



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

PAULO SÉRGIO FERREIRA BARBOSA

**Efeitos renais de miotoxinas e lectinas purificadas dos venenos das
serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. Papel da
ciclooxigenase e endotelina.**

FORTALEZA
2006

PAULO SÉRGIO FERREIRA BARBOSA

EFEITOS RENAIIS DE MIOTOXINAS E LECTINAS PURIFICADAS DAS SERPENTES
Bothrops jararacussu e Bothrops moojeni. PAPEL DE CICLOOXIGENASE E
ENDOTELINA.

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA
2006

PAULO SÉRGIO FERREIRA BARBOSA

EFEITOS RENAIIS DE MIOTOXINAS E LECTINAS PURIFICADAS DAS SERPENTES
Bothrops jararacussu e Bothrops moojeni. PAPEL DE CICLOOXIGENASE E
ENDOTELINA.

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

Data da Defesa: 03/03/2006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
Universidade Estadual de São Paulo-UNESP

Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Foi um sonho feito de brisa
Que o vento levou 14 anos para terminar
Mas, é claro que o sol vai nascer amanhã
E com ele um novo sonho
Pois, é triste o homem que não sonha
É um sinal que ele perdeu a alegria de viver

Dedico minha tese e trabalho:
A minha esposa Vera
Obrigado por me abraçar nas minhas vitórias
E me acalantar nas minhas derrotas

AGRADECIMENTOS

À Professora **Helena Serra Azul Monteiro**: pela acolhida, pelos ensinamentos, pelos sorrisos e a simplicidade e como uma boa mãe sempre esteve ao lado das suas crias, mantendo-as unidas.

Ao Professor **Manassés Claudino Fonteles**: obrigado pela confiança nestes cinco anos de convivência, pelo suporte técnico e científico.

À **Alice Maria Costa Martins**, obrigado pelos conselhos, e por me escutar.

Ao Professor **Aldo Ângelo Moreira Lima**: obrigado pela infra-estrutura que o senhor nos proporcionou, principalmente pela disponibilização da biblioteca da Universidade da Virgínia.

Ao Professor **Benildo Sousa Cavada**: pela imensa contribuição científica dada em alguns dos nossos trabalhos.

Ao Pesquisador **Marcos Hikari Toyama**: por acreditar em nosso grupo, não medindo esforços para a conclusão desta tese. Seu trabalho enobrece cada vez mais a nossa luta do fazer ciência. Estas palavras foram retiradas da tese do Alexandre, mas para mim você é o Marcão além de amigo, irmão.

Ao Professor **Dalgimar Beserra de Menezes**: pela paciência e pela maneira muito educada de fazer as nossas correções tanto em português como em inglês e pela colaboração indispensável nas análises histopatológicas.

À Professora **Maria Elisabete Amaral de Moraes**: pela maneira sempre cordial que me tratou durante o período em fui representante estudantil.

Ao amigo **Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, obrigado pela atenção, carinho e respeito que você tem por mim e ao nosso grupo e ante que eu me esqueça pelas noites de cerveja.

Ao amigo **Alexandre Havt Bindá**: faço a minha as suas palavras “que me ensinou que a primeira impressão nunca deve ser a definitiva. Obrigado por me fazer sentir importante!” você é um grande irmão, com defeitos e virtudes você é muito importante para mim.

A **Ticiane Meirele Sousa**, é uma filha tão querida quanto os meus filhos biológicos. Obrigado pela paciência comigo nestes cinco anos.

Aos companheiros **Marta Kerntopf, René Duarte, Jorge, Marcus Davis e Lucília**, obrigado pelo carinho e pelos momentos de diversão.

À amiga **Arlandia Cristina Lima Nobre**, pelo companheirismo, estou louco para ver você na função mãe.

À **Silvia Maria Silva França**: costumo brincar dizendo que eu vivo sem a mulher, mas não vivo sem a Sílvia, no entanto, acho que vou ter de aprender. Agradecer a você, que esteve ao meu lado em todos os meus experimentos, é muito pouco diante da sua paciência.

À **Renata Sousa Alves**: você é a amiga certa nas horas incerta, no laboratório é claro, obrigado pela ajuda.

Ao **Domingos Barreto**: obrigado pela atenção, carinho, respeito e o ombro amigo.

Ao **José Amadeus**: obrigado pela atenciosa ajuda. Falta o dia da cerveja que venho protelando há cinco anos, mas um dia quem sabe.

À **Joana Tavares**: dona Joaninha a sua saída deixou uma lacuna que até hoje não foi preenchida, falta a sua alegria.

A **Tereza França, Kátia, Fabiana, Sílvia, Áurea e Rose**: sempre muitas atenciosas.

Ao **Bento e ao Jociê**: obrigado pela atenção e por cuidar dos nossos animais.

Aos Bolsistas de iniciação científica: **Taís, Iara, Alana, Cleidiana, João Paulo, Pedro, Diego, Monique, Daniel de Paula, Daniel Freire, Franzé, Claudêmio e Nilton**.
Pela ajuda na hora certa (Almoço)!

Ao **Colega de pós-graduação que votou em mim**: acho que honrei o seu voto como representante estudantil, obrigado por acreditar em mim.

A **CAPES e ao CNPq**: Pelo apoio financeiro.

Ao **Laboratório Acetilon**: Pela a gentileza de nos ceder o inibidor de receptor de endotelina

RESUMO

Efeitos renais de miotoxinas e lectinas purificadas dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. Papel da ciclooxigenase e endotelina.

Paulo Sérgio Ferreira Barbosa. Tese de Doutorado em Farmacologia, 2006.

Orientadora: Helena Serra Azul Monteiro

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará

A insuficiência renal aguda é uma das complicações mais freqüentes nos envenenamentos ofídicos. Contudo, a sua patogênese permanece obscura. Em nossos estudos foram avaliados os efeitos renais causados pelas miotoxinas purificadas dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* (Bthtx I, Lys 49 e Bthtx II, Asp 49) e *Bothrops moojeni* (BmTx I, Lys 49), assim como pelas lectinas dos venenos de *Bothrops moojeni* (BmLec) e *Bothrops jararacussu* (BJcuL). Tentando avaliar o mecanismo envolvido nos efeitos renais das substâncias acima mencionadas, foram testados os efeitos da indometacina, um bloqueador inespecífico de ciclooxigenase. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos inibitórios do Tezosentan, um bloqueador de receptor de endotelina, nos efeitos renais causados pela miotoxina I da serpente *Bothrops moojeni*. Para tanto, as miotoxinas, na dosagem de 5µg/mL, ou as lectinas, na dosagem de 10µg/mL foram adicionadas 30 minutos depois do início dos experimentos. Contudo, a indometacina e o tezosentan foram adicionados no sistema de perfusão sempre no início de cada experimento na dosagem de 10µg/mL. Os efeitos renais foram comparados com um grupo controle, onde os rins foram perfundidos somente com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Bthtx I, BthtxII e BmLec aumentaram a pressão de perfusão ($C_{120} = 110,28 \pm 3,09$, Bthtx I₁₂₀ = $171,20 \pm 6,3$ *, Bthtx II₁₂₀ = $175,50 \pm 7,20$ * e BmLec₁₂₀ = $152,50 \pm 2,10$ *), a resistência vascular renal ($C_{120} = 5,46 \pm 0,54$, Bthtx I₁₂₀ = $8,62 \pm 0,37$ *, Bthtx II₁₂₀ = $8,90 \pm 0,36$ * e BmLec₁₂₀ = $7,77 \pm 0,30$ *), o fluxo urinário ($C_{120} = 0,143 \pm 0,008$, Bthtx I₁₂₀ = $0,326 \pm 0,048$ *, e Bthtx II₁₂₀ = $0,373 \pm 0,085$ *, BmLec₁₂₀ = $0,085 \pm 0,007$ *), o ritmo de filtração glomerular ($C_{120} = 0,678 \pm 0,065$, Bthtx I₁₂₀ = $0,855 \pm 0,133$ *, Bthtx II₁₂₀ = $1,224 \pm 0,282$ *, BmLec₁₂₀ = $1,037 \pm 0,055$ *) e a excreção de sódio potássio e cloreto (ENa⁺, EK⁺, ECl⁻). Porém, diminuíram os percentuais dos transportes tubulares de sódio ($C_{120} = 79,76 \pm 0,56$, Bthtx I₁₂₀ = $62,23 \pm 4,12$ *, Bthtx II₁₂₀ = $70,96 \pm 2,93$ * e BmLec₆₀ = $77,25 \pm 1,36$ *) e potássio ($C_{60} = 66,38 \pm 3,31$, Bthtx I₆₀ = $55,79 \pm 5,57$ *, Bthtx II₆₀ = $50,86 \pm 6,16$ * e BmLec₆₀ = $59,78 \pm 3,49$). A indometacina foi capaz de bloquear os efeitos causados pela miotoxina I da *B. jararacussu* e lectina da *B. moojeni*, mas reverteu parcialmente os efeitos causados pelas miotoxinas II e lectina da *B. jararacussu* e miotoxina I da *B. moojeni*. O tezosentan, por sua vez, bloqueou os efeitos causados pela miotoxina I da *B. moojeni*. Foi concluído que prostaglandinas estão envolvidas nas alterações renais promovidas pelas substâncias isoladas das serpentes *B. jararacussu* e *B. moojeni*, enquanto que endotelina seria o principal mediador nas alterações renais causadas pela miotoxina I da *B. moojeni*.

Palavras-chave: Lectinas Tipo C. Fosfolipases A. Bothrops. Rim – patologia. Rim – fisiologia. Venenos de Serpentes - farmacologia. Venenos de Serpentes – toxicidade.

ABSTRACT

Renal effects promoted by myotoxins and lectins isolated from the snake venoms of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops moojeni*. The role of cyclooxygenase and endothelin.

Paulo Sérgio Ferreira Barbosa (2006) Doctor Degree

Mentor: Helena Serra Azul Monteiro

Department of Physiology and Pharmacology of the Federal University of Ceará

Acute renal failure is one of the most common systemic complications after snakebite. However, its pathogenesis remains obscure. In this study, we evaluated the renal effects of *Bothrops jararacussu* myotoxins I and II (Bthtx-I Lys 49 and BthtxII, Asp 49), *Bothrops moojeni* myotoxin I and the lectins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops jararacussu*. Attempting to investigate the mechanisms involved in the renal effects of the mentioned toxins, we tested indomethacin, an unespecific cyclooxygenase inhibitor. Additionally, tezosentan, an endothelin receptor blocker, was used to evaluate the role of endothelin in the renal effects of *Bothrops moojeni* myotoxin I. All myotoxins (5 µg/mL) and lectins (10 µg/mL) were added to the perfusion system 30 min after the beginning of each perfusion. Indomethacin (10 µg/mL) and tezosentan (10 µg/mL) were always added 30 minutes before the tested substances. The renal effects were compared against a control group, where kidneys were perfused only with the modified Krebs-Henseleit solution. Myotoxins from *Bothrops jararacussu* and the lectin from *Bothrops moojeni* increased the perfusion pressure ($C_{120} = 110.28 \pm 3.09$, Bthtx I₁₂₀ = $171.20 \pm 6.3^*$, Bthtx II₁₂₀ = $175.50 \pm 7.20^*$ and BmLec₁₂₀ = $152.50 \pm 2.10^*$), the renal vascular resistance ($C_{120} = 5.46 \pm 0.54$, Bthtx I₁₂₀ = $8.62 \pm 0.37^*$, Bthtx II₁₂₀ = $8.90 \pm 0.36^*$ and BmLec₁₂₀ = $7.77 \pm 0.30^*$), the urinary flow ($C_{120} = 0.143 \pm 0.008$, Bthtx I₁₂₀ = $0.326 \pm 0.048^*$, and Bthtx II₁₂₀ = $0.373 \pm 0.085^*$), the glomerular filtration rate ($C_{120} = 0.678 \pm 0.065$, Bthtx I₁₂₀ = $0.855 \pm 0.133^*$, Bthtx II₁₂₀ = $1.224 \pm 0.282^*$ and BmLec₁₂₀ = $1.037 \pm 0.055^*$) and the sodium, potassium and chloride excretion. On the other hand, the same substances decreased the percent of renal tubular transport of sodium ($C_{120} = 79.76 \pm 0.56$, Bthtx I₁₂₀ = $62.23 \pm 4.12^*$, Bthtx II₁₂₀ = $70.96 \pm 2.93^*$ and BmLec₆₀ = $77.25 \pm 1.36^*$), potassium ($C_{60} = 66.38 \pm 3.31$, Bthtx I₆₀ = $55.79 \pm 5.57^*$, Bthtx II₆₀ = $50.86 \pm 6.16^*$ and BmLec₆₀ = $59.78 \pm 3.49^*$). Indomethacin inhibited the renal effects induced by *Bothrops jararacussu* myotoxin I and *Bothrops moojeni* lectin, but partially blocked the effects promoted by myotoxin II and the lectin of *Bothrops jararacussu*, and the effects of myotoxin I of *Bothrops moojeni*. Tezosentan inhibited the renal effects induced by *B. moojeni* myotoxin I. In conclusion, prostaglandins are involved in the renal alterations induced by myotoxins and lectins purified from the snake venoms of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops moojeni*. In addition, endothelin is the main mediator of the renal alterations promoted by *Bothrops moojeni* myotoxin I.

Keywords: Lectins, C-Type. Phospholipases A. Bothrops. Kidney – pathology. Kidney – physiology. Snake Venoms – pharmacology. Snake Venoms – toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Serpente da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	27
Figura 2 -	Serpente da espécie <i>Bothrops jararacussu</i>	28
Figura 3 -	Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação	46
Figura 4 -	Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação	47
Figura 5 -	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão	48
Figura 6 -	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro.	49
Figura 7 -	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo na ponta da cânula	49
Figura 8 -	Técnica cirúrgica: A – veia femural; B – ureter direito canulado; C – artéria renal / artéria mesentérica	51
Figura 9 -	Técnica cirúrgica A – intestino delgado e mesentério; B – Artéria mesentérica superior canulada com tubo de polietileno (PE20); C – Leito mesentérico conectado ao sistema de perfusão	57
Figura 10 -	Representação gráfica do sistema de perfusão do leito mesentérico	58
Figura 11 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) na pressão de perfusão (PP)	63
Figura 12 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) na resistência vascular renal (RVR)	64
Figura 13 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no fluxo urinário (FU)	65
Figura 14 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no ritmo de filtração glomerular (RFG)	66
Figura 15 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de sódio transportado (%TNa ⁺)	67
Figura 16 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de potássio transportado (%TK ⁺)	68
Figura 17 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de cloreto transportado (%TCI ⁻)	69
Figura 18 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) percentual de transporte	70

	proximal de sódio (%pTNa ⁺)	
Figura 19 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺)	71
Figura 20 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻)	72
Figura 21 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no sódio excretado (ENa ⁺)	73
Figura 22 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no potássio excretado (EK ⁺)	74
Figura 23 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) no cloreto excretado (ECl ⁻)	75
Figura 24 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) na pressão de perfusão (PP)	78
Figura 25 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) na resistência vascular renal (RVR)	79
Figura 26 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no fluxo urinário (FU)	80
Figura 27 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no ritmo de filtração glomerular (RFG)	81
Figura 28 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de sódio transportado(%TNa ⁺)	82
Figura 29 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de potássio transportado (%TK ⁺)	83
Figura 30 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de cloreto transportado (%TCl ⁻)	84
Figura 31 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺).	85

Figura 32 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺)	86
Figura 33 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I I purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻)	87
Figura 34 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no sódio excretado (ENa ⁺)	88
Figura 35 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no potássio excretado (EK ⁺)	89
Figura 36 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) (05 µg/mL) e BthTx II + indometacina (indo) (10 µg/mL) no cloreto excretado (ECl ⁻)	90
Figura 37 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) na pressão de perfusão (PP)	93
Figura 38 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) na resistência vascular renal (RVR)	94
Figura 39 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no fluxo urinário (FU)	95
Figura 40 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no ritmo filtração glomerular (RFG)	96
Figura 41 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de sódio transportado (%TNa ⁺)	97
Figura 42 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de	98

	potássio transportado (%TK ⁺)	
Figura 43 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de cloreto transportado (%TCl ⁻)	99
Figura 44 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de sódio(pTNa ⁺)	100
Figura 45 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺)	101
Figura 46 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻)	102
Figura 47 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no sódio excretado (ENa ⁺)	103
Figura 48 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no potássio excretado (EK ⁺)	104
Figura 49 -	Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + indometacina (indo) (10 µg/mL), tezosentan (10 µg/mL) e <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) (05 µg/mL) + tezosentan (10 µg/mL) no cloreto excretado (ECI ⁻)	105
Figura 50 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec na pressão de perfusão (PP).	108
Figura 51 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec na resistência vascular renal (RVR).	109
Figura 52 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no fluxo urinário (FU).	110
Figura 53 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no ritmo de filtração glomerular	111

	(RFG).	
Figura 54 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de sódio transportado (%TNa ⁺).	112
Figura 55 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de potássio transportado (%TK ⁺).	113
Figura 56 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de cloreto transportado (%TCl).	114
Figura 57 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺).	115
Figura 58 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺).	116
Figura 59 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl).	117
Figura 60 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no sódio excretado (ENa ⁺).	118
Figura 61 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no potássio excretado (EK ⁺).	119
Figura 62 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no cloro excretado (ECl).	120
Figura 63 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL na pressão de perfusão (PP).	122
Figura 64 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL na resistência vascular renal (RVR).	123
Figura 65 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no fluxo urinário (FU).	124
Figura 66 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no ritmo de filtração	125

	glomerular (RFG).	
Figura 67 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa ⁺).	126
Figura 68 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK ⁺).	127
Figura 69 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCI ⁻).	128
Figura 70 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de sódio (%pTNa ⁺).	129
Figura 71 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de potássio (%pTK ⁺).	130
Figura 72 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de cloreto (%pTCI ⁻).	131
Figura 73 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no sódio excretado (ENa ⁺).	132
Figura 74 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no potássio excretado (EK ⁺).	133
Figura 75 -	Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no cloreto excretado (ECI ⁻).	134
Figura 76 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BthTx I A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo.	136
Figura 77 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BthTx I A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo.	136
Figura 78 -	Figura 94 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BthTx II A. Glomérulo com moderado depósito de material protéico B. Túbulo com moderado depósito de material protéico	137
Figura 79 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BthTx II. A seta mostra Degeneração hidrópica	137

	vacuolar no túbulo	
Figura 80 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BthTx I pré tratado com 10µg/mL de indometacina. A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo	138
Figura 81 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BthTx I e pré tratado com 10µg/mL de indometacina. A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo	138
Figura 82 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BthTx II pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	139
Figura 83 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BthTx II pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	139
Figura 84 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BmTx I pré tratado com 10µg/mL de indometacina glomérulos e túbulos com aparências normais	140
Figura 85 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5µg/mL de BmTx I pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	140
Figura 86 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de tezosentan a seta mostra glomérulo com acentuado depósito de material protéico	141
Figura 87 -	Histopatológico da região da medula renal de rato tratado com 10µg/mL de tezosentan a seta mostra túbulos distal com com acentuado depósito de material protéico	141
Figura 88 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BmTx I pré tratado com 10µg/mL de tezosentan. Glomérulos e túbulos com aparências normais	142
Figura 89 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5µg/mL de BmTx I pré tratado com 10µg/mL de tezosentan. Glomérulos e túbulos com aparências normais	142
Figura 90 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de BmLec. A seta mostra glomérulo com acentuado depósito de material protéico	143
Figura 91 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de BmLec A seta mostra túbulos com acentuado depósito de material protéico	143
Figura 92 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de BmLec pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	144
Figura 93 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de BmLec pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	144
Figura 94 -	Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de Lecjessu pré tratado com 10µg/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais	145
Figura 95 -	Efeitos vasculares em leito mesentérico utilizando-se a	146

	miotoxina I da <i>Bothrops moojeni</i>	
Figura 96 -	Efeitos vasculares em leito mesentérico utilizando-se a miotoxina I da <i>Bothrops jararacussu</i>	147
Figura 97 -	As atividades enzimáticas das duas PLA ₂ foram realizadas na sua forma nativa e em presença da enzima incubada com ρ -BPB (inibidor específico da PLA ₂).	149
Figura 98 -	Microscopia eletrônica de transmissão da <i>Xanthomonas axonopodis pv passiflorae</i> em presença das PLA ₂ miotóxicas nativas e em presença das PLA ₂ em presença da ρ -BPB.	150

LISTA DE ABREVIATURAS

%pTK ⁺	Percentual de transporte tubular proximal de potássio
%pTNa ⁺	Percentual de transporte tubular proximal de sódio
%TCI ⁻	Percentual de transporte tubular total de cloro
%TCI ⁻	Percentual de transporte tubular proximal de cloro
%TK ⁺	Percentual de transporte tubular total de potássio
%TNa ⁺	Percentual de transporte tubular total de sódio
ρ-BPB	Brometo de bromofenacil
BjcuL	Lectina do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i>
BjussuMP-I	Metalloprotease da <i>Bothrops jararacussu</i>
BmLec	Lectina do veneno da serpente <i>Bohrops moojeni</i>
BPL	Lectina do veneno da serpente <i>Bothrops pirajai</i>
BthTx	Miotoxina isolada do veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (bothropstoxin)
BSA	Solução de albumina bovina
CLP	Proteínas relacionadas às lectinas tipo C
ConA	Lectina das sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
CRD	Domínio de reconhecimento para carboidrato
DguiL	Lectina das sementes de <i>Dioclea guianensis</i>
ECA	Enzima de conversão da angiotensina
ECl ⁻	Cloreto excretado
EK ⁺	Potássio excretado
ENa ⁺	Sódio excretado
EPM	Erro padrão médio
ET	Endotelina
FU	Fluxo urinário
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência renal aguda
JSU-5	Miotoxina isolada do veneno da <i>Bothrops jararacussu</i>
kDa	Kilodaltons
Mm	Milímetro
MOO-I	Miotoxina isolada do veneno da <i>Bothrops moojeni</i>
MPB	Metaloproteinase da <i>Bothrops moojeni</i>

MSP	Serino-proteínase da <i>Bothrops moojeni</i>
PAF	Fator de agregação plaquetária
PG	Prostaglandina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PP	Pressão de perfusão
PRP	Plasma rico em plaquetas
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RVR	Resistência vascular renal
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tys	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Serpentes peçonhentas brasileiras	23
1.1.1 Família <i>Elapidae</i>	23
1.1.2 Família <i>Crotalidae</i>	23
1.1.3 Gênero <i>Lachesis</i>	24
1.1.4 Gênero <i>Crotalus</i>	24
1.1.5 Gênero <i>Bothrops</i>	24
1.2 Características e ações do veneno botrópico	28
1.2.1 Miotoxina	32
1.2.2 Lectina	35
1.3 Alterações renais	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos gerais	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Perfusão de rim isolado de rato	43
3.1.1 Grupos de animais	43
3.1.2 Substâncias utilizadas	44
3.1.3 Solução perfusora e seu preparo	45
3.1.4 O sistema de perfusão de rim isolado	45
3.1.5 Preparo do sistema	48
3.1.6 Técnica cirúrgica	50
3.1.7 Protocolo experimental	52
3.1.8 Avaliação bioquímica	52
3.1.9 Cálculos dos parâmetros renais	53
3.1.10 Estatística	55
3.1.11 Histologia	55
3.2 Leito mesentérico	56
3.3. Atividade antibacteriana das miotoxinas	59

3.3.1 Contagem de unidade formadora de colônia	59
3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão	60
4 RESULTADOS	61
4.1 Perfusão renal	61
4.1.1 Grupo controle	61
4.1.2 Miotoxina I purificada da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) lisina 49	61
4.1.3 Miotoxina I purificada da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx I) lisina 49 com indometacina	62
4.1.4 Miotoxina II purificada da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) ácido aspártico 49	76
4.1.5 Miotoxina II purificada da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTx II) ácido aspártico 49 com indometacina	77
4.1.6 Tezosentan antagonista de receptor de endotelina	91
4.1.7 Miotoxina I purificada da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) lisina 49 com indometacina	92
4.1.8 Miotoxina I purificada da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (BmTx I) lisina 49 com tezosentan.	92
4.1.9 Lectina purificada da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (Bmlec)	106
4.1.10 Lectina purificada da serpente <i>Bothrops moojeni</i> (Bmlec) com indometacina	107
4.1.11 Lectina purificada da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjcul)	121
4.1.12 Lectina purificada da serpente <i>Bothrops</i> (Lecjessu) com indometacina	121
4.1.13 Histologia	135
4.2 Leito mesentérico	146
4.3 Efeito enzimático, antimicrobiano e miotóxicos da BthTx I e BthTx II	148
5 DISCUSSÃO	153
6 CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS	160
ANEXOS	175

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes peçonhentas brasileiras

Estima-se que no mundo ocorram 5 milhões de acidentes ofídicos por ano, ocasionando 50.000 mortes especialmente nas áreas rurais de países tropicais da Ásia, África e América do Sul (WARREL, 1996; CHIPPAUX, 1998; LIZANO 2003). No Brasil ocorrem 20.000 casos de acidentes ofídicos por ano ocasionando 90 óbitos. A maioria destes casos deve-se às serpentes dos gêneros *Bothrops* 90% e *Crotalus* 9%, sendo raro os acidentes causados por *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Lachesis* (BRASIL, 2001).

Com relação aos animais domésticos, os estudos epidemiológicos são escassos (FONTEQUE, 2001), porém na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo foram registrados 149 acidentes ofídicos no período de 1972 a 1989, destes 128 foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* (BICUDO, 1994).

No Brasil encontramos duas famílias de serpentes venenosas que obedecem as seguintes características físicas:

1.1.1 Família *Elapidae*:

Estas serpentes apresentam a cabeça arredondada, olhos pequenos com as pupilas arredondadas, ausência de fosseta loreal, presença de placa na cabeça, dentes inoculadores de veneno pequenos e situados no maxilar superior, mais para o interior da boca. O seu corpo tende a ser grosso e longo, a pele é áspera e o seu reconhecimento é difícil e perigoso por necessidade da identificação através do exame dos dentes. Possuem hábitos noturnos e em situação de perigo utilizam a cauda para dar a impressão de que se trata da cabeça, postando-se em situação de defesa, quando molestadas são vagarosas. São representadas pelas serpentes do gênero *Micrurus* (RAGE, 1977).

