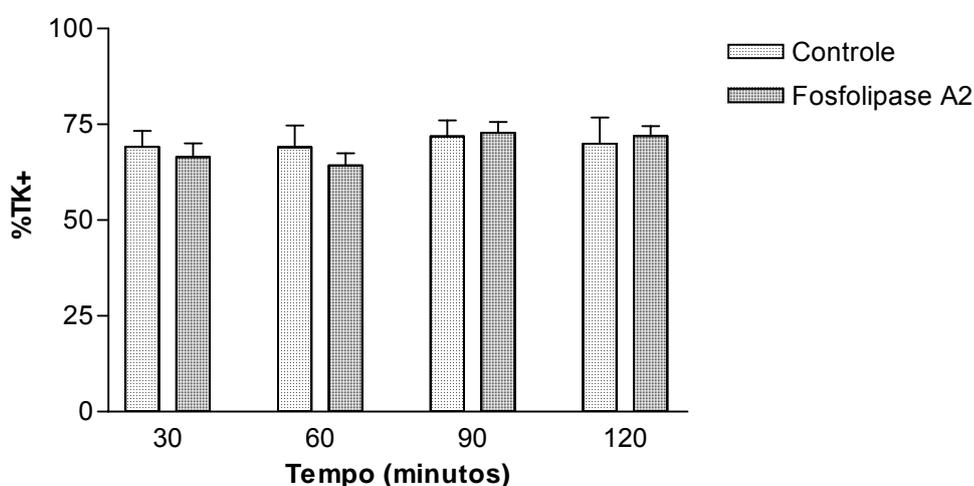


FIGURA 79: Percentual de transporte total de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *B. insularis* 10µg/mL.

Dados em média ± EPM (p<0,05).

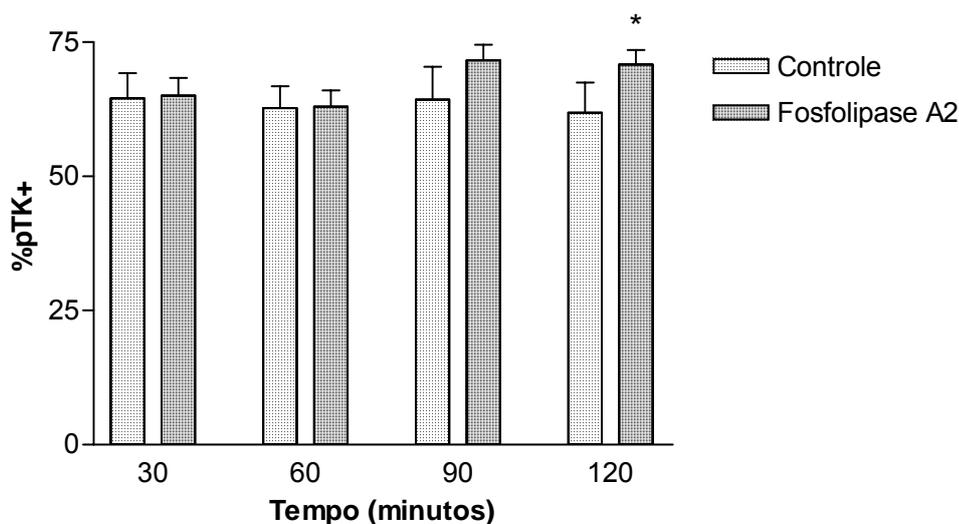


FIGURA 80: Percentual de transporte proximal de potássio em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 32: Parâmetros eletrolíticos do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fração fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		PLA ₂		Controle		PLA ₂	
	%TCl ⁻		%TCl ⁻		%pTCl ⁻		%pTCl ⁻	
min.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	79,90	1,03	78,42	2,41	76,81	1,25	74,29	1,88
60	81,25	2,44	72,00*	2,79	78,49	2,90	68,23*	2,03
90	77,32	2,22	74,71	2,93	76,58	1,20	71,40	1,26
120	78,53	2,33	70,97*	2,86	76,36	2,47	69,88*	1,94

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. %TCl⁻= percentual de transporte total de cloreto; %pTCl⁻= percentual de transporte proximal de cloreto.

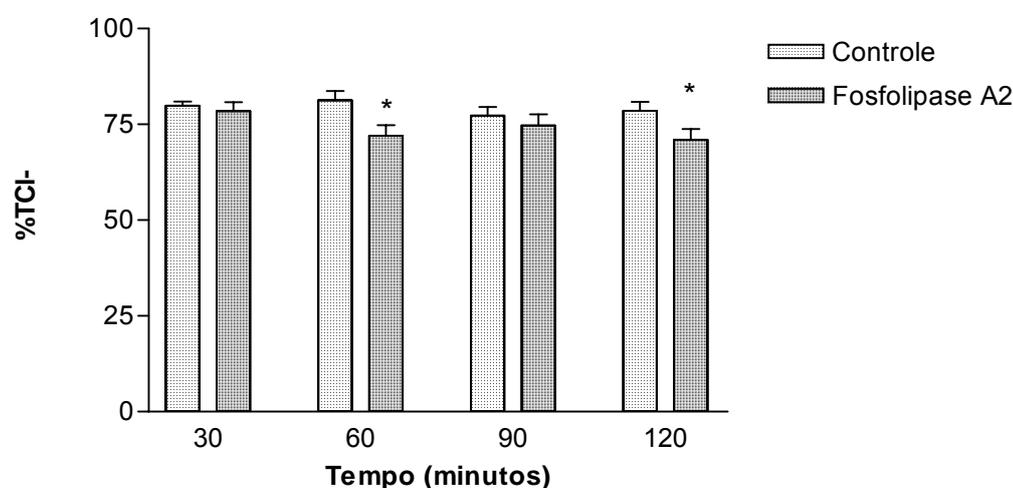


FIGURA 81: Percentual de transporte total de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

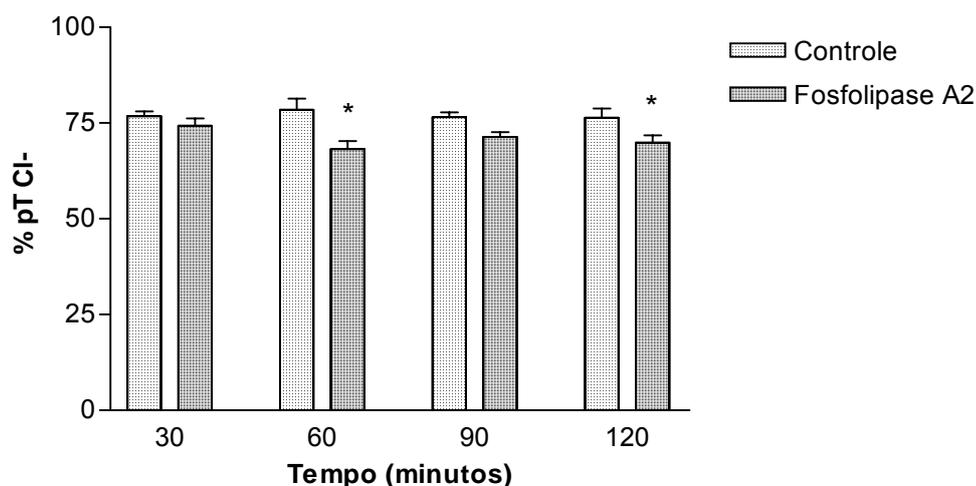


FIGURA 82: Percentual de transporte proximal de cloreto em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *B. insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

TABELA 33: Parâmetros do clearance osmótico do rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Tempo	Controle		PLA ₂	
	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
min.	Média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,120	0,02	0,136	0,02
60	0,121	0,02	0,179*	0,02
90	0,142	0,01	0,192*	0,03
120	0,125	0,02	0,195*	0,05

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).*=Diferença estatisticamente significativa para p<0,05. Cosm= clearance osmótico.

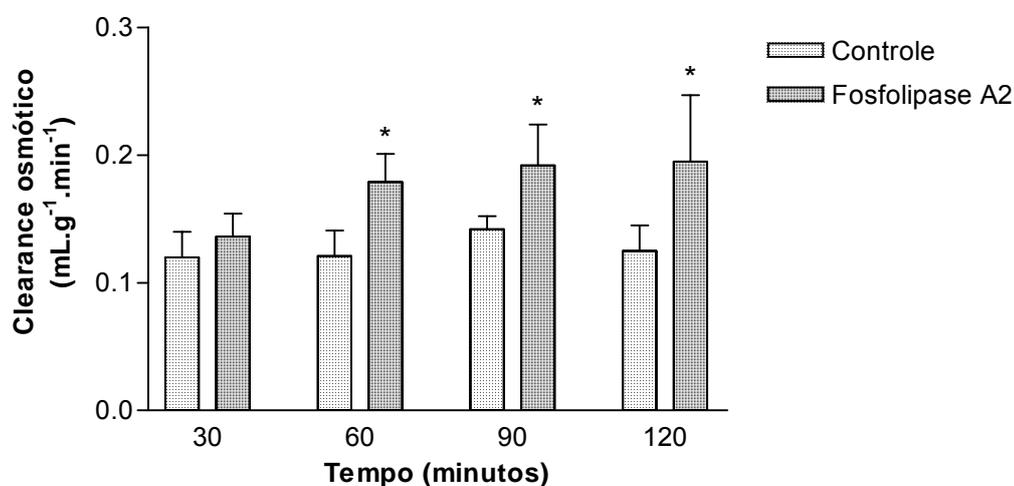


FIGURA 83: Parâmetros do clearance osmótico em rim isolado de ratos Wistar (n=6), na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL).

Dados em média ± EPM (p<0,05). * = diferença estatisticamente significativa do controle.

5.1.2.5.2 Alterações histopatológicas renais induzidas pela fração com atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato

No grupo controle, os rins apresentavam focos esparsos de degeneração hidrópico-vacuolar das células de revestimento tubular, discreta deposição intratubular proximal de material proteináceo; glomérulos, interstício e vasos sem anormalidades (Figura 17).

No grupo tratado com a fração fosfolipase A₂ extraída do veneno da *Bothrops insularis* foram observados áreas focais de necrose tubular aguda na cortical (Figura 84); fenômenos degenerativos reversíveis representados por balonização hidrópica com vacuolização citoplasmática extensa das células de revestimento tubular e descontinuidade da borda em escova; descamação necrótica destas células para a luz tubular (Figura 85); deposição proteinácea acentuada nos túbulos proximais e distais; acentuado extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman dos glomérulos de aspecto crescêntico (Figura 85). Algum grau de extravasamento foi observado em 46,61% dos 118 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40x) por lâmina. Interstício e vasos normais.

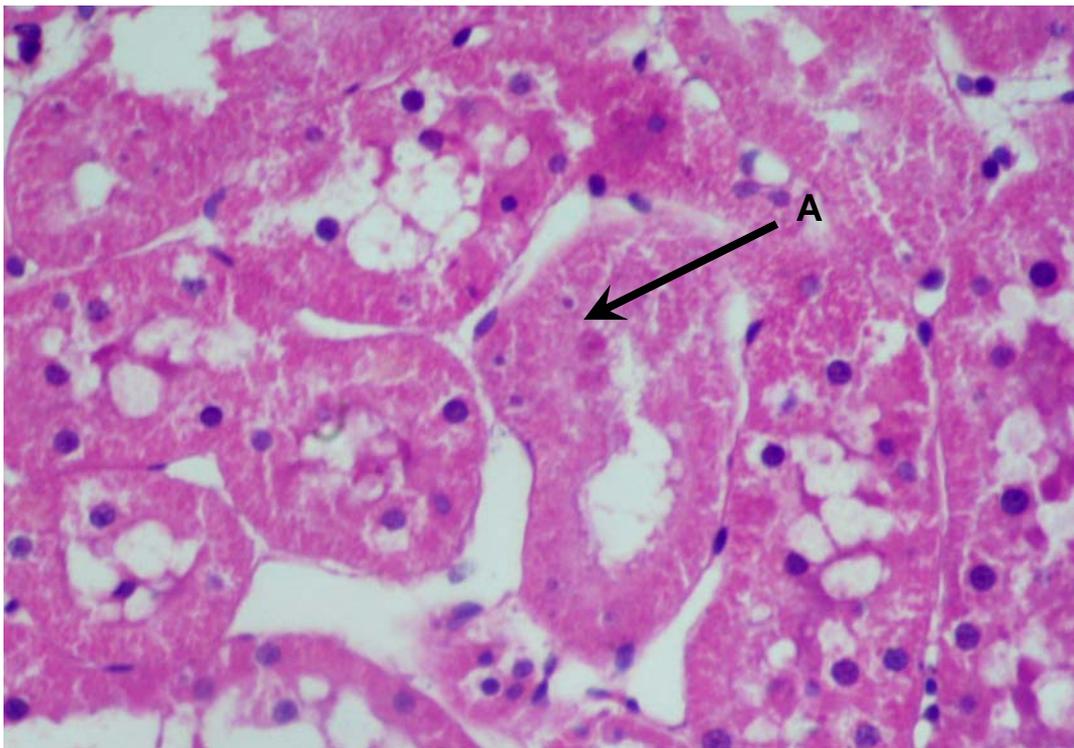


FIGURA 84: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* (10µg/mL). (A) Focos de necrose tubular aguda. (HE), (40x).

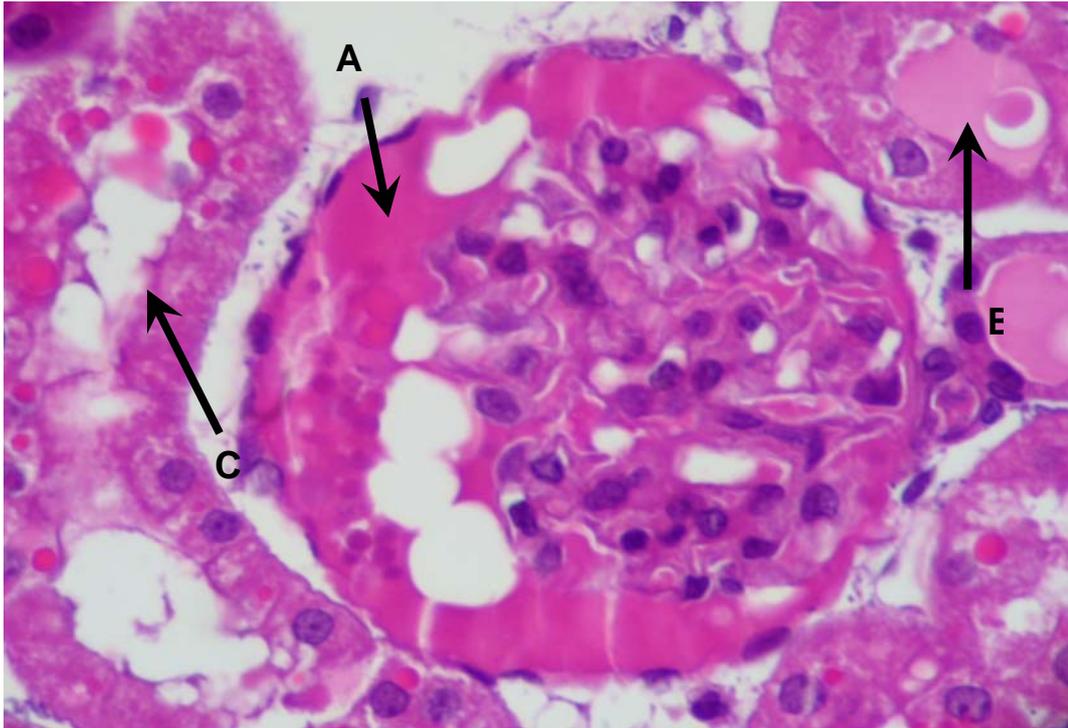


FIGURA 85: Fotografia do rim de rato perfundido, ao final do experimento, na presença da fosfolipase A_2 do veneno da *Bothrops insularis* ($10\mu\text{g/mL}$). (A) Espaço de Bowman e túbulos com material proteináceo (B); (C) balonização de células tubulares. (HE), (40x).

5.2 Efeitos do Veneno da *Bothrops insularis* no Leito Vascular Sistêmico

Foram observados os efeitos fisiológicos relacionados à pressão arterial e histopatológicos no coração, pulmões, rins, fígado e intestino, do veneno da *Bothrops insularis* injetado no leito vascular cítico, *in vivo*.

5.2.1 Alterações fisiológicas sistêmicas do veneno

Foi observada uma forte reação hipotensiva que cresceu com o aumento da dose aplicada, sendo parcialmente recuperada, após cada queda, por efeito compensatório do animal (Tabela 37; Figura 86, 87). A exceção foi a dose de $10\mu\text{g}$ que não aumentou significativamente a pressão arterial.

O controle foi obtido com a injeção de solução salina e aferição da pressão arterial no início dos experimentos (Figura 87). Dois dos seis animais foram a óbito antes da aplicação da última dose, de $300\mu\text{g}$ do veneno.

TABELA 34: Comportamento da pressão arterial sistêmica média com variação das doses de veneno bruto da *Bothrops insularis* aplicadas sistemicamente em ratos Wistar (n=6).

Animal	Salina	1µg	Rec	3µg	Rec	10µg	Rec	30µg	Rec	100µg	Rec	300µg	Rec
Rato 01	128	120	124	40	106	66	110	26	52	0			
Rato 02	128	108	124	92	130	104	126	92	116	78	94	62	80
Rato 03	87	67	85	73	94	70	97	73	100	70	103	55	103
Rato 04	102	92	100	90	102	92	104	82	102	82	100	78	
Rato 05	118	100	112	100	108	101	106	100	109	94	106	80	
Rato 06	111	56	106	46	87	15	96	44	87	74	85		
Média	112	90	108	74	105	75	106	70	94	66	98	69	92

B. Rec = Base de recuperação do nível pressórico após o efeito do veneno.

Salina = Pressão arterial após o uso de solução salina

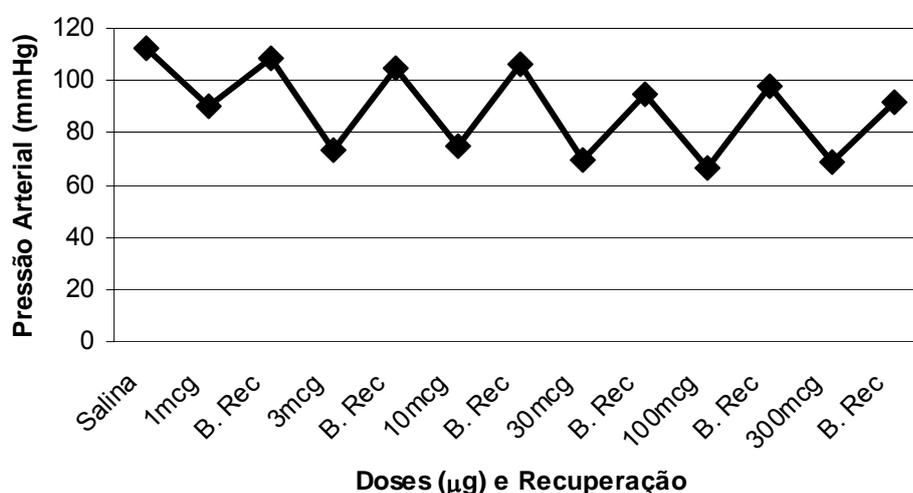


FIGURA 86: Pressão arterial média dos ratos com doses do veneno da *B. insularis*.

Rec = recuperação do nível pressórico. Salina = Pressão arterial após o uso de solução salina.

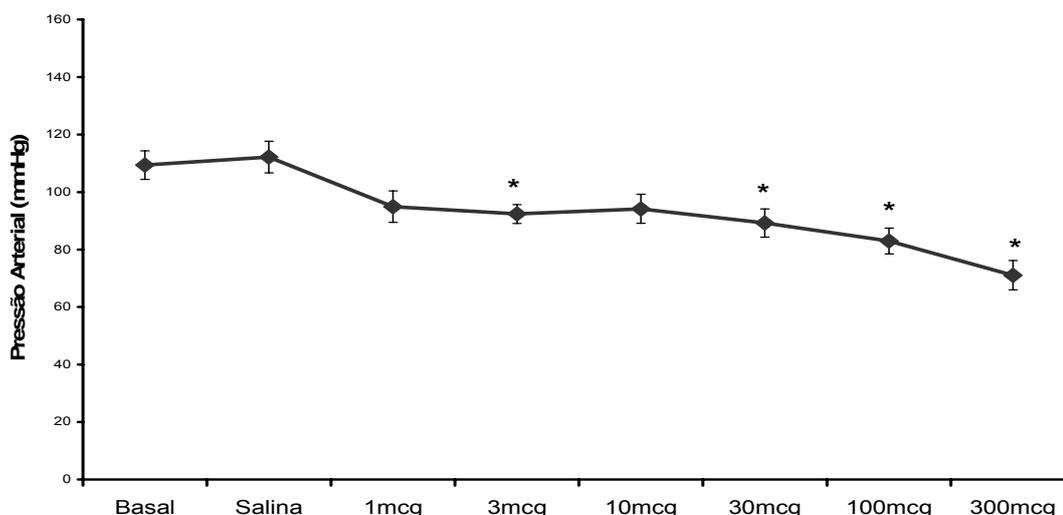


FIGURA 87: Queda da pressão arterial média com doses do veneno da *B. insularis*.

Dados em média ± EPM ($p < 0,05$). * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.2.2 Alterações histopatológicas sistêmicas do veneno

Observou-se acentuada congestão generalizada, de grandes e pequenos vasos, afetando principalmente o coração, fígado, intestino, rins e pulmões (Figura 88, 89, 90, 91, 92, 93). No fígado se observava esteatose em microgotas (Figura 90). Havia focos de hemorragia intersticial nos rins (Figura 92). Nos pulmões houve hemorragia intra-alveolar difusa, com acúmulo de células inflamatórias polimorfonucleares e linfocitárias principalmente ao redor de bronquíolos (Figura 94). Alguns dos alvéolos e bronquíolos estavam rotos e preenchidos de hemorragia (Figura 95). A hemorragia pulmonar era observada macroscopicamente (Figura 96).

Os órgãos do grupo controle não apresentavam alterações.

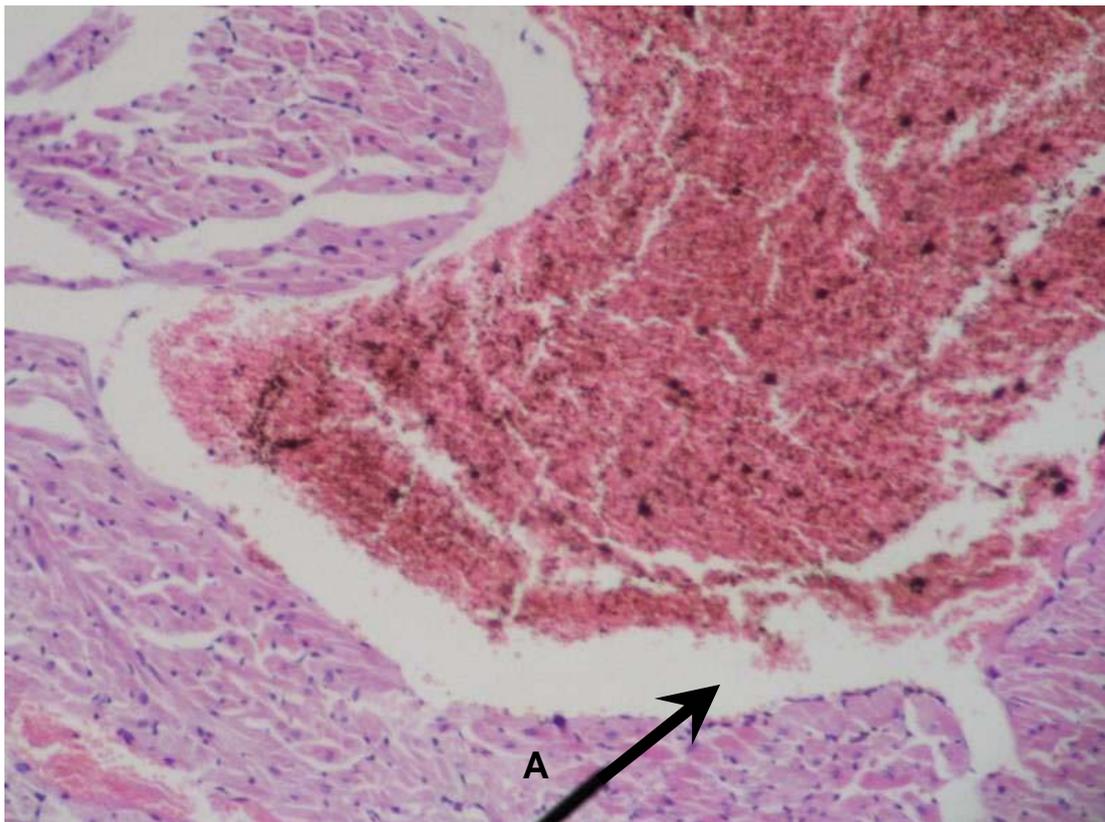


FIGURA 88: Fotografia do coração de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Congestão vascular. (HE), (40x).