1.1.2 Família *Crotalidae*

Possuem a cabeça triangular com escamas, apresentando fosseta loreal, os olhos são pequenos com a pupila em forma de fenda. Os dentes inoculadores de veneno são grandes e implantados no osso maxilar superior situado na parte anterior. Seu corpo tende a ser grosso, com a pele áspera e o reconhecimento é relativamente fácil pela presença da fosseta loreal.

Possuem hábitos noturnos, postam-se em posição de defesa quando molestadas e são vagarosas (BARRAVIERA, 1991). São divididas em três gêneros *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* (RAGE, 1977).

1.1.3 Gênero *Lachesis*

Representado no Brasil pela espécie *Lachesis muta*, subdividida em duas subespécies *Lachesis muta* e *Lachesis muta noctivaga* (BARRAVIERA, 1994). Tem um padrão de cor marrom amarelado, com grandes manchas triangulares pretas, as quais apresentam uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçada (GRANTS AU, 1991). São conhecidas como surucucu, surucucu pico de jaca ou surucutinga. Sendo as serpentes venenosas de maior tamanho em toda América Latina, chegando a um comprimento de quatro metros (BARRAVIERA, 1991).

1.1.4 Gênero *Crotalus*

Representado por 26 espécies em todas às Américas (Norte, Central e Sul), porém no Brasil encontra-se uma única espécie, a *Crotalus durissus*. Esta espécie está subdividida em 6 subespécies, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus trigonicus* (BARRAVIERA, 1993; MATTISON, 1995). Sua coloração é variável. Podemos encontrar as cores oliva-cinzenta, oliva, marrom-cinzenta até marrom, com manchas romboédricas pela linha dorsais, manchas com margens brancas e centro mais claro; lado ventral branco-amarelado até cinzento-amarelado (GRANTS AU, 1991).

1.1.5 Gênero *Bothrops*

Encontrado na América Central e América do Sul, está distribuído por todo o território brasileiro, com aproximadamente 32 espécies. Apresenta grande diversidade de cores, desenhos, tamanhos e hábitos, em virtude do número de espécies, há grande dificuldade na sua identificação pelo nome popular em todo o território nacional. Alguns nomes mais conhecidos são jararaca, jararacussu, jararaca-pintada, urutu e cotiara (PUORTO, 1992). Habita preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, locais de

proliferação de roedores, como zonas rurais e periferia de grandes cidades. Têm hábitos noturnos e são consideradas as serpentes mais agressivas do país (FRANÇA; FAN, 1992).

Principais espécies do gênero *Bothrops* existentes no Brasil (BELLUOMINI, 1984; CAMPBELL; LAMAR 1989):

Bothrops alternatus - conhecida como urutu - cruzeiro. Encontrada em regiões mais elevadas e secas. É ágil, violenta, dando o bote de lado, do tipo chicote, extremamente voraz. Aparece a partir do estado de Minas Gerais até o Sul do país.

Bothrops atrox - Chamada de jararaca ou surucucu, conforme a área da região Norte em que aparece, tendo ampla distribuição geográfica, habita tanto as florestas como áreas desmatadas, adaptando-se facilmente. É a maior responsável pelos acidentes ofídicos no Norte do Brasil, podendo atingir comprimento superior a 1,5 metro.

Bothrops bilineatus - tem cor verde clara e é arborícola. Conhecida como jararaca verde, é muito confundida com a cobra-papagaio (*Corallus Caninus*), que também é arborícola, porém não peçohenta. Encontrada na zona da Mata e na Amazônia.

Bothrops Brazilis - conhecida como jararaca vermelha e surucucu vermelha, pode ser encontrada no Amapá, Pará e Mato Grosso.

Bothrops castelnaudi - possui o nome popular de Jararaca-cinza, e é encontrada no Amapá, Goiás e Mato Grosso.

Bothrops cotiara - conhecida como jararaca, jararaca-da-barriga-preta e cotiara. É encontrada do sul do Estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul.

Bothrops erythromelas - conhecida por jararaca-da-seca, encontrada em toda região nordeste.

Bothrops FONSECAI - popularmente chamada de jararaca, aparece nos estados de São Paulo, Rio Janeiro e Minas Gerais.

Bothrops iglesi - conhecida como jararaquinha, existe apenas no estado do Piauí

Bothrops insularis - chamada de jararaca ilha, é encontrada somente na Ilha de Queimada Grande no Estado de São Paulo.

Bothrops itapetiningae - conhecida como cotiarinha, boipeva, fruta-cor, jararaca-do-campo e pequena cotiara, encontradas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina.

Bothrops Jararaca - Conhecida popularmente como jararaca, é responsável pelo maior número de acidentes ofídicos em virtude de sua ampla distribuição no território nacional. Vive no campo e nos lugares comuns ao homem.

Bothrops leucurus - conhecida como jararaca, existindo somente no estado da Bahia.

Bothrops marajoensis - conhecida como jararaca, encontrada no estado do Amapá, Pará e Ilha do Marajó

Bothrops microphthalmus - chamada de jararaca, encontrada na região Amazônia.

Bothrops neuwiedi - conhecida como jararaca pintada e jararaca-de-rabo-branco. Habita principalmente as regiões secas, sendo considerada uma das espécies mais perigosas.

Bothrops pirajai - de tamanho avantajado para o gênero, podendo competir em tamanho com *bothrops jararacussu*. É encontrada no sul da Bahia e em Minas Gerais

Bothrops pradoi - popularmente chamada de jararaca do Estado do Espírito Santo ou da Bahia, encontrada predominantemente em determinadas regiões desses estados. A última descoberta de uma espécie do gênero *Bothrops* foi a encontrada na ilha de Alcatraz, litoral norte do Estado de São Paulo chamada de Jararaca de Alcatrazes. A espécie foi batizada como *Bothrops alcatraz* (LIMA, 2001).

Bothrops moojeni - Chamada de Caiçaca o comprimento total máximo do macho 1225mm, das fêmeas de 1532mm e Cauda de 11,0 a 15,9% do comprimento total. Habita as regiões mais quentes e secas. Nogueira (1998), relata "os dados obtidos pelos autores somado ao grande números de relatos de terceiros, que indicam que *Bothrops moojeni* são mais comumente encontradas, em áreas úmidas como matas ciliares, campos úmidos e veredas no Brasil central, utilizando também de áreas antrópicas próximas." Alguns autores (CAMPBELL; LAMAR 1979; LELOUP 1984; BORGES; ARAÚJO 1998) indicam a preferência por áreas úmidas no cerrado. Apesar de primordialmente terrestre, com o uso freqüente de tocas no solo e cupinzeiros (LELOUP, 1984) a espécie pode também usar esporadicamente a água e escalar a vegetação (NOGUEIRA, 1998).

Seus hábitos alimentares apresentam uma grande diversificação. Já foram encontrados mamíferos, anfíbios, lagartos, serpentes e aves no seu tubo digestivo (NOGUEIRA, 1998). São serpentes de movimentos muito rápidos. Atacam lançando o corpo várias vezes sobre a vítima dando saltos sucessivos (ROODT et al., 1997). Quanto ao ciclo reprodutivo é marcadamente sazonal, com nascimento de filhotes concentrado em dezembro, durante a estação chuvosa. A vitelogenese inicia-se em torno de abril, havendo ovos no oviduto em fêmeas coletadas no mês de julho. A partir de outubro foram detectados os embriões, e as fêmeas coletadas em dezembro apresentavam ninhadas aparentemente prontas para o nascimento. As ninhadas apresentavam 7 a 32 embriões em fêmeas preservadas (LELOUP, 1975) (Figura 1).



Figura 1 – Serpente da espécie *Bothrops moojeni*

Bothrops jararacussu - conhecida popularmente por jararacuçu que significa "jararaca-grande". Encontrada nas regiões baixas e alagadiços, margem de rios e lagoas pode alcançar tamanho avantajado. É capaz de inocular até quatro mililitros de veneno, o que corresponde aproximadamente a um grama de veneno seco. Constituem enorme perigo para pescadores, caçadores e para os animais, principalmente bovinos e eqüinos. É uma espécie freqüente no litoral do Espírito Santo até Santa Catarina (BELLUOMINI, 1984) (Figura 2).



Figura 2 – Serpente da espécie *Bothrops jararacussu*

1.2 Características e ações do veneno Botrópico

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* possuem muitas atividades biológicas, entre elas destacam-se a atividade hemorrágica, proteolítica, coagulante, edematogênica, fibrinopênica, trombocitopênica e necrosante. As manifestações clínicas podem ser locais e sistêmicas (ROODT et al., 1997).

Em estudo de 46 casos de acidentes ofídicos em humanos em São José do Rio Preto, a *Bothrops moojeni* foi a serpente mais comumente envolvida (KOUYOUMDJIAN; KOUYOUMDJIAN, 1986).

Kouyoumdjian e Polizelli (1988) estudaram 37 casos de envenenamentos por picada da serpente *Bothrops moojeni*, constatando um prolongamento do tempo de coagulação em 73% dos casos, assemelhando-se aos acidentes por picadas da *B. atrox*. Os efeitos locais da picada por *B. moojeni* são graves, apresentando número maior de efeitos em relação aos acidentes por *B. jararaca*. As hemorragias sistêmicas são pouco frequentes e benignas. As complicações ocorreram somente nos casos inicialmente classificados como moderados ou graves, supostamente em virtude da maior inoculação do veneno que pode

chegar a 300 mg de veneno em uma picada. Administração de antiveneno após a picada em concentrações neutralizantes muito elevada, e em tempo rápido, nos casos classificados inicialmente como graves não impediu o aparecimento do quadro sintomático ocasionado pelo veneno (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1988; ROODT et al., 1997).

Ferreira et al. (1992) estudaram o veneno de 9 (nove) espécies de *Bothrops* e constataram que o veneno da serpente *B. moojeni* apresentava baixa atividade hemorrágica, necrosante e coagulante, contudo possuía ainda uma alta atividade proteolítica fosfolipásica, miotóxica e edematogênica. Enquanto que, o veneno da serpente *B. jararacussu* apresentava baixa atividade hemorrágica, edematogênica, proteolítica e coagulante, por outro lado, este veneno apresentava alta atividade fosfolipásica, necrosante e miotóxica.

O acidente ofídico tem repercussão clínica devido à característica coagulante e proteolítica do veneno. A atividade enzimática e proteolítica do veneno botrópico origina dor, edema e eritema no local da picada, que serão mais intensos de acordo com a quantidade inoculada durante a picada. Esses efeitos locais tendem a progredir com formação de edema duro, equimose, bolhas, necrose e celulite (BOER-LIMA, 1999). Pode ocorrer também liberação de peptídeos e enzimas para a circulação ocasionando hipotensão, incoagulabilidade sanguínea devido ao intenso consumo de fibrinogênio, angústia respiratória e dependendo da quantidade de veneno injetado, insuficiência renal com choque periférico e eventual óbito (KOUYOUMDJIAN; KOUYOUMDJIAN, 1986).

O edema causado no acidente botrópico é mediado por metaloproteinase, fosfolipase A₂, produtos eicosanóides quando causado pela *B. moojeni* é semelhante ao encontrado na *B. jararaca* e *B. jararacussu* (RUIZ DE TORRENT et al., 1999).

Hipotensão é uma consequência grave nos acidentes botrópicos, causada pela liberação de óxido nítrico de macrófagos, levando a formação de peroxinitrito, depois de reação com ânions superóxido gerado localmente (ZAMUNER et al., 2001)

Ferreira et al. (1970) fracionaram do veneno de *Bothrops jararaca* nove peptídeos biologicamente ativos. Nestes peptídeos observou-se a presença de fatores potenciadores de bradicinina. Os fatores potenciadores de bradicinina encontrados no veneno *Bothrops jararaca*, inibem as enzimas proteolíticas que inativam a bradicinina e catalisam a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Este mecanismo foi o principal responsável pelo aparecimento de fármacos inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA), utilizados no tratamento da hipertensão.

Hemorragia é uma outra particularidade do envenenamento botrópico, ocasionada pela presença de proteínas com atividade proteolítica, que contêm cálcio e zinco em suas moléculas, denominadas de metaloproteinases (VARANDA; GIANINNI, 1994).

As metaloproteinases do veneno contêm uma seqüência de aminoácidos chamados de RGD (Arg-Gly-Asp) ou ECD (Glu-Cis-Asp), como a jararhagin da *Bothrops jararaca* (CORREIA Jr et al., 2002), que reconhecem o receptor de integrina envolvido na interação da matriz-celular (HUMPHRIES et al., 1986). Atuam assim, diretamente sobre as estruturas dos vasos sanguíneos, provocando extravasamento de sangue (RUIZ de TORRENT et al., 1999), sendo provável que neste efeito também participem enzimas com atividades proteolíticas que em conjunto atuam sobre a lâmina basal, destruindo a matriz extracelular (OWNBY et al., 1978; SERRANO et al., 1993), cercando as células endoteliais dos capilares e degradando “*in vitro*” fibronectina, laminina, colágeno e gelatina (SERRANO et al., 1993) com conseqüente liberação de mediadores pró- inflamatórios como TNF, IL1 β e IL6 (CLISSA et al., 2001).

As metaloproteinases têm sido utilizadas em modelos experimentais para o tratamento de tumores malignos mamário, pulmonar e melanoma em ratos, com redução do número de metástase, interferindo na liberação de fatores de crescimento destes tumores (CORREIA Jr et al., 2002).

Mazzi et al. (2004) isolaram uma metaloproteinase do *Bothrops jararacussu* denominada de BjussuMP-I, esta proteína apresenta o peso molecular de 60 kDa, com alta atividade hemorrágica, miotóxica e proteolítica atuando principalmente na degradação da caseína, fibrinogênio A e B com predileção para o B, além de apresentar atividade bactericida em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Assakura et al. (1985) isolaram uma metaloproteinase da *B. moojeni* denominada protease A. Esta metaloproteinase tem atividade proteolítica na caseína e a presença de Ca²⁺ aumenta a sua atividade. Portanto, de grande importância nas lesões vasculares, ocasionando principalmente a hidrólise da gelatina (ROODT et al., 1997). Além da gelatina, a protease A atua hidrolisando o colágeno do tipo I, fibrinogênio, fibrina e cadeia- β da insulina oxidada. Quanto a sua atividade hemorrágica, ela é considerada baixa (REICHL; MANDELBAUM, 1993).

A protease A em conjunto com outros componentes do veneno, como peptídeos de baixo peso molecular (sistema calicreína-bradicinina), lesam o endotélio e a camada muscular das artérias e arteríolas, causando hipotensão e choque hipovolêmico, comum no acidente botrópico (VIDAL, 1988).

Serrano et al. (1993) isolaram três glicoproteínas da *B. moojeni*, sendo uma com característica de metaloproteinase, denominada MPB, e duas com características de serinoproteinases denominadas de MSP I e MSP II.

A MPB apesar de ser classificada de metaloproteinase, é destituída de atividade hemorrágica e apresenta apenas traços de atividade hemostática. Suas principais atividades é a hidrólise do colágeno tipo I, gelatina e da fibrina, enquanto que o fibrinogênio sofre degradação de sua cadeia γ (REICH; MANDELBAUM, 1993).

O veneno da *B. moojeni* apresentou efeito hemorrágico semelhante *B. jararaca* e *B. jararacussu* de uma mesma região na Argentina (RUIZ de TORRENT et al., 1999), o que difere do efeito observado no Brasil com *Bothrops jararaca* que tem alta atividade hemorrágica (FERREIRA et al., 1992).

As serinoproteinases ou enzimas trombina-símile ou tipo trombina estão presentes em número variado de espécies das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*. Apresentam ações hemostáticas, transformam o fibrinogênio de mamífero em fibrina, ativando o fator de coagulação V e proteína C, atuam no fibrinogênio do tipo A ou no fibrinogênio do tipo B, enquanto a trombina sérica atua em ambos. Isso resulta na formação de um complexo de fibrina facilmente degradada pela plasmina, ocasionando um quadro de diminuição da coagulação sanguínea (RUSSEL, 1983; HAVT, 1999). Além disso, atuam liberando cinina do cininogênio e quebra do complemento C₃ na cascata do complemento (PETRETSKI et al., 2000).

Devido ao seu potencial terapêutico, algumas serinoproteinases têm sido utilizadas em estudos pré-clínico e clínico para infarto do miocárdio, choque isquêmico e doenças trombóticas (HERZIG et al., 1970; WILLIES et al., 1989; CHANG; TSAI, 1995). Além disso, elas têm sido usadas na prevenção e formação de trombo, nas superfícies de prótese evitando agregação plaquetária e na circulação extracorpórea, e na melhora da circulação sanguínea nas várias alterações vasculares, secundária a redução da viscosidade sanguínea (CASTRO et al., 2004).

1.2.1 Miotoxina

Dentre as inúmeras atividades exercidas pelos componentes protéicos, destacamos a ação enzimática e a presença de toxinas protéicas específicas, sendo a maioria delas hidrolases (HAVT, 1999). Algumas são encontradas em todas as espécies, como a fosfolipase A₂.

A atividade fosfolipásica e ação mionecrótica, muito comum nos acidentes botrópicos, deve-se as miotoxinas, que são pequenas proteínas ou peptídeos com estrutura fosfolipásica (destituída ou não de atividade enzimática), que levam uma variedade de efeitos farmacológicos como miotoxicidade (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997), neurotoxicidade (MEBS; OWNBY, 1990), interferem na agregação plaquetária (MARKLAND, 1998), citotoxicidade (BULTRON et al., 1993) e inflamação (CHAVES et al., 1998; ZHANG; GOPALAKRISHNAKONE, 1999). O conjunto destes efeitos leva a transtornos vasculares e hemostáticos, podendo causar um processo tissular isquêmico levando a amputação de membro ou lesão músculo tendinosa permanente (ROODT et al., 1997).

A fosfolipase A₂ hidrolisa as ligações 2 -acilas das fosfatidilcolinas e das fosfatidiletanolaminas, com liberação dos ácidos graxos e formação de lisofosfolípides como lisolectinas (DENNIS, 1994). Desde a descoberta as fosfolipases A₂ são as principais enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico, responsável pela biosíntese de lipídeos mediadores da inflamação como prostaglandinas tromboxanos e leucotrienos. Muito interesse tem sido focalizado nesta família de enzimas no estudo da inflamação (TEIXEIRA et al., 2003).

Fosfolipase A₂ são divididas em dois grupos maiores sendo um intracelular ou citosólico (cPLA₂), com alto peso molecular e encontrado em várias células, enquanto o outro é extracelular ou secretório (sPLA₂), de baixo peso molecular e encontrado nos venenos de serpentes e suco pancreático dos mamíferos (GLASER et al., 1993; De CASTRO et al., 2000).

De acordo com as estruturas primárias e localização das células, as fosfolipases secretórias podem ser divididas em três subgrupos: o primeiro foi obtido dos venenos de serpentes da família *Elapídea e Hidrofídea*, e do pâncreas de mamíferos (suco pancreático); o segundo grupo dos venenos de serpentes da família *Crotalídea e Viperídea* bem como do líquido sinovial e das plaquetas de seres humanos; o terceiro grupo pode ser através do veneno de vespas (DENNIS, 1994; PFEILSCHIFTER, 1995).

O segundo subgrupo de fosfolipase A₂ pode ser dividido em:

1-miotoxinas pequenas são peptídeos básicos de cadeia simples, não enzimáticos possuindo em sua estrutura primária 42 a 45 aminoácidos ligados por três pontes dissulfetos, possuindo como exemplo a crotamina encontrada no gênero *Crotalus*;

2- cardiotoxinas são proteínas básicas não enzimáticas possuindo em sua estrutura primária aproximadamente 60 aminoácidos. Seu principal mecanismo de ação consiste em alterar a integridade do sarcolema (OWNBY et al., 1999; MEBS, 1998);

3- miotoxinas fosfolipase A₂ estas são divididas em:

a) Neurotóxicas: são proteínas básicas, multiméricas com atividade fosfolipásica e neurotoxicidade pré sináptica, possuindo em sua estrutura primária aproximadamente 120 aminoácidos. Estas miotoxinas são comumente encontradas nos venenos de serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus*, sendo responsável pela letalidade dos venenos, devido ao efeito pré-sináptico na junção neuromuscular, além de necrose do músculo esquelético. Estes efeitos fazem com que estas miotoxinas tenham uma DL₅₀ muito baixa (LOMONTE et al., 2003), como exemplo a crotocina do veneno da *Crotalus durissus cascavella*, comumente encontrada em nossa região (MARTINS et al., 1998);

b) Não neurotóxicas são proteínas básicas e diméricas, possuindo aproximadamente 120 aminoácidos comumente encontrados nos venenos das serpentes da família *Crotalidae*. São proteínas abundantes, possuem baixa letalidade e uma DL₅₀ alta, com potencial miotóxico baixo quando comparado com as miotoxinas fosfolipásicas neurotóxicas (LOMONTE et al., 2003). Elas se dividem em:

-Asp-49 sPLA₂ são fosfolipases que contêm na posição 49 da sua cadeia primária um ácido aspártico que atua como sítio de ligação para o íon Ca²⁺; em geral não são agentes hemolíticos, possuem alta atividade enzimática, ligando-se a sítios específicos na membrana ou interagindo com seus componentes, causando hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular, provocando sua desorganização (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; SIX; DENNIS, 2000);

-Lys-49 sPLA₂ contém uma lisina homologa na posição 49, tem pequena ou são destituídas de atividades enzimáticas, são citotóxicas e cálcio independente, seu

mecanismo de ação ocorre por susceptibilidade da membrana celular, que requer a presença de fosfolípido de carga negativa seguido de penetração e desorganização da bicamada da membrana celular. Essa desorganização é seguida por um descontrolado influxo de cálcio e sódio para o interior da célula, causando alteração intracelular irreversível e morte. O C terminal da enzima, rico em lisina, é o responsável pelos efeitos ocorridos (CHIATO et al., 2003; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; LOMONTE, 1994; CALDERÓN; LOMONTE, 1998; OLIVEIRA et al., 2001; LOMONTE et al., 2003);

- Ser 49 sPLA₂, essa miotoxina apresenta um resíduo de serina na posição 49 com atividade enzimática, tendo como característica o grupamento de hidroxila da serina que substitui a carboxila do ácido aspártico na estabilização do cálcio (POLGAR et al., 1996).

Miotoxinas são proteínas facilmente purificadas, e existem em grande quantidade no veneno botrópico, obedecem a um consenso de divisão na sua estrutura primária Y25-G-C-Y/F-C-G-X-G-G33 (resíduos 25-33) que se liga ao cálcio e são conservadas nas miotoxinas Asp 49, entretanto não tão conservadas nas miotoxinas Lis 49. Estas mudanças além da substituição de uma lisina por um ácido aspártico altamente conservado na posição 49 da proteína poderia explicar a quebra na ligação com cálcio reportada nas lis 49 (OWNBY et al., 1999). Resíduos 74-84 compõem a região da asa β da molécula, estes resíduos devem participar na ação miotóxica (SELISTRE de ARAÚJO et al., 1996). Resíduos 54-70 podem estar envolvidos com atividade anticoagulante da molécula (KINI; EVANS, 1987). Resíduos 87-92 seriam sítios neurotóxicos da molécula (KINI; IWANAGA, 1986b; TSAI et al., 1987). Resíduos 104-120 C-terminal possuem ação lítica. Quanto mais rico em lisina maior seria sua atividade miotóxica (LOMONTE et al., 2003)

Dentre as atividades causadas pelas miotoxinas classificadas como não neurotóxicas encontra-se “*in vivo*” miotoxidade acompanhada de edema utilizando o modelo de edema de pata (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; LIU et al., 1991; SOARES et al., 1998, 2002; CHAVES et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; ÂNGULO et al., 2000; LANDUCCI et al., 2000), hiperalgesia (CHACUR et al., 2003) liberação de citocina pró inflamatória (LOMONTE et al., 1993; CHACUR et al., 2003), capacidade de atrair leucócito para cavidade pleural (De CASTRO et al., 2000). “*In vitro*” Observa-se efeitos tóxicos em preparações neuromuscular usando nervo frênico e diafragma de rato, musculatura

esquelética cervical de pinto (DHILLON et al., 1987; HELUANY et al., 1992; OSHIMA-FRANCO et al., 2001; SOARES et al., 2000b), atividade pré sináptica usando nervo frênico e diafragma de rato (OSHIMA-FRANCO et al., 2004) ação citósolica (BRUSÉS et al., 1993; LOMONTE et al., 1994, 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; ÂNGULO et al., 2000; SOARES et al., 2002), destruição de lipossomo (DÍAZ et al., 2001), degranulação de mastócitos (LANDUCCI et al., 1998), ação quimiotóxica com migração de neutrófilo (GAMBERO et al., 2002), atividade antibactericida de largo espectro (PÁRAMO et al., 1998), alteração no transporte de água na bexiga isolada de sapo (LEITE et al., 2004), proliferação, apoptose e necrose em células de linha de linfoblastoide B (MORA et al., 2005)

Moura-da-Silva et al. (1991) isolaram duas miotoxinas denominadas JSU-5 e MOO-I das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* respectivamente, no qual a JSU-5 era destituída de atividade fosfolipásica e MOO-I possuía uma alta atividade fosfolipásica, porém, Lomonte et al. (1990) isolaram a miotoxina I e miotoxina II. Ambas apresentaram-se como Lys 49 PLA₂-símile do veneno da *Bothrops moojeni* e são destituídas de atividade PLA₂, hemorrágica, anticoagulante e coagulante, porém com uma atividade necrótica grave na fibra do músculo esquelético, bem como um rápido e transitório edema de pata. Cintra et al. (1993) isolaram da *Bothrops jararacussu* duas miotoxinas denominadas bothropstoxin I (BthTXI) caracterizada como Lys 49 e bothropstoxin II (BthTXII) caracterizada como Asp 49 .

Além da ação hemolítica, enzimas com atividade de fosfolipase A₂, também apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas e miotóxicas, dando origem à necrose e mioglobínúria (FOHLMAN; EAKER, 1977).

1.2.2 Lectina

O termo Lectina, do latim *legere* (capaz de escolher, selecionar) foi sugerido por lembrar o aspecto seletivo de ligação destas proteínas aos eritrócitos humanos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

A definição proposta por Peumans e Van Damme (1995a) de lectinas como proteínas de origem não imune que apresentam pelo menos um sítio de ligação reversível para carboidratos, tem sido a mais utilizada pela comunidade científica.

Os mesmos autores propuseram uma classificação para este vasto grupo de proteínas, dividindo-as em três classes principais:

- ◆ Tipo I – As lectinas do tipo I possuem apenas um sítio de ligação para carboidrato. Elas não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Estas lectinas receberam a denominação de merolectinas. Dentre esta classe podemos citar as lectinas de orquídeas, proteínas monoméricas que são específicas para manose;
- ◆ Tipo II – Nesta classe encontramos lectinas que apresentam múltiplos sítios de ligação a carboidratos. Elas são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Chamadas de hololectinas estão em sua maioria presentes em plantas. Elas são também conhecidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas;
- ◆ Tipo III – Correspondem às lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação ao carboidrato, mas que exercem atividade catalítica ou outra atividade biológica, associada a um outro domínio molecular que não o sítio de ligação aos açúcares. São chamadas de quimerolectinas. Como exemplos desta classe encontram as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs).

Peumans e Van Damme (1998), introduziram uma nova classe de lectinas, as superlectinas, que apresentam dois ou mais domínios carboidrato-ligantes, porém, com diferentes especificidades.

Drickamer (1993), afirmou que as lectinas dos venenos de serpentes são constituídas de aproximadamente 130 aminoácidos. Possuem uma estrutura primária homóloga ao domínio de reconhecimento para carboidrato (CRD), mas não apresentam outros domínios acessórios. A partir desse fato o autor considerou que estas lectinas se comportam como um CRD livre.

Lectinas dos venenos de serpentes têm sido classificadas como lectinas tipo C (WEIS et al., 1991) são proteínas solúveis, não enzimáticas e na sua maioria específica para β Galactosídeos e requerem o íon cálcio para exercerem sua atividade, caracterizado por possuírem atividades biológicas distintas, apesar de apresentarem uma estrutura primária conservada (DRICKAMAER, 1999).

Elas são divididas em dois tipos:

- 1- Estas lectinas têm uma ponte dissulfeto ligada ao heterodímero $\alpha\beta$ com dois polipeptídeos homólogos de 14 kDa, com baixo peso molecular. Muito encontradas

nos venenos botrópicos possuindo uma atividade aglutinante de eritrócitos (CASTRO et al., 2003; LEE et al., 2003);

- 2- São lectinas que possuem várias pontes dissulfeto ligadas por dois a quatro heterodímero $\alpha\beta$, possuem alto peso molecular, variando entre 50 a 100 kDa, comumente encontradas no veneno crotálico, como a convulxina, possuem atividade de agregar plaquetas e não têm atividade de aglutinar eritrócitos (TOYAMA et al., 2001).

Hirabayashi et al. (1991) sugeriram que as lectinas dos venenos de serpentes teriam um papel na defesa ou na captura das presas, devido as suas atividades de agregação plaquetária e estimulação de células periféricas. No entanto, é sabido que algumas lectinas não são capazes de agregar plaquetas, apesar de hemaglutinarem eritrócitos (OGILVIE et al., 1989).

A especificidade das lectinas dos venenos botrópicos em se ligarem a carboidratos, tem permitido o seu uso para detectar carboidratos, glicoproteínas e imunoglobulinas em superfícies celulares além da identificação de células tumorais, são muito utilizadas como marcadores em superfícies celulares (SINGH et al., 1999). Este reconhecimento de carboidrato em células tumorais tem permitido que estas lectinas sirvam como importante ferramenta na identificação de metástase tumoral (VARKI, 1997). Estas mesmas lectinas possuem diversos efeitos biológicos como adesão, endocitose e neutralização de patógenos (WEIS et al., 1991)

De acordo com Kini e Evans (1992), existem três grupos protéicos que se destacam na complexa composição dos venenos ofídicos: as proteases, as desintegrinas e as proteínas relacionadas com as lectinas tipo C. Segundo Kini (1996), estes três grupos são derivados por proteólise de um precursor comum. O autor propôs um modelo para este precursor contendo cinco domínios. As proteases correspondiam ao domínio C, as disintegrinas eram relacionadas ao domínio D e as lectinas símeles do tipo C (CLPs) com o domínio A. De acordo com esta proposta, os domínios E e B não foram caracterizados. O mesmo autor relatou que as CLPs constituíam um grupo estruturalmente homólogo que não tinham capacidade de se ligar a moléculas de carboidrato, mas apresentavam diferentes funções.

Entre as funções exercidas pelas CLPs isoladas dos venenos de serpente pode-se citar as proteínas anticoagulantes IX/X-bp e Jaracara IX/X-bp, purificadas do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (ATODA et al., 1991) e do veneno de *Bothrops jararaca*,

respectivamente (SEKIYA et al., 1993). Elas interferem com os fatores de coagulação IX e X, ou através da ligação à trombina (ZINGALI et al., 1993).

Outras CLPs se ligam a glicoproteína Ib e interferem inibindo ou estimulando a agregação plaquetária. A albogreguina, isolada do veneno de *Trimeresurus albolabris* induz a agregação plaquetária na ausência de qualquer cofator. Já as CLPs echicetina, isolada do veneno de *Echis carinatus* (PENG et al., 1993), e a agkicetina, proveniente do veneno de *Agkistrodon acutus* (CHENG; TSAI, 1995) inibem a aglutinação plaquetária.

1.3 Alterações renais

Durante um acidente ofídico uma das conseqüências que traz grande preocupação são as alterações renais, descritas por vários autores, como a glomerulonefrite (SEEDAT et al., 1974), glomerulite e nefrite intersticial (SANT; PUNDARE, 1972), necrose tubular (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979), necrose cortical (VARAGUNAM; PANABOKKE, 1970) e insuficiência renal (RAAB; KAISER, 1966). De todas, a mais relatada tem sido a insuficiência renal aguda

A insuficiência renal aguda (IRA) descrita por vários autores (AMORIM et al., 1969; AMORIM; MELO, 1954; SILVA et al., 1979; SHASTRY et al., 1977; AUNG KHIN; 1978) é a principal causa de morte por acidentes com venenos ofídicos, ocorrendo secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda (SEEDAT et al., 1974), necrose tubular aguda (CHUGH et al., 1981) e necrose cortical renal (DATE; SHASTRY, 1981), sendo usualmente atribuída ao sangramento, hipotensão, colapso circulatório, hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada (SOE-SOE, 1990).

Insuficiência renal aguda causado pelo veneno de *Bothrops* vem sendo motivo de muitos estudos. Alguns autores atribuem como mudanças hemodinâmicas causada por uma vasoconstrição e conseqüente isquemia renal, hemólise, deposição de fibrina nos glomérulos e injúria vascular (BURDMANN et al., 1993, CHAVES et al., 1989, CRUZ-HÖFLING et al., 2001, REZENDE et al., 1989) outros autores atribuem a componentes do veneno que têm ação direta sobre o epitélio renal (COLARES-BUZATO et al., 2002, RATCTIFFLE et al., 1989; WILLINGER et al., 1995, De CASTRO et al., 2004) .

Aung-Khin (1978) após a injeção letal do veneno da *Russell's viper* em animais e sete acidentes em pacientes, observou alterações renais que consistiam principalmente em coagulação nos glomérulos, hemorragias e necrose tubular aguda.

Na microscopia observou que os capilares glomerulares estavam congestionados e preenchidos com hemácias dispostas em pilha ou em agregação. A luz dos capilares estava preenchida com material eosinofílico granular, contendo alguns polimorfonucleares e poucos mastócitos. Formas sem granulações também foram vistas. Depósitos de fibrina foram observados nos capilares glomerulares, além de uma grande quantidade de plaquetas e coagulações intraglomerulares, nos espaços de Bowman apareciam hemorragia.

Nos animais ou pacientes que morreram antes de 16 horas foram observadas degenerações das membranas hialinas e a vacuolização de células epiteliais com dilatação do túbulo proximal. Após 24 horas observou necrose tubular aguda.

Boer-Lima et al. (1999) citam que observações histopatológicas após inoculação intravenosa do veneno de *Bothrops moojeni* em camundongos, causavam as seguintes lesões renais: vacuolização celular, descontinuidade da borda de escovas, edema tubular com dano glomerular. Todas estas lesões foram atribuídas a atividade proteolítica e de fosfolipase A₂.

A atividade fosfolipásica pode produzir prostaglandinas vasodilatadoras renais, PGE₁, PGE₂, PGA₁, PGA₂, PGH₂, PGI₂ e PGG₂, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese ou liberação PGF_{2α}, cuja ação é vasoconstritora. Além das prostaglandinas, a PLA₂, através da ciclooxygenase, pode ativar o tromboxano A₂ que também possui ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI, 2000).

Endotelina (ET₁) é um peptídeo de 21 aminoácidos que apresenta uma ação vasoconstritora renal, sendo secretado no compartimento basolateral do endotélio, que existe em abundância no parênquima renal, podendo induzir a formação de fibrina (DOUGLAS, 2001; NAMBI et al., 2001). A formação de fibrina no rim é uma das conseqüências comuns em acidentes ofídicos (PONRAJ; GOPALAKRISHNAKONE, 1997; AUNG-KHIN, 1978; BOER-LIMA et al., 1999).

Rabdomiólise é uma condição clínica freqüente no envenenamento, quando associada a mioglobinúria, pode ser uma das causas que leva a IRA, este fenômeno tem sido referido como síndrome mio-renal (ZAGER, 1996).

Rabdomiólise com a conseqüente formação de mioglobina parece ser proeminente nas primeiras 24 horas após o envenenamento, sendo causado pela miotoxina do veneno de diversas serpentes. Ponraj e Gopalakrishnakone (1997) utilizando a miotoxina da serpente

Pseudechis australis por via intramuscular em camundongos fizeram as seguintes observações:

- 1) A extensão dos danos musculares causados pela miotoxina determinava a quantidade de mioglobina que penetrava na circulação renal;
- 2) A concentração de mioglobina no túbulo distal seria controlada pela mioglobina no túbulo proximal;
- 3) O pH urinário influenciava o aparecimento da IRA. Quando o pH da urina apresentava-se alcalino, tinha-se uma significativa proteção morfológica e funcional, enquanto que em condições ácidas a mioglobinúria promovia IRA;
- 4) A estase na luz do túbulo aumentava o contato com a mioglobina aumentando a citotoxicidade;
- 5) A diminuição do volume intravascular devido à desidratação potencializava vasoconstrição e diminuía o ritmo de filtração glomerular.

O mecanismo de ação hipotético em cultura de células lisossômicas e células musculares esqueléticas “*in vivo*” sugeriram que a miotoxina da *B. moojeni* deveria se ligar a um local ainda não identificado na membrana plasmática celular. Porém, sugere-se que a miotoxina da *B. moojeni* penetra na bicamada da membrana por interação hidrofóbica, entre os seus botões, causando uma desestabilização da membrana e prejuízo na permeabilidade de íons e macromoléculas, ocorrendo um proeminente influxo de cálcio, iniciando uma série de variações de destruição celulares; como alteração do citoesqueleto, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de cálcio (BOER-LIMA et al., 1999).

De Castro et al. (2004) usando método de túbulo proximal isolado, conclui que a toxicidade direta causada pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* era independente do cálcio extracelular e que ele seria parcialmente mediado por peroxidação lipídica. O mesmo autor sugere que ativação das fosfolipase seria comandada pela peroxidação lipídica.

Em estudos usando como modelo rim isolado, Pirotzky et al. (1984), demonstraram que o rim seria capaz de produzir substância como histamina, serotonina e indiretamente, fator de agregação plaquetária (PAF).

Embora muitos destes mediadores não estejam envolvidos diretamente no sistema de perfusão de rim, as células renais podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, fração de complemento e fator de agregação plaquetária (BARRAVIERA et al., 1995; WHATLY, 1989).

Monteiro e Fonteles (1999), concluíram que o veneno da *B. jararaca* causa uma nefrotoxicidade direta no rim isolado de rato, alterando principalmente os parâmetros funcionais e comparam estas alterações ao observado na insuficiência renal aguda, atribuindo ao PAF como sendo um dos possíveis responsáveis.

Havt et al. (2001), concluíram que as alterações nos parâmetros funcionais de pressão de perfusão (PP) e da resistência vascular renal (RVR) em rim isolado de rato utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*, não foram promovidas pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF).

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

Barbosa et al. (2002) estudando o veneno da serpente da *Bothrops moojeni* observaram que as alterações renais promovidas eram similares aos promovidos pela *Bothrops jararacussu*. Eles atribuíram aos peptídeos potenciadores de bradicina a possível causa da diminuição da pressão de perfusão e resistência vascular renal. Os autores usaram duas miotoxinas purificadas, que foram classificadas como Lis 49, sendo atribuído ao C-Terminal rico em lisina como responsável pela alteração renal somente na miotoxina I.

Havt et al. (2005), usando o veneno da serpente *Bothrops pirajai*, observaram efeitos similares às outras *Bothrops* estudadas em rim isolado de rato. Neste trabalho os autores concluíram que a queda na pressão de perfusão e resistência vascular renal não seria causada pelos peptídeos potenciadores de bradicina e que outros fatores poderiam estar envolvidos, como a lectina purificada da *Bothrops pirajai*, que demonstrou um efeito similar ao apresentado pelo veneno.

Continuando a linha de pesquisa do nosso grupo, recentemente Martins (2005) observou que efeitos renais causados pela *Bothrops erythromelas* (a nossa Jararaca seca encontrada no sertão do Ceará) seriam diretos e similares ao observado nos outros venenos botrópico estudados. Neste trabalho a autora bloqueou os seus efeitos utilizando soro antibotrópico purificado do gambá *Didelphis marsupialis*

O nosso trabalho propõe estudar os efeitos renais causados pela miotoxinas e lectinas purificadas do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*, bem como o envolvimento da ciclooxigenase e endotelina neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O nosso objetivo foi analisar a participação da endotelina e ciclooxygenase nos efeitos renais e vasculares causados pelas miotoxinas e lectinas purificadas do veneno das serpentes *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*, bem como suas atividades antibactericidas.

2.2 Objetivos específicos

1) Avaliar os efeitos renais causados pela miotoxina I (Lys 49) e miotoxina II (Asp 49) purificadas do veneno de *Bothrops jararacussu*;

2) Avaliar os efeitos causados pela miotoxina I (Lys 49) purificadas do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* em leito mesentérico;

3) Avaliar a participação da ciclooxygenase renal nos efeitos causados pelas miotoxinas e lectinas purificadas dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, usando como bloqueador a indometacina;

4) Avaliar a participação da endotelina renal nos efeitos causados pela miotoxina I purificada da serpente *Bothrops moojeni* usando como bloqueador o tezosentan;

5) Avaliar os efeitos renais causados pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*;

6) Avaliar a atividade bactericida causada pela miotoxinas de *Bothrops jararacussu*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os venenos utilizados em nossos experimentos foram fornecidos pelo LAROF (Laboratório de Ofídico da Universidade Federal do Ceará), pela pessoa do Dr. Lima Verde. As frações dos venenos foram isoladas no laboratório do departamento de Bioquímica da UNESP-SP (Universidade Estadual de São Paulo) em colaboração com o Dr. Marcos H Toyama.

3.1 Perfusão de rim isolado de rato

Foram utilizados Ratos Wistar adultos com peso entre 270 e 300g, machos, 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".

3.1.1 Grupos de animais

Com a finalidade de avaliar os efeitos das miotoxinas e lectinas purificadas do veneno da *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, os animais foram divididos em doze grupos com 6 animais cada. No grupo controle, os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Em Quatro grupos foram utilizados os mesmos procedimentos do grupo controle até os 30 minutos de perfusão, após este período foi adicionado em 100 mL da solução, no segundo e terceiro grupos, 0,5 mg de miotoxina I (Lys 49) e miotoxina II (Asp 49) respectivamente, purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, enquanto que no quarto e quinto grupo foram utilizadas 1,0 mg da lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* respectivamente. Para observar o efeito da ciclooxygenase no sexto, sétimo, oitavo, nono e décimo grupos os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina e foi adicionada 1,0 mg de indometacina no início do experimento. Após 30 minutos foram adicionados no sexto grupo 0,5 mg de miotoxinas I (Lys 49) do veneno de *Bothrops moojeni*, no sétimo grupo 0,5 mg miotoxina I (Lys 49) do veneno de *Bothrops jararacussu*, no oitavo grupo 0,5 mg de miotoxina II (Asp 49) de *Bothrops*

jararacussu, no nono grupo 1,0 mg de lectina de *Bothrops jararacussu* e no décimo grupo 1,0 mg de lectina de *Bothrops moojeni*. Com intuito de saber o papel da endotelina no efeito da miotoxina I da *Bothrops moojeni*. No décimo primeiro grupo foi utilizado 1mg de tezomentam, um inibidor de receptor de endotelina, na solução perfusora após 30 minutos do início dos experimentos. Para saber o efeito do inibidor de receptor de endotelina com adição da miotoxina da *Bothrops moojeni*, no décimo segundo grupo foi adicionado 1,0 mg de tezomentan no início do experimento e após 30 minutos foi adicionada a miotoxina I da *Bothrops moojeni*.

As frações liofilizadas foram diluídos em 1 mL de solução salina (0,9%) e adicionadas ao sistema, na solução perfusora aos 30 minutos de cada experimento ficando com as dosagens de 10 µg/mL para lectinas, enquanto que para as miotoxinas as dosagens foram de 5 µg/mL.

3.1.2 Substâncias utilizadas na perfusão renal

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as seguintes substâncias:

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 (Roche)

Inulina (Sigma)

Pentobarbital Sódico (Cristália)

3.1.3 Solução perfusora e seu preparo

A solução empregada nas experiências foi a de Krebs-Henseleit modificada, contendo albumina bovina 6g%.

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada a 20%, continha NaCl = 138g, KCl = 7g, NaH₂PO₄ . H₂O = 3,2g, MgSO₄. 7 H₂O = 5,8g e Uréia = 10g. 48 horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foi separada e acrescidos NaHCO₃ = 4,2g , CaCl₂ . 2 H₂O = 0,74g, glicose = 2g, e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000mL com água bidestilada. Foi retirado 300mL desta solução, na qual foi adicionada albumina bovina (6g%). Em seguida, solução foi dialisada com albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvato, citrato e lactatos (HANSON; BALLARD, 1968, COHEN et al., 1977, SCHUREK et al., 1970; ROSS 1978).

A solução de Kresb-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.

3.1.4 O sistema de perfusão de rim isolado

Nos nossos experimentos foi utilizado o sistema de perfusão de rim isolado com recirculação, também conhecido como sistema de perfusão de rim isolado fechado. Este sistema foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Mack (1974) e Ross (1978). Modificado por Fonteles e Moreira Lima (1982), os quais 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-Hanseleit modificada e a oxigenação é adaptada ao sistema (Monteiro 1990).

O sistema de perfusão de rim isolado com recirculação (Figuras 3 e 4) 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;
- 6) Banho Maria - aquece o oxigenador ou o pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre $37\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 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 O_2 e 5% de CO_2).



Figura 3 – Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação

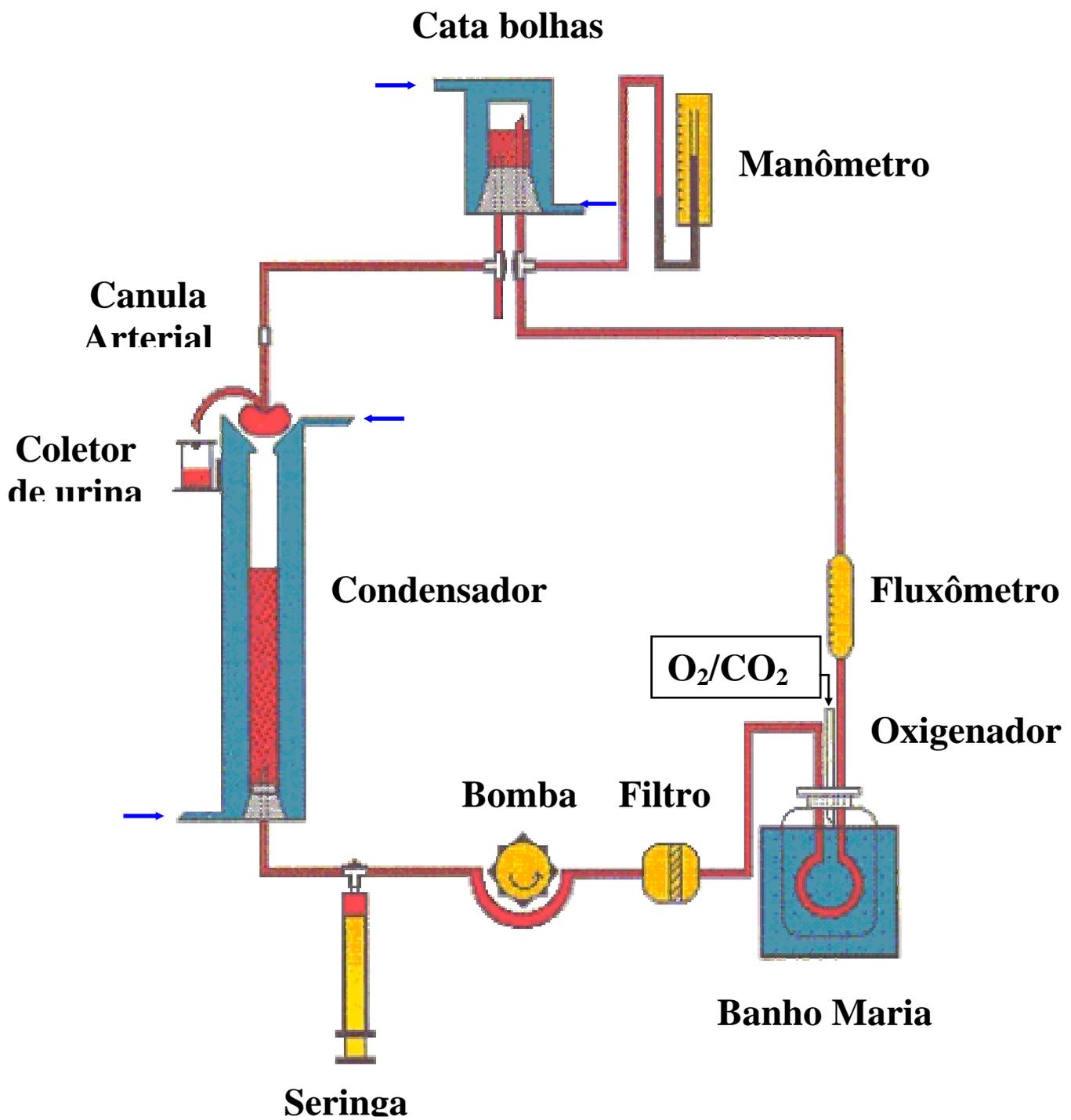


Figura 4 - Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação

3.1.5 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 coletado a solução 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 é feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula arterial. Para tanto, os resultados de calibração obtidos foram compilados em curvas, onde foi plotado 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 (Figuras 5, 6 e 7).

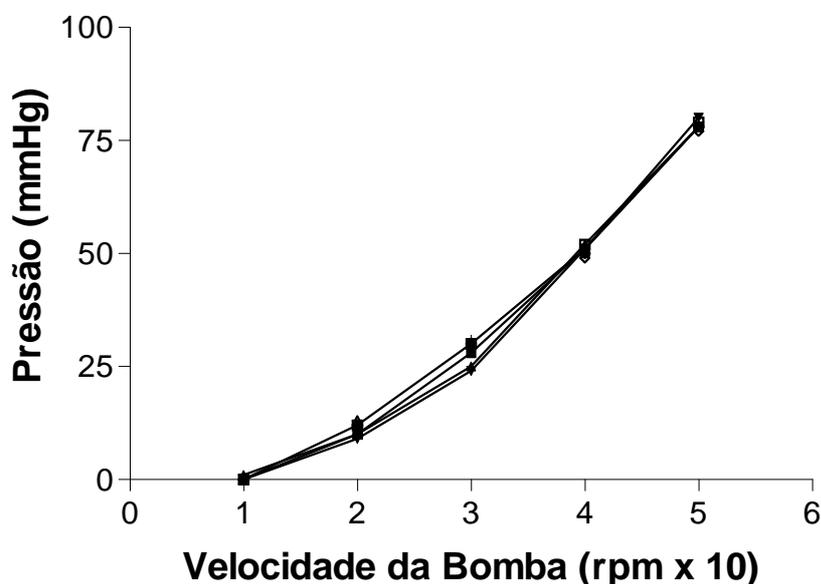


Figura 5 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão.

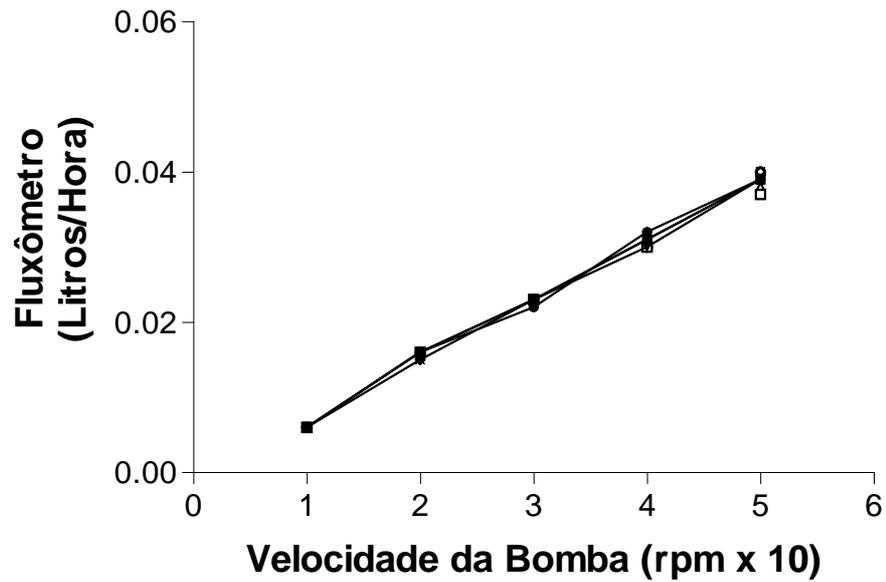


Figura 6 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro.