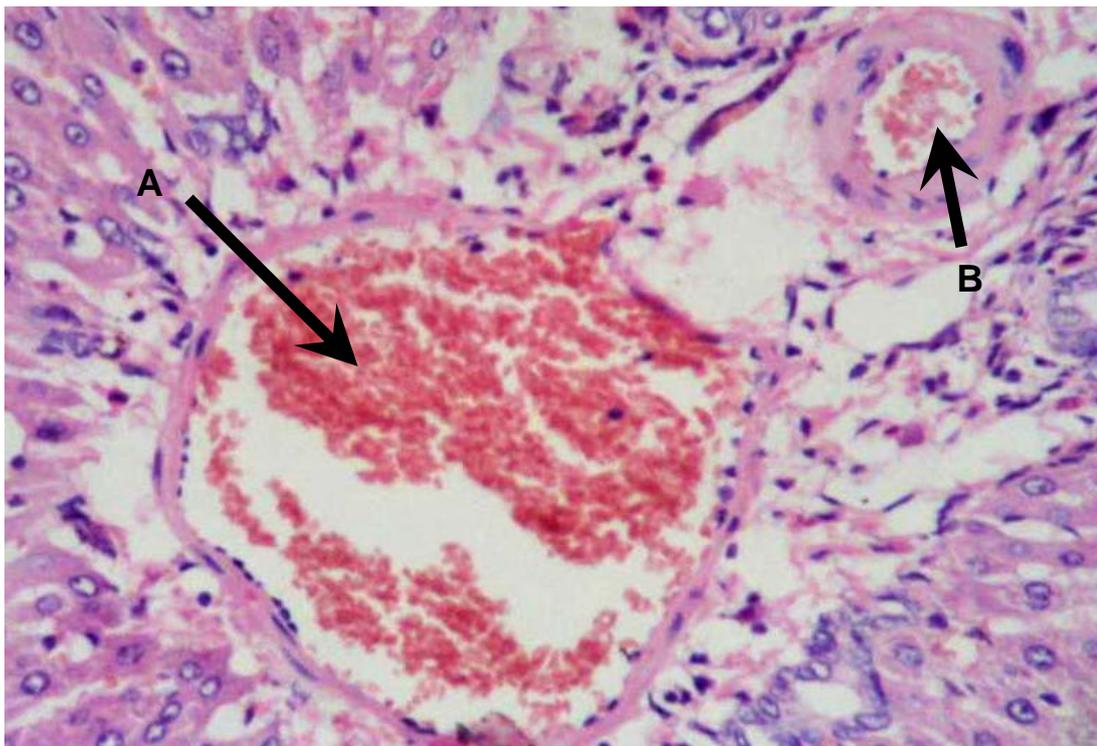


FIGURA 89: Fotografia do fígado de rato na presença de veneno da *B. insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. Congestão de vênula (A) e arteríola porta (B). (HE), (40x).

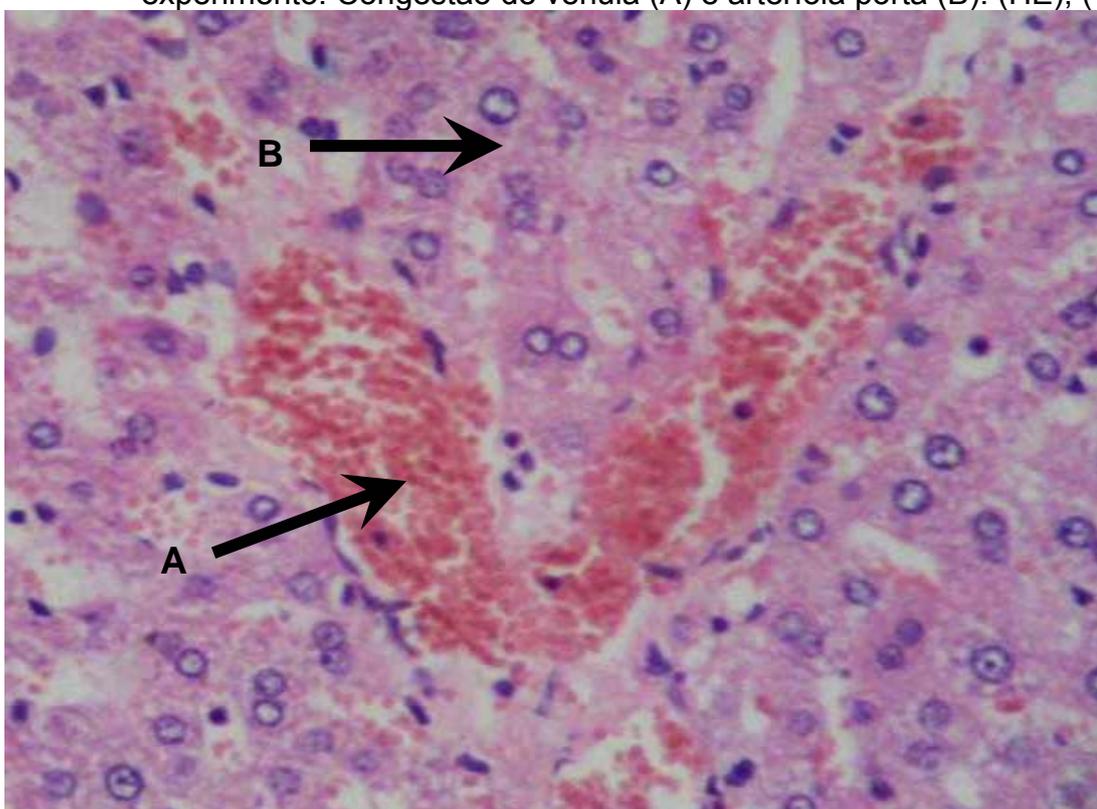


FIGURA 90: Fotografia do fígado de rato na presença de veneno da *B. insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Veia centrolobular congestionada, (B) esteatose em microgotas. (HE), (40x).

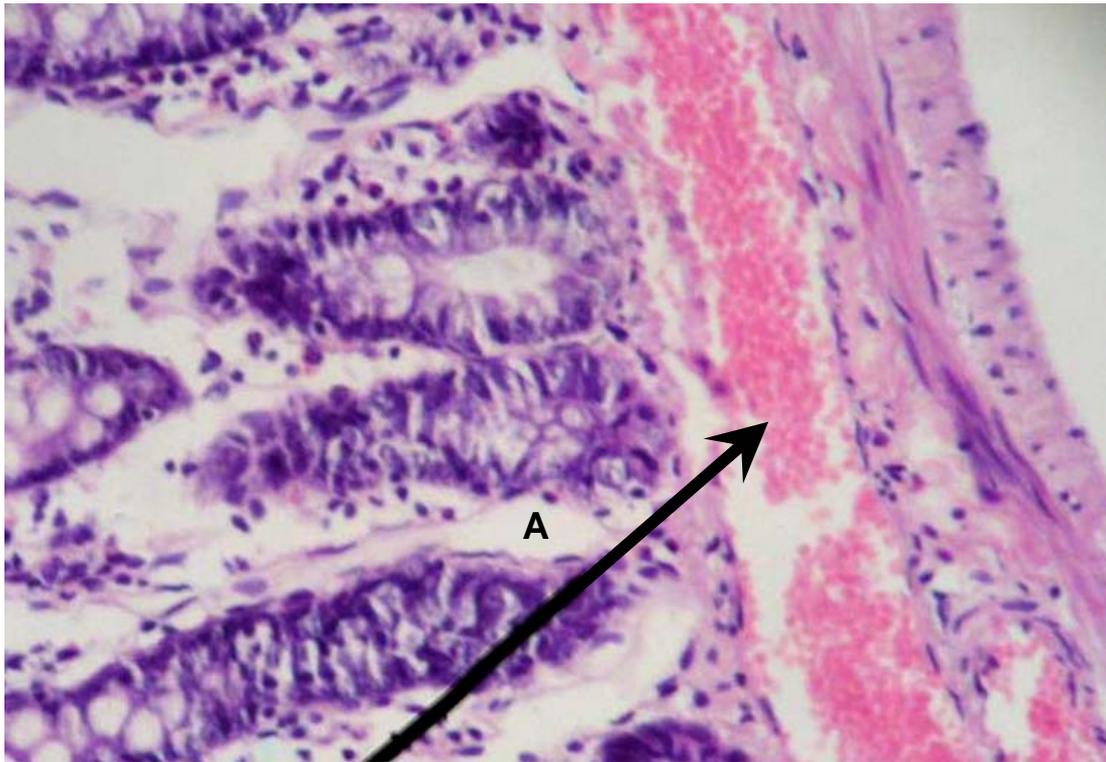


FIGURA 91: Fotografia do intestino de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Congestão vascular. (HE), (40x).

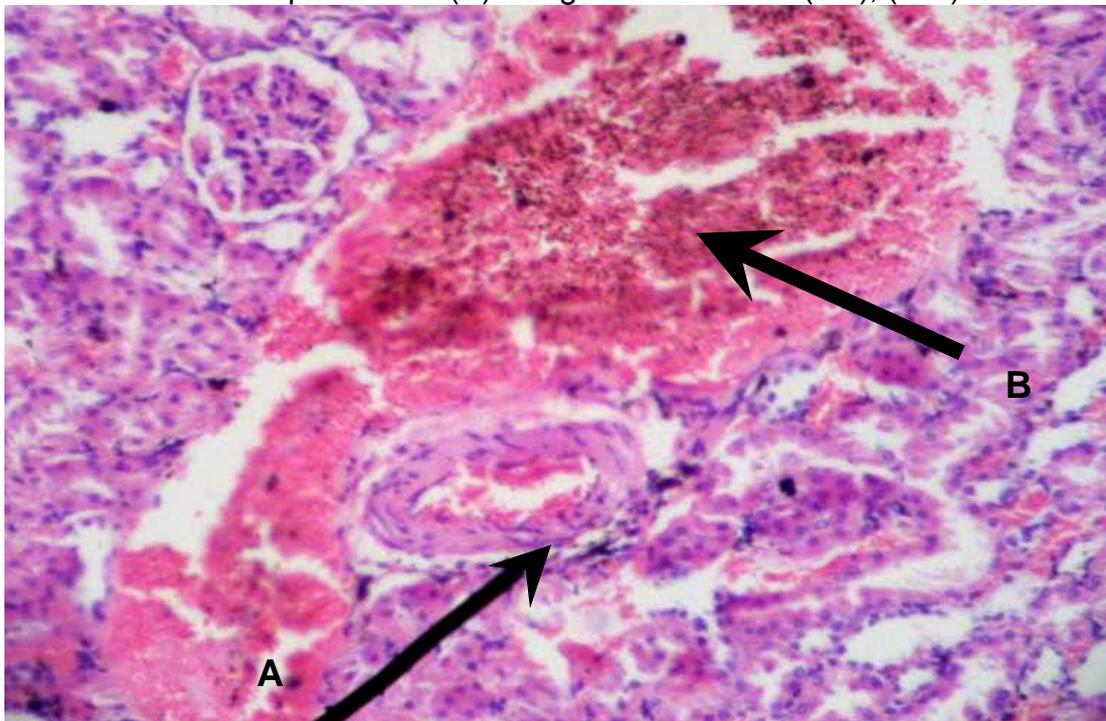


FIGURA 92: Fotografia do rim de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Congestão vascular e hemorragia intersticial focal (B). (HE), (20x).

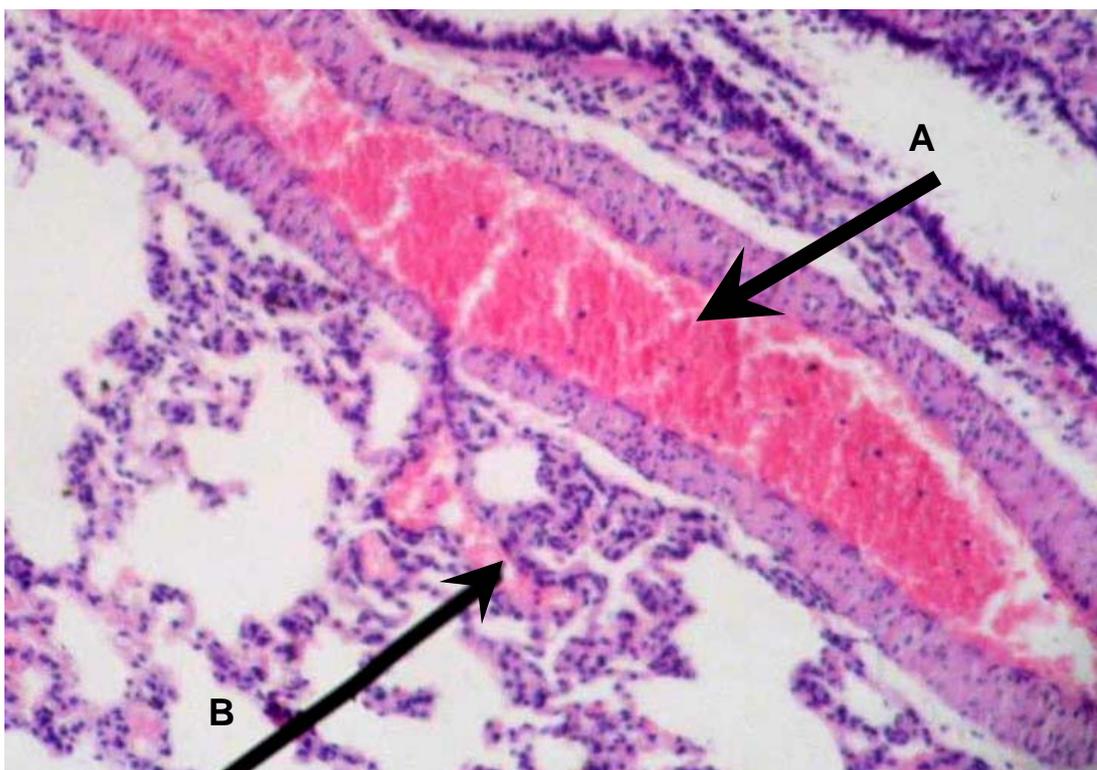


FIGURA 93: Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Congestão de grandes vasos e capilares intersticiais (B). (HE), (40x).

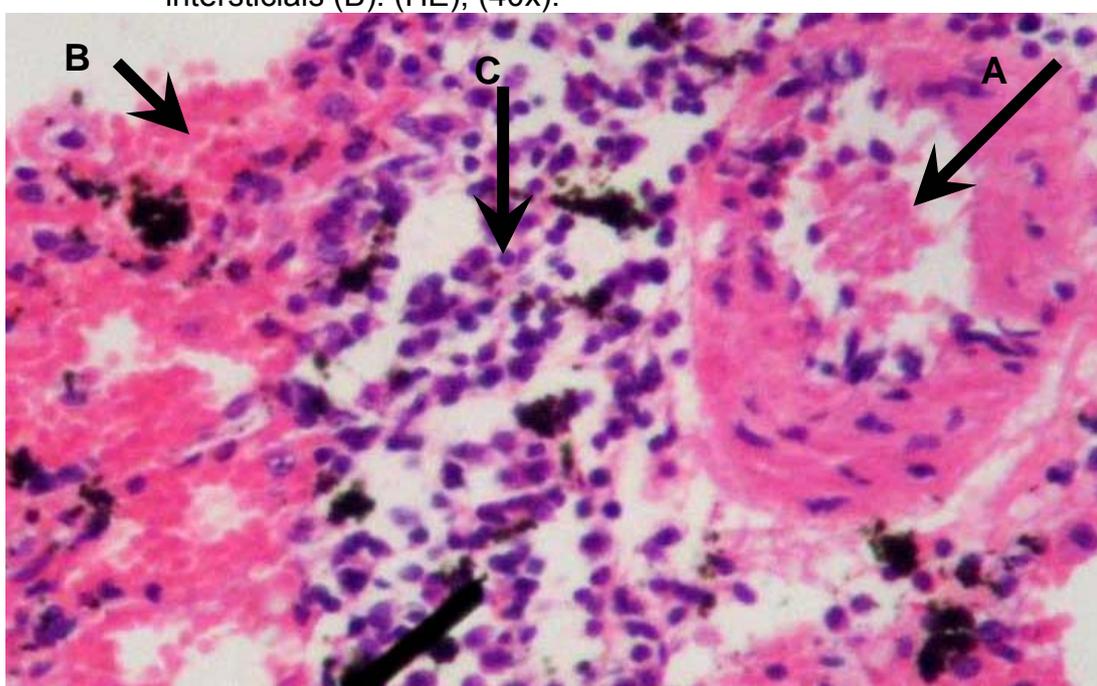


FIGURA 94: Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Congestão de pequenos vasos, (B) hemorragia e (C) infiltrado linfopolimorfonuclear. (HE), (40x).

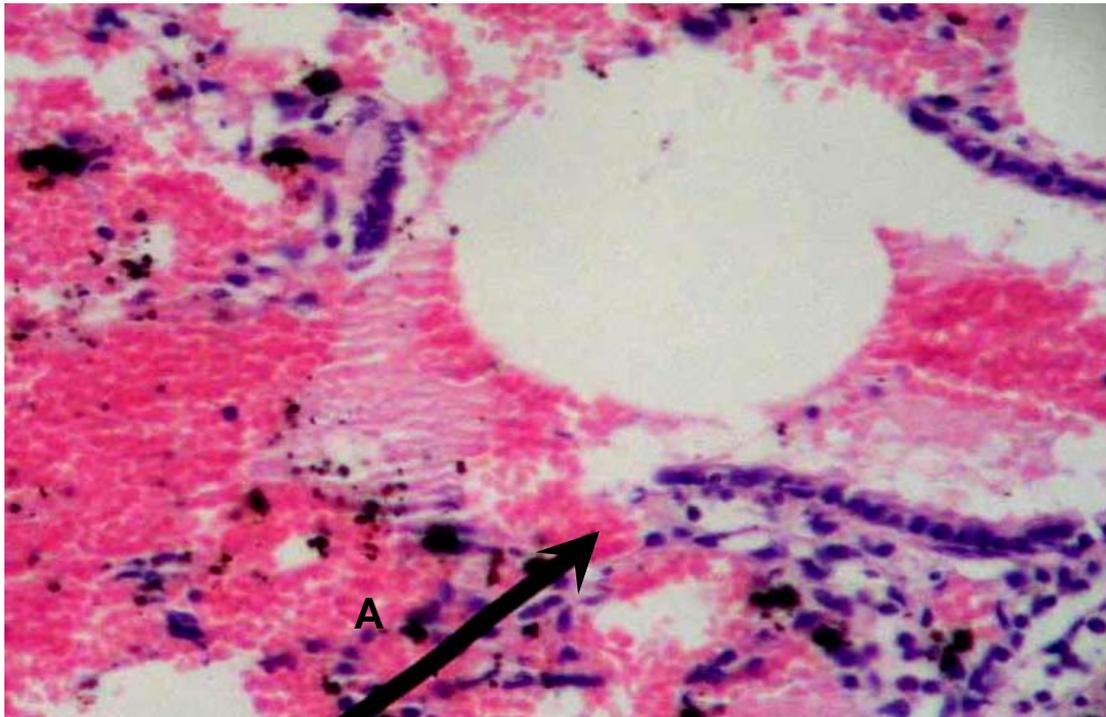


FIGURA 95: Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. (A) Intensa hemorragia difusa bronquioloalveolar. (HE), (40x).

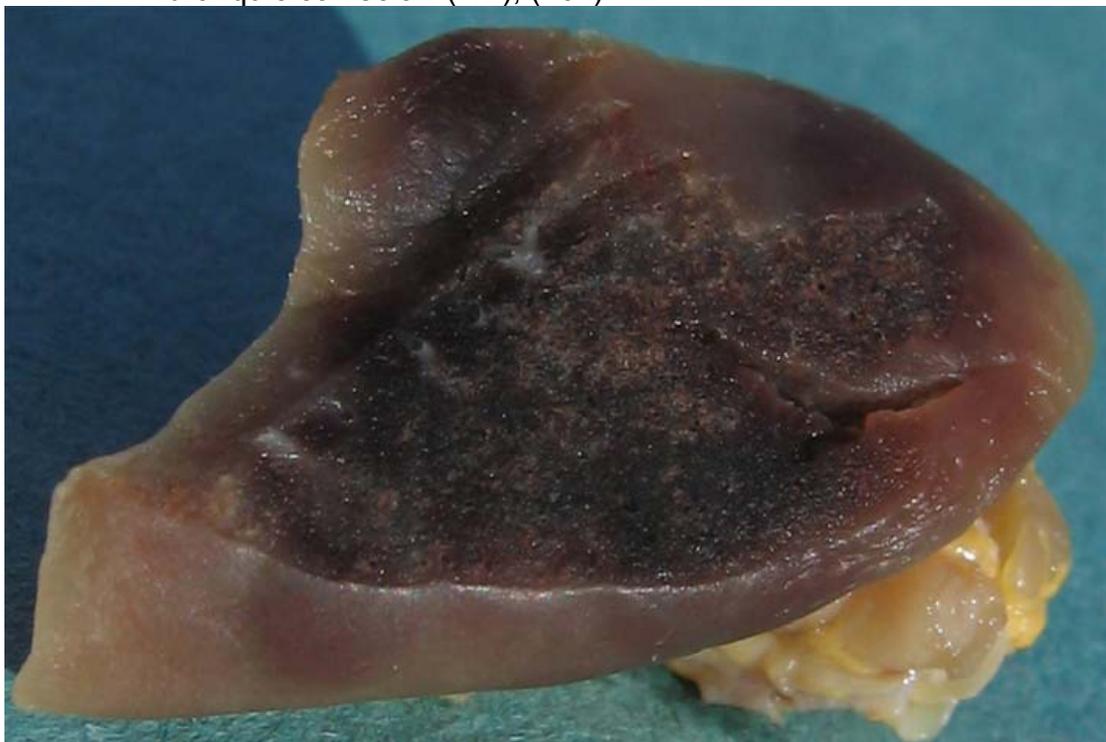


FIGURA 96: Fotografia do pulmão de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* em circulação sistêmica (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/mL), ao final do experimento. Hemorragia macroscópica.

5.3 Efeitos do Veneno da *Bothrops insularis* no Leito Vascular Mesentérico

5.3.1 Alterações fisiológicas do veneno no leito vascular mesentérico

O veneno da *Bothrops insularis* (BiV, 100 μ g/mL/min) induziu uma redução significativa [109,10 \pm 5,104 mmHg* (*p<0,05)] na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico pré-contráido com fenilefrina [139,60 \pm 7,153 mmHg (*p<0,05)] do sistema obtida com a infusão de fenilefrina (5 μ M/mL/min). Isoladamente o veneno [30,63 \pm 2,248 mmHg* (*p<0,05)] produziu uma redução significativa em relação ao controle [38,00 \pm 0,2783 mmHg (*p<0,05)], [(pressão basal de estabilização do leito), (Tabela 38, 39; Figura 97, 98)].

A pressão de perfusão basal do leito mesentérico foi elevada de uma média 38,00 mmHg para 139,60 mmHg, após a administração de fenilefrina, correspondendo a uma elevação de 367,37% (Tabela 38; Figura 97).

A pressão de perfusão máxima obtida com a fenilefrina foi de 163,5 mmHg, que estabilizou em 137,5 mmHg, a pressão submáxima obtida com a aplicação da fenilefrina na qual foi administrado conjuntamente o veneno, correspondendo a 84,09% da pressão arterial máxima (Anexo C).

A pressão de perfusão sofreu elevação média provocada pela fenilefrina para 139,60 mmHg e foi diminuída quando a fenilefrina foi associada ao veneno para 109,10 mmHg, correspondendo a uma redução de 21,84% (Tabela 38; Figura 97).

Os valores da pressão de perfusão variaram da média de 139,6 mmHg, após a infusão da fenilefrina, para 30,63 mmHg com a infusão do veneno isoladamente. Esta diminuição corresponde a aproximadamente 78,05 % da contração média produzida pela fenilefrina (Tabela 38; Figura 97).

O controle apresentou uma pressão de perfusão média de 38,00 mmHg, que diminuiu para 30,63 mmHg com a injeção do veneno isoladamente, correspondendo a uma redução de 19,39 % (Tabela 38; Figura 97).

Aleatoriamente, em um dos experimentos foi readministrada fenilefrina após o final da avaliação, constatando-se a integridade do leito vascular cuja resposta á fenilefrina mostrou nova elevação da pressão de perfusão.

TABELA 35: Pressão de leito mesentérico em ratos tratados (n=6), exclusivamente com Fenilefrina (5 μ M); com o veneno de *Bothrops insularis* (BiV, 10 μ g/mL/min) e fenilefrina (5 μ M); e somente com o veneno (10 μ g/mL/min).

Drogas	Resultados
Pressão basal (controle)	38,00 \pm 0,2789
Fenilefrina (5 μ M)	139,60 \pm 7,153 ^a
Fenilefrina (5 μ M)+BiV (10 μ g/mL/min)	109,10 \pm 5,104 ^b
BiV (10 μ g/MI/min)	30,63 \pm 2,248 ^{a,b,c}

Resultados expressos em Média \pm EPM.

a = p<0,05 em relação à pressão basal; b = p<0,05 em relação a fenilefrina; a,b,c = p<0,05 em relação ao controle, à fenilefrina, à fenilefrina com o veneno.

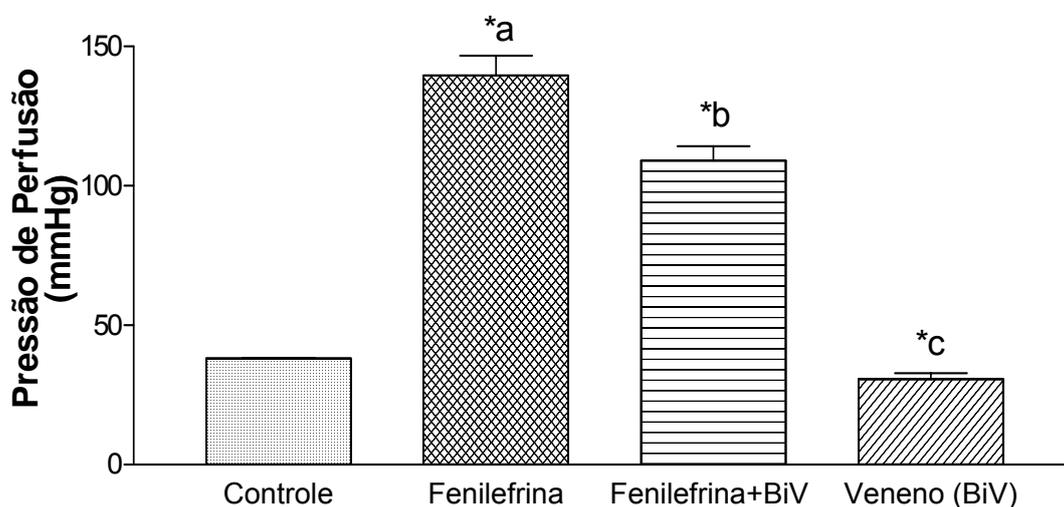


FIGURA 97: Ação do veneno da *B. insularis* no leito mesentérico de ratos (n=6), (BiV, 10 μ g/mL/min), com redução significativa da pressão de perfusão basal.