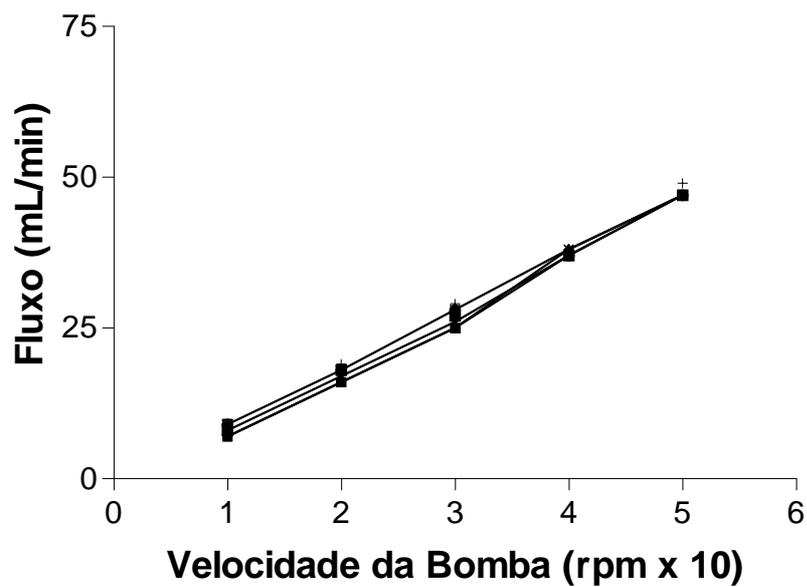


Figura 7 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo na ponta da cânula.

3.1.6 Técnica cirúrgica

Após a anestesia do animal com Pentobarbital Sódico na dose de 50mg/Kg intraperitoneal (IP), foi injetado na veia femural, devidamente identificada, 3ml 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. 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 pinçado no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido foi introduzida 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 aclopado ao sistema, passa por um período de adaptação in vitro de aproximadamente 30 minutos (Figura 8).

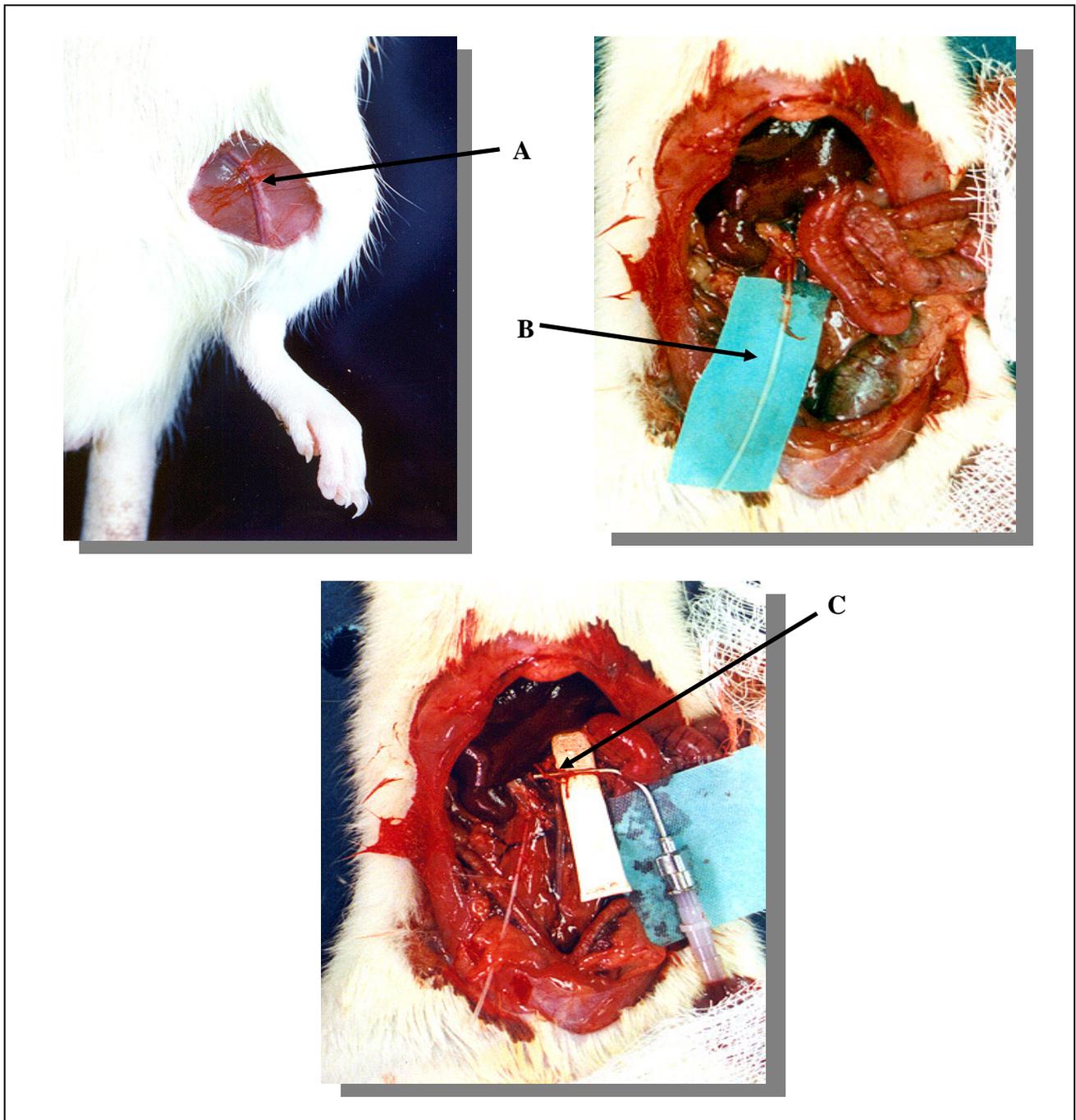


Figura 8 - Técnica cirúrgica: A – veia femoral; B – ureter direito canulado; C – artéria renal / artéria mesentérica

3.1.7 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a adaptação do órgão ao sistema num tempo de aproximadamente 20 minutos. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, foram coletados a cada 5 minutos as medida do fluxômetro e a pressão do perfusato. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, foram coletados a urina e o perfusato, de modo que na hora de coletar o último não se trocava o coletor de urina e vice e versa. 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, cloro, inulina e osmolaridade.

Com o rim direito montado no sistema, o rim esquerdo foi coletado para controle, 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.

3.1.8 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 de dosagem de sódio e potássio, pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443IL). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta, descrita 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.

3.1.9 Cálculos dos parâmetros renais

Foram Utilizadas as seguintes fórmulas para determinação dos parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO et al., 1978; FONTELES, 1980):

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

FU - fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1} . \text{min}^{-1}$)=

$$\text{FU} = \text{peso do volume urinário/peso do rim esquerdo} \times 10$$

FPR - fluxo plasmático renal ($\text{mL.g}^{-1} . \text{min}^{-1}$)

$$\text{FPR} = \text{Fluxo registrado a cada 10min/intervalo de tempo} \times \text{peso do rim}$$

RVR - resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1} . \text{min}^{-1}$) =

$$\text{RVR} = \text{PP/FPR}$$

RFG - ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1} . \text{min}^{-1}$) =

$$\text{RFG} = \text{DOUin/DOPin} \times \text{FU, onde}$$

DOUin = densidade ótica da inulina na urina

DOPin = densidade ótica da inulina no perfusato

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

$$\text{FNa}^+ = \text{RFG} \times \text{PNa}^+, \text{ onde}$$

PNa⁺ = concentração de sódio no perfusato

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

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

UNa⁺ = concentração de sódio na urina

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

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

%TNa⁺ - percentual de sódio transportado =

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$$

C_{osm} - clearance osmótico ($mL \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$C_{osm} = (U_{osm} / P_{osm}) \times FU, \text{ onde}$$

U_{osm} = osmoralidade urinária

P_{osm} = osmoralidade do perfusato

C_{H_2O} - clearance de água livre ($mL \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) =

$$C_{H_2O} = FU - C_{osm}$$

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

$$dTNa^+ = C_{H_2O} \times PNa^+$$

$AdNa^+$ - aporte distal de sódio ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)

$$AdNa^+ = dTNa^+ + ENa^+$$

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

$$pTNa^+ = FNa^+ \times AdNa^+$$

$\%pTNa^+$ - percentual de transporte proximal de sódio

$$\%pTNa^+ = pTNa^+ \times 100 / FNa^+$$

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

3.1.10 Estatística

Utilizou-se um computador PC Athlon (1,6GHz) e programa Graphpad Prism versão 3.0 para análise estatística dos dados, expresso por média \pm EPM. Os valores dos parâmetros renais dos doze grupos aqui avaliados foram comparados por ANOVA (bonferroni teste) e teste t Student pareado, com significância de * $p < 0,05$.

Em todas as tabelas e gráficos, os parâmetros renais foram avaliados e estudados de acordo com a variável de tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos.

3.1.11 Histologia

Após cada experimento, fragmentos dos dois rins foram retirados e acondicionados em frasco de formol 10% para proceder à análise histológica. 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 por microscópio óptico (Nikon).

Todas as lâminas da perfusão foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica - Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo professor Dalgimar Beserra de Menezes

3.2 Leito Mesentérico

O leito mesentérico isolado foi utilizado com o objetivo de investigar se as miotoxinas da serpente apresentam atividade direta nos vasos, isto é, vasodilatação ou vasoconstrição. Para tanto, dois protocolos foram idealizados. No primeiro, estas miotoxinas (10 μ g/ mL) foram infundidas depois de estabelecida uma pressão de perfusão basal (20 – 40 mmHg), para testar um possível efeito vasoconstritor. No segundo, miotoxinas purificadas dos venenos das serpentes foram infundidas em leitões mesentéricos pré-contraídos submaximamente (~ 50 – 60 %) com fenilefrina, para simular as condições de pressão do leito “*in vivo*”, sendo possível verificar efeitos vasodilatadores e vasoconstritores.

Seguindo o método descrito por MacGregor (1965), ratos Wistar pesando entre 250 e 300 g, de ambos os sexos, com livre acesso à alimentação e água, foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Inicialmente, foi feita uma incisão da cavidade abdominal, paralelamente a linha Alba, e dois cortes perpendiculares ao primeiro, para ampliar o campo cirúrgico.

Em seguida, a artéria mesentérica superior foi identificada para que os ramos pancreático-duodenal, íleo-cecal e cecal desta artéria fossem ligados. A artéria mesentérica foi cuidadosamente dissecada do material conjuntivo externo e canulada na sua porção distal, próxima a aorta, utilizando tubo de polietileno (PE20). O mesentério foi separado do intestino a partir da borda interna e imediatamente levado ao sistema de perfusão (Figura 9).

O leito mesentérico foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit, cuja composição em gramas/L era: 6,7 g de NaCl; 0,37 g de KCl; 0,17 g de KH₂PO₄ . H₂O; 0,144 g de MgSO₄ . 7 H₂O; 2,1 g de NaHCO₃; 0,31 g de CaCl₂ . 2H₂O; e 0,65 g de glicose. O sistema foi mantido em temperatura constante de 37 °C. Os experimentos foram realizados em fluxo contínuo e as alterações de pressão foram registradas em manômetro ligado a um transdutor de força para registro fisiográfico da pressão.

Os experimentos foram iniciados com uma pressão basal entre 20 e 40 mmHg. O tempo de infusão das substâncias testadas foi sempre de 1 hora.

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e comparados com o grupo controle, nos quais apenas a solução de Krebs-Henseleit foi infundida. e analisados pelo teste t de Student com nível de significância de 5%.

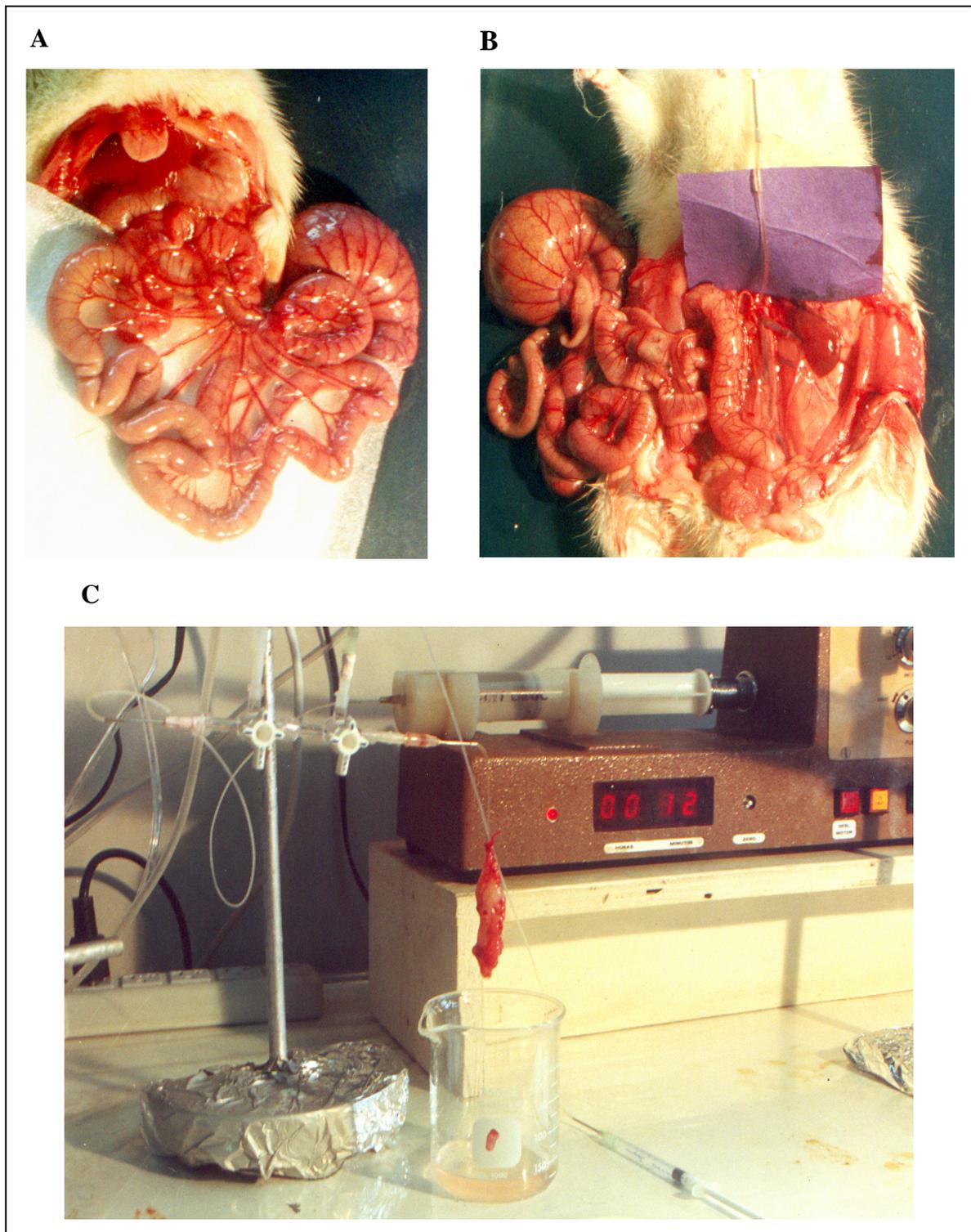


Figura 9 – A – intestino delgado e mesentério; B – Artéria mesentérica superior canulada com tubo de polietileno (PE20); C – Leito mesentérico conectado ao sistema de perfusão.

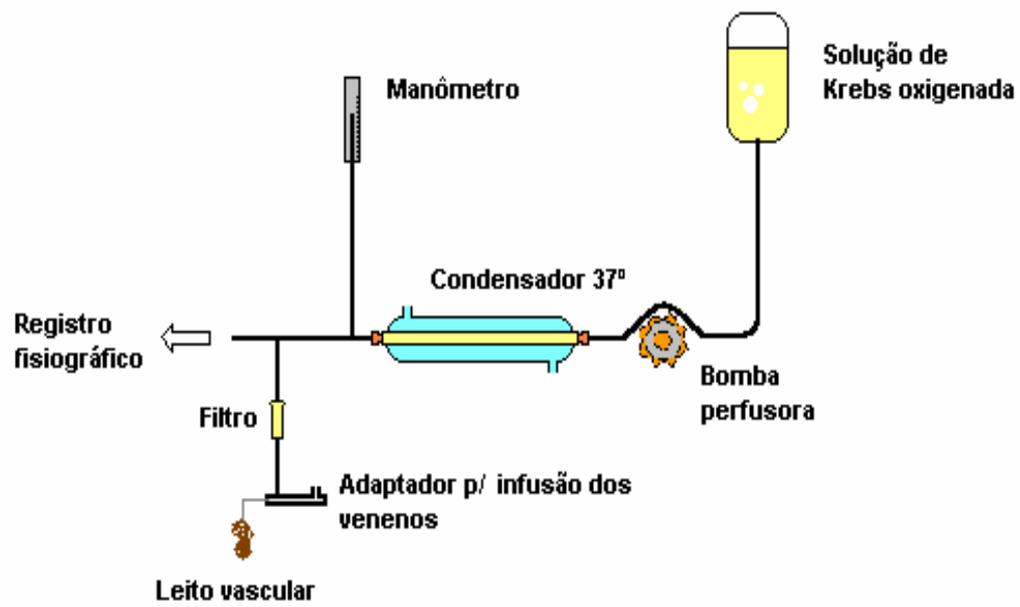


Figura 10 - Representação gráfica do sistema de perfusão do leito mesentérico

3.3 Atividade antibacteriana das miotoxinas purificadas da serpente *Bothrops jararacussu*

A atividade antibacteriana foi realizada em duas etapas: a primeira determinação da capacidade antibacteriana pela contagem de unidades formadoras de colônias em ausência e presença das proteínas a serem testadas e seguidas por avaliações das alterações ultraestruturais ou morfológicas das bactérias tratadas, usando técnicas de microscopia eletrônica.

3.3.1. Contagem de unidade formadora de colônia

As linhagens e o crescimento de bactérias foram inicialmente realizados em colaboração com o Laboratório de Microbiologia, Instituto Biológico de São Paulo, Unidade Campinas. A metodologia para determinação da atividade antibacteriana seguiu a metodologia descrita por Páramo et al. (1998). As bactérias foram coletadas de placas de ágar e foram suspensas em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,4. A suspensão bacteriana teve sua concentração ajustada para 3×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL (A_{650nm}), posteriormente sendo diluídas para 10^3 . As amostras de proteínas purificadas ou de veneno total foram preparadas utilizando-se 1mg de proteína que foi dissolvida em 2mL de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,4. A solução de proteínas foi então esterilizada através da filtração deste material em unidades filtrantes estéreis para seringas da Corning® (15mm, 0,2 μ m). Para o ensaio antibacteriano, 500 μ L da diluição bacteriana foram adicionados a 500 μ L das frações protéicas esterilizadas, sendo essa suspensão (bactérias e proteínas) incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 100 μ L da suspensão foi plaqueado em agar nutriente e deixados em estufa a 28°C durante 48h ou até a visualização das unidades formadoras de colônia, para sua contagem. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (n=5). Para maximizar o uso das proteínas e peptídeos, sua atividade antibacteriana relativa foi comparada com da polimixina B, pelo teste de ambos agentes nas mesmas concentrações. Concentração bactericida mínima será estimada como descrito por Hultmark et al. (1982).

3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação da atividade das proteínas sobre a morfologia bacteriana, foi realizada técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As amostras provenientes da incubação das proteínas com as bactérias (suspensão) foram fixadas em solução (2,5% Glutaraldeído) e tampão cacodilato de sódio 0,1M, permanecendo nesta solução por 2 horas a 4°C. Estas amostras (pellets), foram lavadas 3x com tampão fosfato 0,05M, pH 7,4. Os pellets após as lavagem foram fixados em Tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 durante 2h a 4°C. Após a segunda fixação o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (cada desidratação foi de 30 min) Após a desidratação o material foi processado para inclusão em resina Epon. Os blocos obtidos foram trimados e cortados em um ultramicrótomo ULT (LEICA) e coletados em telas de cobre. O material foi contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo de Reynolds. As observações foram realizadas em microscópio LEO-906.

3.3.3 Modificação da His com (ρ -BPB)

O tratamento das PLA₂ com brometo de bromofenacil (ρ -BPB) foi realizado conforme o método descrito por Nishida et al. (1985), basicamente 3 mg de amostra foram dissolvidas em 900 μ l de tampão bicarbonato de amônia 0.2M (pH 7,9, contendo 1,5mM de EDTA) e misturadas com 300 μ l de ρ -BPB para obtenção de concentração final de 1mg/ mL. A mistura foi incubada durante 20 h à 37°C. Após este período, a mistura foi desalificada em uma coluna de Sephadex G25 para eliminação do excedente de EDTA e ρ -BPB, que não se complexou com as PLA₂. Após a desalificação estas amostras serão liofilizadas e guardadas a -20°C.

4 RESULTADOS

4.1 Perfusão renal

4.1.1 Grupo controle

Este grupo perfundido somente com solução Krebs-Hanseleit modificada a 6g% (n=6) apresentou todos os parâmetros fisiológicos dentro da normalidade e foram comparados aos grupos tratados com miotoxina I, miotoxina II e lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, miotoxina I e lectina da *Bothrops moojen.*,

4.1.2 Miotoxina I purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) lisina 49

Com relação ao grupo controle a BthTx I apresentou um aumento na pressão de perfusão (PP) com significância aos 60 minutos permanecendo até o final do experimento (Figura 11).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), BthTx I causou um aumento significativo em relação ao grupo controle aos 90 minutos, persistindo até o final do experimento (Figura 12).

BthTx I apresentou um aumento significativo aos 120 minutos do fluxo urinário (Figura 13).

O efeito produzido BthTxI no ritmo de filtração glomerular (RFG) foi uma diminuição significativa aos 60 minutos. Aos 90 minutos há retorno ao normal. Aos 120min o RFG aumentou significativamente quando comparado ao grupo controle (Figura 14).

Com relação ao percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) observou-se uma queda a partir significativa aos 60 minutos, permanecendo assim até o final dos experimentos (Figura 15).

Foi observado que no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) houve uma queda significativa aos 60 minutos, mantendo-se até o final do experimento quando comparado ao grupo controle (Figura 16).

O efeito produzido pela BthTx I no transporte tubular de potássio (%TK⁺), foi de queda significativa aos 60 minutos retornando aos parâmetros normais aos 90 minutos (Figura 17).

O efeito da BthTx I com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) foi de uma queda significativa somente aos 60 minutos (Figura 18).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) foi observado uma queda significativa aos 60 minutos, retornando aos parâmetros normais aos 90 e voltando a cair aos 120 minutos, quando comparado com o grupo controle (Figura 19).

O efeito produzido pela BthTx I no percentual do transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) foi estatisticamente significativo aos 60 minutos e aos 120 minutos (Figura 20).

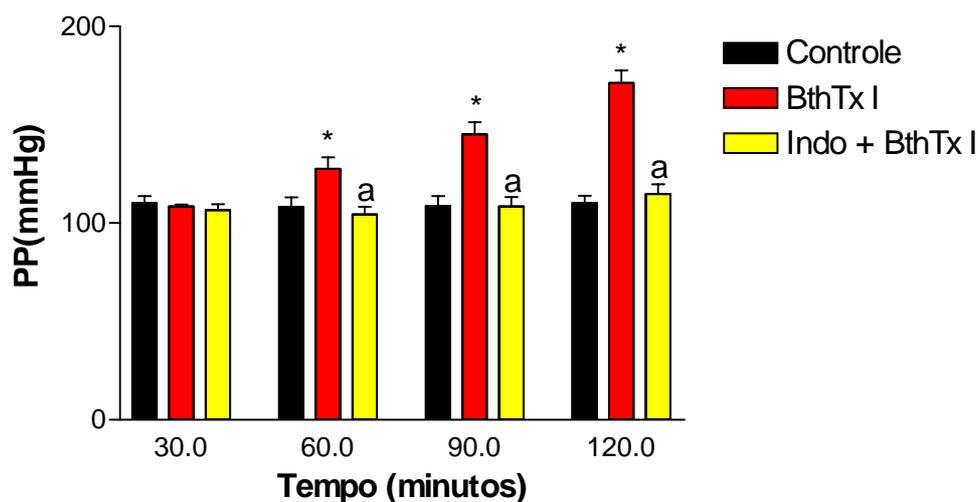
No parâmetro referente à excreção de sódio (ENa⁺) foi observado um aumento aos 60 minutos sendo estatisticamente significativo com relação ao controle, permanecendo até o final do experimento (Figura 21).

Foi observada um aumento na excreção de potássio (EK⁺) ocasionado pela BthTx I a partir dos 90 minutos, quando comparação ao controle (Figura 22).

Com relação à excreção de cloreto (ECl⁻), a BthTx I promoveu um aumento aos 120 minutos (Figura 23).

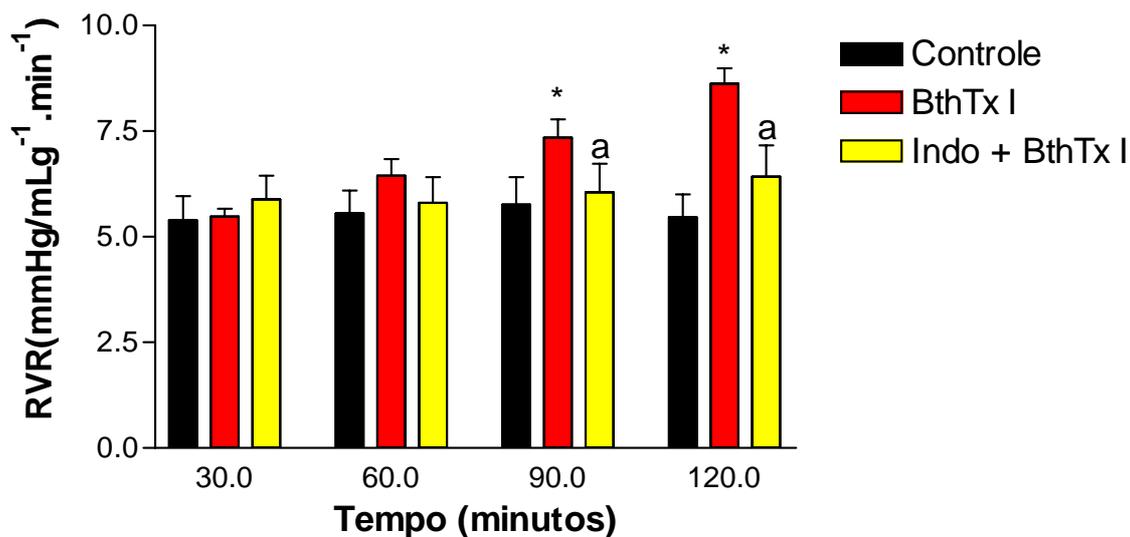
4.1.3 Miotoxina I purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) lisina 49 com indometacina

Indometacina, quando comparado ao grupo controle, reverteu todo os parâmetros alterado pela BthTxI exceto no percentual de potássio transportado. e percentual de transporte proximal de potássio. BthTx I com indometacina diminuiu estes transportes aos 90 minutos persistindo até o final do experimento (Figuras 16 e19) e foi observado um aumento na excreção de potássio no mesmo tempo (Figura 24).