Resultados expressos em Média \pm EPM.

*a = p<0,05 em relação à pressão basal; *b = p<0,05 em relação a fenilefrina; *c = p<0,05 em relação ao controle e à fenilefrina com o veneno.

TABELA 36: Alterações da pressão arterial mesentérica em ratos tratados (n = 6), exclusivamente com Fenilefrina (5 μ M); com o veneno de *Bothrops insularis* (BiV, 10 μ g/mL/min) e com Fenilefrina (5 μ M); e somente com o veneno (10g/mL/min).

Drogas	Pressão Arterial
Fenilefrina (5 μ M)	↑
Fenilefrina (5 μ M)+BiV (10 μ g/mL/min)	↓
BiV (10 μ g/mL/min)	↓↓

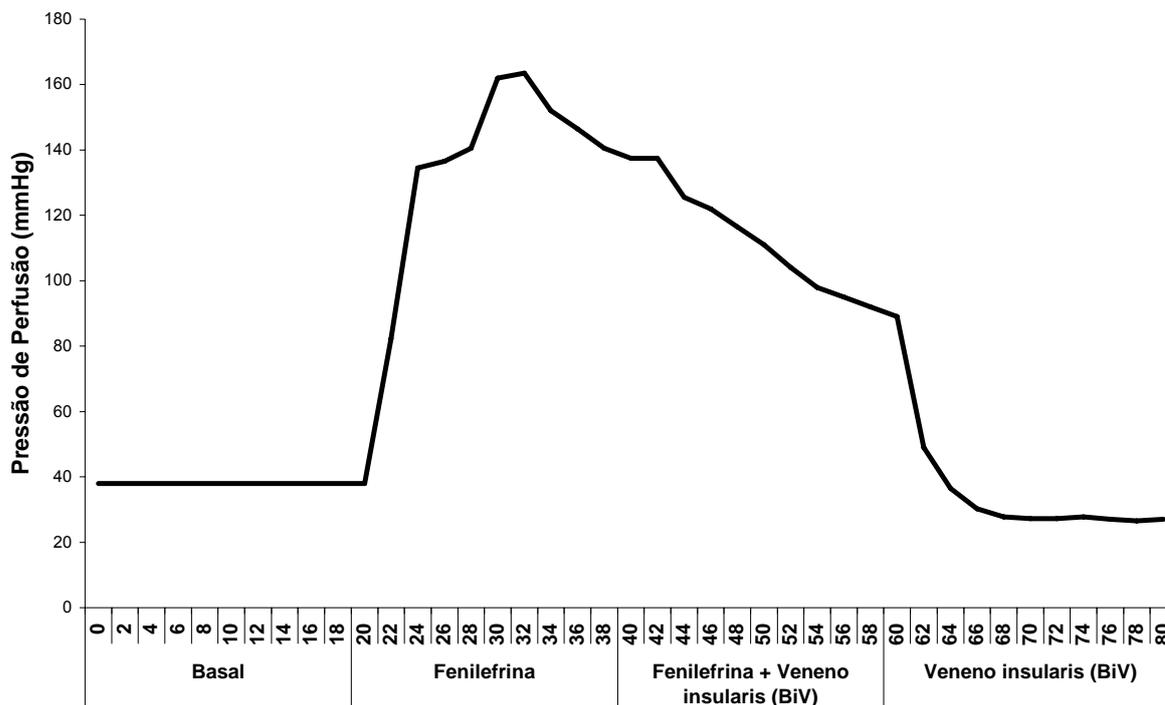


FIGURA 98: Traçado da perfusão de leito vascular mesentérico isolado de rato, obtido após infusão de Fenilefrina ($5\mu\text{M}/\text{mL}/\text{min}$); de Fenilefrina ($5\mu\text{M}/\text{mL}/\text{min}$) e o veneno da *Bothrops insularis* (BiV, $10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$); e somente com o veneno da *Bothrops insularis* (BiV, $10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$).

5.3.2 Alterações histopatológicas do veneno no leito mesentérico

Não foram observadas alterações macroscópicas no tecido periférico ao leito mesentérico perfundido (Figura 99).

Microscopicamente os vasos apresentavam as células adiposas, células de revestimento endotelial e musculatura lisa vascular, também sem alterações evidentes ao microscópio óptico (Figura 100, 101).

O grupo controle não apresentava alterações.



FIGURA 99: Mesentério de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$), ao final do experimento. Macroscopia..

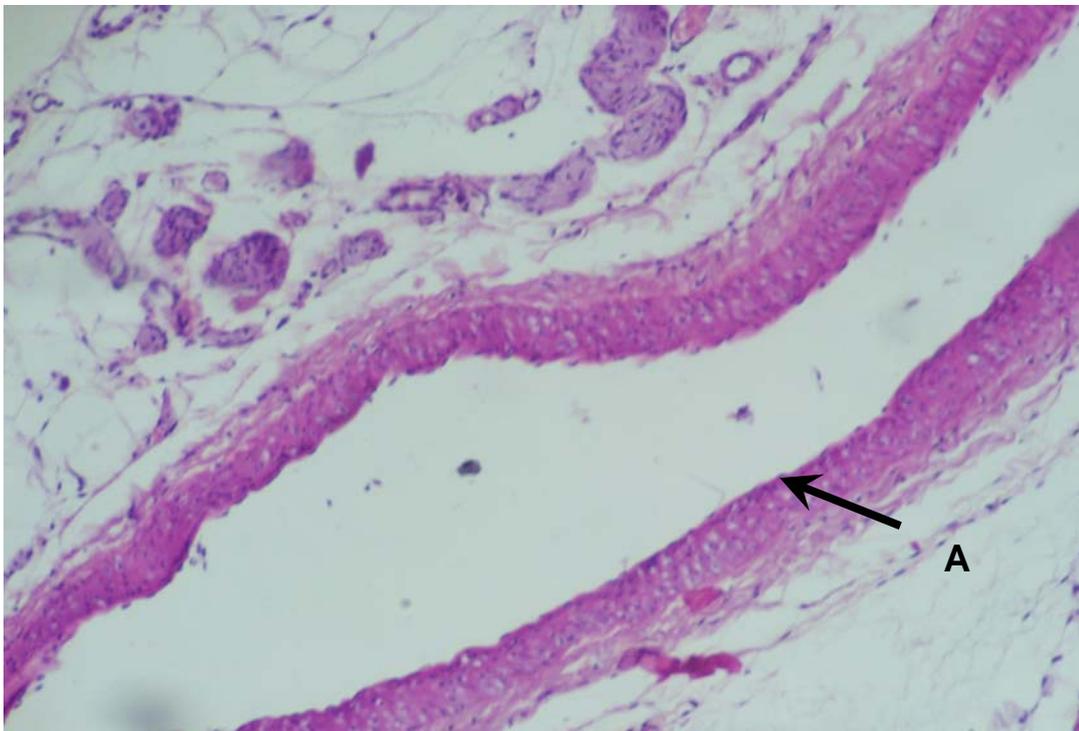


FIGURA 100: Mesentério de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$), ao fim do experimento. Adipócitos e artéria mesentérica preservados. (20x).

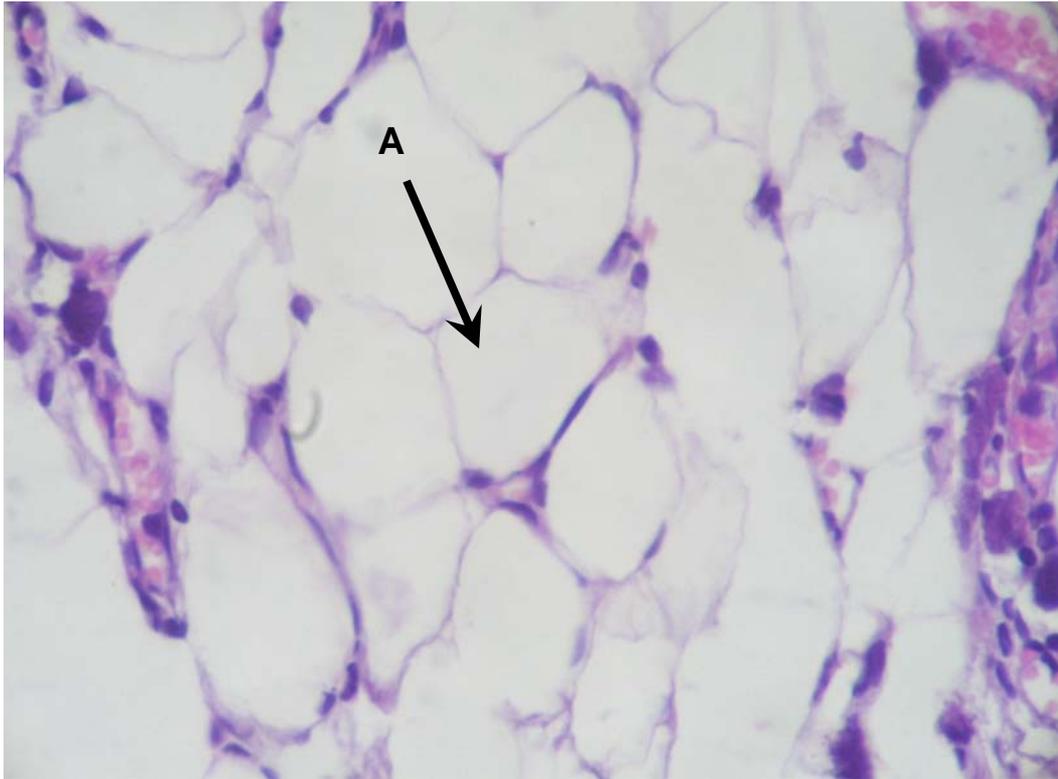


FIGURA 101: Mesentério de rato na presença de veneno da *Bothrops insularis* ($10\mu\text{g/mL/min}$), ao final do experimento. Tecido adiposo preservado (A). (40x).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Efeitos no Rim Isolado de Rato

O veneno e as diversas frações estudadas apresentaram respostas características próprias que estão referidas separadamente. A fração trombina símile participou com o maior aumento da permeabilidade, deixando extravasar material proteináceo em um número maior de glomérulos (73% dos glomérulos), (Tabela 5, 6; Figura 18). A fração lectina provocou necrose tubular aguda em maior extensão (Tabela 5; Figura 45). É provável que parte expressiva destas ações tenha decorrido da liberação de mediadores pelas células renais, estimuladas pelo veneno ou frações que foram perfundidas (Tabela 40).

TABELA 37: Prováveis mediadores liberados pelas células renais na presença das frações estudadas, no início e no final de cada experimento.

Fração do Veneno	Mediadores Iniciais	Mediadores Finais
Lectina	<ul style="list-style-type: none">• Tromboxano A2.• Fator de Ativação Plaquetário (PAF)<ul style="list-style-type: none">– Alta dose	<ul style="list-style-type: none">• Óxido Nítrico• Purinas<ul style="list-style-type: none">– Guanosina
L-Aminoácido Oxidase (LAAO)	<ul style="list-style-type: none">• Peróxido de hidrogênio<ul style="list-style-type: none">– Óxido Nítrico	<ul style="list-style-type: none">• Óxido Nítrico• Purinas<ul style="list-style-type: none">– Guanosina
Trombina símile	<ul style="list-style-type: none">• Receptores ativados por proteinases<ul style="list-style-type: none">– RAP 1• Proteinoquinase C	<ul style="list-style-type: none">• Bradicinina• Óxido nítrico
Fosfolipase A2	<ul style="list-style-type: none">• Tromboxano A2• Fator de Ativação Plaquetária – (PAF)<ul style="list-style-type: none">– Alta dose	<ul style="list-style-type: none">• Endotelina• Fator de Ativação Plaquetária – (PAF)<ul style="list-style-type: none">– Baixa dose

• Efeitos do veneno no rim isolado de rato

Os efeitos causados pelo veneno de *Bothrops insularis* sugerem a sua nefrotoxicidade direta em rim isolado de rato, com redução de todos os parâmetros funcionais renais analisados. Houve queda nos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal (Tabela 7; Figura 19, 20); nos parâmetros

funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular (Tabela 8; Figura 21, 22); nos parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio e do cloreto (Tabela 9,11; Figura 23, 24, 27), sem alteração significativa no de potássio (Tabela 10; Figura 25, 26) , além de queda no clearance osmótico (Tabela 12; Figura 29).

Segundo Sitprija e Chaiyabutr (1999), os efeitos renais no envenenamento ofídico decorreriam de coagulação intravascular disseminada, de ação nefrotóxica direta pela ação proteolítica do veneno, ou de espasmos dos vasos renais decorrente da liberação de substâncias vasoativas. Monteiro e Fonteles, 1999, testaram o veneno da *Bothrops jararaca* em sistema de rim isolado de rato, observando diminuição da pressão de perfusão, do fluxo urinário, do ritmo de filtração glomerular e do percentual de transporte tubular de sódio, potássio e do clearance osmótico, sugerindo a participação do PAF nestes efeitos, já que sua inibição específica por triazolobenzodiazepina (WEB 2086) bloqueava estas alterações. Havt et al., 2001, trabalhando com o veneno da *Bothrops jararacussu* no mesmo sistema, também constataram a diminuição da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular, com reversão dos efeitos no fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular ao final do experimento.

Barbosa e et al., 2002, compararam os efeitos do veneno da *Bothrops moojeni* com algumas de suas frações e observaram resultados muito diferentes. O veneno completo apresentou-se com as mesmas características dos venenos *Bothrops* em geral, mas as frações fosfolipase A2 demonstraram alguns efeitos opostos, sugerindo que o conjunto das frações resulta num somatório das atividades com efeitos mais complexos.

Havt et al., 2005, demonstraram que o veneno da *Bothrops pirajai* apresentava as mesmas respostas que uma lectina, dele extraída, com redução de todos os parâmetros renais, vasculares funcionais renais e na reabsorção de eletrólitos como o sódio, o cloreto e o potássio, estudados no sistema de rim isolado de rato. As respostas eram semelhantes as de outros venenos botrópicos previamente analisados pelo mesmo sistema de rim isolado de rato (BARBOSA et al., 2002; HAVT et al., 2001; MONTEIRO; FONTELES, 1999). Eles propuseram que provavelmente os resultados decorriam da liberação de mediadores inflamatórios

liberados por células endoteliais e mesangiais, estimuladas pelo veneno e seus componentes.

Em nosso trabalho o veneno da *B. insularis*, produziu uma queda em todos os parâmetros renais avaliados, compatível com os estudos anteriormente citados, sem, entretanto, qualquer reversão dos parâmetros ao final do experimento (Tabela 4). Os potenciadores da bradicinina presentes nos venenos *Bothrops*, já bem estudados por Ferreira (1992), que influenciam na produção renal de bradicinina seguida da de óxido nítrico, explicariam esta queda. O veneno, em nosso estudo, também apresentou respostas diferentes daquelas observadas quando testamos suas frações com atividade fosfolipase e trombina símile. O resultado de sua atividade se assemelhou mais aos efeitos produzidos pela fração com atividade L-aminoácido oxidase e lectina (Tabela 4). É provável que sua atividade decorra de efeito tóxico direto sobre as células renais (SITPRIJA; CHAIYABUTR, 1999), levando a um quadro de insuficiência renal aguda (KUMAR; ABBAS; FAUSTO et al., 2004), com parada do funcionamento da reabsorção de eletrólitos pelas células tubulares e relaxamento das células musculares lisas dos vasos, compatível com o achado histopatológico de necrose tubular aguda [(Tabela 5; Figura 31), (D'ABREU, 1996; DA CRUZ HOFLING et al., 2001)].

- **Achados histopatológicos com o veneno**

O veneno da *Bothrops insularis*, neste trabalho, alterou a arquitetura renal provocando focos de necrose tubular aguda, provavelmente por toxicidade direta dele ou de suas frações (Figura 31). As alterações renais do tipo necrose tubular, afetando principalmente os túbulos contornados proximais, já foram descritas como resultantes da atividade do veneno da *Bothrops insularis*, como também vacuolização e irregularidades na borda em escova das células de revestimento destes túbulos (D'ABREU, 1996; DA CRUZ HOFLING et al., 2001). A necrose tubular aguda é uma lesão irreversível do epitélio tubular renal (ALPERS, 2005) com duas etiologias potenciais. A isquemia, nos casos de insuficiência circulatória renal como a que ocorre no choque hipovolêmico pela diminuição do fluxo sanguíneo renal; e a lesão tóxica direta do epitélio de revestimento tubular, no caso de intoxicações químicas, como nos envenenamentos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO,

2005). No presente caso a lesão direta pela toxicidade do veneno teria determinado a morte do epitélio.

Os fenômenos degenerativos representados por balonização hidrópico-vacuolar extensa das células de revestimento tubular são lesões reversíveis que refletem as fases iniciais da agressão tóxica do veneno, que culminou com a necrose tubular aguda (Figura 30). Podem decorrer de desequilíbrio eletrolítico e hemodinâmico, observado nas fases iniciais do choque hipovolêmico (ORDÓNES; ROSAI, 2004). A discreta deposição intratubular de material proteináceo decorreu da lesão epitelial tubular que provocou o acúmulo de proteína liberada do citoplasma das células lesadas, juntamente com resíduos citoplasmáticos (Figura 31). Não foram encontrados os achados referidos por Resende (1989) a respeito de hemorragia e infiltrado leucocitário glomerular com deposição de fibrina, os quais, provavelmente, decorreram do maior tempo de exposição ao veneno nos casos de acidentes ofídicos, ou resultaram da deposição de hemácias, células inflamatórias e fibrina no espaço urinário (AUNG-KHIN, 1978), células e material que não estão presentes no sistema de perfusão de rim isolado. O veneno não provocou extravasamento proteináceo para o espaço de Bowman, não influenciando a permeabilidade capilar glomerular (Tabela 6; Figura 18).

- **Efeito da fração lectina no rim isolado de rato**

Os rins tratados com a fração lectina apresentaram uma resposta marcante, porém variada. Os parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal sofreram uma elevação inicial, embora esta última não tenha apresentado significância estatística, com queda posterior (Tabela 13; Figura 32, 37); os parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular caíram progressivamente (Tabela 14; Figura 34, 35). Houve aumento da reabsorção eletrólitos como o sódio, e o potássio (Tabela 15, 16; Figura 36, 37, 38, 39). A reabsorção do cloreto não se alterou significativamente (Tabela 17; Figura 40, 41), e diminuiu o clearance osmótico (Tabela 18; Figura 42).

Lectinas do tipo-C mostram atividades contra fatores de coagulação (IX, X, VWF), inibição da agregação plaquetária e da trombina, afetando a homeostase e

trombose (OGAWA et al., 2005). São heterodímeros constituídos de subunidades idênticas α e β . A família das lectinas do tipo C, dos venenos das serpentes, possui características biológicas muito variáveis, apesar de manterem uma estrutura primária bem conservada, com domínios de reconhecimento de carboidrato homólogos às verdadeiras lectinas do tipo C (DRICKAMER, 1999).

Havt et al., 2005, demonstraram que a lectina extraída do veneno da serpente *B. pirajai* induzia redução significativa na pressão de perfusão, da resistência vascular renal, no fluxo urinário, e no ritmo de filtração glomerular, no rim isolado de rato. Eles propuseram que estes resultados provavelmente se deviam à liberação de mediadores produzidos pelas células endoteliais e mesangiais estimuladas pela lectina. Por outro lado, como estes resultados eram semelhantes aos produzidos pelo veneno da *B. pirajai*, eles acreditaram que a lectina era a fração mais influente nos efeitos renais, embora sugeriram que a lectina possa alterar parâmetros dependentes do aumento da permeabilidade, como o fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular, através de mecanismos diferentes. Entretanto, ao tentar potencializar a atividade da bradicinina na contração do íleo de cobaia com a lectina não obtiveram resultado, o que acontecia no controle em que estava captopril. Também a lectina não afetava a pressão de perfusão basal ou pré-contraída de artéria mesentérica isolada.

Trabalhos recentes demonstraram que lectinas de plantas e animais podem promover a liberação de mediadores inflamatórios (ALENCAR et al., 1999; ASSREUY et al., 2002). Havt et al., 2003, trabalhando com lectinas vegetais no mesmo sistema, observaram a elevação da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, que sugeriu serem conseqüentes à liberação de eicosanóides de atividade vasoconstritora como o tromboxane A_2 , ou outros fatores endoteliais vasoativos, pois foram bloqueados pela indometacina. Em estudo mais detalhado, Barraviera, et al., 1995, observou que pacientes picados por serpentes podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, frações de complemento, e fator de ativação plaquetária (PAF). Todas estas substâncias podem ser também liberadas pelas células renais (HAVT et al., 2001; KOEPPEN; STANTON, 1997). Neste sentido, prostaglandinas renais poderiam interferir também no transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, promovido pela lectina (HAVT et al., 2005). Os

eicosanóides renais representam um papel importante autoregulador na função renal modificando a hemodinâmica e fisiologia glomerular e tubular (FOEGH, et al., 1998).

Em nosso trabalho a perfusão do rim com a solução de Krebs-Henseleit, sem plasma, exclui a atividade descrita das lectinas relacionadas à hemaglutinação, inibição da trombina ou de fatores da coagulação. Como os parâmetros vasculares sofreram uma rápida elevação inicial com queda posterior e os parâmetros funcionais renais caíram progressivamente, é provável que as a lectina testada apresente outras características ainda não esclarecidas, como a agressão tóxica direta [(Tabela 4), (DE CARVALHO et al., 2001; KASSAB et al., 2004)]. Diferentemente do trabalho de Havt et al., 2005 com a lectina da *Bothrops pirajai*, os resultados observados com a lectina da *Bothrops insularis* não foram os mesmos daqueles com o veneno, exceto no final. Entretanto, o aumento inicial nos parâmetros vasculares poderia ser decorrente da estimulação das células mesangiais e endoteliais pela lectina, com liberação de eicosanóides vasoconstritores como o Tromboxane A₂, seguido da liberação de vasodilatadores como a bradicinina ou outros derivados eicosanóides como prostaglandinas, ou do fator de ativação plaquetário (PAF) que em baixas doses tem efeito vasodilatador, todos capazes de diminuir a pressão vascular e de perfusão renal. O aumento da reabsorção de eletrólitos, com conseqüente diminuição do clearance osmótico (Tabela 4), poderia decorrer da ativação da bomba de Na⁺/K⁺/Cl⁻, em um efeito inverso ao descrito por Teixeira et al. (2001) para proteínas vegetais. A maior reabsorção de eletrólitos carregaria água e levaria à redução do filtrado. O potássio, excretado em troca do NaCl, retornaria passivamente devido à grande permeabilidade das células tubulares a este íon (GUYTON, 2002).

Até o momento, entretanto, não existem provas determinantes de quais mediadores estão envolvidos nestas alterações.

- **Achados histopatológicos com a lectina**

Os achados histopatológicos provocados pela ação da lectina revelaram alteração da arquitetura renal, com diversos focos de necrose tubular aguda e deposição proteínácea no espaço de Bowman, devido a extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares (Tabela 5, 6; Figura 43, 45). A atividade lectina,

ou seja, de proteína que se liga a açúcares, é característica de algumas proteínas de adesão celular a outras células e à matriz extracelular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). É o caso das selectinas, importantes na adesão e migração leucocitária nos de mamíferos, as quais se ligam pelo seu domínio lectina a oligossacarídeos sializados, como o sializado de Lewis X, que por sua vez estão ligados covalentemente a outras glicoproteínas de receptores de membrana. Dentre as selectinas a E-selectina (CD62E, previamente denominada ELAM-1) é tipicamente expressa no endotélio. Juntamente com as integrinas, outras glicoproteínas, como a laminina e fibronectina, expressas na superfície celular possibilitam a ligação entre células endoteliais e a glicoproteínas da membrana basal. Sua expressão é estimulada por certas citocinas pró-inflamatórias, e sendo as integrinas capazes de alterar a conformação do citoesqueleto com contração celular, ampliando os poros juncionais intercelulares do endotélio, uma das alterações do endotélio relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular na inflamação aguda (RANG et al., 2004). Marcinkiewicz et al. (2000) isolaram uma lectina do veneno de *Echis multisquamatus*, um potente e seletivo inibidor da integrina $\alpha 2\beta 1$. A lectina ainda poderia substituir as ligações de oligossacarídeos ou polissacarídeos como proteoglicanos, às glicoproteínas de adesão da superfície celular, deixando as células livres de suas ligações intercelulares, ampliando novamente os poros intercelulares, o que permitiria o extravasamento do perfusato para a cápsula de Bowman. Outro mecanismo de aumento da permeabilidade é a injúria direta ao endotélio, já bem caracterizada pela lectina do veneno da *Bothrops jararacussu* (DE CARVALHO et al., 2001; KASSAB et al., 2004), permitindo também o extravasamento de albumina do perfusato para o espaço de Bowman. Monteiro e Fonteles (1999) sugeriram a ação do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) no aumento da filtração glomerular e no fluxo urinário em sistema idêntico de rim isolado, o qual poderia ser liberado pelas células endoteliais lesadas. Kassab et al. (2004) demonstraram que as lectinas dos venenos das serpentes são citotóxicas para algumas linhagens de células endoteliais e estas sob estresse podem produzir PAF (BALESTRIERI et al., 2004), que por sua vez aumenta a permeabilidade às moléculas plasmáticas, incluindo albumina (HANDLEY et al., 1984), provavelmente por ativação direta das células endoteliais da microvasculatura (VICTORINO; NEWTON; CURRAN, 2004). Uma lectina do veneno da *Bothrops jararaca*, a

bothrojaracin (BJC), inibe a trombina por se ligar ionicamente aos seus sítios I e II, através dos quais ela exerce sua função de agregação plaquetária e quebra do fibrinogênio (AROCAS et al., 1996; ZINGALI et al., 1993). Possivelmente estes mesmos sítios são aqueles capazes de ativar a produção de PAF pelo endotélio, agindo a lectina como substituto da trombina nesta sua ação específica (RANG et al., 2004). As lectinas também podem agir como anticoagulantes com atividade antitrombina, atividade esta inexistente no sistema perfundido sem sangue como este.

Os fenômenos celulares degenerativos, representados em nosso estudo por núcleos de cromatina condensada característicos da moderada necrose tubular aguda, foram bem visíveis, e refletem a citotoxicidade direta da lectina, já descrita por alguns autores para certas linhagens celulares tumorais [(Figura 45), (DE CARVALHO et al., 2001)]. Ela participou com maior intensidade no potencial citotóxico do veneno, provocando necrose tubular aguda em maior extensão (+++), embora apenas tardiamente tenha provocado alterações fisiológicas sugestiva de redução da função renal (Tabela 4, 5; Figura 45). Esta citotoxicidade pode ter contribuído para o extravasamento proteináceo glomerular, como resultado de agressão endotelial e aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares (Tabela 6; Figura 18, 43). A balonização hidrópica por vacuolização extensa com descontinuidade da borda em escova das células de revestimento tubular e a descamação destas células para a luz tubular sinais reversíveis de sofrimento celular, foram observados em maior intensidade do que quando ocorreram nas outras frações estudadas, demonstrando o potencial lesivo inicial da lectina (Figura 44). Também foram vistas nos controles, porém em menor intensidade e limitadas à camada cortical do rim.

- **Efeito da fração L-aminoácido oxidase no rim isolado de rato**

Os rins tratados com a fração L-aminoácido-oxidase extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, apresentaram intensas alterações da função renal (Tabela 4). Os parâmetros vasculares e funcionais renais sofreram uma redução importante e precoce, sendo o fluxo urinário reduzido desde a primeira avaliação, aos 60 minutos (Tabela 19, 20; Figura 46, 47, 48, 49). Todos os eletrólitos

apresentaram redução na reabsorção. O sódio total e proximal no final, juntamente com o cloreto e o potássio que sofreu redução significativa a partir dos 90 minutos (Tabela 21,22,23; Figura 50, 51, 52, 53, 54, 55). O clearance osmótico foi reduzido desde o início do experimento, embora de modo significativo apenas depois dos 90 minutos (Tabela 24; Figura 56).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, capazes de atuar na ativação de plaquetas, na citotoxicidade por indução de apoptose e de provocar hemorragia (DU, CLEMETSON, 2002). Nos venenos crotálicos elas se associam especificamente às células endoteliais de mamíferos, induzindo apoptose (SUHR; KIM, 1996). Com relação à função plaquetária seu efeito tem sido descrito como dúbio, porém este efeito seria através da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), inibindo a interação de uma integrina (GPIIb/IIIa), expressa na superfície da plaqueta ativada, com o fibrinogênio. Outros autores observaram a ativação da agregação plaquetária humana (ALI et al., 2000) ação também relacionada ao H_2O_2 . A LAAO induz a agregação plaquetária pela produção de peróxido de hidrogênio, que por sua vez aumenta a produção de Tromboxane A_2 dependente de cálcio (DU; CLEMETSON, 2002), fato pouco expressivo neste sistema desprovido de plaquetas. As LAAOs são também capazes de promover a hipotensão pela ativação da guanilato ciclase solúvel e ativação da cGMP na presença de peróxido de hidrogênio e superóxido dismutase (AIRD, 2002), atuando cGMP no relaxamento da musculatura lisa (RANG et al., 2004), em vasos com ou sem endotélio (MARCZIN; RYAN; CATRAVAS, 1992; SCHMIDT et al., 1992). O peróxido de hidrogênio pode ativar a óxido nítrico sintetase gerando óxido nítrico através da L-arginina, o qual se difunde através da membrana celular e ativa a guanilato ciclase solúvel (AIRD, 2002) ou atuar diretamente na produção de óxido nítrico (MITTAL, 1993; KIM et al., 1998).

A indução da apoptose pelas LAAOs está relacionada a células do endotélio vascular (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997), envolvendo também a produção de peróxido de hidrogênio. Muitas evidências sugerem que é desencadeada pelo mecanismo celular oxidativo, já que os agentes que a promovem são oxidantes ou estimulantes deste mecanismo (DU, CLEMETSON, 2002). O peróxido de hidrogênio induz a expressão de Fas em células endoteliais, através de uma proteína tirosinoquinase. Fas é uma proteína de membrana da família dos receptores do fator

de necrose tumoral e do fator de crescimento neural, mediadores da morte celular, e media a apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio (SUHARA et al., 1998). O H_2O_2 aumenta ainda a atividade da caspase 3, uma cisteína protease, bem reconhecida na indução da morte celular (DIPIETRANTONIO et al., 1999), fato que embora não esteja diretamente relacionado com a atividade das LAAOs, reforça o envolvimento do H_2O_2 no mecanismo da apoptose. As condições patológicas resultando em lesão celular com liberação de altos níveis de purinas podem provocar apoptose (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). A guanosina provavelmente contribui com a hipotensão que ocorre nos envenenamento ofídicos pelo aumento do cGMP no endotélio vascular (AIRD, 2002). As L-aminoácido oxidases podem liberar leucina que acelera a atividade de proteases quimiotripsinas-símiles endógenas, colaborando com as metaloproteases dos venenos em sua ação proteolítica (AIRD, 2002). A função primária das LAAOs é provavelmente promover hipotensão pela ativação de guanilato ciclase solúvel, na presença de superóxido dismutase, e seu potencial apoptótico, nos venenos das serpentes, tem mais função digestiva do que de captura (AIRD, 2002).

Exclusivamente as células endoteliais, mesangiais, e tubulares no rim isolado de rato, sofrem a ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou de purinas, já que não há circulação de plaquetas neste sistema. Elas são aptas também, a partir de lesão celular com conseqüente liberação de radicais livres do oxigênio, a liberar derivados do ácido aracdônico, neste caso prostaciclina (PGI_2), pois são ricas em prostaciclina sintetase. A prostaciclina é um potente vasodilatador, agindo ainda sinergicamente com outros vasodilatadores inflamatórios, como a bradicinina e a histamina, e promove a natriurese inibindo a reabsorção tubular de sódio (RANG et al., 2004). Causa aumento da permeabilidade capilar, embora esta ação seja descrita como indireta, resultante da potencialização dos efeitos de mediadores como a bradicinina e a histamina. Dentre outros efeitos biológicos, Ali et al., 2000, estudando as LAAOs com o modelo da pata de rato, observou a formação de edema pronunciado após uma hora da injeção de LAAO do veneno da *E. macmahoni*. É possível, portanto, que a vasodilatação e o extravasamento proteináceo decorram da liberação de prostaciclina, histamina e bradicinina, nas células renais (PIROTZKY et al., 1984), em contacto com peróxido de hidrogênio ou com purinas (AIRD, 2002).

Desta maneira, ainda que em nosso estudo não se possa precisar o mais influente, a produção de prostaciclina, histamina, bradicinina, ou óxido nítrico, estimulada pela liberação de peróxido de hidrogênio provocada pela LAAO, ou a atividade de purinas como a guanosina, a leucina, ou da guanilato ciclase solúvel na presença da superóxido dismutase, liberadas pelas células apoptóticas, podem ser responsabilizadas pela vasodilatação arteriolar. Esta provocou queda nos parâmetros circulatórios avaliados, a pressão de perfusão e a resistência vascular renal, com conseqüente redução do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular devido à passagem direta do perfusato nos vasos dilatados, sem produzir o filtrado urinário (Tabela 4)..

A apoptose de células tubulares provavelmente produziu a acentuada redução na reabsorção de eletrólitos. Com a manutenção da queda da filtração glomerular, foi observada a queda subsequente do clearance osmótico. Dentre as frações estudadas a LAAO foi a que apresentou um efeito mais próximo daquele produzido pelo veneno, sugerindo que seja a sua atividade promotora da apoptose a maior responsável pela atividade tóxica do veneno da *B. insularis* (Tabela 4).

- **Achados histopatológicos com a L-aminoácido oxidase**

Na histopatologia foram observados fenômenos degenerativos representados por núcleos de cromatina condensada em apoptose; balonização hidrópica por vacuolização extensa das células de revestimento tubular; descamação destas células para a luz tubular; deposição proteínácea moderada nos túbulos proximais (Figura 58); extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteínácea no espaço de Bowman dos glomérulos, apresentando formato de aspecto em crescente (Figura 59). Algum grau de extravasamento foi observado em 40% dos 108 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40x) por lâmina (Tabela 6; Figura 18, 59). O interstício e os vasos estavam normais.

A avaliação histopatologia reflete o aumento da permeabilidade, com o extravasamento de proteínas, observado no espaço de Bowman, e daí para os túbulos, que provavelmente resultou da lesão endotelial pelo estímulo à apoptose ou da atividade de mediadores liberados, como prostaciclina, histamina, bradicinina, ou o óxido nítrico.

A apoptose com núcleos picnóticos foi bem evidenciada, como descrita na literatura, podendo se confundir morfológicamente com o aspecto da necrose tubular aguda [(Figura 57), (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997)]. As áreas observadas com necrose tubular aguda de moderada intensidade com núcleos de cromatina condensada refletem o estímulo à apoptose desencadeado pelas LAAOs (Figura 61a), bem como os sinais reversíveis de sofrimento celular, um passo inicial da morte celular apoptose, como a balonização pela vacuolização citoplasmática e descontinuidade da borda em escova com descamação de células de revestimento tubular proximais e distais para a luz, que também foram vistas nos controles, porém em menor intensidade e limitadas à cortical (Figura 17, 58). Todos estes sinais foram descritos por Aird (2002) como característicos da função digestiva das LAAOs, que resulta da sua ligação direta com a superfície celular (SUHR, KIM, 1996) e liberação de peróxido de hidrogênio (TORII et al., 1997).

- **Efeito da fração trombina símile no rim isolado de rato**

Os rins tratados com a fração trombina símile extraída do veneno da serpente *Bothrops insularis*, apresentaram alterações variadas na função renal ao final do experimento. Observou-se elevação inicial dos valores pressóricos, pressão de perfusão e resistência vascular renal, dos funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, com queda no final (Tabela 25, 26; Figura 60, 61, 62, 63). Houve também queda final no transporte de eletrólitos, como o sódio e o cloreto (Tabela 27, 29; Figura 64, 65, 68, 69), com aumento inicial do transporte de potássio (Tabela 28; Figura 66, 67), e aumento inicial do clearance osmótico com diminuição final (Tabela 30; Figura 70).

CASTRO e et al., em revisão de 2004 sobre as frações com atividade semelhantes à trombina (trombina símile), mostram que elas apresentam outras atividades biológicas totalmente diferentes daquelas características da família. Cita o exemplo da LM-TL do veneno da *Laquesis muta*, composta de um polipeptídeo de cadeia única, produz em camundongos opstótomo e rolamentos convulsivos em torno do eixo longitudinal dos animais. Curiosamente uma serinoprotease homóloga, expressa no sistema nervoso de mamíferos, denominada neuropsina, está envolvida em epileptogênese leve e na plasticidade hipocampal. Ela tem relações estruturais

com tripsina e com o fator de crescimento de nervo gama, um membro da família calicreína. De forma semelhante à LM-TL, a neuropsina forma pontes dissulfídicas correspondendo às aquelas formadas pela tripsina, e seus sítios ativos são também restritos a pequenos resíduos de prolina no substrato. Há uma superposição da sua estrutura cristalizada com a da LM-TL. Alguns neuropeptídeos podem contribuir para a chamada inflamação neurogênica, produzindo, às vezes, contração muscular lisa, como as taquicininas (substância P e neurocinina) (HOLZER, 1988), outras vezes vasodilatação, como na ação do peptídeo relacionado à calcitonina (RANG et al., 2004), promovendo a liberação de óxido nítrico e histamina (KOSTIZA et al., 1995; KOSTIZA; MÉIER, 1996).

Os componentes da família trombina símile promovem a liberação de cininas a partir do cininogênio plasmático, geralmente a bradicinina, produzindo hipotensão (MATSUI et al., 2000; KOMORI; NIKAI, 1997; MARKLAND, et al., 1982; PETRETSKI et al., 2000; KOMORI et al., 2001; SERRANO et al., 1998). É bem conhecida a presença de calicreína em tecidos tais como o pâncreas, as glândulas salivares, a pele e o cólon, capaz de provocar a proteólise do cininogênio gerando bradicinina (GRIESBACHER et al., 2003; PETRAKI; KARAVANA; DIAMANDIS, 2003; KOMATSU, et al., 2005; BARTNIK, 2003).

Katori e Majima, 2003, demonstraram que os túbulos renais distais são capazes de produzir todos os componentes do sistema cinina-calicreína, independentemente do sistema cinina-calicreína plasmático, e que este sistema tecidual ativado induz natriurese e diurese. Além disso o rim é um rico produtor de endotelina, cujos níveis circulantes podem ser aumentados por estímulo da trombina (SOROKIN; KOHAN, 2003).

A ação da bradicinina se processa através da geração de óxido nítrico, prostaglandina (PGI₂), provocando vasodilatação, agindo a calicreína tecidual como importante controle do fluxo sanguíneo para certas glândulas. Provoca aumento da permeabilidade vascular e estimula o transporte de íons e a secreção de líquidos em vários epitélios, incluindo o do intestino, vias aéreas e da vesícula biliar (RANG et al., 2004).

Bagate e et al. (2001), demonstraram a atividade vasodilatadora em rim isolado de rato, produzida por mecanismos envolvendo o receptor B(2), das cininas, ligada a atividade de canais de potássio ativados no endotélio que Quilley e Qiu

(2005), revelaram ser independente da ação do óxido nítrico e prostaglandinas. São receptores de uma categoria abrangente e pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G.

Em alguns tecidos a bradicinina é espasmogênica para o músculo liso, incluindo aquele do intestino e o do útero (CALIXTO, 1995).

Existe uma variedade de forças atuando na monocamada endotelial, cujo somatório determina o dinâmico equilíbrio entre a manutenção de sua integridade e sua responsividade. De um lado as forças que mantêm as células unidas entre si, como as caderinas e moléculas de adesão à membrana basal, e as forças que atuam na tensão centrípeta, contraindo a musculatura vascular lisa, primariamente via fosforilação das miosinas de cadeia leve. O efeito da trombina na indução da ativação da quinase da miosina de cadeia leve é dependente da proteólise do receptor, da mobilização do cálcio, e da ativação da proteinoquinase C. A formação de poros entre na monocamada, evento central na permeabilidade vascular, depende por sua vez da ativação das quinases que fosforilizam a miosina de cadeia leve, um evento obrigatório na contração da musculatura lisa vascular (GARCIA; VERIN; SCHAPHORST, 1996). A contração muscular lisa também pode ser provocada pelas taquicininas (substância P e neurocinina), pertencentes à família das cininas (DE SCHEPPER et al., 2005; QUINN; COLLINS; BAIRD, 2004).

Glusa et al, 1996, já mostraram que em vasos com endotélio desnudo a trombina e peptídios ativadores dos receptores da trombina produzem respostas contráteis dependentes da concentração, associadas com o aumento da produção de trifosfato de inositol e da ativação da proteína quinase C (KUTZ; PAINTZ; GLUSA, 1998). No endotélio intacto ambos induzem relaxamento mediado por óxido nítrico. São efeitos vasculares opostos determinados pela trombina, em receptores diferentes (KU; ZALESKI, 1973).

Receptores ativados por proteínases (RAPs), uma classe de receptores acoplados a proteína G, são ativados pela proteólise e exposição da seqüência NH₂ terminal de proteínas, que age como ligante e ativador deste receptor (DERY et al., 1998; HOLLENBERG; COMPTON, 2002; MACFARLANE et al., 2001). Foram clonados quatro membros desta família de receptores, mas apenas RAPs 1, 3, e 4 são ativados pela trombina. Embora PARs 1, e 4 sejam capazes de gerar sinais

intracelulares após a ativação proteolítica, RAP3 apesar de não sinalizar age como cofator da ativação do RAP4 (HOLLENBERG; COMPTON, 2002).

Os rins expressam em abundância o RAP1 em camundongos e em humanos, com localização detectada nas células vasculares e tubulares (GUI; LOUZENHISER; HOLLENBERG, 2003). O papel funcional do RAP1 na fisiologia renal foi sugerido, em trabalhos recentes, como tendo um papel importante na inflamação renal (CUNNINGHAM et al., 2000), demonstrando o impacto da sua ativação na função vascular periférica (HOLLENBERG et al., 1993, TESHAMARIAM, 1994a; TESHAMARIAM, 1994b).

Gui et al., 2003, utilizando o método do rim isolado de rato, demonstraram que RAP1 causava vasoconstrição renal e diminuição do ritmo de filtração glomerular RFG, mediando a resposta da trombina. Nós observamos resultados similares com a trombina símile da *Bothrops insularis*, fato que sugere a participação de RAP1 neste efeito.

Outros trabalhos relacionam a produção de endotelina à ação da trombina (SOROKIN; KOHAN, 2003). A endotelina é um vasoconstritor potente, produzido por células mesangiais e tubulares renais. Age produzindo efeito autócrino e parácrino e tem meia vida curta devido ao estoque celular limitado. Os receptores da endotelina são membros da família de receptores acoplados à proteína G, e os do tipo 1 (ET1) são os mais encontrados nas células mesangiais. Ao serem estimulados são capazes de modular uma variedade de cascatas intracelulares, regulando a produção de cicloxigenases, tirosinoquinases, e óxido nítrico sintetase. Seu mecanismo de ação envolve a ativação de fosfolipase C, e proteinoquinase C, com resultante aumento da troca de sódio por hidrogênio. Em baixas concentrações a endotelina causa aumento lento da concentração intracelular de cálcio a partir de influxo pelos canais de cálcio voltagem dependente. Em altas concentrações há um aumento rápido e transitório a partir dos estoques intracelulares. O resultado é a contração rápida das células mesangiais (SOROKIN; KOHAN, 2003).

Desta forma, a ativação de receptores RAP1, ou a liberação de endotelina estimulados pela trombina símile, pode ter sido responsável pela rápida elevação inicial da pressão de perfusão e da resistência vascular renal (Tabela 25; Figura 60, 61).

Paralelamente a liberação de bradicinina, sobreposta em seu efeito vasodilatador pela endotelina ou receptores RAP1, aumentou a permeabilidade vascular com o aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular, observados em nosso estudo (Tabela 26; Figura 62, 63). Posteriormente, após o consumo do estoque de endotelina, seria liberada em toda a sua extensão a atividade da bradicinina, com a produção de óxido nítrico relaxamento destas células e queda dos níveis pressóricos, com o perfusato passando livremente pelos vasos glomerulares, determinando queda no ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário (Tabela 4). A reabsorção de sódio e de cloreto foi reduzida no final do experimento, possivelmente devido à atividade da bradicinina, cujos receptores relacionados, B2, possuem atividade natriurética (KATORI; MAJIMA, 2003), como também pela redução do filtrado urinário (Tabela 27; Figura 64, 65). A reabsorção tubular, total e proximal, de potássio aumentou, possivelmente por reabsorção dependente da Na⁺-K⁺ ATPase, que reabsorveu potássio em troca da excreção de sódio (Tabela 28; Figura 66, 67). A diminuição do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular trouxe como consequência a diminuição do clearance osmótico, que havia aumentado inicialmente, acompanhando este parâmetro (Tabela 30; Figura 70).

Desta forma podemos sugerir que, partir de nossos experimentos, houve uma vasoconstrição inicial, decorrente da atividade vasoconstritora produzida pela trombina símile do veneno da *B. insularis*. Embora não possamos afirmar quais mediadores operam este mecanismo, é provável que seja consequência da ação direta da trombina símile nos receptores ativados por proteinases (RAP1), ou por mediadores produzidos e liberados pelas células endoteliais e mesangiais estimuladas pela trombina símile. Compreendem substâncias da mesma família da trombina símile, como as taquicininas, ou mesmo de endotelina, que tem fisiologicamente sua produção estimulada pela trombina, levando à elevação dos parâmetros vasculares, como a pressão de perfusão e a resistência vascular renal. O aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular seria decorrente do maior extravasamento do filtrado pelos poros das células endoteliais devido ao efeito inicial de mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade, como a bradicinina. Em seguida, com o esgotamento do pequeno estoque intracelular de endotelina (SOROKIN; KOHAN, 2003), prevaleceu a ação estimulatória ao endotélio para a produção de bradicinina, com efeito parácrino sobre as paredes vasculares,

liberação da produção de óxido nítrico, e conseqüente vasodilatação (BAGATE et al., 2001), resultando na inversão de todos os valores, com queda dos níveis pressóricos e da formação de urina (Tabela 4).

O aumento inicial da formação de urina produziu o aumento da reabsorção de potássio por difusão passiva devido à grande permeabilidade das faces basolaterais das células epiteliais tubulares, independente da bomba de sódio-potássio ATPase (GUYTON, 2002). No final, com a diminuição do filtrado urinário e o efeito natriurético da bradicinina (KATORI; MAJIMA, 2003), ocorreu diminuição da reabsorção de sódio e de cloreto, que foi carregado junto com o sódio, voltando o potássio aos níveis normais de exceção (Tabela 4).

O aumento inicial da reabsorção de potássio, por sua vez, leva à elevação dos níveis de potássio intersticial, que pode ter contribuído com a vasodilatação observada ao final do experimento, como demonstraram Quilley e Qiu (2005). Os níveis de potássio elevados promovem vasodilatação de maneira independente da intermediação de vasodilatadores como o óxido nítrico ou prostaglandinas, mas por hiperpolarização das células endoteliais devido à ativação de canais de cálcio.

- **Achados histopatológicos com a trombina símile**

Na histopatologia observou-se intensa deposição proteinácea nos túbulos proximais, distais e canais coletores; degeneração hidrópica por vacuolização citoplasmática e descontinuidade da borda em escova das células tubulares proximais (Figura 72); acentuado extravasamento de perfusato dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman dos glomérulos, com aspecto em crescente (Figura 71). Praticamente não se observou necrose tubular aguda com a fração trombina símile (Tabela 5);

O achado histopatológico de deposição proteinácea na cápsula de Bowman reflete bem a elevação da permeabilidade vascular nos capilares glomerulares, decorrente da liberação de bradicinina pelas células endoteliais, permitindo o extravasamento de proteínas (BAGATE et al., 2001), com conseqüente acúmulo nos túbulos distais e canais coletores. Foi a fração onde se observou maior extravasamento proteináceo para o espaço urinário (73,19%) e túbulos distais,

provavelmente em decorrência de liberação de mediadores que provocam aumento da permeabilidade capilar glomerular (Tabela 6; Figura 18).

Os sinais de sofrimento celular reversível como degeneração hidrópica por vacuolização citoplasmática e descontinuidade da borda em escova, das células tubulares proximais, também foram vistos nos controles e eram discretos e limitados à cortical (Figura 72).

- **Efeito da fração fosfolipase A₂ (PLA₂) no rim isolado de rato**

Os efeitos causados nos rins perfundidos pela Fosfolipase A₂ extraída do veneno de *Bothrops insularis* foram marcantes e incluem elevação dos valores pressóricos e funcionais renais, do início ao final do experimento (Tabela 4; 31, 32; Figura 73, 74, 75, 76). Houve também queda no transporte sódio e de cloreto (Tabela 33, 35; Figura 77, 78, 81, 82), desde o início, e aumento na reabsorção de potássio proximal no final (Tabela 34; Figura 79, 80) com aumento do clearance osmolar do início ao final do experimento (Tabela 36; Figura 73).

Cogo e et al. (1998) isolaram uma fração fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* que apresentava atividade na placa neural. Esta atividade se caracterizava por uma contração muscular inicial seguida de inibição completa da condução neuromuscular, com completa e rápida despolarização dose dependente, que sugeriram estar relacionada com alterações cinéticas dos canais de potássio.

Havt et al., 2001, estudaram a atividade do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e a inibição de sua atividade fosfolipase A₂ no rim isolado de rato e constataram uma diminuição na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, queda no transporte tubular total de sódio e de potássio, e no final do experimento um aumento na taxa de filtração glomerular e no fluxo urinário. Eles relacionaram a alteração nos parâmetros funcionais renais (fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular) e no transporte de potássio, à produção do fator de ativação plaquetária (PAF). A diminuição na pressão de perfusão e na resistência vascular renal relacionaram à produção de bradicinina e conseqüente liberação de NO pelo endotélio, potencializada por fatores potenciadores de bradicinina anteriormente descritos por Ferreira et al. (1970). O óxido nítrico também estimularia o aumento na taxa de filtração glomerular e no fluxo urinário, (KOEPPEN, STANTON, 1997).