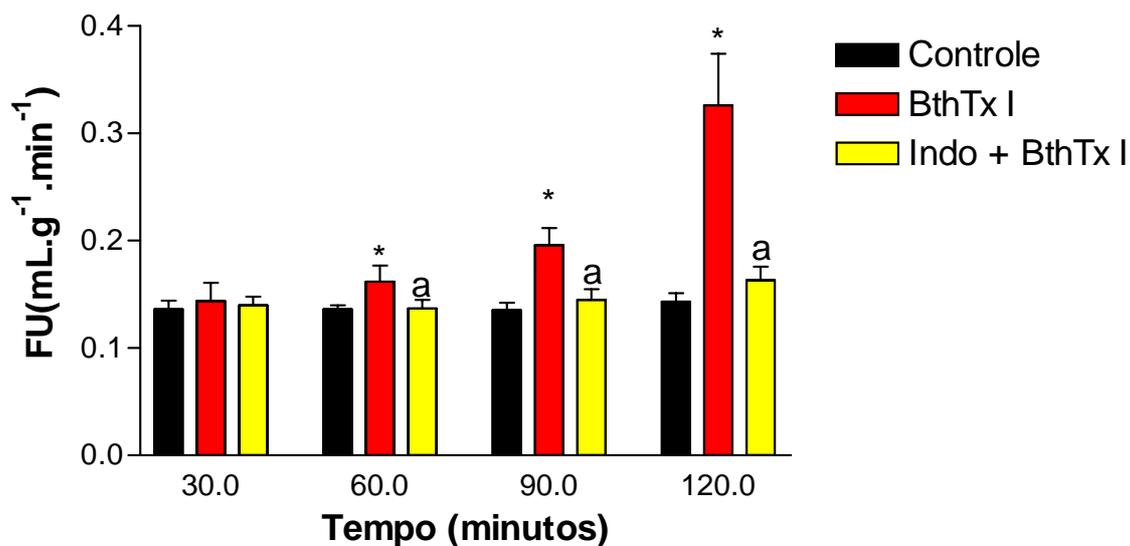
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	110,11 ± 3,7	108,40 ± 1,0	106,6 ± 2,9
60	108,27 ± 4,88	127,50 ± 5,9 *	104,4 ± 3,9 a
90	108,69 ± 5,09	145,10 ± 6,2 *	108,4 ± 4,9 a
120	110,28 ± 3,09	171,20 ± 6,3 *	114,7 ± 5,0 a

Figura 11 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



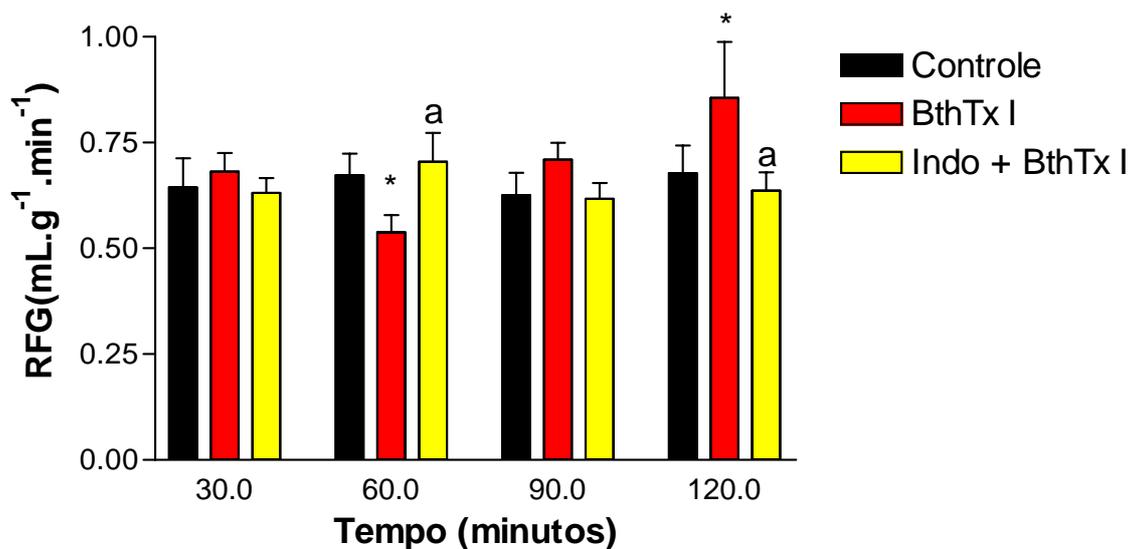
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	5,39 ± 0,57	5,48 ± 0,18	5,89 ± 0,56
60	5,56 ± 0,54	6,45 ± 0,39	5,80 ± 0,61
90	5,76 ± 0,65	7,35 ± 0,43 *	6,05 ± 0,68 a
120	5,46 ± 0,54	8,62 ± 0,37 *	6,42 ± 0,74 a

Figura 12 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



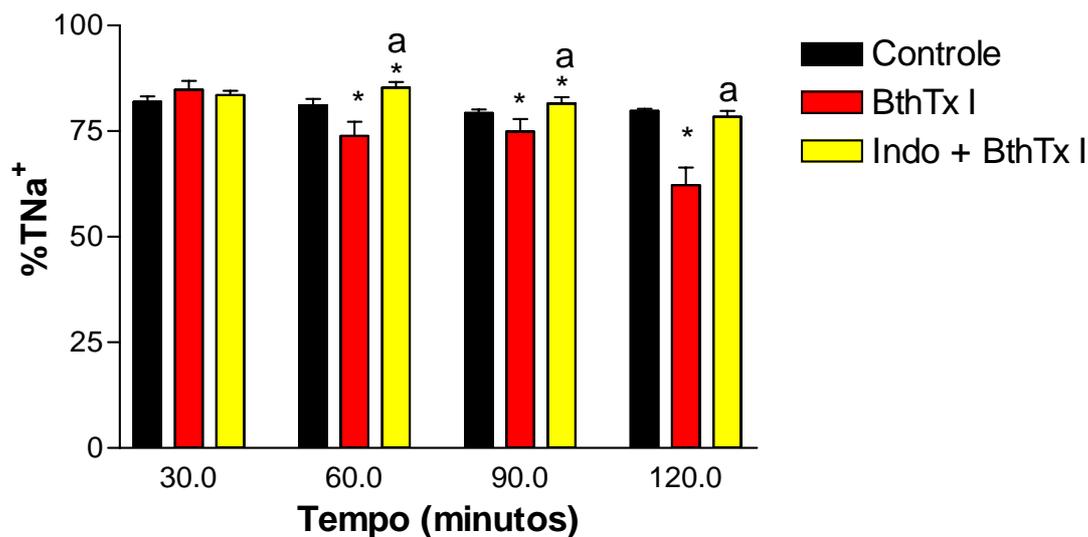
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	0,136 ± 0,008	0,144 ± 0,017	0,140 ± 0,008
60	0,136 ± 0,004	0,162 ± 0,015 *	0,137 ± 0,008
90	0,135 ± 0,007	0,196 ± 0,016 *	0,145 ± 0,010
120	0,143 ± 0,008	0,326 ± 0,048 *	0,163 ± 0,013

Figura 13 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



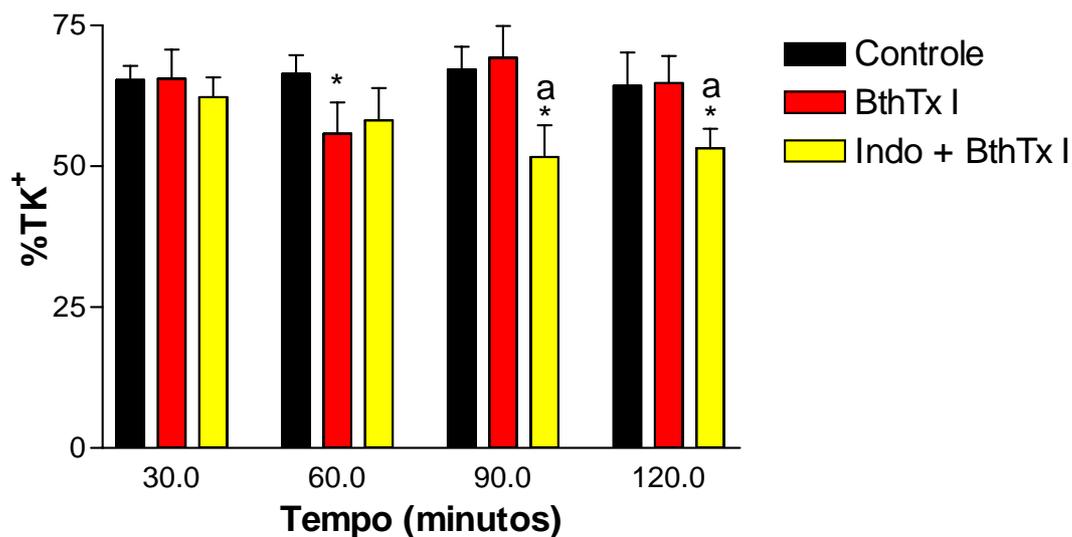
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	0,644 ± 0,069	0,681 ± 0,044	0,631 ± 0,035
60	0,673 ± 0,051	0,538 ± 0,041 *	0,705 ± 0,068 a
90	0,625 ± 0,054	0,710 ± 0,040	0,617 ± 0,038
120	0,678 ± 0,065	0,855 ± 0,133 *	0,636 ± 0,044 a

Figura 14 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e BthTx I + indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



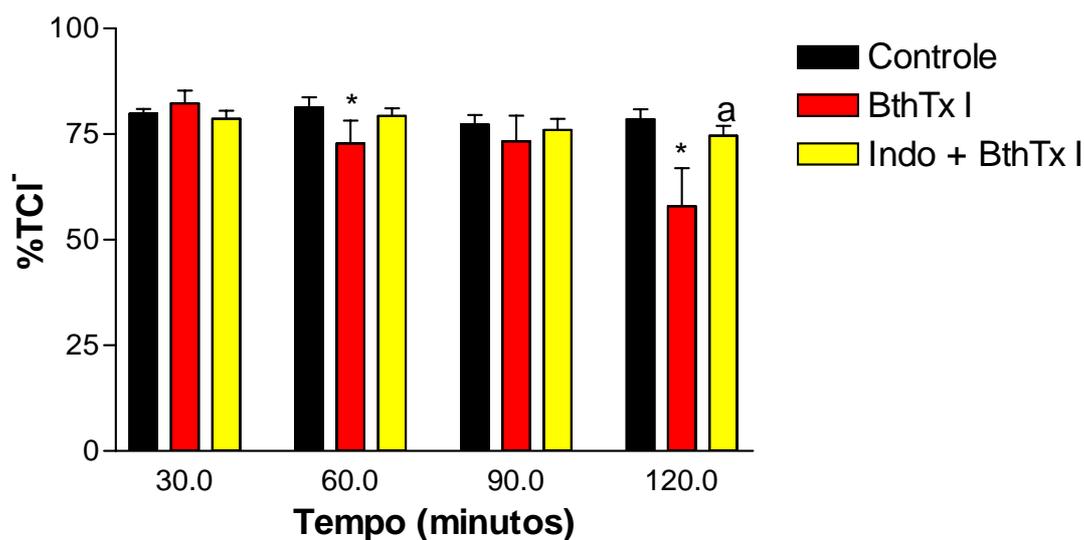
Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	81,94 ± 1,24	84,75 ± 2,75	83,51 ± 1,01
60	81,11 ± 1,52	73,88 ± 3,3 *	85,30 ± 1,36 * a
90	79,26 ± 0,90	74,84 ± 3,04 *	81,53 ± 1,54 * a
120	79,76 ± 0,56	62,23 ± 4,12 *	78,38 ± 1,41 a

Figura 15 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no percentual de sódio transportado (%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



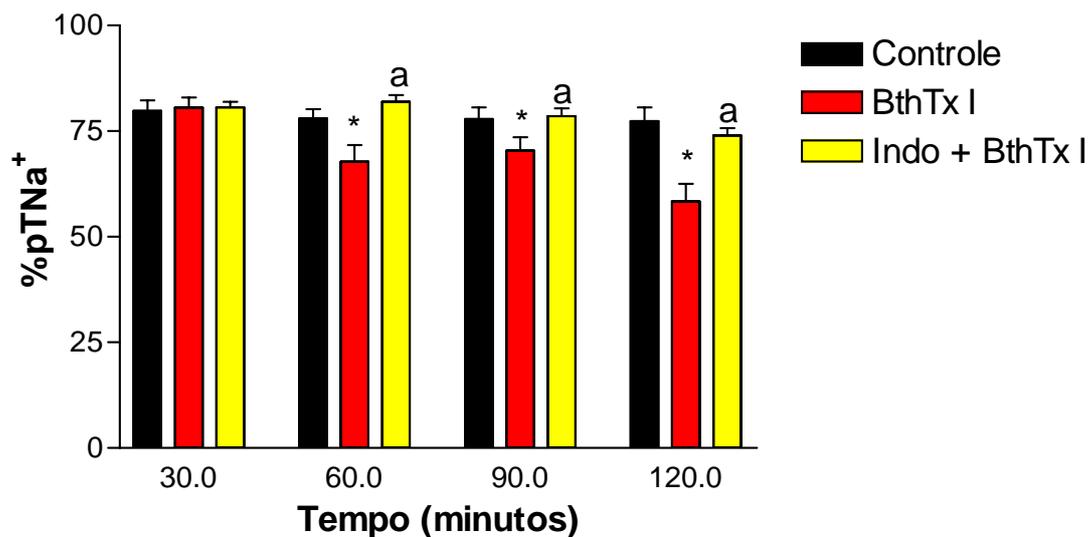
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	65,36 ± 2,47	65,55 ± 5,19	62,30 ± 3,47
60	66,38 ± 3,31	55,79 ± 5,57 *	58,16 ± 5,76
90	67,20 ± 4,04	69,26 ± 5,65	51,64 ± 5,61 *a
120	64,28 ± 5,93	64,78 ± 4,79	53,20 ± 3,45 *a

Figura 16 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no percentual de potássio transportado (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



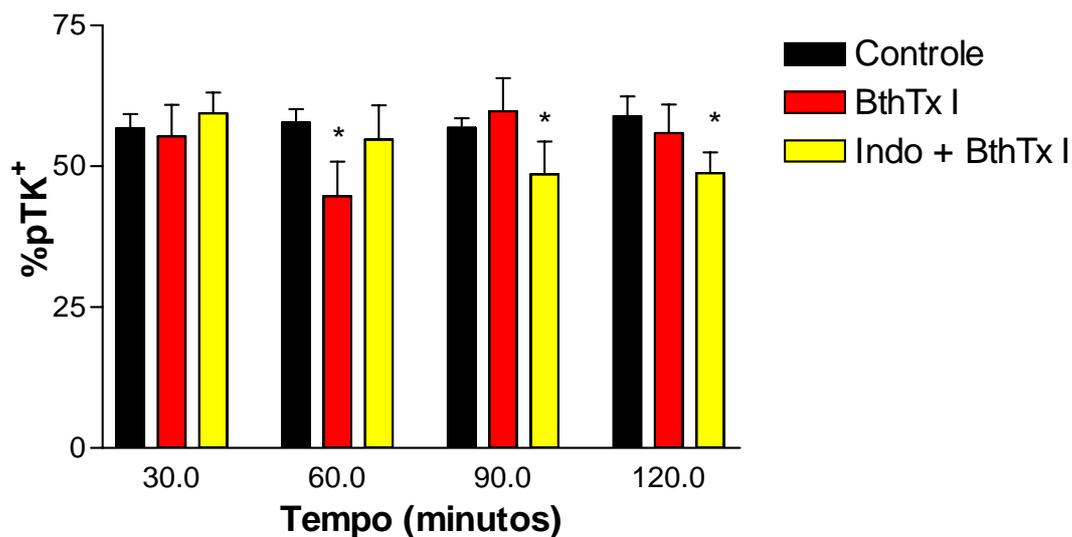
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	79,90 ± 1,03	82,26 ± 3,01	78,63 ± 1,87
60	81,25 ± 2,44	72,81 ± 5,37 *	79,39 ± 1,84
90	77,32 ± 2,22	73,26 ± 6,13	75,97 ± 2,67
120	78,53 ± 2,33	57,94 ± 9,02 *	74,66 ± 2,30 a

Figura 17 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no percentual de cloreto transportado (%TCl⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



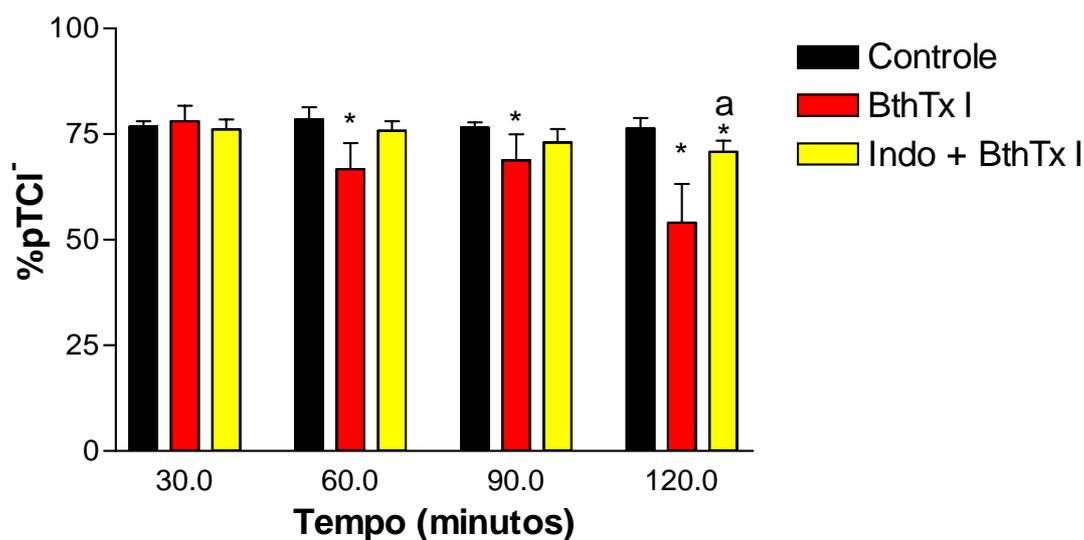
Tempo (minutos)	controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	79,82 ± 2,47	80,57 ± 2,40	80,61 ± 1,33
60	77,97 ± 2,24	67,79 ± 3,92 *	81,95 ± 1,62 a
90	77,90 ± 2,69	70,38 ± 3,15 *	78,51 ± 1,85 a
120	77,41 ± 3,24	58,34 ± 4,22 *	73,97 ± 1,76 a

Figura 18 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



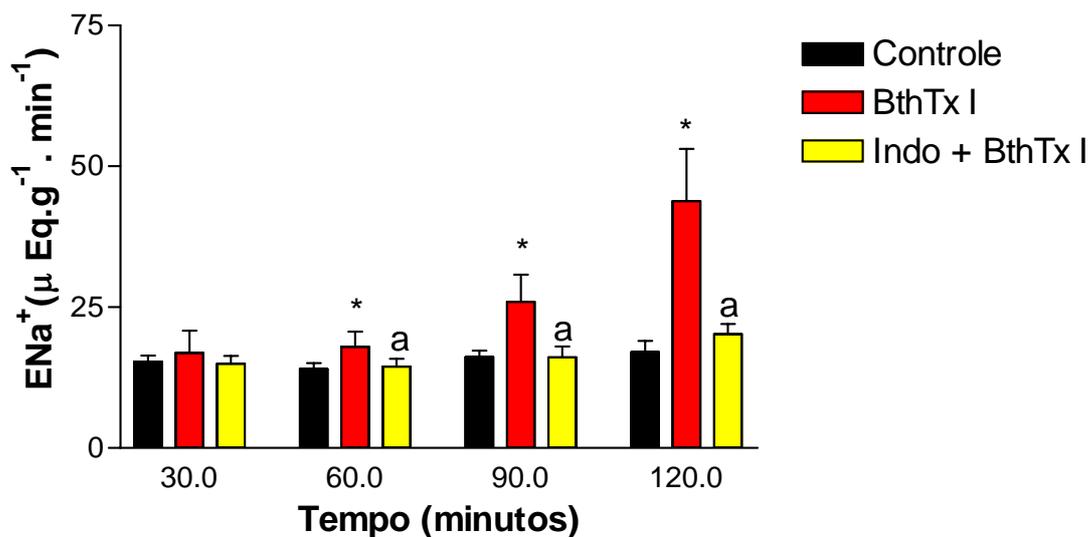
Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	56,77 ± 2,50	55,36 ± 5,54	59,40 ± 3,69
60	57,75 ± 2,39	44,70 ± 6,15 *	54,81 ± 6,02
90	56,84 ± 1,67	59,80 ± 5,87	48,62 ± 5,80 *
120	58,92 ± 3,49	55,89 ± 5,05	48,79 ± 3,65 *

Figura 19 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



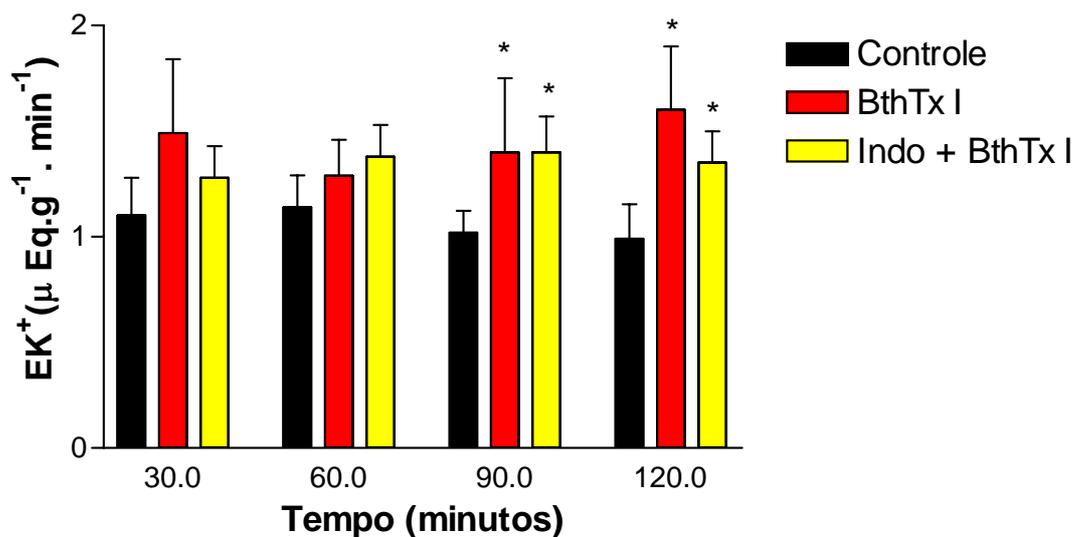
Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	76,81 ± 1,25	78,08 ± 3,65	76,13 ± 2,35
60	78,49 ± 2,90	66,72 ± 6,15 *	75,79 ± 2,21
90	76,58 ± 1,20	68,80 ± 6,15 *	73,04 ± 3,18
120	76,36 ± 2,40	54,05 ± 9,13 *	70,75 ± 2,96 *a

Figura 20 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx I no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



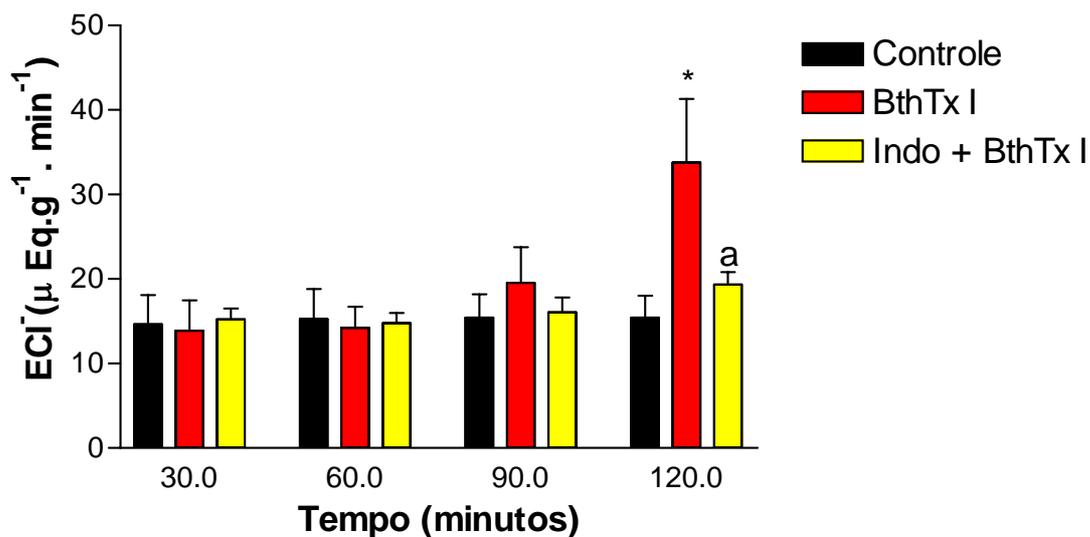
Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	15,34 ± 1,07	16,91 ± 3,92	14,95 ± 1,37
60	14,01 ± 1,10	17,95 ± 2,69 *	14,49 ± 1,33 a
90	16,13 ± 1,13	25,98 ± 4,83 *	16,12 ± 1,89 a
120	17,05 ± 1,99	43,83 ± 9,26 *	20,24 ± 1,79 a

Figura 21 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BthTx I no sódio excretado (ENa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entres os grupos tratados com *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	1,10 ± 0,18	1,49 ± 0,35	1,28 ± 0,15
60	1,14 ± 0,15	1,29 ± 0,17	1,38 ± 0,15
90	1,02 ± 0,10	1,40 ± 0,35 *	1,40 ± 0,17 *
120	0,99 ± 0,17	1,60 ± 0,30 *	1,35 ± 0,15 *

Figura 22 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 $\mu\text{g/mL}$) e indometacina (indo) (10 $\mu\text{g/mL}$) + BthTx I no potássio excretado (EK^+). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.