Propuseram ainda que o veneno da *B. jararacussu* teria fatores natriuréticos para justificar um aumento da diurese, observado no intenso aumento no ritmo de filtração glomerular, no fluxo urinário e na eliminação de sódio, independentes dos parâmetros vasculares, já que ocorria uma queda na pressão de perfusão e resistência vascular renal. Observaram ainda que a PLA₂ deste veneno não possuía atividade enzimática, pois sua ação não era inibida por corticosteróides, propondo que teria atividade exclusivamente miotóxica (citotóxica).

Utilizando exclusivamente a fração PLA₂, Barbosa et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes aos nossos. Observaram que PLA₂, com Lys-49, do veneno da *B. moojeni*, ocorreu um aumento na pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, e percentual de potássio transportado, com decréscimo do transporte de sódio e cloreto, ao contrário do veneno completo que provocava queda nos parâmetros vasculares renais, com aumento no fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular. Propôs que a região C terminal rica em lisina desta PLA₂, seria a indutora da atividade tóxica por agressão direta à membrana celular, podendo estimular a liberação de vasoconstritores, liberados por estímulos agressores diretos independentemente de atividade enzimática como ocorre com muitas PLA₂ com Lys-49 de veneno de serpentes (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003). A atividade enzimática das PLA₂ Asp-49, como a utilizada em nosso estudo, produzindo derivados do ácido aracdônico, como a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), o Tromboxane A₂ (TXA₂) e o fator de ativação plaquetária (PAF) que têm ação vasoconstritora, e fisiologicamente promovem redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário (BYDLOWSKI, 2000). No sistema de rim isolado de rato utilizado, porém, o fluxo do perfusato é mantido constante devido o permanente bombeamento, transitando sob maior pressão nos capilares glomerulares e produzindo maior filtrado em decorrência da pressão vascular aumentada e da atividade de prostaglandinas aumentando a permeabilidade; o resultado é um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário.

Estudando uma fosfolipase A₂ extraída da *Bothrops jararacussu*, também uma Asp49, Barbosa et al. (2005), observaram efeitos muito parecidos. Houve redução dos parâmetros vasculares, pressão de perfusão, resistência vascular renal, e funcionais renais, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, com diminuição do

transporte tubular de sódio e potássio. Estes efeitos foram bloqueados apenas parcialmente pela indometacina, sugerindo uma atividade parcial enzimática, através da liberação de mediadores inflamatórios derivados da cicloxigenase. Eles sugeriram que os outros efeitos não bloqueados poderiam decorrer da atividade da porção C-terminal da fosfolipase. Foi observada ainda a atividade antibacteriana desta Asp49, com destruição de membrana e parede celular do microrganismo estudado, *Xanthomonas axonopodis*, que sob seu efeito apresentava perda e desorganização de elementos citoplasmáticos, à microscopia eletrônica.

Rigden et al. (2003) registraram atividade mionecrótica em uma fosfolipase A₂ do tipo Asp49 extraída da *Bothrops pirajai*, PrTx-III, que apresenta atividade catalítica na porção N-terminal. Desta forma, a agressão sobre as membranas das células endoteliais ou mesangiais desencadearia a produção de vasoconstritores como a endotelina. Entretanto, a atividade enzimática não bloqueada pela indometacina poderia decorrer da atuação de outros derivados do ácido aracônico como os liberados pela lipoxigenase, o tromboxano A₂ ou o fator de ativação plaquetária (PAF).

Monteiro e Fonteles (1999) descreveram o envolvimento do fator de ativação plaquetária (PAF) na mediação dos efeitos do veneno da *Bothrops jararaca* no sistema de rim isolado de ratos. Eles mostraram que antagonistas de receptores do PAF, como a triazolobenzodiazepina (WEB 2086) e um componente natural da Ginko biloba, BN 52021, bloqueavam os efeitos do veneno nos parâmetros do fluxo urinário e no ritmo de filtração glomerular.

O PAF deriva de seu precursor lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF) liberado pela fosfolipase A₂ dos fosfolípidios da membrana celular, podendo ele mesmo ativar a fosfolipase A₂ com conseqüente produção de eicosanóides (RANG et al., 2004). Em doses baixas produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, enquanto que em doses mais elevadas produz hiperalgesia liberação de tromboxane A₂ e lecotrienos, com atividade espasmogênica na musculatura lisa (RANG et al., 2004). Pirotzky et al. (1984) demonstraram que o rim isolado de rato produz substâncias como histamina, serotonina e o fator de ativação plaquetária (PAF).

O veneno da *B. jararaca* reduzia o fluxo urinário, a pressão de perfusão, o ritmo de filtração glomerular e o transporte de sódio e potássio, com redução também no clearance osmolar (MONTEIRO; FONTELES, 1999). Os bloqueadores

de PAF e a indometacina, um inibidor da cicloxigenase (HIGGS; VANE, 1983), anulavam os efeitos do veneno no fluxo urinário e no ritmo de filtração glomerular sem afetar a atividade do veneno na pressão de perfusão e transporte de íons, mostrando a participação do PAF e de outros fatores dependentes da cicloxigenase, como as prostaglandinas e o tromboxano A₂, nas alterações provocadas pelo veneno (MONTEIRO; FONTELES, 1999).

Em nosso estudo a fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* apresentou com elevação dos parâmetros renais vasculares e fisiológicos funcionais renais, além de aumento da reabsorção de potássio, com a redução no transporte de sódio (Tabela 4). Estes efeitos variados na atividade dos venenos botrópicos revelam a atuação de um conjunto de substâncias influenciando na sua resposta, sendo possível que a fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* contribua com atividade enzimática na produção do PAF e tromboxano A₂ em maior quantidade que resultou em constrição da musculatura lisa vascular e elevação dos valores pressóricos e da resistência vascular renal, paralelamente à produção de outros fatores que aumentaram o transporte de potássio.

Outro candidato a promotor desta atividade vasoconstritora é a endotelina, um fator vasoconstritor produzido por células endoteliais descrito por Hickey et al. em 1985, com três isoformas, cujo subtipo endotelina 1 (ET1) é encontrada particularmente nos rins, em células endoteliais (MASAKI, 1993). É liberada a partir de estímulos como trombina, plaquetas ativadas, angiotensina II, arginina-vasopressina, adrenalina, tromboxane A₂, hipóxia, estresse de cisalhamento e endotoxinas (ASAKURA et al., 2005). Age como mediador parácrino, embora possa também estimular a produção de hormônios como a adrenalina aldosterona e o peptídeo atrial natriurético (RANG et al., 2004). A endotelina ativa receptores de membrana acoplados à proteína G, cujo RNA mensageiro é expressos nos rins, especialmente nas células mesangiais (SOROKIN; KOHAN, 2003). Os receptores do tipo ET_A estão presentes, principalmente, no músculo liso vascular e mediam funções como vasoconstrição, mutagênese, secreção de aldosterona e a troca de sódio por potássio, estando acoplados à fosfolipase C. Os receptores ET_B tem o RNA mensageiro expresso nos rins e é altamente expresso nas células endoteliais, sendo também encontrado nas células musculares lisas vasculares. Agonistas de receptores ET_B foram encontrados em venenos de áspedes e foram subdivididos em

duas categorias; ET_{B1} presente no endotélio e ET_{B2} presente no músculo liso vascular. Os do tipo, ET_{B1} provocam vasodilatação ao aumentar o cálcio intracelular das células endoteliais o qual, juntamente com a calmodulina, ativa a oxido nítrico sintetase e a fosfolipase A₂, com conseqüente aumento de ON e prostaglandinas (PGI₂), (RANG et al., 2004).

Os receptores ET_{B2} mediam respostas vasoconstritoras de modo semelhante aos referidos para o ET_A, acoplados à fosfolipase C e ativando a proteína quinase C (RANG et al., 2004). Fisiologicamente a endotelina mantém uma vasoconstrição tônica através de sua ação na musculatura lisa vascular. Suas concentrações plasmáticas se elevam em condições patológicas com componente de vasoespasmo, como o infarto agudo do miocárdio, vasoespasmo renal e cerebral (MASAKI, 1993; RANG et al., 2004). A fosfolipase A₂ (PLA₂) ligando-se a membrana celular e desestabilizando sua dupla camada lipídica (BARBOSA et al., 2005), esterificando fosfolipídios desta membrana e produzindo derivados do ácido aracdônico como o tromboxane A₂, ou ligando-se a receptores de superfície e desencadeando a liberação de variados produtos celulares (VALENTIN; LAMBEAU, 2000), estimularia a liberação de endotelina pelo endotélio vascular glomerular e células endoteliais. Desta forma, através da endotelina a fosfolipase produziria a resposta vasoconstritora observada neste trabalho, expressa na elevação da pressão de perfusão e na resistência vascular renal. Com a agressão ao endotélio poderia ocorrer extravasamento de líquido, agravado pela manutenção da perfusão no sistema, produzindo aumento do filtrado urinário e do ritmo de filtração glomerular.

A atividade das PLA₂ também pode ser expressa a partir de liberação de purinas de origem endógena. Após a desestabilização dos fosfolipídios das membranas celulares e indução de lesões nas membranas celulares, o influxo de íons promove alterações intracelulares irreversíveis e morte celular (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003; BARBOSA et al., 2005), com liberação de bases nucleotídicas dos núcleos. Recentemente Aird, 2002, estudou o papel das purinas na ação do veneno das serpentes. As frações fosfolipases, as citotoxinas, miotoxinas e as de atividade trombina símile, podem participar de sua liberação. No rim a adenosina ativando receptores A₂, de baixa afinidade promove vasodilatação (INSCHO et al., 1991), entretanto os receptores de alta afinidade A₁, mediam

vasoconstrição que predomina sobre a vasodilatação, e no vivo causa redução do fluxo renal (INSCHO et al., 1991, 1994), principalmente pela atividade da arteríola aferente, contração das células mesangiais e inibição de renina e outros neurotransmissores (AGMON; DINOUR; BREZIS, 1993; MUNGER; JACKSON, 1994). A adenosina exógena, experimentalmente, diminui a excreção de água e sódio pela ativação de receptores A1 (MIZUMOTO et al, 1993; VAN BUREN et al., 1993).

Seja através da produção de derivados do ácido aracdônico, (PAF ou tromboxano A₂) de endotelina ou de purinas com atividade vasoconstritora, a PLA2 provocou um aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal. Em consequência do aumento da pressão aumentou o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular. Houve diminuição da reabsorção de sódio e cloreto, provavelmente por agressão direta às células tubulares, concomitantemente. O aumento da reabsorção do potássio nos túbulos proximais pode ser consequência à sua difusão passiva devido à grande permeabilidade das faces basolaterais das células epiteliais tubulares, independente da bomba de sódio-potássio ATPase (GUYTON, 2002), mesmo porque que sua reabsorção total não foi afetada. O balanço final, com redução da reabsorção de sódio e cloreto levou ao aumento do clearance osmótico devido à eliminação urinária elevada destes íons (Tabela 4).

A fração fosfolipase A2 foi a que demonstrou efeitos mais antagônicos aos provocados pelo veneno. Como as fosfolipases compõem grande parte dos venenos botrópicos (VALENTIN; LAMBEAU, 2000), é possível que sua atividade enzimática, liberando mediadores, ou direta, na agressão celular, seja antagonizada pelas demais frações testadas, já que todas foram aplicadas com a mesma dose 10µg/mL.

- **Achados histopatológicos com a fosfolipase A₂**

O achado histopatológico de moderada deposição proteinácea na cápsula de Bowman reflete bem a elevação da permeabilidade vascular nos capilares glomerulares, permitindo o extravasamento de proteínas (Tabela 6; Figura 85). Chacur et al., 2003, demonstraram a capacidade de induzir hiperalgesia de PLA2, principalmente do tipo Asp-49, através da produção de edema em pata de rato, e atribuiu este efeito à sua atividade enzimática com mediação local de bradicinina. É

provável, portanto, que a PLA₂ utilizada em nosso estudo, do tipo Asp-49, tenha produzido o extravasamento de perfusato para o espaço urinário através deste mediador, além da pressão de perfusão elevada. Este extravasamento levou conseqüentemente ao aumento da deposição de proteínas nos túbulos renais.

As áreas focais corticais, ainda que discretas, de necrose tubular aguda refletem lesão irreversível do epitélio de revestimento tubular, possivelmente em resposta à atividade citotóxica da PLA₂, sobre os fosfolipídios das membranas celulares, que provocou também a descamação do epitélio tubular, reforçando a suposição de agressão direta nas células (Tabela 5; Figura 84).

Da Cruz Hofling e et al. (2001) registraram alterações semelhantes provocadas por fosfolipase A₂ extraída do veneno da *Bothrops insularis*, in vivo, que atribuíram à toxicidade direta desta fração, potencializada por distúrbios isquêmicos regionais. D'Abreu et al. (1996) descreveram, além de necrose tubular aguda, vacuolização e irregularidades da borda em escova das células do revestimento tubular proximal e congestão dos corpúsculos renais com ruptura da barreira de filtração glomerular, estudando pintos vivos. Eles observaram ainda que a necrose tubular era menos marcante que aquela determinada pelo veneno, fato que foi compatível com nossas conclusões. Observações histopatológicas renais, relativas à *Bothrops moojeni* (Barbosa et al., 2002), constataram picnose com condensação da cromatina, nos núcleos de células de vários túbulos proximais, descontinuidade da borda em escova, vacuolização citoplasmática e, em alguns túbulos, degeneração e descamação de células necróticas, sendo sugerido que essas alterações teriam sido provocadas pela atividade proteolítica de fosfolipases A₂ (PLA₂) do veneno (BOER-LIMA; GONTIJO; CRUZ-HÖFLING, 1999). Estas áreas, entretanto, em nosso estudo eram discretas e o achado de sofrimento reversível de células tubulares proximais foi preponderante, com balonização por vacuolização citoplasmática e perda da borda em escova (Figura 85). Estes últimos também foram vistos nos controles, porém em menos intensidade e limitados à cortical (Figura 17).

6.2 Efeitos do veneno da *Bothrops insularis* no leito arterial sistêmico

Neste sistema podem ser estudadas as ações conjuntas de todas as substâncias componentes do veneno, bem como dos mediadores que estas possam ativar a liberação, incluindo sobre as células sanguíneas e componentes do plasma.

Houve redução da pressão arterial diretamente proporcional à dose do veneno aplicada por via intrajugular de 1µg, 3µg, 10µg, 30µg, 100µg e 300µg, com exceção da dose de 10µg, em todos os animais estudados (n=6) (Tabela 37; Figura 86, 87).

Cintra e et al., 1990, já haviam estudado os efeitos sistêmicos do veneno da serpente *Bothrops insularis* em ratos anestesiados, observando também sua atividade hipotensora, a qual atribuiu a potenciadores da bradicinina.

A vasodilatação acentuada e generalizada em todos os órgãos estudados, fígado, baço, rins intestino e principalmente os pulmões, ocorreu em consequência da hipotensão que o veneno determinou.

Desde as pesquisas iniciais de Rocha e Silva, 1949 são conhecidos os peptídios potenciadores da bradicinina do veneno botrópico, que já inspiraram a produção dos antihipertensivos sintéticos mais bem aceitos no mercado farmacêutico. Usualmente demonstram dois tipos diferentes de atividade. A potenciação da bradicinina pela inibição de sua enzima inativadora, e inibição da enzima conversora da angiotensina, aparentemente os dois eventos ocorrendo independentemente, segundo a conformação molecular do peptídeo (FERREIRA et al., 1999). A bradicinina é inativada por cininases, uma delas idêntica à enzima conversora da angiotensina, a cininase II. Esta última é uma peptidil dipeptidase que remove os dois aminoácidos C-terminais da cinina inativando-a, e liga-se à superfície luminal das células endoteliais ocorrendo principalmente no pulmão. Cliva também os dois aminoácidos C-terminais do peptídeo inativo, a angiotensina I, convertendo-o no peptídeo vasoconstritor ativo, a angiotensina II. Deste modo a sua inativação perpetua a ação de um vasodilatador, a bradicinina, ao mesmo tempo em que impede a geração de um vasoconstritor, dando como resultado a vasodilatação (RANG et al., 2004). A outra enzima, a cininase I menos específica, é uma carboxipeptidase que remove a arginina C-terminal da bradicinina, produzindo des-Arg-bradicinina, agonista específico de uma das classes principais de receptores de

bradicinina. A bradicinina tem ação vasodilatadora por induzir a produção de prostaciclina (PGI₂), que também inibe a agregação plaquetária, e de óxido nítrico (NO) através do aumento da produção endotelial da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (RANG et al., 2004). Os peptídeos potenciadores da bradicinina são os responsáveis pela hipotensão provocada pelo veneno *Bothrops* (ROCHA-E-SILVA; BERALDO; ANDRADE, 1949; FERREIRA; ROCHA-E-SILVA, 1965), já havendo sido isolados e bem caracterizados alguns deles. Ferreira (1998) descreve a história do isolamento de nove peptídeos de pequeno peso molecular extraídos do veneno da *Bothrops jararaca*, dos quais o nonapeptídeo BPP_{9a} era o mais ativo, tanto na inibição da conversão da angiotensina como na potenciação da bradicinina (inibição da cininase), bem como da determinação da estrutura do menor peptídeo, BPP_{5a}. Estão presentes no veneno de várias espécies do gênero *Bothrops* (CINTRA; VIEIRA; GIGLIO, 1990; FERREIRA; ROCHA-E-SILVA, 1965; FERREIRA et al., 1998), já havendo sido reconhecidos peptídeos potenciadores da bradicinina em venenos de várias espécies de serpentes e até mesmo em venenos de escorpiões (FERREIRA; ALVES; HENRIQUES, 1993; FERREIRA et al., 1998; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA, 2000).

A atividade do veneno compreende um somatório das atividades individuais de todas as suas frações, cada uma delas participando na proporção da quantidade presente no veneno e da intensidade de seu efeito.

A fração LAAO do veneno pode também contribuir com a hipotensão promovendo a produção de peróxido de hidrogênio pelo endotélio vascular (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997). O peróxido de hidrogênio age como segundo mensageiro, ativando o metabolismo do ácido araquidônico e a fosfolipase C (PIGNATELLI et al., 1998), com a produção de derivados araquidônicos vasodilatadores como a prostaciclina (PGI). Com a apoptose provocada pelas L-aminoácido oxidases, em algumas células, são liberados altos níveis de purinas, dentre as quais a guanosina que provavelmente contribui com a hipotensão pelo aumento do cGMP no endotélio vascular (AIRD, 2002). As LAAOs ativam a guanilato ciclase, através da liberação de purinas, solúvel produzindo cGMP na presença de superóxido dismutase (AIRD, 2002). O cGMP produz relaxamento da musculatura lisa afetando canais iônicos, fosfodiesterases e a proteína quinase G, resultando em diminuição da entrada de cálcio e seqüestro do cálcio no retículo sarcoplasmático,

impedindo a despolarização celular (RANG et al., 2004). A adenosina é outra purina liberada a partir da apoptose e fragmentação celular, sendo capaz de ativar receptores de adenosina A_2 na vasculatura produzindo hipotensão (AIRD, 2002). A ação decorre do aumento da adenilato ciclase e do AMP cíclico, que pela ativação da proteinoquinase A, fosforiliza e inibe a quinase de cadeia leve de miosina, responsável pela fosforilação da miosina e possibilitando a sua interação com a actina e contração muscular (RANG et al, 2004). A adenosina também é capaz de ativar receptores A_3 em mastócitos que liberam substâncias vasoativas hipotensoras como a histamina, leucotrienos e serotonina (AIRD, 2002).

Outras frações do veneno poderiam atuar pela estimulação de receptores α_2 de atividade relaxante vascular que liberam prostanóides vasorelaxantes (VANHOUTTE; MILLER, 1989), ou mesmo de receptores α_1 vasorelaxantes localizados nas células endoteliais (ZSCHAUER et al., 1997), dos quais o subtipo α_{1D} , quando estimulado é capaz de gerar óxido nítrico através da ativação da fosfolipase C, liberação de trifosfato de inositol que libera os estoques de cálcio intracelulares, do retículo sarcoplasmático, gerando óxido nítrico sintetase (FILIPPI et al., 2001) uma vez que a ativação desta enzima é cálcio dependente (LUCKHOFF et al., 1988; BERDEAUX, 1993). Outros tipos de receptores vasorelaxantes que devem ser considerados são os receptores ativado por proteinases do subtipo 2 (PARS2), que são ativado por tripsina ou triptases que podem ser liberadas por mastócitos (GUI; LOUTZENHISER; HOLLENBERG, 2003). Eles pertencem à família dos receptores ativado por proteinases cujos demais subtipos conhecidos PARs1, 3 e 4 são ativado também pela trombina, dentre outras proteinases, podendo sofrer a estimulação direta da trombina endógena liberada no plasma do animal pela presença do veneno, ou pela fração trombina símile constituinte do veneno. Todos são mais bem discutidos na análise da atividade direta do veneno no leito arterial mesentérico isolado de ratos.

Outro efeito bem evidente foi a hemorragia, principalmente intraalveolar, nos pulmões, que não foi bem caracterizada nos demais órgãos estudados. Os animais sobreviveram pouco tempo após a última dose, e alguns morreram antes do final do experimento, provavelmente não dando tempo para a atuação de frações estimulantes de hemorragia nos órgãos não afetados. Antes disso a hipotensão levou à formação do quadro do pulmão de choque, que ocorre em consequência de

hipertensão e se expressa pela vasodilatação pulmonar com extravasamento de hemácias, células inflamatórias como polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e deposição de fibrina para o interior dos alvéolos. É um quadro que decorre do sofrimento do epitélio pulmonar pela hipóxia que se estabelece nos quadros de choque vasoplégico, que ocorre em respostas a toxinas como as dos venenos das serpentes (MITCHELL, 2005).

Entretanto as frações anticoagulantes como as lectinas acentuaram a hemorragia alveolar, que se mostrou tão evidente (MONTEIRO et al., 2003). O efeito procoagulantes da fração trombina símile, que também causa hemorragia pelo consumo de fibrinogênio, provavelmente colaborou com as lectinas no desenvolvimento de hemorragia pulmonar (CASTRO et al., 2004), embora não tenham sido encontrados sinais de coagulação intravascular disseminada como trombos nos pequenos vasos (MITCHELL, 2005). As LAAOs podem também contribuir para a hemorragia pela indução da apoptose nas células endoteliais (LI et al., 1994; MASUDA et al., 1997). A fosfolipase contribui para a hemorragia devido ao seu efeito tóxico sobre as membranas celulares (BARBOSA et al., 2005).

As metaloproteinases zinco dependentes, são componentes dos venenos botrópicos capazes de destruir as ligações de proteínas de sustentação, como as integrinas, com o colágeno, de clivar proteínas da membrana basal, da própria matriz extracelular e de componentes plasmáticos importantes para a homeostase, agravando a hemorragia (RUCAVADO et al. , 2005; TANJONI et al., 2003).

No fígado a congestão centrolobular era bem marcante, juntamente com esteatose em microgotas. Não foram encontradas as lesões dos sinusóides hepáticos e espaços porta descritas por Paronetto (1996). Este autor estudou comparativamente a atividade sistêmica do veneno e de uma sua fração de atividade miotóxica, fosfolipase A2. Ele observou que o veneno da *Bothrops insularis* e uma fração PLA₂ apresentaram capacidade de provocar lesões hepáticas, em pintos com uma reação dose e tempo dependente para ambas as drogas, com o veneno completo agindo mais intensamente na alteração da arquitetura hepática, tornando irreconhecíveis os sinusóides, espaços-porta e centrolobular. Em altas doses houve vacuolização dos hepatócitos com ruptura das cristas mitocondriais e o aparecimento de muitas sombras hepatocitárias. Houve marcante diminuição dos depósitos de glicogênio, evidência de ativação de grande número de células de Pitt

e de Kuppfer, com a fração PLA₂ provocando hemorragia hepática mais intensa (PARONETTO, 1996). Provavelmente o tempo de sobrevivência curto em nosso estudo, não permitiu o estabelecimento destes sinais de sofrimento hepático, além da esteatose em microgotas, já que os animais morriam logo após o experimento com a dose crescente até a dose letal, de forma rápida pela insuficiência respiratória. É provável, entretanto, que outras frações como as L-aminoácido oxidases, promovendo apoptose também contribuam com a lesão celular hepática (DU, CLEMETSON, 2002). Outras observações registradas por Barraviera et al. (1989), constituindo-se de desaparecimento das cristas mitocondriais por edema, com rarefação da matriz e perda do conteúdo mitocondrial de hepatócitos, foram vistas na microscopia eletrônica, que não foi o caso de nosso estudo.

Nos rins não se observaram as alterações clássicas descritas por Amaral e et al. (1985), como necrose tubular aguda ou a ocorrência de alterações glomerulares (RESENDE, 1989), mas Aung-khin, 1978, refere que as alterações renais são mais evidentes em animais que sobrevivem pelo menos 16 horas. Nos mortos em menos tempo as alterações surgiam apenas nos túbulos com vacuolização das células de revestimento, degeneração hialina e dilatação dos túbulos contornados proximais. São sinais descritos também por D'Abreu et al. (1996) e Da Cruz Hofling et al. (2001), em pintos vivos, como resposta ao veneno da *Bothrops insularis*. Mas somente após 24 horas de sobrevivência aparecia típica necrose tubular, hemorragia intersticial, com infiltrado mononuclear contendo eosinófilos e mastócitos em meio a edema. Somente a congestão acentuada em grandes e pequenos vasos, com focos de hemorragia intersticial era marcante em nosso estudo.

TABELA 38: Prováveis mediadores liberados e frações atuantes nos experimentos com o veneno, no leito arterial sistêmico.

Local de Ação	Mediadores	Frações Hemorrágicas	Frações Hipotensoras
Veneno – no leito arterial sistêmico	<ul style="list-style-type: none"> • TNFα • Histamina • RAP2 - NO • Bradicinina • Prostaglandinas – PGI 	<ul style="list-style-type: none"> • Lectina • Metaloproteinases • Trombina símile 	<ul style="list-style-type: none"> • LAAO • Potenciadores da Bradicinina

6.3 Efeitos do veneno da *Bothrops insularis* no leito arterial mesentérico isolado

O leito mesentérico isolado foi perfundido com o objetivo de se investigar a atividade direta do veneno nos vasos, isto é, vasodilatação ou vasoconstrição, já que neste sistema a solução é desprezada após a passagem no leito vascular, não permitindo a recirculação de possíveis substâncias produzidas pelo endotélio, além de não permitir a interferência das contrações intestinais (MCGREGOR, 1965). Entretanto, aquelas substâncias com atividade autócrina ou parácrina podem produzir reatividade característica. Hill e et al., 1996, demonstraram que neste sistema a função arterial era controlada pelos nervos simpáticos perivasculares e pela atividade parácrina do óxido nítrico liberado pelo endotélio. O endotélio é fonte ainda de numerosos mediadores químicos potentes que por uma atividade parácrina controlam a contração ou o relaxamento do músculo liso subjacente (RANG et al., 2004). O músculo liso difere do estriado e do cardíaco por não conter troponina. O Cálcio+calmodulina regulam a quinase de miosina cadeia leve, que por sua vez fosforiliza as cadeias leves de miosina, permitindo a sua interação com a actina, início do processo de contração (RANG et al., 2004).

A hipertensão provocada pela fenilefrina sofria uma queda nos momentos finais de sua atividade pela dessensibilização de receptores específicos de atividade vasoconstritora os simpaticomiméticos α_1 . A partir da injeção do veneno esta queda se agravou com uma hipotensão estatisticamente significativa, revelando sua potente atividade hipotensora. Esta atividade foi ainda mais marcante com a administração do veneno isoladamente (Tabela 38, 39; Figura 97), comprovando que sua atividade independe da fenilefrina, e portanto, de algum efeito agonista fraco, mas que decorre de ação direta. As várias frações constituintes do veneno produziram um efeito global vasodilatador e, portanto, hipotensor, compatível com o efeito descrito na literatura para a atividade dos venenos botrópicos (Tabela 38, 39; Figura 97).

A enzima óxido nítrico sintetase, em sua forma constitutiva e indutível, está presente no músculo liso vascular e esta última pode ser expressa a partir de estímulos patológicos que agredam às células. Elas desencadeiam a formação de óxido nítrico que age como mediador autócrino e parácrino, ativando a guanilato ciclase com conseqüente formação de cGMP, seqüestrando o cálcio e impedindo a

contração muscular lisa. O óxido nítrico pode também atuar pela hiperpolarização do músculo liso vascular através da ativação dos canais de potássio (RANG et al., 2004).

A atividade relaxante de receptores α_2 foi bem estudada por Vanhoutte e Miller (1989), bem como a atividade vasoconstritora de receptores α_1 pós-juncionais, os principais responsáveis pela atividade simpaticominética na resistência vascular. Entretanto Zschau et al. (1997) demonstraram a presença de receptores α_1 vasorelaxantes em artérias braquiais e pulmonares de coelhos e ratos. Eles sugerem que a estimulação destes receptores α_1 localizados nas células endoteliais é capaz de gerar óxido nítrico, enquanto os receptores α_2 liberam prostanoídes vasorelaxantes. A atividade vasorelaxante dos receptores α_1 seria um mecanismo modulador local da resposta simpaticomimética, além da dessensibilização do receptor (HU; MILLER; HOFFMAN, 1994). É conhecido o aumento da resposta vasoconstritora simpática em vasos com o endotélio removido ou quando concomitante com inibidores do óxido nítrico (GREENBERG et al., 1989; BOERLIMA; GONTIJO; CRUZ-HÖFLING, 1999). Muitos tecidos expressam receptores α_1 e três de seus subtipos são encontrados no músculo liso, α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (ZHONG; MINNEMAN, 1999). Filippi et al. (2001) estudaram a atividade destes receptores em leito mesentérico isolado de ratos, utilizando fenilefrina, um agonista específico α_1 , concluindo que o subtipo α_{1D} está envolvido no relaxamento endotélio dependente, e que agonistas α_1 tem maior afinidade por este subtipo, visto que o efeito ocorre em concentrações menores do que as suficientes para produzir vasoconstrição. Eles concluíram que a ativação do receptor α_{1D} ativaria a fosfolipase C liberando trifosfato de inositol que liberaria os estoques de cálcio intracelulares, do retículo sarcoplasmático, gerando óxido nítrico sintetase, uma vez que a ativação desta enzima é cálcio dependente (Luckhoff et al., 1988; Berdeaux, 1993). Isto poderia explicar não somente a queda da pressão de perfusão ao final da administração da fenilefrina, potencializando a dessensibilização dos receptores, como também a possível atuação do veneno da *B. insularis* nestes receptores, provocando vasodilatação por efeito direto. A possibilidade do veneno atuar somente como agonista competitivo fraco da fenilefrina nos receptores α_{1A} e α_{1B} , apenas com

bloqueio parcial da fenilefrina pode ser descartada, tendo em vista que sozinho o veneno também promoveu vasodilatação (Tabela 38, 39; Figura 97).

Outra possível atuação do veneno no desencadear da vasodilatação promovida no leito arterial mesentérico seria pela ativação dos receptores ativados por proteinases (PARs). Eles compreendem uma família de receptores transmembrana acoplados a proteína G que são ativados por proteólise, envolvidos na resposta endotelial a agressões (BUCCI; ROVIEZZO; CIRINO, 2005). Eles são naturalmente ativados pela trombina e outras proteases inflamatórias ou coagulantes (STEINBERG, 2005). A fração trombina símile do veneno da *Bothrops insularis* poderia atuar através da sua ativação. Estão presentes em vários vasos sanguíneos, onde modulam o tônus vascular. Experimentos recentes sugerem a participação em especial dos receptores do tipo PARs 2 na fisiopatologia do sistema cardiovascular (BUCCI ROVIEZZO; CIRINO, 2005). Eles não são diretamente ativados pela trombina, mas podem ser estimulados por peptídios liberados pela clivagem de proteínas (GUI; LOUTZENHISER; HOLLENBERG, 2003). Na artéria mesentérica pré-contraída de ratos, Kawabata et al. (2004) demonstraram que os PARs 2 ativados causam relaxamento via liberação de óxido nítrico e pela hiperpolarização provocada por fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio. Sua ativação produz relaxamento dos músculos lisos vasculares e causa hipotensão por mecanismos dependentes de óxido nítrico e prostanóides (KAWABATA et al., 2004), mas também por mecanismos hiperpolarizantes, independentes de óxido nítrico, ciclooxigenases ou guanilato ciclase, que são dependentes de canais de potássio e poderiam constituir o mecanismo primário da produção de hipotensão “*in vivo*” (MCGUIRE et al., 2004). A trombina tem atividade na produção de bradicinina e potenciadores de seu efeito, que ativam a produção do óxido nítrico pelas células endoteliais (KU; ZALESKI, 1973). No endotélio intacto induz relaxamento mediado por óxido nítrico (KU; ZALESKI, 1973).

A fosfolipase A₂ do veneno da *Bothrops insularis* apresenta atividade na placa neuromuscular e este efeito parece relacionado com alteração na cinética de canais de potássio. Inicialmente causa contração, logo seguida de bloqueio, que poderia contribuir para a vasodilatação. Este efeito parece ser dependente de sua atividade enzimática (COGO et al., 1998). Outras fosfolipases A₂ neurotoxinas correntemente apresentam atividade bloqueadora dos canais de potássio nas junções

neuromusculares, provavelmente ocorre pela facilitação da liberação da liberação do neurotransmissor, antes do bloqueio irreversível (ROWAN; HARVEY, 1996). Esta atividade enzimática poderia, também, desencadear também a liberação de endotelina, mediada pelo tromboxane A_2 (ASAKURA et al., 2005), ou diretamente pelo estresse (RANG et al., 2004) provocado pela fosfolipase A_2 nos lipídios da membrana celular (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). Os receptores da endotelina do tipo ET_A estão presentes, principalmente, no músculo liso vascular e mediam funções como vasoconstrição, que em geral são preponderantes. Entretanto, os receptores da endotelina do tipo ET_B têm o RNA mensageiro altamente expresso nas células endoteliais. Ativadores de receptores ET_B foram encontrados em venenos de áspedes e foram subdivididos em duas categorias; ET_{B1} presente no endotélio e ET_{B2} presente no músculo liso vascular. Os do tipo, ET_{B1} provocam vasodilatação ao aumentar o cálcio intracelular das células endoteliais que, juntamente com a calmodulina, ativa a óxido nítrico sintetase e a fosfolipase A_2 , com conseqüente aumento de ON e retroalimentação na esterificação do ácido aracônico e produção de prostaglandinas (PGI_2) (RANG et al., 2004).

A participação da fração lectina neste sistema é questionável. Com lectina extraída do veneno da serpente *B. pirajai*, Havt et al., 2005, demonstraram que ela induzia redução significativa na pressão de perfusão e da resistência vascular renal no rim isolado de rato. Eles propuseram que estes resultados provavelmente se deviam à liberação de mediadores produzidos pelas células endoteliais e mesangiais estimuladas pela lectina. Entretanto, ao tentar potenciar a atividade da bradicinina na contração do íleo de cobaia com a lectina não obtiveram resultado. Também a lectina não afetava a pressão de perfusão basal ou pré-contraída de artéria mesentérica isolada de rato, ou mesmo da pressão do leito pré-contraído com fenilefrina.

A indução da apoptose pelas LAAOs, está relacionada a células do endotélio vascular (SUHR, KIM, 1996; TORII et al., 1997), envolvendo a produção de peróxido de hidrogênio. Lucchesi et al. (2005), demonstraram que o peróxido de hidrogênio tem ação vasodilatadora em artéria mesentérica de camundongos pré-contraídos com fenilefrina, independente da óxido nítrico sintetase, cicloxigenase, e canais de K do endotélio. Em condições em que a hiperpolarização está comprometida, como com o uso de cloreto de potássio, o peróxido de hidrogênio produz vasoconstrição.

Eles propõem que o peróxido de hidrogênio controla o tônus arterial como um fator hiperpolarizante dependente do endotélio. O peróxido de hidrogênio age como segundo mensageiro, ativando o metabolismo do ácido aracdônico e a fosfolipase C (PIGNATELLI et al., 1998). Na apoptose provocada pelas LAAOs, são liberados altos níveis de purinas, dentre as quais a guanosina que provavelmente contribui com a hipotensão pelo aumento do cGMP no endotélio vascular (AIRD, 2002). As L-aminoácido oxidases podem contribuir, ainda, para a queda da pressão de perfusão ativando a guanilato ciclase solúvel que produz cGMP na presença de superóxido dismutase (AIRD, 2002), atuando esta cGMP no relaxamento da musculatura lisa pela diminuição das respostas ao íon cálcio no músculo liso vascular (RANG et al., 2004). A produção de prostaciclina, estimulada pela liberação de peróxido de hidrogênio provocada pela LAAO, ou a atividade de purinas como a guanosina, a leucina, ou da guanilato ciclase solúvel na presença da superóxido dismutase, liberadas pelas células apoptóticas, provavelmente contribuem com a vasodilatação arteriolar. Entretanto, neste experimento, a apoptose foi discreta pois o leito arterial voltou a responder à fenilefrina readministrada após o final do ensaio, não sendo também observada no exame histológico, o que não exclui sua ocorrência.

Não se pode descartar, porém, a atividade de outros constituintes do veneno que provavelmente contribuem para a vasodilatação observada no leito mesentérico. Enzimas como as dispeptidil dispeptidases, por exemplo, podem destruir neuropeptídeos vasoconstritores como a substância P, neuropeptídeo Y e peptídeo YY (AIRD et al., 2002), liberados nos neurônios sensoriais presentes na vasculatura mesentérica (RANG et al., 2004).

TABELA 39: Prováveis mediadores liberados e frações atuantes nos experimentos com o veneno no leito arterial mesentérico isolado.

Local de Ação	Mediadores	Frações Hemorrágicas	Frações Hipotensoras
Veneno – no leito arterial mesentérico	<ul style="list-style-type: none"> • RAP2 – NO • Bradicinina • Prostaglandinas – PGI 	Atividade não observada	<ul style="list-style-type: none"> • PLA₂ - Ação enzimática • LAAO • Potenciadores de bradicinina

Não foram observados efeitos histopatológicos na perfusão do leito arterial mesentérico, provavelmente devido ao fato de as alterações necróticas dependerem, em grande parte da intervenção de células inflamatórias e do plasma, praticamente ausentes neste sistema pela sua raridade no tecido gorduroso, pela ausência de circulação linfática, abolida com o isolamento do leito arterial, e ao pouco tempo de exposição do mesentério ao veneno (Figura 99, 100, 101).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- **Alterações renais provocadas pelo veneno e frações da *Bothrops insularis***

O veneno bruto mostrou uma toxicidade acentuada provocando um quadro de insuficiência renal aguda. Somente não foi reduzido o transporte de potássio, que em grande parte ocorre por difusão, independente da atividade celular.

A fração lectina participou com maior intensidade, dentre todas as frações estudadas, no potencial citotóxico do veneno, provocando necrose tubular aguda em maior extensão. Estes resultados, com efeitos finais revertendo a elevação inicial de alguns parâmetros, sugerem a liberação inicial de mediadores que intermediaram o aumento da pressão de perfusão e a reabsorção de eletrólitos, seguida da agressão direta final da lectina que alterou a integridade das células renais.

A fração LAAO foi a que apresentou um efeito mais próximo daquele produzido pelo veneno bruto, com redução dos parâmetros vasculares, funcionais renais, da reabsorção de eletrólitos e do clearance osmótico, além da moderada produção de necrose tubular aguda. É provável que sua atividade promotora da liberação de H₂O₂ e seus mediadores, se juntou à sua capacidade promotora da apoptose, que tem a mesma representação morfológica de necrose tubular aguda, caracterizando seu papel importante na atividade tóxica do veneno da *B. insularis*.

A fração trombina símile apresentou efeitos contraditórios. Inicialmente promoveu elevação dos parâmetros vasculares e fisiológicos, com redução final. Também os eletrólitos, em geral, sofreram aumento inicial do transporte com queda ao final do experimento. Foi a fração onde se observou maior extravasamento proteináceo para o espaço urinário e túbulos distais. É provável que tenha atuado através de mediadores sem potencial citotóxico já que não se observou necrose tubular. Possivelmente vasoconstritores foram produzidos inicialmente, em seguida substituídos por vasodilatadores que aumentaram também a permeabilidade vascular, provocando o extravasamento protéico dos capilares glomerulares.

A fração fosfolipase A₂ foi a que demonstrou efeitos mais antagônicos aos provocados pelo veneno, com elevação dos parâmetros vasculares e na produção

de urina. Houve queda também no transporte de eletrolíticos, como o sódio e cloreto, mas o potássio mostrou aumento da reabsorção. O clearance osmótico aumentou, demonstrando a redução global do transporte de eletrólitos. É provável que sua atividade enzimática, liberando mediadores, tenha se combinado com a agressão direta que produziu necrose tubular no final.

Na histopatologia observou-se o aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares com deposição proteinácea no espaço de Bowman. Não foi vista na atividade do veneno completo, porém foi observada em na presença de todas as frações, com maior intensidade na fração trombina símile onde 73,19% dos glomérulos apresentaram algum grau de extravasamento.

A necrose tubular aguda, um achado quase inexistente com a trombina símile, moderado na ação do veneno bruto, de forma leve na da fosfolipase A₂, moderada na LAAO (confundindo-se com apoptose), e mais intenso com a lectina, demonstrou o potencial tóxico direto das frações.

Finalmente a apoptose foi vista como resultado da fração LAAO, como descrito na literatura, contribuindo para a necrose tubular observada na sua atividade.

- **Alterações vasculares sistêmicas provocadas pelo veneno da *Bothrops insularis***

Observou-se uma importante atividade hipotensora do veneno bruto. A recuperação após queda inicial nos níveis pressóricos provavelmente decorria de resposta reflexa do animal à queda da pressão arterial, à custa de atividade adrenérgica ou liberação de outros vasoconstritores.

Na histopatologia foi observada a vasodilatação acentuada e generalizada em todos os órgãos estudados (coração, rins, intestino, fígado e pulmões), refletindo a hipotensão que o veneno provoca.

Nos pulmões a hemorragia foi bem evidente, ocorrendo em menor intensidade nos rins. Em outros órgãos a hemorragia foi menos expressiva, possivelmente devido ao tempo de morte dos animais que foi quase imediato. O efeito procoagulante da fração trombina símile, que causa hemorragia pelo consumo

de fibrinogênio, provavelmente potencializou o da lectina em sua atividade anticoagulante, no desenvolvimento de hemorragia.

Os animais chegavam ao óbito, com as doses maiores, devido à hipotensão e por insuficiência respiratória decorrente da hemorragia pulmonar maciça.

- **Alterações vasculares mesentéricas do veneno da *Bothrops insularis***

O veneno bruto produziu relaxamento em vasos pré-contraídos com fenilefrina, demonstrando a importância de sua atividade hipotensora, capaz de inibir qualquer resposta do hospedeiro. Sem vasoconstritores também foi marcante a vasodilatação resultante da ação isolada do veneno, excluindo sua atividade limitada a agonismo competitivo fraco da fenilefrina.

O relaxamento provavelmente resultou da atividade global das frações hipotensoras do veneno, como a lectina a LAAO e a trombina símile, bem como de outras não determinadas, que promoveram a liberação de fatores como prostaglandinas, purinas, peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, com sua atividade hiperpolarizante nos canais de potássio..

Não ocorrendo recirculação neste sistema, estes fatores foram liberados diretamente pelo endotélio, com atividade autócrina e parácrina alcançando os músculos lisos vasculares.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- O veneno bruto da *Bothrops insularis* mostrou atividade hipotensora, hemorrágica e necrotizante, provocando hemorragia mais acentuada nos pulmões e necrose tubular aguda.
- A fração Lectina mostrou o maior potencial necrotizante renal.
- A fração Trombina símile provocou o maior extravasamento proteináceo glomerular.
- A fração Fosfolipase provocou efeitos opostos ao do veneno bruto nos rins.
- A fração LAAO mostrou os resultados mais semelhantes ao do veneno bruto nos rins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGMON, Y.; DINOOR, D.; BREZIS, M. Disparate effects of adenosine A1- and A2-receptor agonists on intrarenal blood flow. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. 802-806, 1993.

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

AROCAS, V.; ZINGALI, R. B.; GUILLIN, M. C.; BON, C.; JANDROT-PERRUS, M. Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. **Biochemistry**, v. 35, p. 9083-9089, 1996.

ASAKURA, H.; ASAMURA, R.; ONTACHI, Y.; HAYASHI, T.; YAMAZAKI, M.; MORISHITA, E.; MIYAMOTO, K. I.; NAKAO, S. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates organ dysfunction and elevated endothelin levels in LPS-induced DIC model rats. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 5, p. 1050-1055, 2005.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, M. A. S.; CAVADA, B. S., FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHW, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, p. 953-960, 1998.

ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 216-226, 2000.

ALPERS, E. C. The kidney. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. 1525p. cap. 20, p 955-1021.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 220-227, 1986.

AMARAL, C. F.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.

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

AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. Histopathologic study. **Am. J. Pathol.**, v. 30, p. 479-499, 1954.

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

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. A two-dimensional gel database of human plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 12, n. 11, p. 883-906, 1991.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ÂNGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ARAGÓN-ORTIZ, F.; BRENES-BRENES, J. R.; GUBENSEK, F. Characterization and properties of a lectin-like protein from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 28, p. 143, 1990.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂: a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.

ASSREUY, A. M.; CALVETE, J. J.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; ROCHA-FILHO, D. R.; MELO, S. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol. Reprod.**, v. 67, N. 6, p. 1796–1803, 2002.

AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. **Toxicon**, v.16, p. 71-75, 1978.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S.E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-636, 1985.

BAGATE, K.; GRIMA, M.; IMBS, J. L.; JONG, W. D.; HELWIG, J. J.; BARTHELMEBS M. Signal transduction pathways involved in kinin B(2) receptor-mediated vasodilation in the rat isolated perfused kidney. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 8, p. 1735-1742, 2001.

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

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

BALESTRIERI, M. L.; DE PRISCO, R.; NICOLAUS, B.; PARI, P.; MORIELLO, V. S.; STRAZZULLO, G.; IORIO, E. L.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C. Lycopene in association with alpha-tocopherol or tomato lipophilic extracts enhances acyl-platelet-activating factor biosynthesis in endothelial cells during oxidative stress. **Free Radic Biol. Med.**, v. 36, n.8, p. 1058-1067, 2004.

BARBOSA, A. M.; AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 515-523, 2003.

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

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom **Toxicon**, v. 46, p. 376-386, 2005.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 23, p. 940-945, 1995.

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

_____. Animais peçonhentos de importância médica no Brasil. **J. Bras. Med.**, v. 68, p. 121-126, 1995.

BARRAVIERA, B.; BONJORNO Jr., J. C.; ARAKARI, D.; DOMINGUES, M. A.; PEREIRA, P. C.; MENDES, R. P.; MACHADO, J. M.; MEIRA, D. A. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snakebites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, p. 5-12, 1989.

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

BARTNIK, W. Inflammatory bowel disease - Polish contribution. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, Suppl. 3, p. 205-210, 2003.

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

BERDEAUX A. Nitric oxide: an ubiquitous messenger. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 7, n. 8, p. 401-411, 1993.

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

BJARNASON, J. B.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotatus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and role of zinc in hemorrhagic toxine. **Biochemistry**, v. 17, p. 3395-3404, 1978.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 735-746, 2002.

_____. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n.1, p. 7-16, 2003.

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Lett.**, v. 331, n.1/2, p. 134-140, 1993.

BODE, W.; KRESS, L. F.; MEYER, E. F.; GOMIS-RÜTH, F. X. The crystal structure of adamalysin II, a zinc-endopeptidase from rhe snake venom of the Eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 8, p. 2049-2068, 1994.

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

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

BOWMAN, R. H. Gloconeogenesis in the isolated perfused isolated rat kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 245, p.1604-1612, 1970.

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

_____. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; CIRINO, G. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in cardiovascular system. **Vascul. Pharmacol.**, v. 43, n.4, p. 247-253, 2005.

BYDLOWSKI, S. P. Bioquímica e fisiologia dos eicosanóides. In: DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia geral, mecanismo das doenças**. São Paulo: Robe, 2000. p. 528-529.

CAIAFFA, W. T.; ANTUNES, C. M.; DE OLIVEIRA, H. R.; DINIZ, C. R. Epidemiological and clinical aspects of snakebite in Belo Horizonte, southeast Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 39, n. 2, p. 113-118, 1997.

CALDERON, J.; OLVERA, L.; MARTINEZ, L. M.; DAVILA, G. A *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase. **Microbiology**, v. 143, p. 1969-1974, 1997.

CALIXTO, J. B. Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea pig smooth muscles in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 281, n. 3, p. 279-288, 1995.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venemous reptitis of Latin America**. Ithaco: Comstock/Cornell Univ. Press, 1989. 425p.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 7-8, p. 843-856, 2004.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado. Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. **Zoonoses no Ceará um desafio a vencer**. [Fortaleza], 1991.

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

CHAN, K. E. Comparison of the antithrombotic action of the thrombin-like fraction of Malayan pit viper venom and heparin. **Cardiovasc. Res.**, v. 3, p. 171, 1969.

CHAPMAN, D. The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of central and southern Africa. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1968. v. 1, p. 463-527.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. WHO**, v. 76, p. 515-524, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-846, 1998.

CHU, C. C.; PAUL, W. E. Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 6, p. 2507-2512, 1997.

CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J. Protein. Chem.** v. 9, n. 2, p. 221-227, 1990.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONE, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, n.10, p. 1237-1247, 1993.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONE, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon**, v. 36, n.10, p. 1323-1332, 1998.

COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONE, L.; PRADO-FRANCISCHETTI, J. The effects of *Bothrops insularis* venom on isolated nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 28, p. 605, 1990.

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

CUNNINGHAM, M. A.; RONDEAU, E.; CHEN, X.; COUGHLIN, S. R.; HOLDSWORTH, S. R.; TIPPING, P. G. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 455-462, 2000.

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

D'ABREU, A. C. F.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONE, L. The nephrotoxic action of the crude *Bothrops insularis* venom and of the PLA₂-containing fraction. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 312-313, 1996.

DA CRUZ HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) venom and a phospholipase A₂-containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, n. 1, p. 185-195, 2001.

DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon.**, v. 41, n. 2, p. 251-255, 2003

DATE, A.; SHASTRY, J. C. M. Renal ultrastructure in cortical necrosis following russel's viper envenomation. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.84, p.3-9, 1981.

DE CARVALHO, D.D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon.**, v. 39, n. 10, p. 1471-1476, 2001.

DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of Bothrops jararacussu snake venom lectin. **J. Protein Chem.**, v. 21, n. 1, p. 43-50, 2002.

DE SCHEPPER, H. U.; DE WINTER, B. Y.; SEERDEN, T. C.; HERMAN, A. G.; PELCKMANS, P. A.; DE MAN, J. G. Functional characterisation of tachykinin receptors in the circular muscle layer of the mouse ileum. **Regul Pept.**, v. 130, n. 3, p. 105-115, 2005.

DERY, O.; CORVERA, C. U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N. W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 274, p. C1429–C1452, 1998.

DIPIETRANTONIO, A. M.; HSIEH, T.; WU, J. M. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, n. 2, p. 477-482, 1999.

DOUGLAS, C. R. Patofisiologia do processo inflamatório. In: DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia do sistema renal**. São Paulo: Robe, 2000. p. 272-274.