Tempo (minutos)	Controle	BthTx I	Indometacina + BthTx I
30	14,65 ± 3,45	13,89 ± 3,58	15,24 ± 1,30
60	15,28 ± 3,52	4,21 ± 2,51	14,79 ± 1,18
90	15,44 ± 2,75	19,56 ± 4,19	16,07 ± 1,74
120	15,42 ± 2,61	33,77 ± 7,54 *	19,35 ± 1,48 a

Figura 23 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx I) (05 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BthTx I no cloreto excretado (ECI). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx I) e indometacina (indo) + BthTx I.

4.1.4 Miotoxina II purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) ácido aspártico 49

A miotoxina II apresentou um aumento significativo na pressão de perfusão (PP) a partir dos 60 minutos, até o final do experimento (Figura 24).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR) causado pela BthTx II, foi observado um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (Figura 25).

BthTx II aumentou significativamente o fluxo urinário (FU) aos 90 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 26).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuiu aos 60 minutos e aumentou com esta toxina aos 90 e 120 minutos, quando comparado com o grupo controle (Figura 27).

O efeito causado pela BthTx II no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) foi uma diminuição significativa em relação ao grupo controle aos 60 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 28).

No percentual do transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) houve uma diminuição neste transporte quando comparado com o grupo controle aos 60, 90 e 120 minutos (Figura 29).

Observou-se uma diminuição significativa no transporte tubular de potássio (%TK⁺) somente aos 60 minutos, retornando aos parâmetros normais aos 90 e 120 minutos (Figura 30).

Foi observado, logo aos 60 minutos, uma diminuição bastante significativa no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) desta miotoxina permanecendo até o final do experimento (Figura 31).

Com relação aos efeitos produzidos pela BthTx II no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) observou-se uma diminuição deste transporte com relação ao grupo controle aos 60 minutos permanecendo até o final do experimento (Figura 32).

No percentual do transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻), a BthTx II apresentou uma queda significativa, que se inicia aos 60 minutos persistindo até o final do experimento (Figura 33).

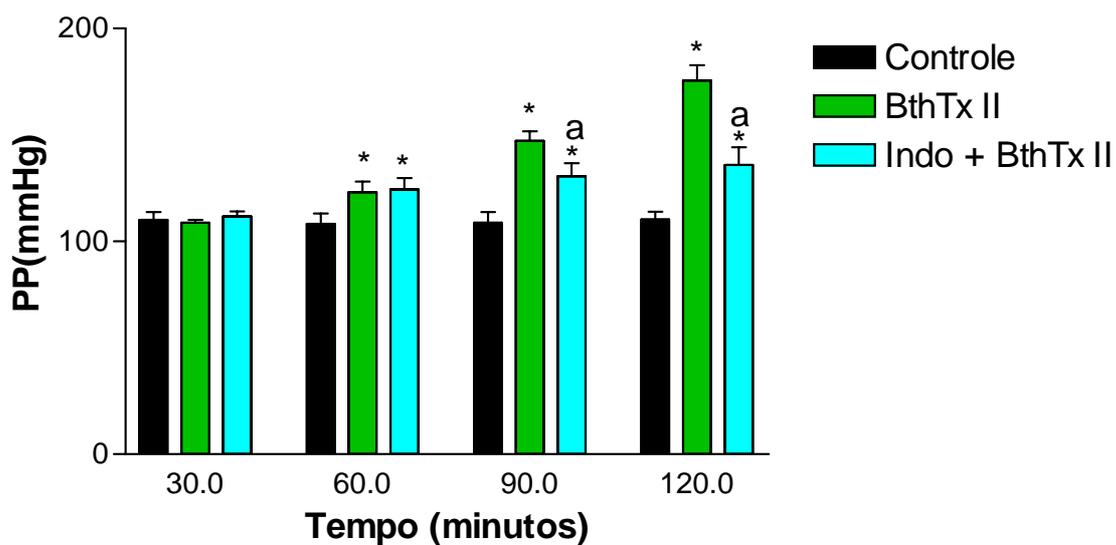
Na excreção de sódio (ENa⁺) o aumento desta miotoxina foi significativo, quando comparado com o grupo controle, aos 90 minutos persistindo até o final do experimento (Figura 34).

A excreção de potássio (EK^+) está aumentada aos 90 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 35).

Na excreção de cloreto (ECl^-), observou-se um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (Figura 36).

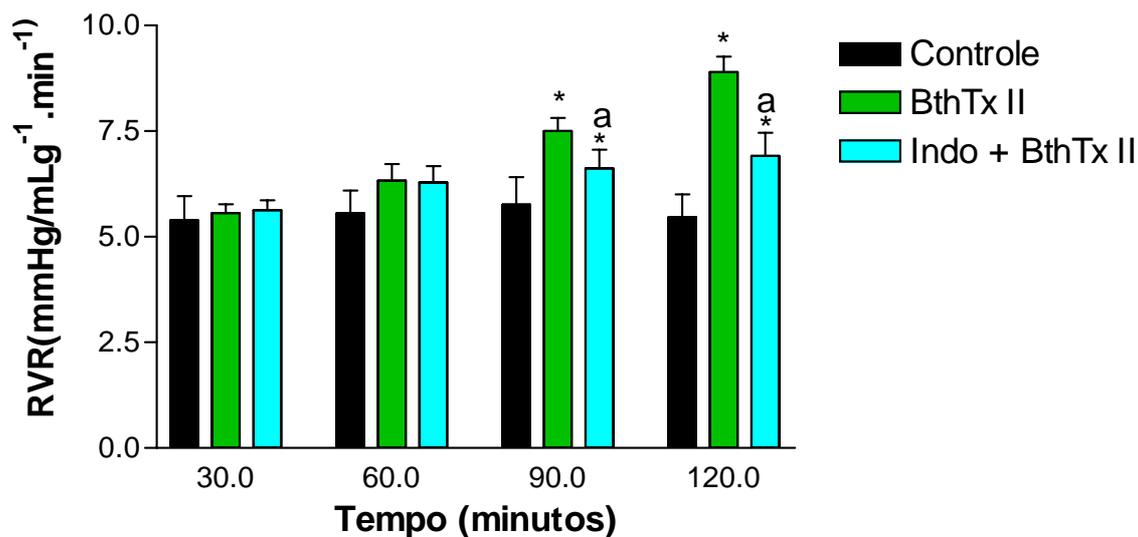
4.1.5 Miotoxina II purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) ácido aspártico 49 com indometacina

A indometacina conseguiu reverter os efeitos causados pela BthTx II, quando comparado ao grupo controle, no ritmo de filtração glomerular (RFG) (Figura 27), transporte tubular de sódio ($\%TNa^+$) e no percentual do transporte tubular proximal de sódio ($\%pTNa^+$). (Figuras 28 e 31).



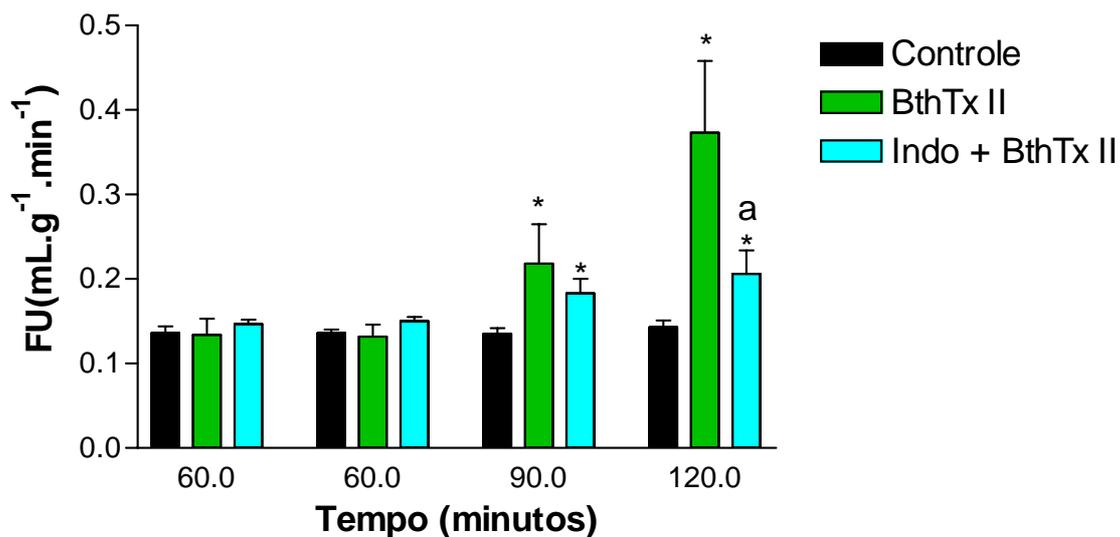
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	110,11 ± 3,7	108,70 ± 1,30	111,70 ± 2,4
60	108,27 ± 4,88	123,10 ± 4,9 *	124,40 ± 5,3 *
90	108,69 ± 5,09	147,30 ± 4,5 *	130,60 ± 6,1 *a
120	110,28 ± 3,09	175,50 ± 7,20 *	135,90 ± 8,40 *a

Figura 24 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



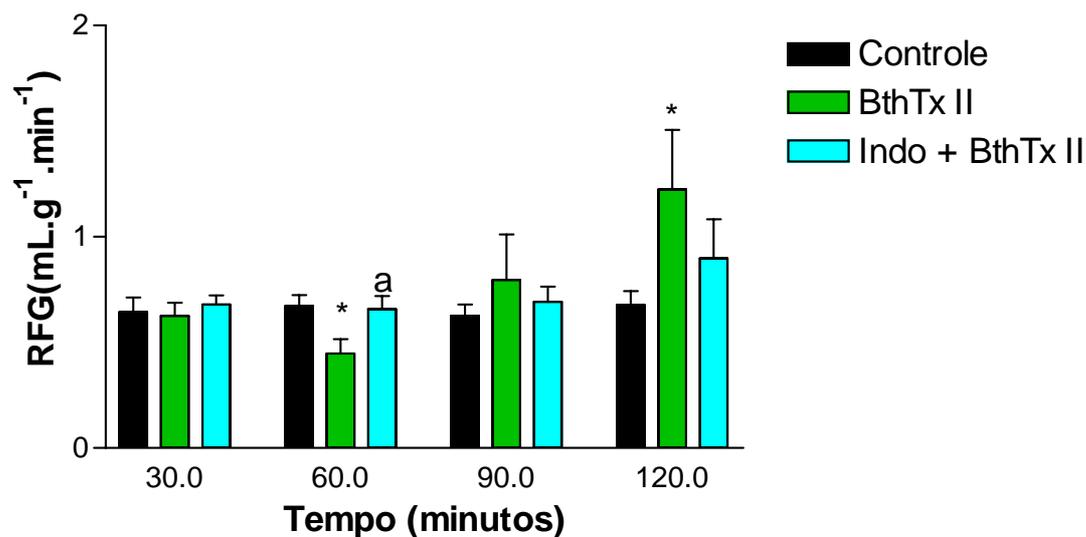
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	5,39 ± 0,57	5,56 ± 0,21	5,63 ± 0,23
60	5,56 ± 0,54	6,30 ± 0,39	6,29 ± 0,38
90	5,76 ± 0,65	7,50 ± 0,31 *	6,62 ± 0,44 *a
120	5,46 ± 0,54	8,90 ± 0,36 *	6,91 ± 0,55 *a

Figura 25 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



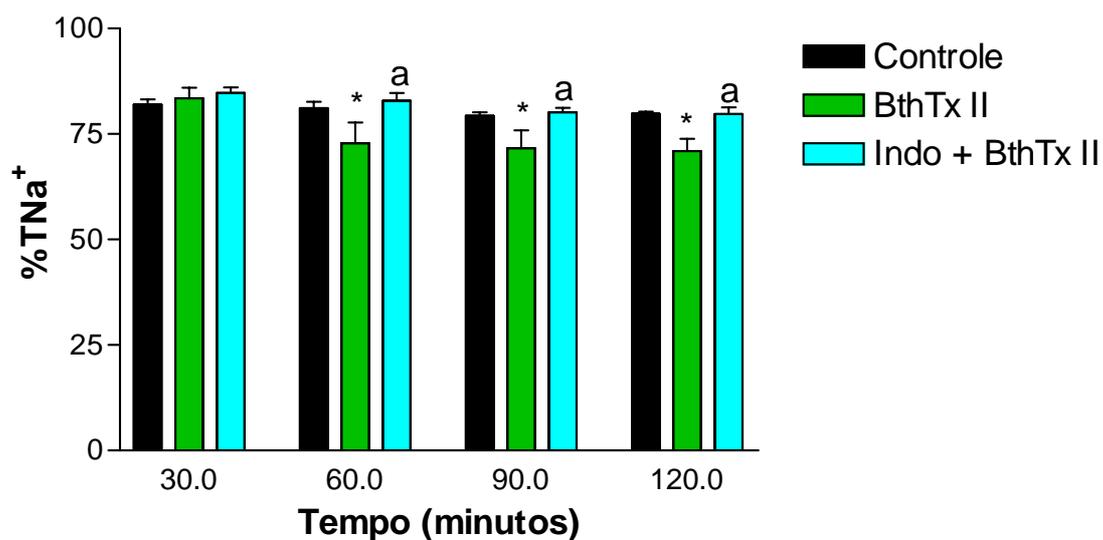
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	0,136 ± 0,008	0,134 ± 0,019	0,147 ± 0,005
60	0,136 ± 0,004	0,132 ± 0,014	0,150 ± 0,005
90	0,135 ± 0,007	0,218 ± 0,047 *	0,183 ± 0,017 *
120	0,143 ± 0,008	0,373 ± 0,085 *	0,206 ± 0,028 *a

Figura 26 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupostratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



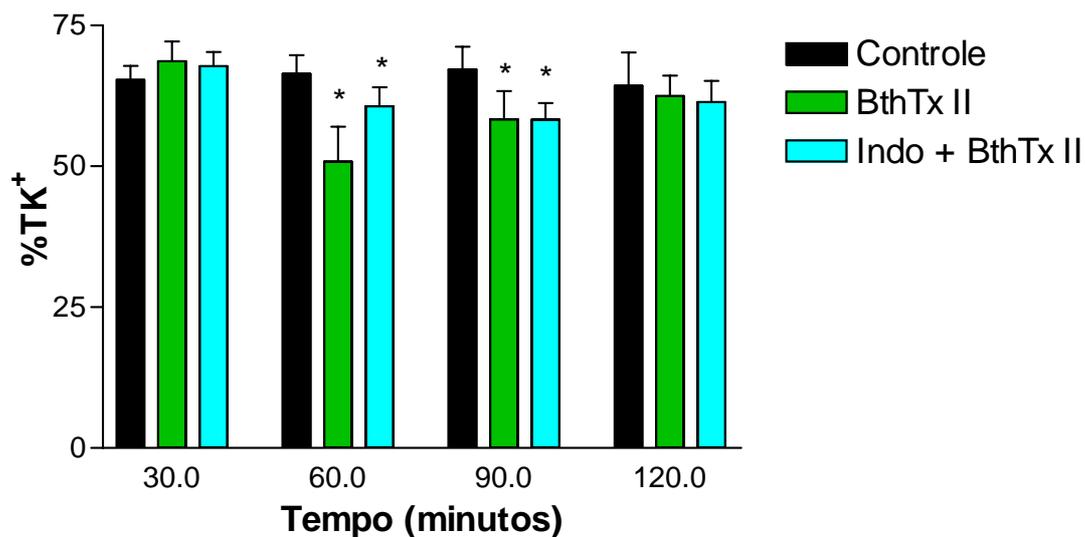
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	0,644 ± 0,069	0,625 ± 0,063	0,679 ± 0,044
60	0,673 ± 0,051	0,448 ± 0,068 *	0,658 ± 0,062 a
90	0,625 ± 0,054	0,795 ± 0,216	0,693 ± 0,072
120	0,678 ± 0,065	1,224 ± 0,282 *	0,897 ± 0,186

Figura 27 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



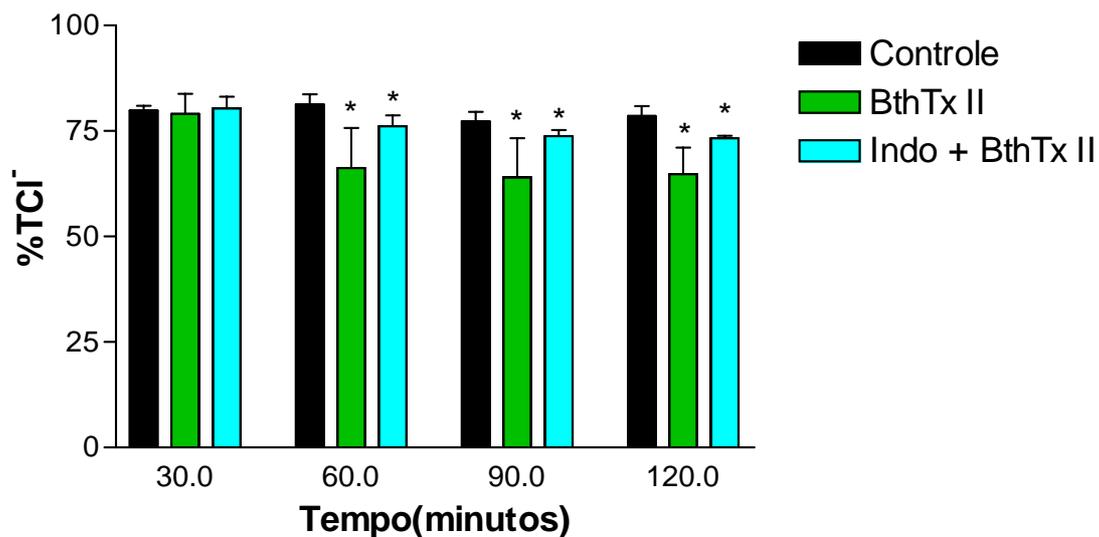
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	81,94 ± 1,24	83,44 ± 2,52	84,72 ± 1,36
60	81,11 ± 1,52	72,82 ± 4,87 *	82,90 ± 1,77 a
90	79,26 ± 0,90	71,63 ± 4,26 *	80,13 ± 1,04 a
120	79,76 ± 0,56	70,96 ± 2,93 *	79,72 ± 1,61 a

Figura 28 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de sódio transportado(%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



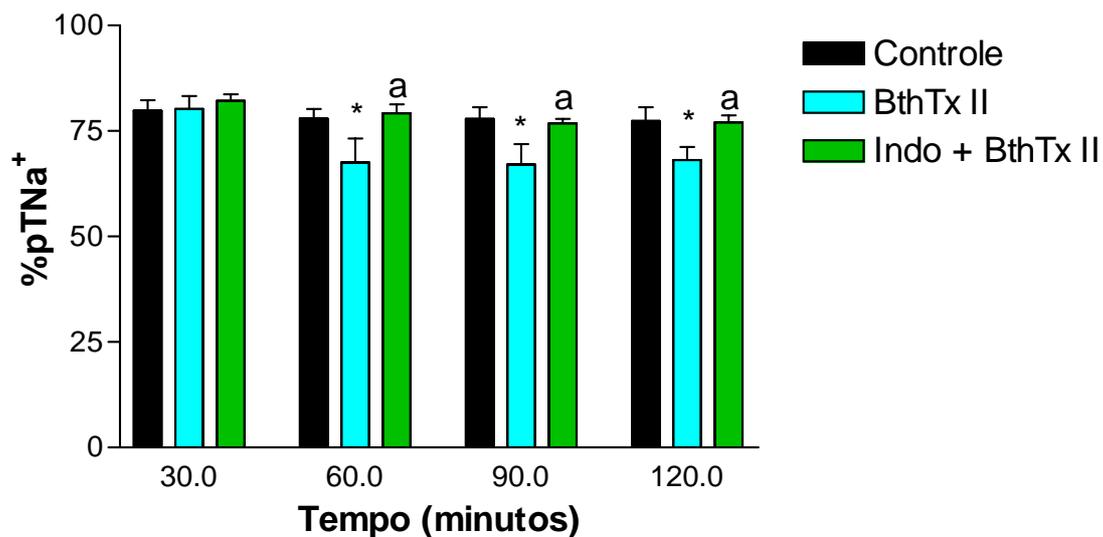
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	65,36 ± 2,47	68,68 ± 3,50	67,80 ± 2,48
60	66,38 ± 3,31	50,86 ± 6,16 *	60,63 ± 3,38 *
90	67,20 ± 4,04	58,34 ± 4,98 *	58,31 ± 2,91 *
120	64,28 ± 5,93	62,44 ± 3,67	61,41 ± 3,77

Figura 29 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de potássio transportado (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



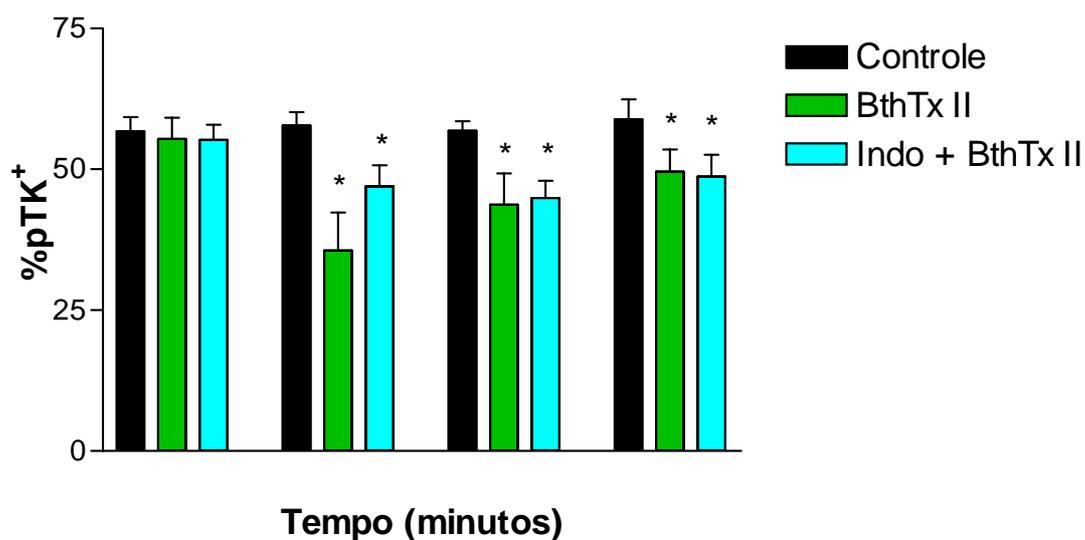
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	79,90 ± 1,03	79,01 ± 4,77	80,38 ± 2,78
60	81,25 ± 2,44	66,23 ± 9,44 *	76,16 ± 2,53 *
90	77,32 ± 2,22	64,00 ± 9,32 *	73,83 ± 1,37 *
120	78,53 ± 2,33	64,75 ± 6,33 *	73,26 ± 0,60 *

Figura 30 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de cloreto transportado (%TCl⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



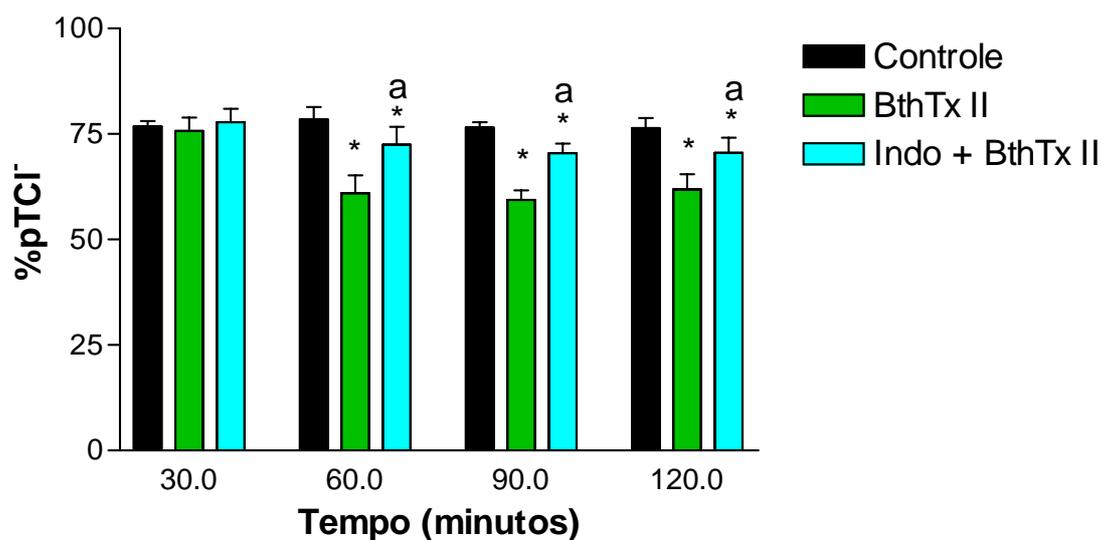
Tempo (minutos)	controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	79,82 ± 2,47	80,17 ± 3,16	82,16 ± 1,56
60	77,97 ± 2,24	67,54 ± 5,96 *	79,21 ± 2,12 a
90	77,90 ± 2,69	67,01 ± 4,85 *	76,75 ± 1,15 a
120	77,41 ± 3,24	68,11 ± 3,07 *	77,02 ± 1,72 a