_____. Patofisiologia da insuficiência renal aguda. In: DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia geral, mecanismo das doenças**. São Paulo: Robe, 2001. p. 549.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 45, p. 207-232, 1993.

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

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

DUARTE, M. R.; PUORTO, G.;FRANCO, F.L. A biological survey of the pitviper Bothrops insularis Amaral (Serpentes, Viperidae): Na endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. **Studies on neotropical fauna and environment**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 1995.

FEITOSA, R. F. G. **Efeitos renais e pulmonares do veneno da cascavel (*Crotalus durissus cascavella*) em ratos**. 1996.135f. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

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

FERREIRA, L. A.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from Tityus serrulatus scorpion venom. **Toxicon.**, v. 31, n. 8, p. 941-947, 1993.

FERREIRA, L. A.; AUER, H.; HASLINGER, E.; FEDELE, C.; HABERMEHL, G. G. Spatial structures of the bradykinin potentiating peptide F from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 661-676, 1999.

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

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

FERREIRA, S. H. A Bradykinin-potentiating factor (BFP) present in the venom *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 163-169, 1965.

_____. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. **Semin. Perinatol.**, v. 24, n. 1, p. 7-10, 2000.

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

_____. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 8, p.1693-1698, 1994.

_____. Do fator de potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA/ From bradykinin potentiation factor (BPF) to the inhibitors of angiotensin conversor enzyme. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.5, n.1, p.6-8, 1998.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of Bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, p. 2583-2593, 1970.

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

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

FILIPPI, S.; PARENTI, A.; DONNINI, S.; GRANGER, H. J.; FAZZINI, A.; LEDDA, F. alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 296, n. 3, p. 869-875, 2001.

FOEGH, M. L.; HECKER, M.; RAMWELL, P. W. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, & related Compounds. In: KATSUNG, B. G. (Ed.). **Pharmacology**. Stanford: Appleton & Lange, 1998. p. 304–318.

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

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

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, v. 90, n. 3, p. 159-161, 1982.

FONTELES, M. C. C.; VILLAR-PALLASI, G.; FANG, J.; LARNER, AND R. L. GUERRANT. Partial characterization of an ANF/urodilatin-like substance released from perfused rabbit kidney under hypoxia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 75-79, 1993.

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

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

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T. Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. **Thromb. Haemost.**, v. 74, n. 2, p. 743-750, 1995.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373 - 376, 1980.

GARCIA, J. G.; VERIN, A. D.; SCHAPHORST, K. L. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 22, n. 4, p. 309-315, 1996.

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; SILVEIRA, P. F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon**, v. 40, n.11, 1617-1626, 2002.

GLUSA, E.; PAINTZ, M.; BRETSCHEIDER, E. Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 22, n. 3, p. 261-265, 1996.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. W.; HAEGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984.

GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. São Paulo: Ed. Mercedes Benz, 1990. 101 p.

GREENBERG, S.; DIECKE, F. P.; PEEVY, K.; TANAKA, T. P. The endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 162, n. 1, p. 67-80, 1989.

GRIESBACHER, T.; RAINER, I.; TIRAN, B.; FINK, E.; LEMBECK, F.; PESKAR, B.A. Mechanism of kinin release during experimental acute pancreatitis in rats: evidence for pro- as well as anti-inflammatory roles of oedema formation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, n. 2, p. 299-308, 2003.

GUI, Y.; LOUZENZHISER, R.; HOLLENBERG, M. D. Bidirectional regulation of renal hemodynamics by activation of PAR 1 and PAR2 in isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p. F95-F104, 2003.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; S DUTRA, D. L.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R.B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Dec 1;432(1):1-11.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. **Rev. Biol. Trop.**, v. 32, p. 213-222, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILA, E. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon**, v. 24, p. 885-894, 1986a.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 84, p. 159-164, 1986b.

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

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiología Médica**. 10ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 864p. p. 281-296, 313-327.

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

HAMILTON, R. L.; BERRY, M. N.; WILLIAMS, M. C.; SEVERINGHAUS, E. M. A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J Lipid Res.** v. 15, n. 2, p. 182-186, 1974.

HANDLEY, D. A.; ARBEENY, C. M.; LEE, M. L.; Van VALEN, R. G.; SAUNDERS, R. N. Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules. **Immunopharmacology**, v. 8, n. 3-4, p. 137-142, 1984.

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

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

HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A.; KARLSSON, E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 2, p. 383-404, 1975.

HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; SOUSA, T. M.; MARTINS, A. M.; NOBRE, A. C.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; PINTO, V. P.; SAMPAIO, A. H.; FONTELES, M. C.; CAVADA, B. S.; MONTEIRO, H. S. Renal alterations promoted by the lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Dioclea guianensis* (DguiL) seeds. **Protein Pept. Lett.**, v. 10, n. 2, p. 191-197, 2003.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF. **Toxicon**, v. 39, n.12, p.1841-1846, 2001.

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.**, v. 37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 4, p. 293-306, 1979.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 68, p.1560-1563, 1971.

HICKEY, K. A.; RUBANYI, G.; PAUL, R. J.; HIGHSMITH, R. F. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 248, n. 5 pt. 1, p. C550-C556, 1985.

HIGGS, G. A.; VANE, J. R. Inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxygenase. **Br. Med. Bull.** v. 39, n. 3, p. 265-270, 1983.

HILL, B.; RALEVIC, V.; CROWE, R.; BURNSTOCK, G. Innervation and nitric oxide modulation of mesenteric arteries of the golden hamster. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 317, n. 2-3, p. 275-283, 1996.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca²⁺-dependent-type lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 4, p. 2320-2326, 1991.

HOLLENBERG, M. D.; COMPTON, S. J. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, p. 203-217, 2002.

HOLLENBERG, M. D.; LANIYONU, A. A.; SAIFEDDINE, M.; MOORE, G. J. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains of thrombin receptor-derived polypeptides in biological activity in vascular endothelium and gastric smooth muscle: evidence for receptor subtypes. **Mol. Pharmacol.**, v. 43, p. 921-930, 1993.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve ending: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24. p. 739-768, 1988.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONE, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothrops toxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-627, 1988.

HOUSSAY, B. A. Classification des actions des venins de serpents sur l'organisme animal. **C. R. Soc. Biol.**, Paris, v. 109, p. 308-310, 1930.

HOWIE, P. W.; PRENTICE, C. R.; McNICOL, G. P. A method of antithrombin estimation using plasma defibrinated with Ancrod. **Br. J. Haematol.**, v. 25, n. 1, p. 101-110, 1973.

HU, Z. W.; MILLER, J. W.; HOFFMAN, B. B. Induction of enhanced release of endothelium-derived relaxing factor after prolonged exposure to alpha-adrenergic

agonists: role in desensitization of smooth muscle contraction. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 23, n. 2, p. 337-343, 1994.

INSCHO, E. W.; CARMINES, P. K.; NAVAR, L.G. Juxtamedullary afferent arteriolar responses to P1 and P2 purinergic stimulation. **Hypertension**, v. 17, p. 1033-1037, 1991.

INSCHO, E. W.; MITCHELL, K. D.; NAVAR, L. G. Extracellular ATP in the regulation of renal microvascular function. **FASEB J.** v. 8, p. 319-328, 1994.

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

JUNG, SK.; MAI, A.; IWAMOTO, M.; ARIZONO, N.; FUJIMOTO, D.; SAKAMAKI, K.; YONEHARA, S. Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis. **J. Immunol.**, v. 165, n. 3, p.1491-1497, 2000.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; FARSKY, S. H.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Molecular cloning and expression of a snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 43, p. 39836-39842, 2001.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. I. C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Review article. **Toxicon**, v. 27, p. 955-963, 1989.

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

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, pt. 2, p. 635-641, 1996a.

KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I. S.; NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by the *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.199-204, 1986.

KASSAB, B.H.; CARVALHO, D. D.; OLIVEIRA, M. A.; BAPTISTA, G. R.; PEREIRA, G. A.; NOVELLO, J. C. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein. Expr. Purif.**, v. 35, n. 2, p. 344-352, 2004.

KATORI, M.; MAJIMA, M. The renal kallikrein-kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 43-115, 2003.

KAWABATA, A.; NAKAYA, Y.; ISHIKI, T.; KUBO, S.; KURODA, R.; SEKIGUCHI, F.; KAWAO, N.; NISHIKAWA, H.; KAWAI, K. Receptor-activating peptides for PAR-1

and PAR-2 relax rat gastric artery via multiple mechanisms. **Life Sci.**, v. 75, n. 22, p. 2689-2702, 2004.

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

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure-function relationship of phospholipase II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, v.24, n.9, p. 895-905, 1986.

KIM, S. M.; BYUN, J. S.; JUNG, Y. D.; KANG, I. C.; CHOI, S. Y.; LEE, K. Y. The effects of oxygen radicals on the activity of nitric oxide synthase and guanylate cyclase. **Exp Mol Med.**, v. 30, n. 4, p. 221-226, 1998.

KISIEL, W. Molecular properties of the Factor V-activating enzyme from Russell's viper venom. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 23, p. 12230-12234, 1979.

KISIEL, W.; KONDO, S.; SMITH, K. J.; MCMULLEN, B. A.; SMITH, L. F. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 26, p. 12607-12613, 1987.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Glomerular filtration and renal blood flow. In: KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Ed.). **Renal physiology**. 2th ed. St. Louis: Mosby, 1997. c. 3, p.31-51.

KOMATSU, N.; SAIJOH, K.; TOYAMA, T.; OHKA, R.; OTSUKI, N.; HUSSACK, G.; TAKEHARA, K.; DIAMANDIS, E. P. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. **Br J Dermatol.**, v. 153, n. 2, p. 274-281, 2005.

KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 17, p. 261-277, 1997.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TOHKAI, T.; SUGIHARA, H. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus*. **Toxicon**, v. 37, n 7, p. 1053-1064., 1999.

KOMORI, Y.; TATEMATSU, R.; TANIDA, S.; NIKAI, T. Thrombin-like enzyme, flavovilase, with kinin-release activity from *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. **J. Nat. Toxins.**, v.10, p. 239-248, 2001.

KOSTIZA, T.; DAHINDEN, C. A.; RIHS, S. OTTEN, V.; MEIER, J. Nerve growth factor from the venom of the Chinese cobra *Naja naja atra*: Purification and description of non-neural activities. **Toxicon**, v. 33, p.1249-1261, 1995.

KOSTIZA, T; MEIER, J. Nerve growth factor from snake venom: Chhimical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, p. 787-806, 1996.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 202, p. 1165-1168, 1991.

KU, D. D.; ZALESKI, J. K. Receptor mechanism of thrombin-induced endothelium-dependent and endothelium-independent coronary vascular effects in dogs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 22, n. 4, p. 609-616, 1993.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68/69, p. 3-58, 2002.

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

KUTZ, C.; PAINTZ, M.; GLUSA, E. Inhibition of thrombin-induced contractile responses by protein kinase inhibitors in porcine pulmonary arteries. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 50, n. 4-6, p. 497-500, 1998.

LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, c. 343, p. 257-263, 1998.

LEE, W. H.; DA-SILVA-GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLICARPOV, I.; GARRAT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin ii complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, p. 28-36, 2001.

LI, Q.; COLBERG, T. R.; OWNBY, C. L. A simple and rapid method for isolating small myotoxins from rattlesnake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 1197-1201, 1993.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1349-1358, 1994.

LIMA, A. Ilha de São Paulo tem nova espécie de cobra. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 4 mar. 2001. *Ciência Zoológica*. p. 19.

LISY, O.; JOUGASAKI, M.; HEUBLEIN, D. M.; SCHIRGER, J. A.; HEN, H. H.; WENBERG, P. W.; BURNETT, J. C. Renal actions of synthetic *Dendroaspis natriuretic* peptide. **Kidney Int.**, v. 56, p. 502-508, 1999.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

LÔBO-ARAÚJO. apud COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONE, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, n.10, p. 1237-1247, 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MATA, E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 23, p. 807-813, 1985.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. Antibodies neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 25, p. 443-449, 1987.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 41-55, 1994.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J. M.; RAMIREZ, G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**, v. 28, n. 1, p. 75-81, 1990.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom : analysis of edema formation , inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105, 1993.

LUCCHESI, P. A.; BELMADANI, S.; MATROUGUI, K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. **J. Hypertens.**, v. 23, n. 3, p. 571-579, 2005.

LUCKHOFF, A.; POHL, U.; MULSCH, A.; BUSSE, R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **Br J Pharmacol.**, v. 95, n. 1, p. 189-196, 1988.

MACFARLANE, S. R.; SEATTER, M. J.; KANKE, T.; HUNTER, G. D.; PLEVIN, R. Proteinase-activated receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 245-282, 2001.

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; FACA, V. M.; GREENE, L. J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELA, I. R.; GIGLIO, J. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south American

rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, p. 1927-1937, 1998.

MANDELBAUM, F. R.; REICHL., A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 20, p. 955-972, 1982.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P. H.; BEACHAM, D. A.; NIEWIAROWSKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the α 2 β 1 integrin. **Biochemistry**, v. 39, p. 9859-9867, 2000.

MARCZIN, N.; RYAN, U. S.; CATRAVAS, J. D. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, n. 1, p. 170-179, 1992.

MARKLAND, F. S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S. S.; REDDY, K. N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G.B.; THEODOR, I.; PIRKLE, H. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 1688-1692, 1982.

MARQUES, A. V.; MARTINS, M.; SAZINA, I. **Ciência Hoje**, v.31, n. 186, p. 56-59, 2002.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPAVA-STITZER, S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.

MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; GUEDES JUNIOR, E. O.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1441-1450, 1998.

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

MASAKI, T. Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. **Endocrinol. Rev.**, v. 14, n. 3, p. 256-268, 1993.

MASCI, P. P.; WHITAKER, A. N.; De JERSEY, J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis textilis*. **Biochem. Int.**, v. 17, n. 5, p. 825-835, 1988.

MASUDA, S.; ARAKI, S.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, n. 1, p. 59-63, 1997.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1477, n. 1/2, p. 146-156, 2000.

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

MCGUIRE, J. J.; HOLLENBERG, M. D.; BENNETT, B. M.; TRIGGLE, C. R. Hyperpolarization of murine small caliber mesenteric arteries by activation of endothelial proteinase-activated receptor 2. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 82, n. 12, p. 1103-1112, 2004.

MEBS, D. A comparative study of enzyme activity in snake venoms. **J. Biochem.**, v. 1, p. 335, 1970.

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

MEBS, D.; SAMEJIMA, Y. Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A₂ from crotalid venoms. **Toxicon**, v. 24, p. 161-168, 1986.

MEIER, J.; STOCKER, K. Effects of snake venoms on hemostasis. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 21, n. 3, p. 171-182, 1991.

MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotalinevenoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, v. 37, p. 199-215, 1999.

MILANI, R.; JORGE, M. T.; de CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S.; SANO-MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; OLIVEIRA, I. C.; FERNANDES, J. C.; ALFRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A. Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **Q. J. Med.**, v. 90, p. 323-334, 1997.

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

MITTAL, C. K. Nitric oxide synthase: involvement of oxygen radicals in conversion of L-arginine to nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 193, n. 1, p. 126-132, 1993.

MIZUMOTO, H.; KARASAWA, A.; KUBO, K. Diuretic and renal protective effects of 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902), a novel adenosine A1-receptor antagonist, via pertussis toxin insensitive mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 200-206, 1993.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina.** 1990. 79f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

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

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

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

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

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.; MOTA, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and crude venoms. **Toxicon**, v. 29, p. 1471-1480, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J.; DENNISON, J. M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 9, p. 2000-2005, 1996.

MUNGER, K. A.; JACKSON, E. K. Effects of selective A1 receptor blockade on glomerular hemodynamics: involvement of renin-angiotensin system. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. 783-790, 1994.

MURAYAMA, N.; HAYASHI, M. A.; OHI, H.; FERREIRA, L.A.; HERMANN, V. V.; SAITO, H.; FUJITA, Y.; HIGUSHI, S.; FERNANDES, B. L.; YAMANE, T.; DE-CAMARGO, A. C. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 1189-1193, 1997.

NANCY, G.; AHLSTROM, M. D.; LUGINBUHL, M. D. W.; TISHER, M. D. C. Acute anuric renal failure after pigmy rattlesnake bite. **South. Med. J.**, v. 84, p. 783-785, 1991.

NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. **Thromb. Haemost.**, v. 48, n. 3, p. 277-282, 1982.

NIEMIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BRUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with

platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, v. 18, n. 16, p. 3570-3577, 1979.

NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Primary structure of the lectin from the venom of *Bitis arietans* (puff-adder). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 11, p. 1620-1622, 1995.

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

OGILVIE, M. L.; DOCKTER, M. E.; WENZ, L.; GARTHER, T. K. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. **J. Biochem.**, v. 100, n. 6, p. 1425-1431, 1986.

OLIVER, J. J.; RAJAPAKASE, N. W.; EVANS, R. G. Effects of indometacin on response of regional kidney perfusion to vasoactive agents in rabbits. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 873-879, 2002.

ORDÓÑES, N. G.; ROSAI, J. Urinary tract. In: ROSAI, J. (Ed.) **Rosai and Ackerman's Surgical Pathology**, 9th ed. St. Louis, 2004. cap. 17, p 1163-1361.

OZEKI, Y., MATSUI, T., HAMAKO, J., SUZUKI, M., FUJIMURA, Y., YOSHIDA, E., NISHIDA, S. AND TITANI, K. C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, n. 1, p. 306-310, 1994.

PARONETTO, C. C.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONE, L.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Hepatic morphological alterations induced by *Bothrops insularis* venom and a fraction with PLA₂ activity in chicks. **Toxicon**, v. 34, n. 3, p. 313, 1996.

PEGG, D. E. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. **Cryobiology**, v. 8, n. 5, p. 431-440, 1971.

PETRAKI, C. D.; KARAVANA, V. N.; DIAMANDIS, E. P. Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 4, p. 493-501, 2003.

PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E. W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p. 1293-1300, 2000.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Proposal for a novel system of nomenclature of plant lectins. **Lectins**, v. 10, p. 105-117, 1995.

PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F. M.; LENTI, L.; GAZZANIGA, P. P.; VIOLI, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. **Blood**, v. 91, n. 2, p. 484-490, 1998.

PINHO, F. M.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS F. Snakebites in the State of Goias, Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 1, p.93-96, 2004).

PIROTZKY, E.; BIDAULT, J.; BURTIN, C.; GLUBERY, M. C.; BENVENISTE, J. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, vasoactive amines from isolated rat kidney. **Kidney Int.**, v. 25, p. 404-416, 1984.

PITTS, R. F. Metabolism of amino acids by the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 220, p. 862-867, 1971.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzyme activity of low-Mr phospholipase A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v. 319, p. 961-968, 1996.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 313, n. 2, p. 373-378, 1994.

PONRAJ, D.; GOPALAKRISHNAKONE, P., Renal lesion in rhabdomyolysis caused by *Pseudechis australis* snake myotoxin. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1956-1969, 1997.

PRADO-FRANCISCHETTI, J.; VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, p. 875-887, 1981.

QUILLEY, J.; QIU, Y. K-induced vasodilation in the rat kidney is dependent on the endothelium and activation of K channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 508, p. 193-199, 2005.

QUINN, T.; COLLINS, C.; BAIRD, A. W. Mechanisms of neurokinin A- and substance P-induced contractions in rat detrusor smooth muscle in vitro. **BJU Int.**, v. 94, n. 4, p.651-657, 2004.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 413-492, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 182-208, p. 246-297, p. 325-348.

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

RESENDE, N. A. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; CAMPOS, V. A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRAO, M. L.; JORGE, M. T. Deaths caused by venomous snakes in the State

of São Paulo: evaluation of 43 cases from to 1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 44, p 312-318, 1998.

RIBEIRO, L. A.; DE CAMPOS, V. A.; ALBUQUERQUE, M. D. E.; J, TAKAOKA N. Y. Snake bites in the state of Sao Paulo, Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 39, n. 1, p. 4-7, 1993.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiology of accidents due to bites of poisonous snakes: a study of cases attended in 1988. **Rev. Saude Publ.**, v. 29, n. 5, p. 380-388, 1995.

RIGDEN, D. J.; HWA, L. W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 59, p. 255-262, 2003.

RIZZA, C. R.; CHAN, K. E.; HENDERSON, M. P. Separation of factor VIII (antihemophilic factor) activity from fibrinogen by means of a snake venom. **Nature**, v. 207, p. 90, 1965.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S. R.; COGO, J. C.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v. 43, n. 6, p. 633-638, 2004.

ROSEMBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W. T.; MEBS, D. **Handbook of toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 67-277.

ROSENFELDE, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. v. 2, p. 345-384.

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

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

ROWAN, E. G.; HARVEY, A. L. Toxins affecting K⁺ channels. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1765-1780, 1996.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; GUTIERREZ, J. M. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. **Toxicon**, v. 43, n. 4, p. 417-424, 2004.

RUCAVADO, A.; SOTO, M.; ESCALANTE, T.; LORIA, G. D.; ARNI, R.; GUTIERREZ, J. M. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thromb. Haemost.**, v. 94, n. 1, p. 123-131, 2005.

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

RUSSEL, F. E. **Snake venom poisoning**. New York: Scholium International Grat Neck, 1983.

SALMI, M.; JALKANEN, S. VAP-1: an adhesin and an enzyme. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 4, p. 211-216, 2001.

SALVINI, T. F.; AMARAAL, A. C.; MIYABARA, E. H.; TURRI, J. A. O.; DANELLA, P. M.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, p. 1141-1149, 2001.

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

SCHMIDT, H. H.; GAGNE, G. D.; NAKANE, M.; POLLOCK, J. S.; MILLER, M. F.; MURAD, F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 40, n. 10, p. 1439-1456, 1992.

SEEGERS, W. H.; OUYANG, C. Snake venoms and blood coagulation. In: LEE, C. Y. (Ed.) **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. v. 52, p. 684.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, v. 25, p. 1135-1144, 1987.

SELISTRE, H. S.; QUIEROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 28, p. 261-273, 1990.

SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine protease (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 845-853, 1998.

SERRANO, S. M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, n. 21, p. 7186-7193, 1995.

SHARON, E.; SHARON, N.; BEN-TAL, N. Evolutionary analysis reveals collective properties and specificity in the C-type lectin and lectin-like domain superfamily. **Proteins**, v. 53, n.1, p. 44-55, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cells agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-958, 1972.

SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **Nat. Toxins**, v. 8, p. 271-277, 1999.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A., The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SKARNES, R. C. L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. **Nature**, v. 225, n. 5237, p. 1072-1073, 1970.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 7-15, 2000a.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A_2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, The phospholipase A_2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 33, p. 877-888, 2001.

SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, n. 6, p. 668-677, 2002.

SOE-SOE; THAN-THAN; KHIN-EI-HAN. The nephrotoxic action of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon**, v. 28, n. 5, p. 461-467, 1990.

SOROKIN, A.; KOHAN, D. E. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal Mesangium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p. 579–589, 2003.

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

STEINBERG, S. F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 67, n. 1, p. 2-11, 2005.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1129-1141, 1991.

SUHARA, T.; FUKUO, K.; SUGIMOTO, T.; MORIMOTO, S.; NAKAHASHI, T.; HATA, S.; SHIMIZU, M.; OGIHARA, T. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 160, n. 8, p. 4042-4047, 1998.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 1, p.134-139, 1996.

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 blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S.; SAISAKA, Y.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 14109–14117, 1992.

TAMBOURGI, D. V.; DOS SANTOS, M. C.; FURTADO, M. D.E. F.; DE FREITAS, M. C.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, n. 3, p. 723-727, 1994.

TAN, Y.; WANG, B.; KEUM, J. S.; JAFFA, A. A. Mechanisms through which bradykinin promotes glomerular injury in diabetes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 288, n. 3, p. 483-492, 2005.

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

TEIXEIRA, E. H.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S. F.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein Pept. Lett.**, v. 8, p. 477-484, 2001.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, Jr. H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moogeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. p. 620-624, 2001.

TENG, C. M.; KO, F. N. A comparison of the platelet aggregation induced by three thrombin-like enzymes of snake venom and thrombin. **Thromb. Haemost.**, v. 59, p. 304-309, 1998.

TESFAMARIAM, B. Distinct receptors and signaling pathways in-thrombin- and thrombin receptor peptide-induced vascular contractions. **Circ. Res.**, v. 74, p. 930-936, 1994a.

_____. Thrombin receptor-mediated vascular relaxation differentiated by a receptor antagonist and desensitization. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 267, p. H1962-H1967, 1994b.

TOKUNAGA, F.; NAGASAWA, K.; TAMURA, S.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; KISIEL, W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 33, p. 17471-17481, 1988.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 14, p. 9539-9542, 1997.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; AMARAL, M. E. C.; VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 7, p. 585-591, 2001.

TOYAMA MH, MANCUSO LC, GIGLIO JR, NOVELLO JC, OLIVEIRA B, MARANGONI S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 37, n. 6, p. 1047-1055, 1995.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; VIEIRA, C. A.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.**, v. 17, n. 7, p. 713-718, 1998.

TRENTO, E. P.; GARCIA, O. S.; RUCAVADO, A.; FRANCA, S. C.; BATALINE, C.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological

actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, p. 1521-1529, 2001.

TROIANO, J. C. **Manejo sanitário de répteis em cativeiro**. Buenos Aires: RA **Prensa Veterinária Argentina**, 1991.

UMANA, V. Purification and isolation of isoenzymes of L-amino acid oxidase from the venom of *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 1982.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, v. 201, n. 1, p. 331-339, 1994.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-831, 2000.

VAN BUREN, M.; BIJLSMA, J. A.; BOER, P.; VAN RIJN, H. J.; KOOMANS, H. A. Natriuretic and hypotensive effect of adenosine-1 blockade in essential hypertension. **Hypertension**, v. 22, p. 728-734, 1993.