Figura 31 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



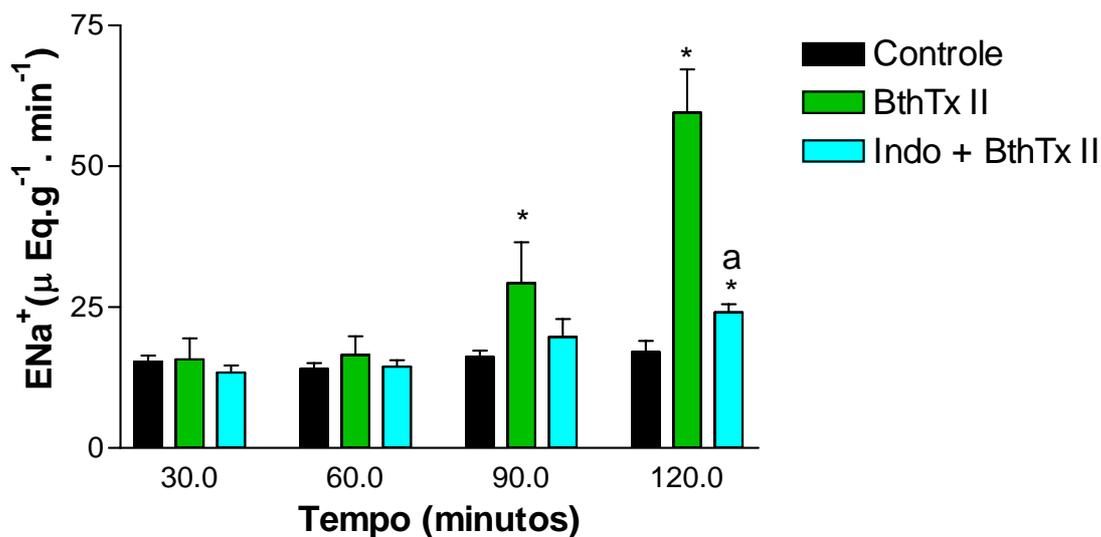
Tempo (minutos)	Controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	56,77 ± 2,50	55,40 ± 3,75	55,24 ± 2,69
60	57,75 ± 2,39	35,58 ± 6,77 *	46,94 ± 3,75 *
90	56,84 ± 1,67	43,72 ± 5,57 *	44,93 ± 3,01 *
120	58,92 ± 3,49	49,60 ± 3,92 *	48,71 ± 3,86 *

Figura 32 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



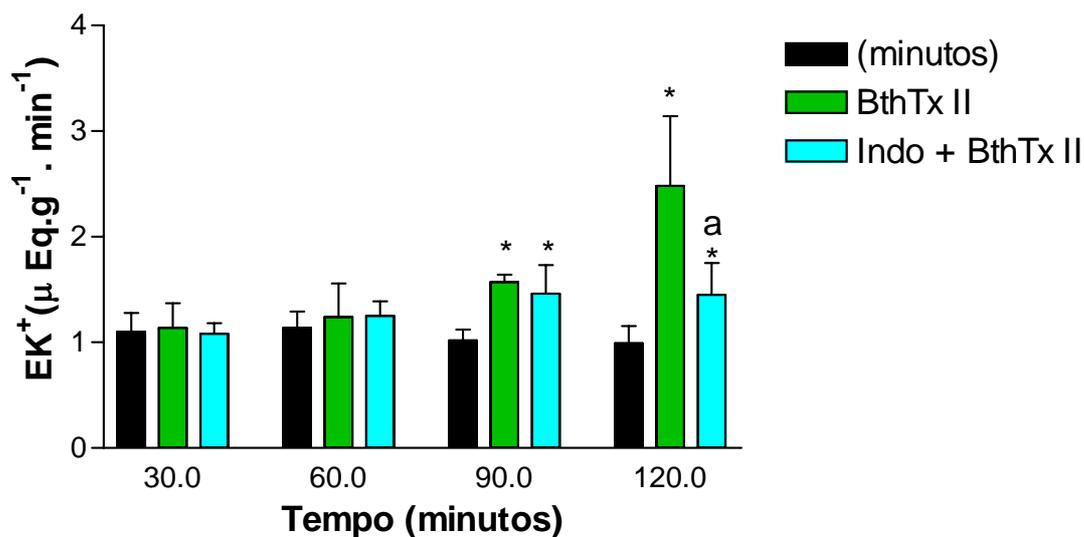
Tempo (minutos)	Controle	BthTx II	Indometacina+BthTx II
30	76,81 ± 1,25	75,74 ± 3,13	77,82 ± 3,13
60	78,49 ± 2,90	60,95 ± 4,27 *	72,47 ± 4,27 *a
90	76,58 ± 1,20	59,37 ± 2,29 *	70,45 ± 2,29 *a
120	76,36 ± 2,40	61,90 ± 3,53 *	70,58 ± 3,53 *a

Figura 33 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina I I purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BthTx II no percentual de transport proximal de cloreto (%pTCI). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



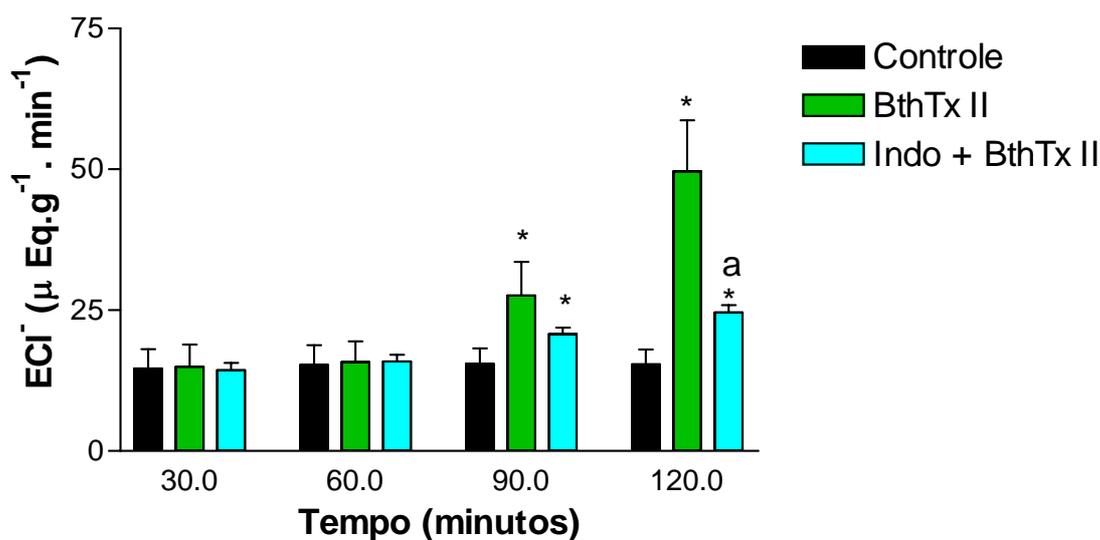
Tempo (minutos)	Controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	15,34 ± 1,07	15,69 ± 3,80	13,42 ± 1,22
60	14,01 ± 1,10	16,53 ± 3,30	14,46 ± 1,14
90	16,13 ± 1,13	29,30 ± 7,20 *	19,69 ± 1,17 *
120	17,05 ± 1,99	59,50 ± 7,70 *	24,11 ± 1,40 *

Figura 34 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BthTx II no sódio excretado (ENa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



Tempo (minutos)	Controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	1,10 ± 0,18	1,14 ± 0,23	1,08 ± 0,10
60	1,14 ± 0,15	1,24 ± 0,32 *	1,25 ± 0,14 *
90	1,02 ± 0,10	1,57 ± 0,07 *	1,46 ± 0,27 *
120	0,99 ± 0,17	2,48 ± 0,66 *	1,45 ± 0,30 *a

Figura 35 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 $\mu\text{g/mL}$) e indometacina (indo) (10 $\mu\text{g/mL}$) + BthTx II no potássio excretado (EK^+). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.



Tempo (minutos)	Controle	BthTx II	Indometacina + BthTx II
30	14,65 ± 3,45	14,94 ± 3,99	14,36 ± 1,30
60	15,28 ± 3,52	15,81 ± 3,68	15,93 ± 1,16
90	15,44 ± 2,75	27,58 ± 6,02 *	20,75 ± 1,17 *
120	15,42 ± 2,61	49,65 ± 9,04 *	24,62 ± 1,28 *a

Figura 36 – Efeitos renais promovidos pela miotoxina II purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BthTx II) (05 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BthTx II no cloreto excretado (ECI⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre *Bothrops jararacussu* (BthTx II) e indometacina (indo) + BthTx II.

4.1.6 Tezosentan antagonista de receptor de endotelina

O tezosentan apresentou uma diminuição significativa na pressão de perfusão (PP) há partir 60 minutos, até o final do experimento (Figura 37).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), tezosentan causou uma diminuição aos 90 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 38).

Tezosentan não alterou significativamente o fluxo urinário (FU) (Figura 39).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) aumentou significativamente, quando comparado com o grupo controle aos 60 minutos e 120 minutos com o tezosentan (Figura 40).

O efeito causado pelo tezosentan no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) foi um aumento significativo em relação ao grupo controle aos 90 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 41).

O percentual do transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) aumentou aos 60, 90 e 120 minutos (Figura 42).

Observou-se um aumento significativo no transporte tubular de potássio (%TK⁺) a partir dos 60 minutos, permanecendo até o final do experimento. (Figura 42).

Foi observado, logo aos 60 minutos, um aumento significativo do tezosentan no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) aos 60 minutos e 90 minutos (Figura 45).

Com relação aos efeitos produzidos pelo tezosentan no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) observou-se um aumento deste transporte com relação ao grupo controle aos 120 minutos (Figura 43).

Quando foi relacionado ao grupo controle no percentual do transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻), o tezosentan apresentou um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (Figura 46).

Na excreção do sódio (ENa⁺). Foi observado um aumento significativo provocado pelo tezosentan aos 60 minutos, retornando em seguida aos parâmetros normais (Figura 47).

A excreção de potássio (EK⁺) está diminuída aos 90 minutos e aos 120 minutos, quando comparado ao controle (Figura 48).

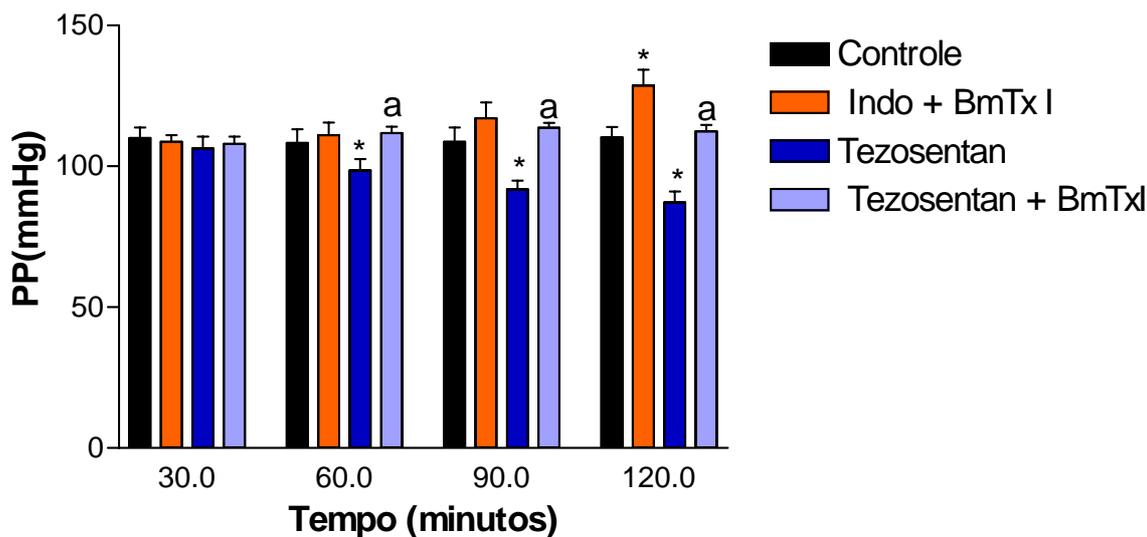
Na excreção de cloreto (ECl⁻), não foi observado nenhuma alteração significativa deste parâmetro quando comparado com o grupo controle (Figura 49).

4.1.7 Miotoxina I purificada da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) lisina 49 com indometacina

BmTxI alterou todos os parâmetros renais (BARBOSA et al., 2002). Indometacina bloqueia alterações observadas no ritmo de filtração glomerular (RFG) e no percentual de transporte tubular de sódio, causado pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* quando comparado com o grupo controle (Figuras 42 e 44).

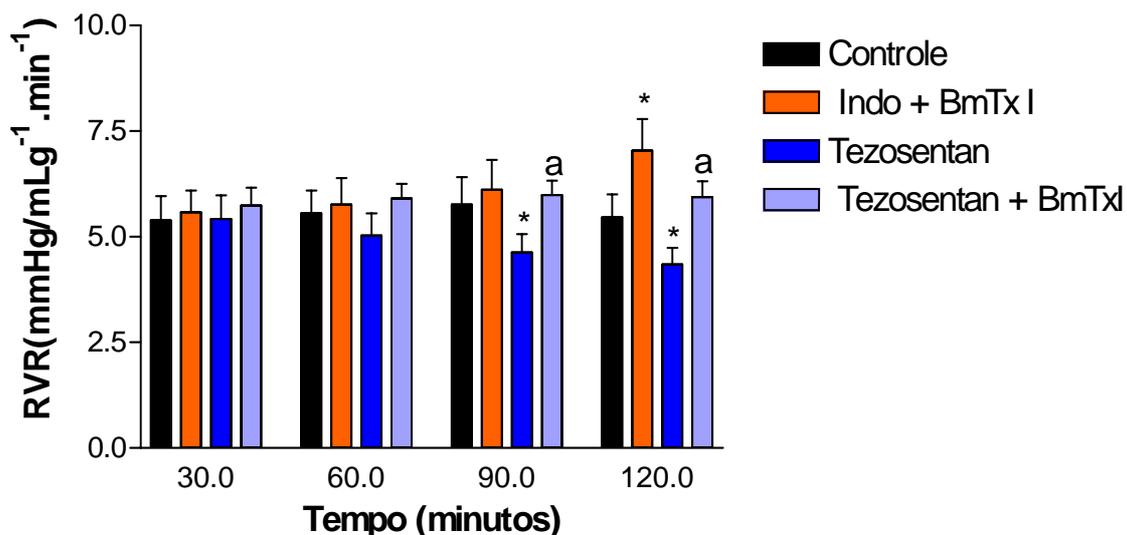
4.1.8 Miotoxina I purificada da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) lisina 49 com tezosentan

Tezosentan bloqueia todos os efeitos causados pela miotoxina I da *Bothrops moojeni* além de provocar uma inversão nos parâmetros de ritmo de filtração glomerular (RFG) (Figura 40) e fluxo urinário (FU) (Figura 39), apresentando uma diminuição de ambos, enquanto que nas excreções de sódio potássio e cloro, foi observado uma diminuição dos efeitos. Contrastando com o observado em BmTx I (Figuras 47, 48 e 49).



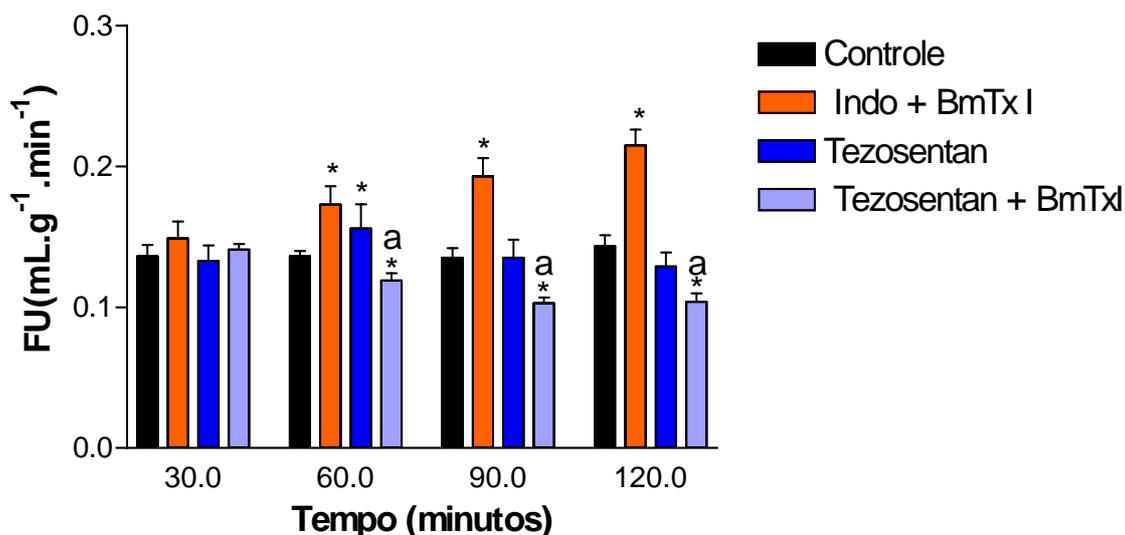
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	110,11 ± 3,7	108,70 ± 2,30	106,30 ± 4,3	107,90 ± 2,7
60	108,27 ± 4,88	111,00 ± 4,5	98,60 ± 4,0 *	111,80 ± 2,2 a
90	108,69 ± 5,09	117,10 ± 5,6	91,80 ± 3,1 *	113,70 ± 1,7 a
120	110,28 ± 3,09	128,70 ± 5,6 *	87,20 ± 3,8 *	112,40 ± 2,3 a

Figura 37 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



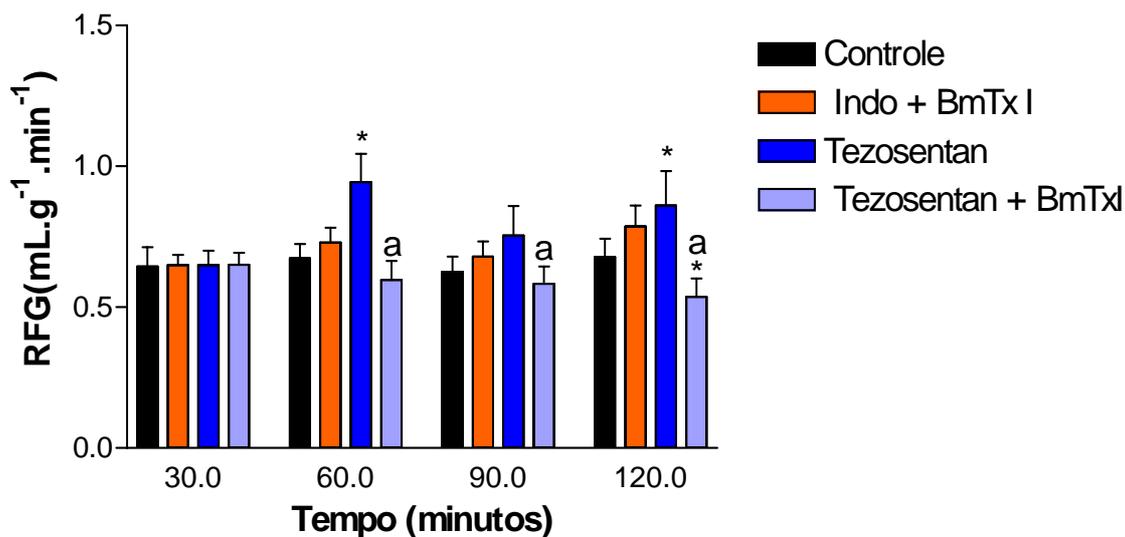
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	5,39 ± 0,57	5,58 ± 0,52	5,42 ± 0,56	5,74 ± 0,42
60	5,56 ± 0,54	5,76 ± 0,52	5,03 ± 0,52	5,90 ± 0,35
90	5,76 ± 0,65	6,11 ± 0,71	4,63 ± 0,43 *	5,99 ± 0,34 a
120	5,46 ± 0,54	7,04 ± 0,75 *	4,35 ± 0,39 *	5,94 ± 0,37 a

Figura 38 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupostratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a= comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



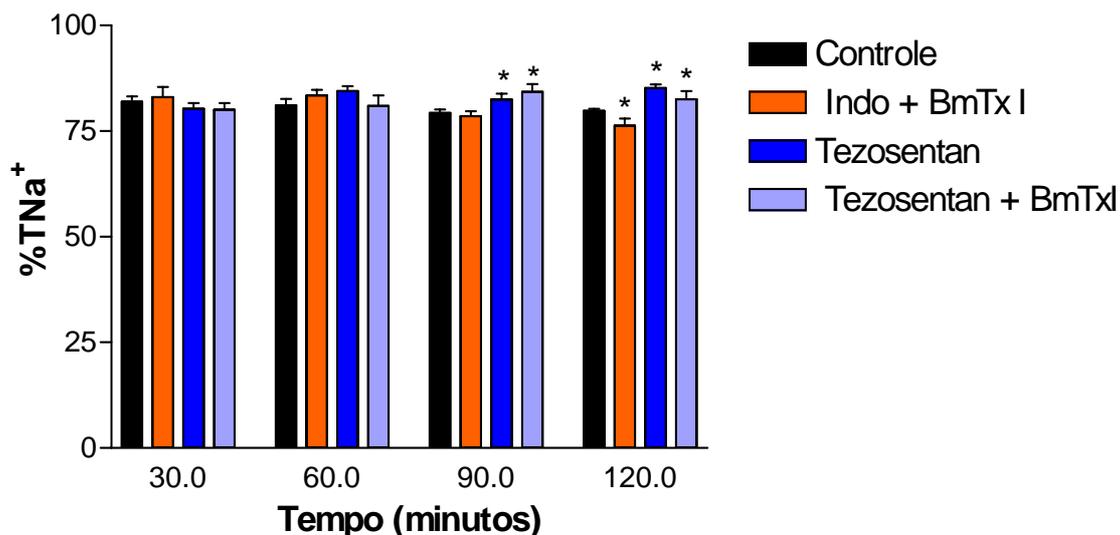
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	0,136 ± 0,008	0,149 ± 0,012	0,133 ± 0,011	0,141 ± 0,004
60	0,136 ± 0,004	0,173 ± 0,013 *	0,156 ± 0,017 *	0,119 ± 0,005 a
90	0,135 ± 0,007	0,193 ± 0,013 *	0,135 ± 0,013	0,103 ± 0,004 *a
120	0,143 ± 0,008	0,215 ± 0,011 *	0,129 ± 0,012	0,104 ± 0,006 *a

Figura 39 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 µg/mL) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 µg/mL), tezosentan (Tezos) (10 µg/mL) e tezosentan (10 µg/mL) + BmTx I (05 µg/mL) no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



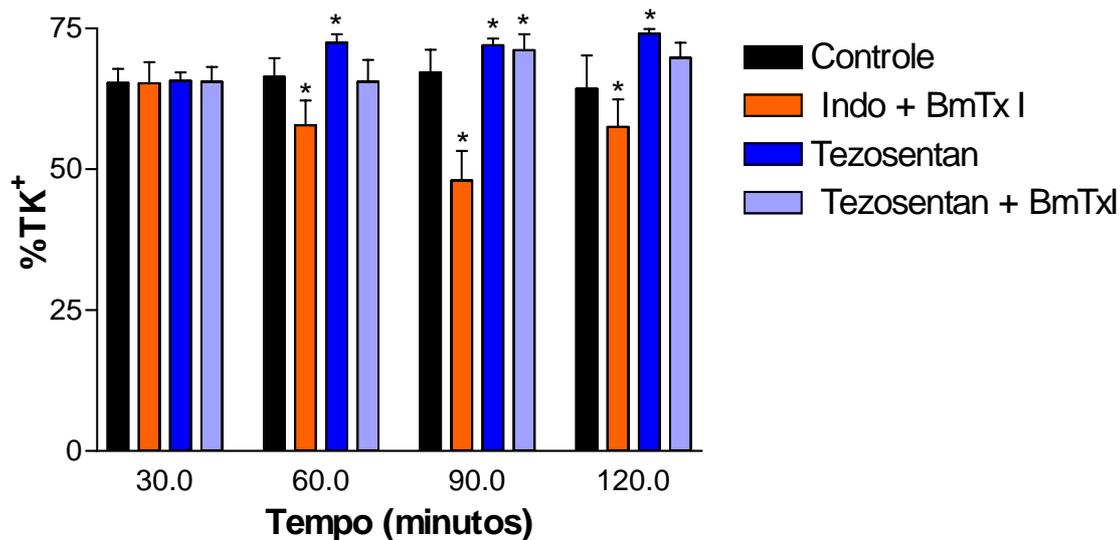
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	0,644 ± 0,069	0,650 ± 0,035	0,649 ± 0,052	0,651 ± 0,042
60	0,673 ± 0,051	0,729 ± 0,053	0,945 ± 0,099 *	0,597 ± 0,067 a
90	0,625 ± 0,054	0,679 ± 0,054	0,755 ± 0,104	0,583 ± 0,061 a
120	0,678 ± 0,065	0,787 ± 0,074	0,860 ± 0,123 *	0,537 ± 0,065 *a

Figura 40 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no ritmo filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



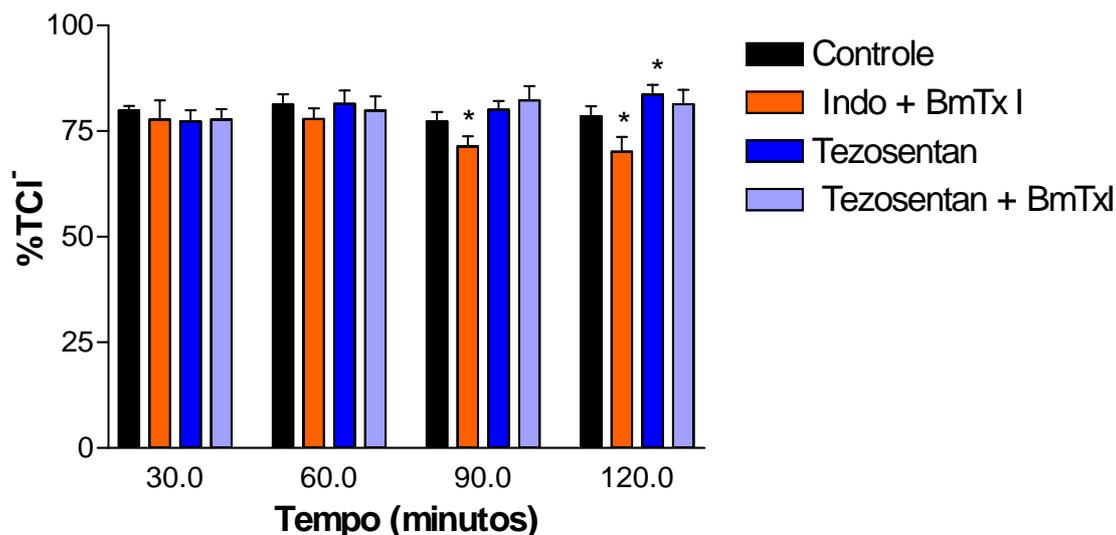
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	81,94 ± 1,24	83,05 ± 2,42	80,29 ± 1,37	80,07 ± 1,52
60	81,11 ± 1,52	83,43 ± 1,37	84,42 ± 1,21	80,98 ± 2,47
90	79,26 ± 0,90	78,53 ± 1,14	82,49 ± 1,38 *	84,31 ± 1,81 *
120	79,76 ± 0,56	76,25 ± 1,72 *	85,20 ± 0,83 *	82,56 ± 1,87 *

Figura 41 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 µg/mL) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 µg/mL), tezosentan (Tezos) (10 µg/mL) e tezosentan (10 µg/mL) + BmTx I (05 µg/mL) no percentual de sódio transportado (%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTxI.