VANHOUTTE, P. M.; MILLER, V. M. Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Med.**, v. 87, n. 3, p. 1S-5S, 1989.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B.(Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.14, p. 205.

VICTORINO, G. P.; NEWTON, C. R.; CURRAN, B. Modulation of microvascular hydraulic permeability by platelet-activating factor. **J. Trauma**, v. 56, n. 2, p. 379-384, 2004.

VILLARROEL, M. S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R. S. Padronização da avaliação da proteína de antivenenos botrópicos em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 325-336, 1978/1979a.

_____. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 311-323, 1978/1979b.

_____. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *Bothrops jararaca*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 345-355, 1978/1979c.

VILLARROEL, M. S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 337-344, 1978/1979d.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: CORBERT, C. E. (Ed.). **Farmacodinâmica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982. p. 1044-1074 .

_____. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 26, p. 212-218, 1980.

VITAL BRAZIL, O.; EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol.**, v. 212, p. 34-35, 1971.

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

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

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), **Envenomings and Their Treatments**. Editions Fondation Marcel Me´rieux, Lyon, pp. 63–76, 1996.

WEN, F. H.; FRANÇA, F. S.; CARDOSO, J. L. C. Ofidismo. In: MENDES, R. **Patologia do trabalho: trabalho agrícola e sua relação saúde/doença**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. cap. 20, p. 487-544.

WHITE, J.; WARRELL, D.; EDDLESTON, M.; CURRIE, B. J.; WHYTE, I. M.; ISBISTER, G. K. Clinical toxicology--where are we now? **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 41, n. 3, p. 263-276, 2003.

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

XIAO, X. D.; MARZLUF, G. A. Amino-acid substitutions in the zinc finger of NIT2, the nitrogen regulatory protein of *Neurospora crassa*, alter promoter element recognition. **Curr. Genet.**, v. 24, n. 3, p. 212-218, 1993.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; KIM, S. T. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg 726-Ser-727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v. 107, p. 111-117, 2002.

ZAGER, R. A. Rhabdomyolysis and myhemoglobinuric acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 49, p. 113-117, 1996.

ZAMUNER, S. R.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; RODRIGUES-SIMIONE, L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v. 34, n. 3, p. 314-315, 1996.

ZHANG, Y.; GAO, R.; LEE, W. H.; ZHU, S. W.; XIONG, Y. L.; WANG, W. Y. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom,

and comparative study with other venom proteases. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 131-142, 1998.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 375, n. 1-3, p. 261-276, 1999.

ZINGALI, R. B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M. C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10794-10802, 1993.

ZSCHAUER, A. O.; SIELCZAK, M. W.; SMITH, D. A.; WANNER, A. Norepinephrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: role of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor activation. **J. Appl. Physiol.**, v. 82, n. 6, p. 1918-1925, 1997.

ANEXO A

Equipamento utilizado nos experimentos.

Microscópio óptico (Nikon) - Exame histológico

Máquina fotográfica Canon PowerShot A95 5MP Digital Camera with 3x Optical Zoom -As fotografias microscópicas e macroscópicas.

Transdutores P23 Stath - transdução da pressão arterial sistêmica ao fisiógrafo

Fisiógrafo "Gemini" 7070, 2 channel recorders - Monitoramento da pressão arterial sistêmica

ANEXO B

Substâncias utilizadas na perfusão renal

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as substâncias abaixo.

NaHCO₃ (Synth)

NaH₂PO₄.H₂O (Synth)

NaCl (Synth)

MgSO₄ . 7H₂O (Reagen)

CaCl₂ . 2H₂O (Reagen)

Manitol (Reagen)

Uréia (Reagen)

KCl (Merck)

Glicose (Squibb)

Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)

Heparina (CEME)

Inulina (Sigma)

Pentobarbital Sódico (Cristália)

Albumina Bovina

Solução de Krebs-Henseleit

114.0mM de NaCl; 4.96mM de KCl; 1.24mM de KH₂PO₄; 0.5mM de MgSO₄.7H₂O; 24.99mM de NaHCO₃; 2.10mM de CaCl₂.2H₂O; e 3.60mM de glicose

ANEXO C

Comportamento da pressão arterial do leito mesentérico de ratos perfundido com o veneno da *Bothrops insularis*, pré-contraído com fenilefrina, combinado com fenilefrina e Isoladamente, na dose de 10µg/mL/min.

	Média	
Basal	0	38
	2	38
	4	38
	6	38
	8	38
	10	38
	12	38
	14	38
	16	38
	18	38
Fenilefrina	20	38
	22	127
	24	134,5
	26	136,5
	28	140,5
	30	162
	32	163,5
	34	152
	36	146,5
	38	140,5
Fenilefrina + Veneno insularis	40	137,5
	42	137,5
	44	125,5
	46	122
	48	116,5
	50	111
	52	104
	54	98
	56	95
	58	92
Veneno insularis	60	89
	62	49
	64	36,5
	66	30,25
	68	27,75
	70	27,25
	72	27,25
	74	27,75
	76	27
	78	26,5
	80	27

ANEXO D

Tabelas dos parâmetros renais do grupo controle com o rim isolado de rato.

Parâmetros vasculares e fisiológicos urinários do rim isolado perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle).

Tempo	PP (mmHg)		RVR (mmHg/ mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		RFG (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	110,11	3,68	5,15	0,49	0,14	0,01	0,70	0,07
60	108,27	4,88	5,38	0,51	0,16	0,01	0,71	0,05
90	108,69	5,09	5,36	0,59	0,16	0,02	0,63	0,05
120	110,28	3,69	5,20	0,47	0,16	0,02	0,70	0,08

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).

PP= pressão de perfusão; RVR= resistência vascular renal; FU= fluxo urinário; RFG= ritmo de filtração glomerular.

Parâmetros eletrolíticos do rim isolado perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle).

Tempo	% TNa		%pTNa		%TK		%pTK	
	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	81,94	1,24	75,65	1,42	69,13	4,14	64,50	4,74
60	81,11	1,52	74,69	0,99	69,04	5,68	62,71	4,08
90	79,26	0,90	73,84	2,64	71,84	4,21	64,27	6,12
120	79,76	0,56	74,94	3,41	69,94	6,86	61,83	5,62

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).

%TNa⁺= percentual de transporte de sódio; %pTNa⁺= percentual de transporte proximal de sódio;

%TK⁺= percentual de transporte de potássio; %pTK⁺= percentual de transporte proximal de potássio.

Parâmetros eletrolíticos do rim isolado perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle).

Tempo	C osm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)		%TCl		%pTCl	
	média	epm	Média	e.p.m.	média	e.p.m.
30	0,120	0,02	79,90	1,03	76,81	1,25
60	0,121	0,02	81,25	2,44	78,49	2,90
90	0,142	0,01	77,32	2,22	76,58	1,20
120	0,125	0,02	78,53	2,33	76,36	2,47

Dados apresentados por média±EPM (p<0,05).

%TCl⁻= percentual de transporte de cloro; %pTCl⁻= percentual de transporte proximal de cloro; C osm= clearance osmótico.

ANEXO E

Trabalho Apresentado no: XXIII Encontro Universitário De Iniciação À Pesquisa da UFC, realizado em Fortaleza, Ceará, entre 01 a 02 de julho de 2004.

Título: Alterações Renais Induzidas Pelo Veneno Da *Bothrops insularis*.

RESUMO

Monique Aguiar Porto (Farmácia-UFC), Daniel Freire de Sousa- (PIBIC/CNPq-

Farmácia-UFC), João Paulo Saraiva- Abreu (Medicina-UFC), Marcus Davis Machado

Braga (Co-orientador), Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora). Departamento de

Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de- Medicina – UFC.

Palavras-Chave: *Bothrops insularis*; rim; perfusão; nefrotoxicidade.

Introdução: Dentre as complicações secundárias mais comuns nos-
envenenamentos ofídicos podemos citar a insuficiência renal- aguda.
Objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos causados pelo- veneno da
Bothrops insularis em rim isolado de rato. Métodos: Utilizamos rins de
ratos Wistar (260-300g; n=6) perfundido- segundo técnica descrita por
Fonteles, M.C. et al, Am. J. Physiol., 244, p.235, 1983. Os resultados do
grupo controle (C), onde os-rins foram perfundidos apenas com a solução
de Krebs-Hanseleit- modificada com 6 g% de albumina bovina, foram
comparados ao-grupo tratado com o veneno da *Bothrops insularis*
(10µg/mL). Os-experimentos tiveram a duração de 120 minutos e o
veneno foi-adicionado aos 30 minutos de perfusão. Os resultados foram-
analisados por Teste t de Student com *p<0,05. Resultados: O- veneno
da *Bothrops insularis* (BiV) reduziu a pressão de perfusão-
($C_{90}=108,70\pm 5,1$ mmHg; $BiV_{90}=51,9\pm 5,7$ mmHg*), a resistência- vascular
renal ($C_{90}=5,76\pm 0,65$ mmHg/ml⁻¹ .g .min⁻¹; $BiV_{90}=2,85\pm 0,52$ mmHg/ml⁻¹ .g
⁻¹ .min⁻¹), o fluxo urinário- ($C_{90}=0,138\pm 0,008$ ml .g .min⁻¹;
 $BiV_{90}=0,044\pm 0,008$ ml .g .min⁻¹), o ritmo de filtração
glomerular ($C_{90}=0,699\pm 0,089$ ml .g .min⁻¹; $BiV_{90}=0,194\pm 0,050$ ml .g .min⁻¹
¹) e o percentual de transporte- tubular de sódio ($C_{120}=79,76\pm 0,56$;
 $BiV_{120}=73,78\pm 3,45$ *). Conclusão: Os efeitos causados pelo veneno da
Bothrops insularis-sugerem nefrotoxicidade direta em rim isolado de rato.
Apoio financeiro: CNPq

ANEXO F

Trabalho Apresentado no: VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia. Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology, realizado em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil de 19 a 23 de Setembro de 2004.

Título: Renal histopathological alterations inserted by the venom of the *Bothrops insularis* serpent.

¹Braga, M.D.B., ²Barbosa, P.S.F., ⁴Toyama, M.H., ⁴Toyama, D.O., Aprígio, C.C., ²Evangelista, I.L., ³Martins, A.M.C., ²Martins, R.D., ²Alves, R.S., ²Capelo, P.A.O., ¹Menezes, D.B., ²Fonteles, M.C., ²Monteiro, H.S.A.

¹Depto. de Patologia, ²Depto. de Fisiologia e Farmacologia, e ³Dpto. de Análises Clínicas e Toxicológicas –UFC, ⁴Depto. de Bioquímica –UNESP.

Acute Renal Failure (ARF) is one of the major complications of botropic accidents. The aim this study was evaluates the histopathological alterations caused by the *Bothrops insularis* (*Bi*) venom. Isolated kidneys from Wistar rats weighing 260 to 300g, were perfused with Krebs-Hansleit solution containing 6% of bovine serum albumin. After the experiments the kidneys were immersed in 10% formaldehyde for 24 hours, inserted in wax for 3 micra thickness slices and stained by hematoxilin-eosin. In the control group (c), the kidneys showed sparse areas of vacuolar-hydropic degeneration of the tubular coating cells, discreet intratubular deposition of proteic material; glomerules, interstitio and vessesl with no abnormalities. In the treated group with *Bithrops insularis* (*Bi*), venom were observed a degeneration represented by vast vacuolar-hydropic ballooning of the tubular coating cells; cortical focal areas showing cells of picnotic nucleus similar to acute tubular necrosis; increased proteic depot within the tubules but normal vessels, gomerules and interstitio. In conclusion the kidney architecture is disrupted in presence of *Bothrops insularis* venom, with dead of tubular coating cells.

ANEXO G

Trabalho Apresentado no: XXXVI Congresso Da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), realizado em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil de 17 a 20 de outubro de 2004.

Título: Alterações Renais Induzidas Pelo Veneno Da *Bothrops insularis*.

Braga, M.D.M., Barbosa P.S.F., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Martins, R.D., Alves, R.S., Evangelista, J.S.A.M., Aprígio C.C., Oliveira, A.L., Martins A.M.C., Marongoni, S., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A.

Deptos Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia da UFC, UNESP e UNIFOR.

Introdução: Dentre as complicações secundárias mais comuns nos envenenamentos ofídicos podemos citar a insuficiência renal aguda. Objetivo deste Trabalho foi avaliar os efeitos causados pelo o veneno da serpente *Bothrops insularis* em rim isolado de rato. Métodos e Resultados: Utilizamos rins de ratos Wistar (260- 300gr; n=6) perfundidos segundo técnica descrita por Fonteles, M.C. et al, Am. J. Physiol., 244, p. 235, 1983. Os resultados do grupo controle (C), onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6 g% de albumina bovina, foram comparado ao grupo tratado com o veneno da *Bothrops insularis* (10µg/ml) adicionado 30 minutos após o início do experimento, sendo que estes experimentos tiveram a duração de 120 minutos. Os resultados foram analisados por Teste T de Student com *p<0,05. Nos grupos em que os rins foram tratado com o veneno da serpente *Bothrops insularis* apresentou uma redução em todos os parâmetros estudados: pressão de perfusão (PP) (C₉₀=108,70±5,085; BiV₉₀=51,9±5,7); resistência vascular renal (RVR) (C₉₀=5,76± 0,65; BiV₉₀=2,85±0,52); fluxo urinário (FU) (C₉₀=0,138±0,008; BiV₉₀=0,044±0,008); ritmo de filtração glomerular (RFG) (C₉₀=0,699±0,089; BiV₉₀=0,194±0,050); percentual de transporte tubular de sódio (TNa⁺) (C₁₂₀=79,76±0,56; BiV₁₂₀=73,78±3,45).

Conclusão: Os efeitos causados pelo veneno de *Bothrops insularis* sugerem a sua nefrotoxicidade direta em rim isolado de rato.

ANEXO H

Trabalho Apresentado no: XXIV Encontro Universitário De Iniciação à Pesquisa da UFC, realizado em Fortaleza, Ceará, entre 09 a 10 de junho de 2005.

Título: Efeito Renal da Fração Trombina-Like do Veneno de *Bothrops insularis*.

João Paulo Saraiva Abreu (PIBIC/CNPq Medicina-UFC), Monique Aguiar Porto (CNPq Farmácia-UFC), Marcus Davis Braga (Co-orientador). Depto. de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina - UFC. Paulo Sérgio F. Barbosa (co-orientador). Depto. de Fisiologia e Farmacologia. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora). Depto. de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina - UFC. Palavras-Chave: *Bothrops insularis*, veneno, nefrotoxicidade, trombina-like. Agradecimentos: apoio financeiro do CNPq e CAPES.

O trabalho objetiva avaliar os efeitos nos padrões fisiológicos e histopatológicos renais causados pela fração trombina-like do veneno de *Bothrops insularis* (BiT), em rim isolado de rato. Os rins de ratos Wistar (260-300gr; n=6) foram perfundidos em sistema de rim isolado, segundo metodologia descrita por Fonteles, M.C. et al., *Am. J. Physiol.*, 244, p.235, 1983. Os resultados do grupo controle (C) foram comparados aos do grupo tratado com BiT (10µg/mL). Os dados foram analisados por teste t de Student com *p<0,05. Para o estudo histopatológico, os rins perfundidos foram seccionados em cortes de 5µm e corados com HE. O grupo tratado com BiT apresentou um aumento da pressão de perfusão aos 60min, seguido de redução aos 120min ($C_{120}=110,28\pm 3,69$; $BiT_{120}=99,5 \pm 5,5$ mmHg*); aumento da resistência vascular renal ($C_{90} = 5,32 \pm 0,57$; $BiT_{90} = 6,83 \pm 1,06$ mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹*); redução do fluxo urinário ($C_{120} = 0,160\pm 0,020$; $BiT_{120} = 0,039 \pm 0,005$ mL.g⁻¹.min⁻¹*) e redução do ritmo de filtração glomerular ($C_{120} = 0,697 \pm 0,084$; $BiT_{120} = 0,151 \pm 0,022$ mL.g⁻¹.min⁻¹*); os percentuais de transporte tubular de sódio e cloreto diminuíram. A histopatologia evidenciou achados sugestivos de necrose tubular aguda e a presença de deposição proteinária no espaço de Bowman e nos túbulos proximais e distais. Como conclusão, verificou-se que a fração trombina-like purificada do veneno da serpente de *Bothrops insularis* (BiT) alterou os parâmetros renais, possivelmente por modificação do controle vascular renal e danos celulares diretos, como necrose tubular aguda.

ANEXO I

Trabalho Apresentado no: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005)

XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, XXX Congresso Brasileiro de Biofísica, XL Congresso Brasileiro de Fisiologia, XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica e XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento, realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

Título: Alterações Renais Induzidas pela L-aminoáido-oxidase (LAAO) do veneno *Bothrops insularis*.

- Toxicologia

43.001

ALTERAÇÕES RENAIIS INDUZIDAS PELA L-AMINOÁIDO-OXIDASE (LAAO) DO VENENO BOTHROPS INSULARIS. 1 Maia, D.G. ; 2 Braga, M D M ; 1 Barbosa, P. S. F. **; 1 Evangelista, I.L. **; 3 Toyama, M. H. ; 3 Toyama, D. O. **; 1 Martins, RD **; 1 Alves, RS **; 4 Porto, M.A. *; 1 Capelo, P.A.O. *; 5 Fonteles, M. C. ; 1 Martins, A. M. C. ; 1 Monteiro, H. S. A. ; 1 Fisiologia e Farmacologia, UFC; 2 Patologia e Medicina Legal, UFC; 3 Bioquímica, UNICAMP; 4 Farmácia e Farmacologia, UFC; 5 Instituto de Ciências Biológicas, UEC

Objetivo: Avaliar os efeitos causados pela LAAO do veneno da *Bothrops insularis* (BiLA), em rim isolado de rato.

Métodos e Resultados: Utilizamos rins de ratos Wistar (260-300gr; n=6) perfundidos segundo técnica descrita por Fonteles, M.C. et al, Am. J. Physiol., 244, p.235, 1983. Para o estudo histopatológico os rins perfundidos foram seccionados em cortes de 5µm e corados com HE. Os resultados do grupo controle (C), onde os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6g% de albumina, foram comparados aos do grupo tratado (com BiLA 10Lg/ml) adicionada 30 minutos após o início do experimento. Os experimentos tiveram duração de 120 minutos. Os resultados foram analisados por teste t de Student com *p<0,05. O grupo em que o rim foi tratado com a BiLA apresentou uma diminuição da pressão de perfusão (C120=110,28±69; BiLA120=82,2±6 mmHg*), da resistência vascular renal (C120=5,48±53; BiLA120=4,12±42 mmHg/mL.g-1.min-1*); do fluxo urinário (C120=0,160±0,020; BiLA120=0,064±0,012 mL.g-1.min-1*), do ritmo de filtração glomerular (C120=0,697±0,084; BiLA120=0,176±0,017 mL.g-1.min-1*); e no transporte tubular de sódio e cloreto. Na histopatologia observou-se deposição proteinácea acentuada nos túbulos proximais, distais e no espaço de Bowman. Extravasamento foi observado em 40% dos 108 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40X) por lâmina.

Conclusões:

A L-aminoáido-oxidase da *Bothrops insularis* reduziu todos os parâmetros renais, além de alterar a permeabilidade capilar glomerular.

ANEXO J

Trabalho Apresentado no: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005)

XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, XXX Congresso Brasileiro de Biofísica, XL Congresso Brasileiro de Fisiologia, XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica, XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento. realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

Título: Alterações Renais Induzidas Pela Trombina Like do Veneno da *Bothrops Insularis*.

43.027

ALTERAÇÕES RENAIIS INDUZIDAS PELA TROMBINA LIKE DO VENENO DA BOTHROPS INSULARIS. 1 Porto, M.A. ; 2 Braga, M D M ; 3 Barbosa, P. S. F. **; 3 Evangelista , J. S. A. M. **; 4 Toyama, M. H. ; 4 Toyama, D. O. **; 3 Abreu, J. P. S. *; 3 Martins, R. D. **; 3 Alves, R. S. **; 2 Menezes, D. B. ; 5 Fonteles, M. C. ; 1 Martins, A. M. C. ; 3 Monteiro, H. S. A. ; 1 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC; 2 Patologia e Medicina Legal, UFC; 3 Fisiologia e Farmacologia, UFC; 4 Bioquímica, UNICAMP; 5 Instituto de Ciências Biológicas, UEC

Objetivo: Avaliar os efeitos fisiológicos e histopatológicos causados pela trombina like (BiT), isolada do veneno da *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato. Métodos e Resultados: Utilizamos rins de ratos Wistar (260-300g; n=6) perfundidos segundo técnica descrita por Fonteles, M.C. et al, Am. J. Physiol., 244, p.235, 1983. Para o estudo histopatológico os rins perfundidos foram conservados, seccionados em cortes de 5µm e corados com HE. Os resultados do grupo controle (C), onde os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6g% de albumina, foram comparados ao grupo tratado com BiT (10Lg/mL) adicionada 30 min após o início do experimento com duração de 120 min. Os resultados foram analisados por teste t de Student com *p<0,05. O grupo em que os rins foram tratados com a BiT apresentou um aumento da pressão de perfusão aos 60min seguido de redução aos 120min (C120=110,28±69; BiT120=99,5±5 mmHg*); aumento da resistência vascular renal (C90=5,32±57; BiT90=6,83±06 mmHg/mL.g-1.min-1*); enquanto que o fluxo urinário (C120=0,160±020; BiT120=0,039±005 mL.g-1.min-1*) e o ritmo de filtrado glomerular reduziram (C120=0,697±084; BiT120=0,151±022 mL.g-1.min-1*); os percentuais de transporte tubular de sódio e cloreto diminuíram. A histopatologia mostrou áreas focais corticais com células de núcleos picnóticos característicos de necrose tubular aguda; deposição proteinácea no espaço de Bowman e nos túbulos proximais e distais. Extravasamento foi observado em 73% dos 97 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40X) por lâmina.

Conclusões: Trombina like purificada do veneno da serpente de *Bothrops insularis* (BiT) alterou todos os parâmetros renais, possivelmente por danos celulares diretos como necrose tubular aguda.

ANEXO K

Trabalho Apresentado no: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE 2005)

XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, XXX Congresso Brasileiro de Biofísica, XL Congresso Brasileiro de Fisiologia, XXXVII Congresso Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXI Congresso Brasileiro de Investigação Clínica, XXIX Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento, realizado em Águas de Lindóia, SP Brasil entre 24 e 27 de agosto de 2005.

Título: Alterações Renais Induzidas pela Lectina do Veneno da *Bothrops insularis*.

43.033

ALTERAÇÕES RENAIIS INDUZIDAS PELA LECTINA DO VENENO DA BOTHROPS INSULARIS. 1 Martins, A. M. C. ; 2 Braga, M D M ; 3 Barbosa, P. S. F. **; 3 Sousa, T. M. **; 4 Toyama, M. H. ; 4 Toyama, D. O.; 3 Martins, RD **; 3 Alves, RS **; 3 Germano, D. *; 2 Menezes, D. B. ; 3 Moura Filho, F.J.R. *; 5 Fonteles, M. C. ; 3 Monteiro, H. S. A. ; 1 Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; 2 Patologia e Medicina Legal, UFC; 3 Fisiologia e Farmacologia, UFC; 4 Bioquímica, UNICAMP; 5 Ciências Biológicas, UEC

Objetivo: Avaliar os efeitos causados pela lectina (BiLc) purificada, do veneno da *Bothrops insularis*, em rim isolado de rato. Métodos e Resultados: Utilizamos rins de ratos Wistar (260-300gr; n=6) perfundidos segundo técnica descrita por Fonteles, M.C. et al, Am. J. Physiol., 244, p.235, 1983. Para o estudo histopatológico os rins perfundidos foram seccionados em cortes de 5µm e corados com HE. Os resultados do grupo controle (C), onde os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6 g% de albumina, foram comparados ao grupo tratado (com BiLc, 10Lg/ml) adicionada 30 minutos após o início do experimento com duração de 120 min. Os resultados foram analisados por teste t de Student com *p<0,05. A lectina apresentou uma diminuição da pressão de perfusão (C120=110,28 ± 7; BiLc120=100,0 ± 2 mmHg*); do fluxo urinário (C120=0,160 ± 0,020; BiLc120=0,082 ± 0,008 mL.g-1.min-1*); e do ritmo de filtração glomerular (C120=0,697 ± 0,084; BiLc120= 0,394 ± 0,063 mL.g-1.min-1*); aumentou os percentuais de transporte tubular de sódio e potássio. O histopatológico mostrou áreas focais corticais de necrose tubular aguda; deposição proteinácea nos túbulos proximais, distais e no espaço de Bowman. Extravasamento foi observado em 36% dos 129 glomérulos contados em 10 campos de grande aumento (40X) por lâmina. Conclusões: A lectina da *B. insularis* promoveu alterações em todos os parâmetros renais estudados; induziu aumento na permeabilidade capilar glomerular por nefrotoxicidade direta.

ANEXO L

Trabalho aceito para publicação na revista Toxicon em 10/02/2006.

Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom

----- Forwarded message -----

From: toxicon@strath.ac.uk <toxicon@strath.ac.uk>

Date: 10/02/2006 06:37

Subject: Your Submission

To: martinsalice@gmail.com

Ms. Ref. No.: TOXCON-D-06-00037

Title: Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom

Toxicon

Dear Alice,

I am pleased to confirm that your paper "Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom" has been accepted for publication in Toxicon.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Alan Harvey
Receiving Editor
Toxicon

Comments from the Editors and Reviewers:

Dear Prof Monteiro

MS 06-44

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for publication in Toxicon. It has been sent to the publishers and you will receive proofs in due course.

Yours sincerely
Alan Harvey