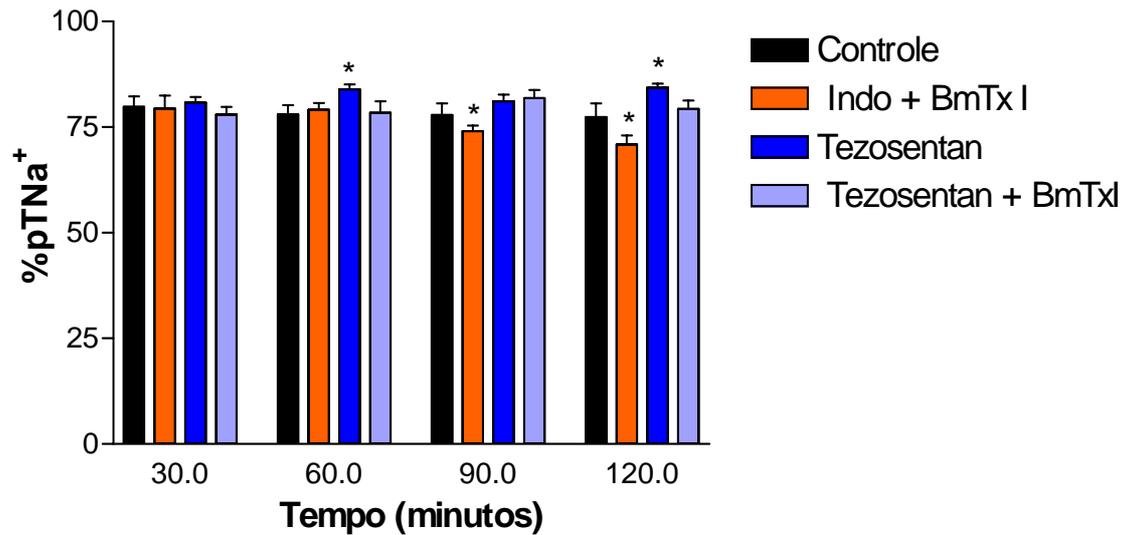
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	65,36 ± 2,47	65,29 ± 3,74	65,69 ± 1,50	65,51 ± 2,64
60	66,38 ± 3,31	57,82 ± 4,41 *	72,44 ± 1,54 *	65,56 ± 3,85
90	67,20 ± 4,04	48,03 ± 5,22 *	72,01 ± 1,19 *	71,17 ± 2,77 *
120	64,28 ± 5,93	57,56 ± 4,83 *	74,10 ± 0,79 *	69,81 ± 2,65

Figura 42 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 µg/mL) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 µg/mL), tezosentan (Tezos) (10 µg/mL) e tezosentan (10 µg/mL) + BmTx I (05 µg/mL) no percentual de potássio transportado (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



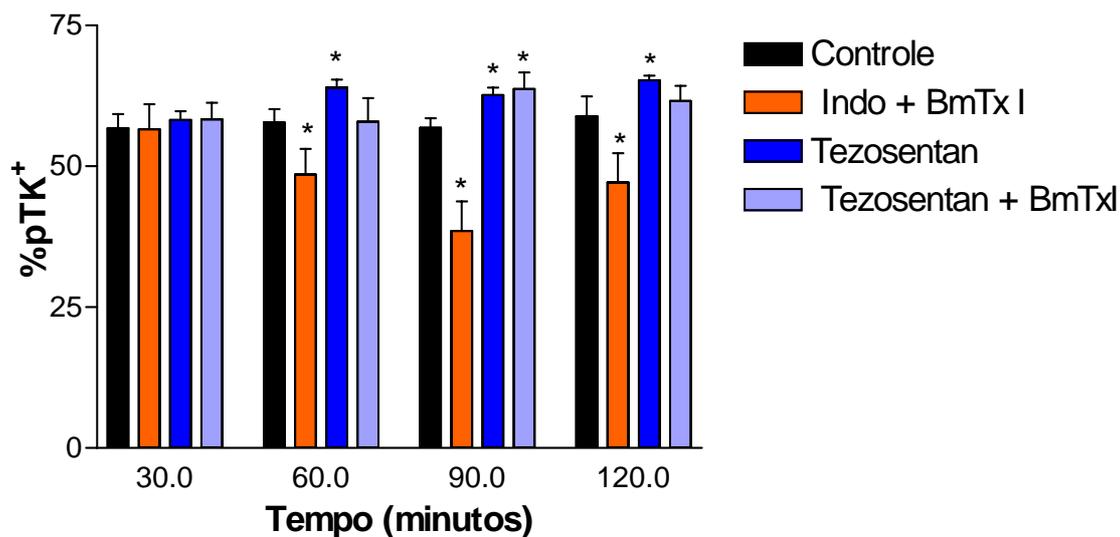
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	79,90 ± 1,03	77,67 ± 4,67	77,31 ± 2,65	77,70 ± 2,52
60	81,25 ± 2,44	77,86 ± 2,5	81,47 ± 3,15	79,90 ± 3,34
90	77,32 ± 2,22	71,40 ± 2,42 *	80,07 ± 2,08	82,27 ± 3,38
120	78,53 ± 2,33	70,13 ± 3,52 *	83,61 ± 2,32 *	81,38 ± 3,39

Figura 43 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no percentual de cloreto transportado (%TCI). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupostratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



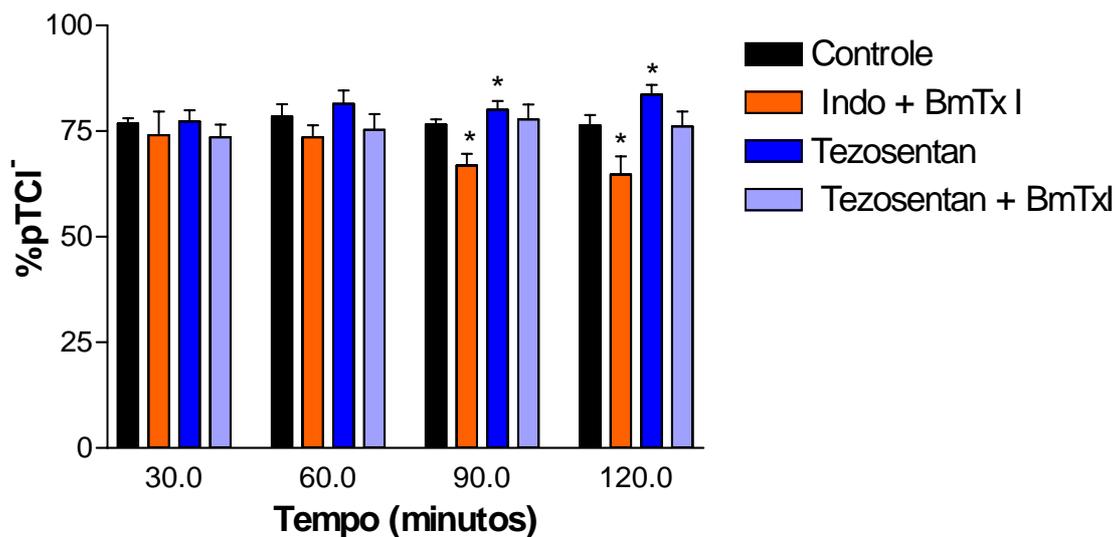
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	79,82 ± 2,47	79,38 ± 3,05	80,82 ± 1,29	77,93 ± 1,85
60	77,97 ± 2,24	79,11 ± 1,59	83,93 ± 1,16 *	78,34 ± 2,81
90	77,90 ± 2,69	74,01 ± 1,33 *	81,15 ± 1,54	81,85 ± 1,96
120	77,41 ± 3,24	70,86 ± 2,19 *	84,39 ± 0,91 *	79,33 ± 1,95

Figura 44 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no percentual de transporte proximal de sódio (pTNa⁺). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



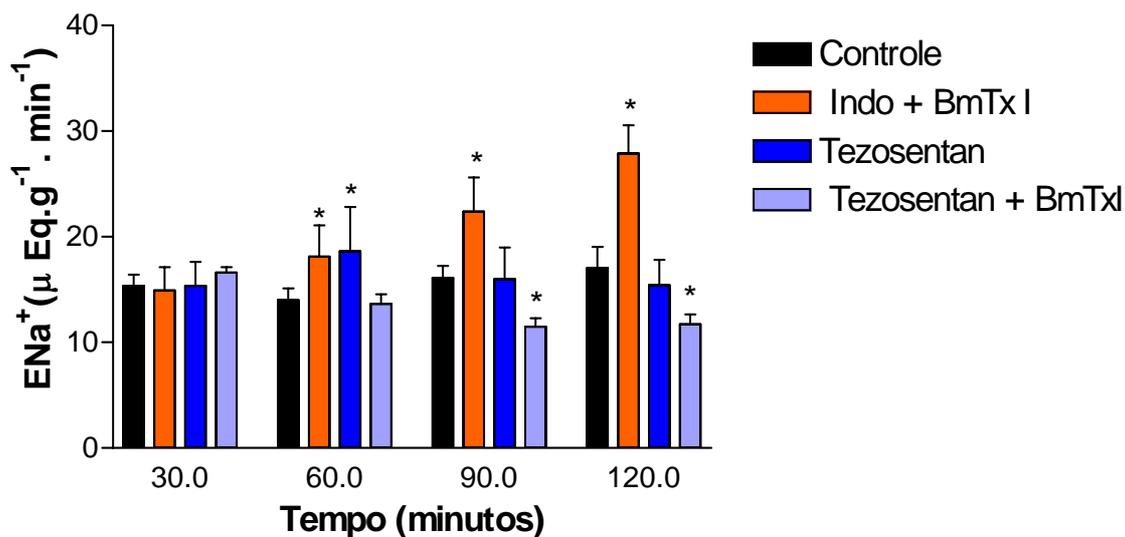
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	56,77 ± 2,50	56,62 ± 4,41	58,21 ± 1,59	58,37 ± 2,9
60	57,75 ± 2,39	48,50 ± 4,62 *	63,95 ± 1,48 *	57,91 ± 4,16
90	56,84 ± 1,67	38,51 ± 5,27 *	62,67 ± 1,30 *	63,72 ± 2,93 *
120	58,92 ± 3,49	47,16 ± 5,18 *	65,69 ± 0,83 *	61,57 ± 2,74

Figura 45 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 µg/mL) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 µg/mL), tezosentan (Tezos) (10 µg/mL) e tezosentan (10 µg/mL) + BmTx I (05 µg/mL) no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



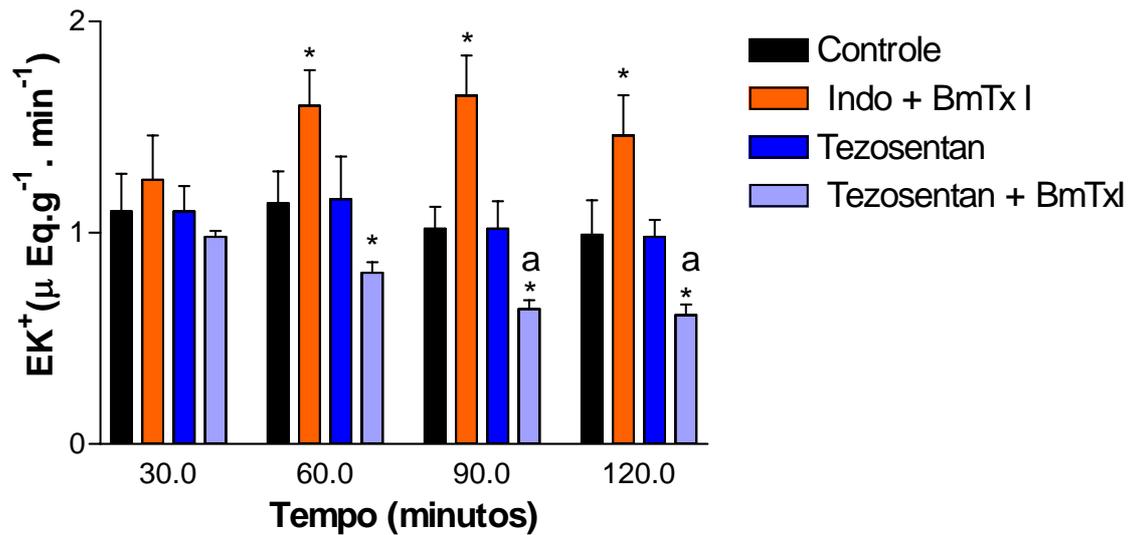
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	76,81 ± 1,25	74,02 ± 5,63	77,31 ± 2,65	73,56 ± 2,97
60	78,49 ± 2,90	73,53 ± 2,88 *	81,47 ± 3,15 *	75,25 ± 3,77
90	76,58 ± 1,20	66,88 ± 2,78 *	80,07 ± 2,08 *	77,82 ± 3,5
120	76,36 ± 2,40	64,74 ± 4,29	83,61 ± 2,32	76,15 ± 3,47

Figura 46 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 µg/mL) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 µg/mL), tezosentan (Tezos) (10 µg/mL) e tezosentan (10 µg/mL) + BmTx I (05 µg/mL) no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



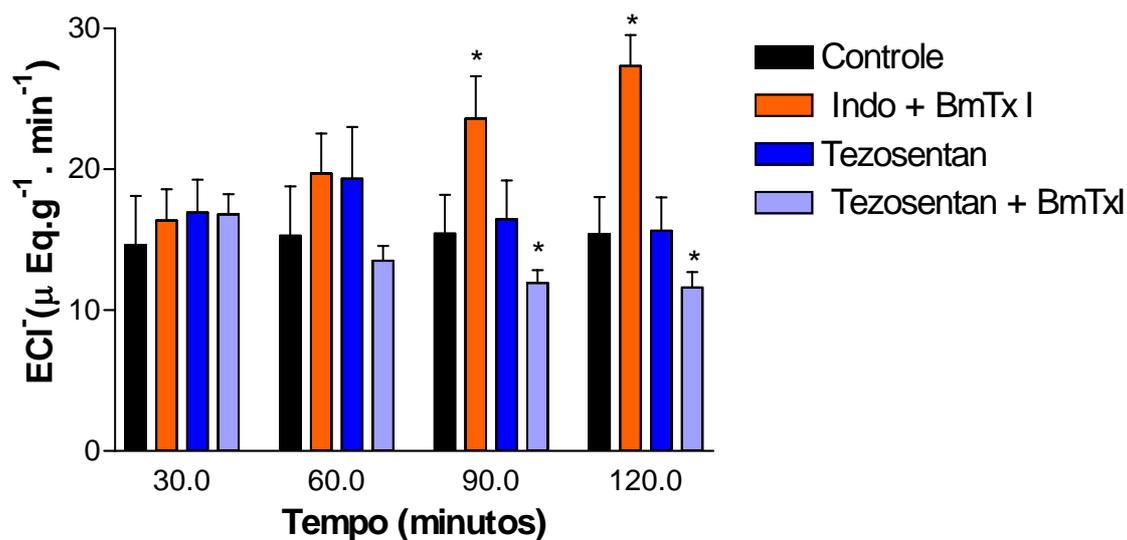
Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	15,34 ± 1,07	14,91 ± 2,22	15,34 ± 2,26	16,63 ± 0,50
60	14,01 ± 1,10	18,13 ± 2,96 *	18,60 ± 4,21 *	13,64 ± 0,92
90	16,13 ± 1,13	22,37 ± 3,23 *	15,99 ± 2,98	11,48 ± 0,82 *
120	17,05 ± 1,99	27,87 ± 2,67 *	15,41 ± 2,40	11,72 ± 0,94 *

Figura 47 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no sódio excretado (ENa^+). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



Tempo (min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	1,10 ± 0,18	1,25 ± 0,21	1,10 ± 0,12	0,98 ± 0,03
60	1,14 ± 0,15	1,60 ± 0,17 *	1,16 ± 0,20	0,81 ± 0,05 *
90	1,02 ± 0,10	1,65 ± 0,19 *	1,02 ± 0,13	0,64 ± 0,04 *a
120	0,99 ± 0,17	1,46 ± 0,19 *	0,98 ± 0,08	0,61 ± 0,05 *a

Figura 48 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no potássio excretado (EK^+). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre tezosentan e tezosentan + BmTx I.



Tempo(min)	Controle	Indo + BmTx I	Tezosentan	Tezos + BmTx I
30	14,65 ± 3,45	16,35 ± 2,24	16,94 ± 2,31	16,81 ± 1,42
60	15,28 ± 3,52	19,70 ± 2,83	19,34 ± 3,68	13,51 ± 1,04
90	15,44 ± 2,75	23,62 ± 2,99 *	16,46 ± 2,75	11,93 ± 0,91 *
120	15,42 ± 2,61	27,34 ± 2,19 *	15,65 ± 2,37	11,60 ± 1,10 *

Figura 49 – Efeitos renais promovidos pela indometacina (indo) (10 $\mu\text{g/mL}$) e miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTx I) (05 $\mu\text{g/mL}$), tezosentan (Tezos) (10 $\mu\text{g/mL}$) e tezosentan (10 $\mu\text{g/mL}$) + BmTx I (05 $\mu\text{g/mL}$) no cloreto excretado (ECI). Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$)

4.1.9 Lectina purificada da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec)

A lectina apresentou um aumento significativo na pressão de perfusão (PP) aos 60 minutos, permaneceu aumentada até o final do experimento (Figura 50).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), Bmlec causou um aumento aos 60 minutos, permanecendo até o final do experimento (Figura 51).

BmLec aumentou significativamente, quando comparado ao grupo controle, o fluxo urinário (FU) aos 90 e 120 minutos (Figura 52)

O ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuiu aos 60 minutos e aumentou com esta lectina aos 90 e 120 minutos, quando comparado com o grupo controle (Figura 53).

O efeito causado pela BmLec no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) foi uma diminuição significativa aos 60 minutos, retornando aos parâmetros normais a partir do 90 minutos (Figura 54).

No percentual do transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) houve uma diminuição neste transporte quando comparado com o grupo controle aos 60 minutos, retornando ao parâmetro normais aos 90 minutos (Figura 57).

Observou-se uma diminuição significativa no transporte tubular de potássio (%TK⁺) somente aos 60 minutos, retornando aos parâmetro normais aos 90 e 120 minutos (Figura 55).

Foi observado, logo aos 60 minutos, uma diminuição bastante significativa no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) desta lectina (Figura 58).

Com relação aos efeitos produzidos pela BmLec no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl) observou-se uma diminuição deste transporte com relação ao grupo controle aos 60 minutos retornado aos parâmetros normais. (Figura 56).

Quando foi relacionado ao grupo controle no percentual do transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl), a BmLec apresentou uma queda significativa, somente aos 60 minutos (Figura 59).

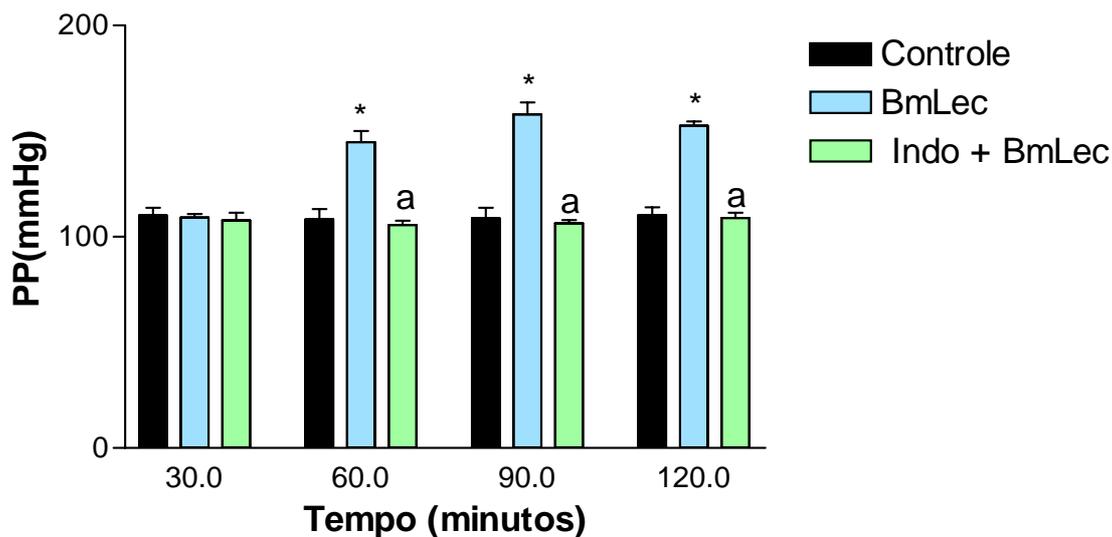
Na excreção do sódio (ENa⁺) foi observado aumento significativo provocado pela lectina, quando comparado com o grupo controle, aos 90 minutos persistindo até o final experimento (Figura 60).

A excreção de potássio (EK⁺) está diminuída aos 60 minutos e aumentada aos 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (Figura 61).

Na excreção de cloro (ECI^-), observou-se um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (Figura 62).

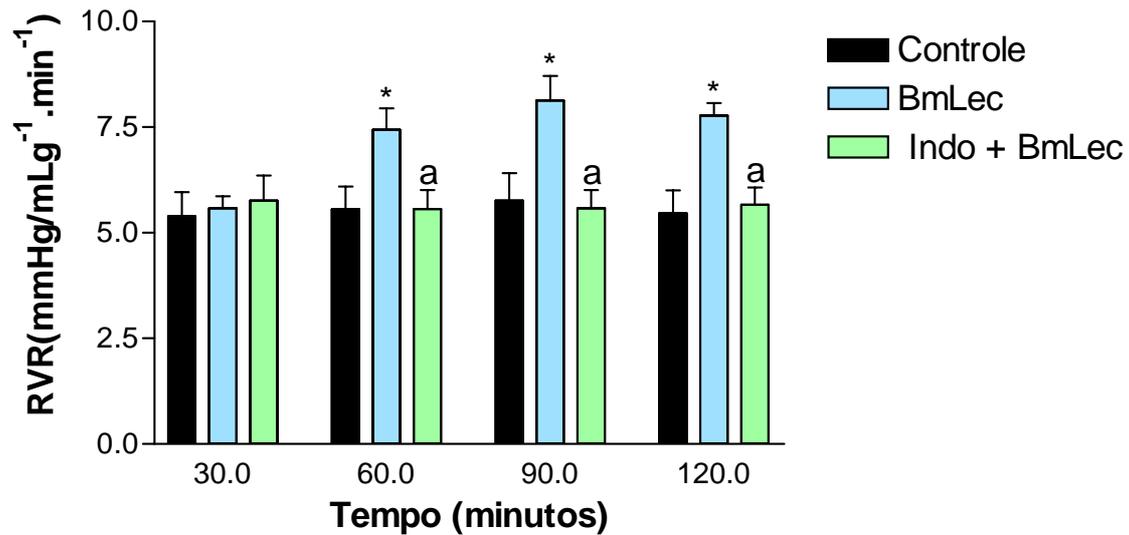
4.1.10 Lectina purificada da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) com indometacina

Indometacina bloqueou todos os parâmetros causados pela lectina purificada do veneno da *Bothrops moojeni* exceto o percentual do transporte proximal de potássio e cloreto. (Figuras 58 e 59).



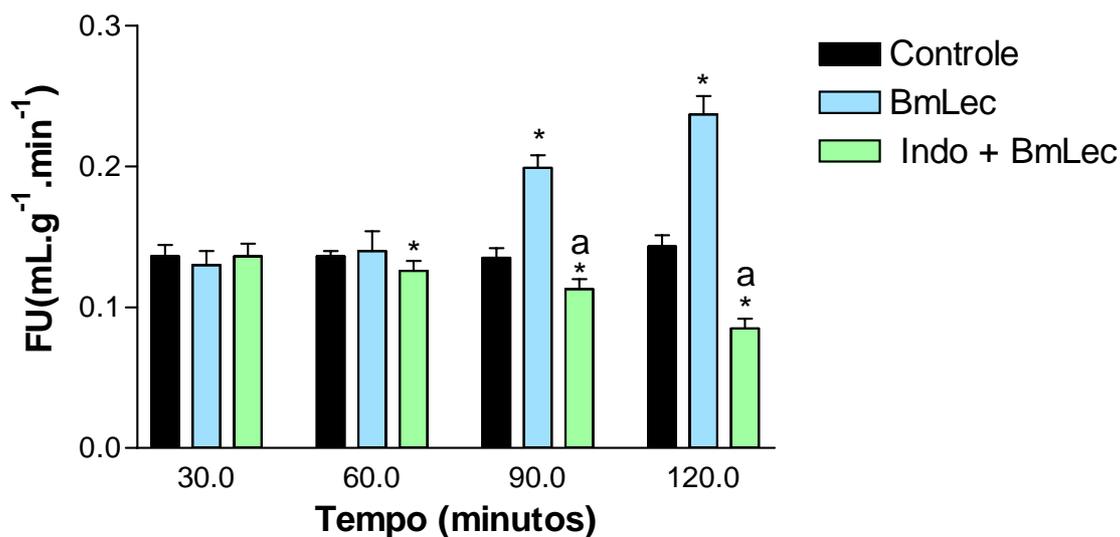
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	110,11 ± 3,7	109,00 ± 1,70	107,70 ± 3,7
60	108,27 ± 4,88	144,80 ± 5,30 *	105,60 ± 1,9 a
90	108,69 ± 5,09	157,90 ± 5,60 *	106,40 ± 1,5 a
120	110,28 ± 3,09	152,50 ± 2,10 *	108,90 ± 2,5 a

Figura 50 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



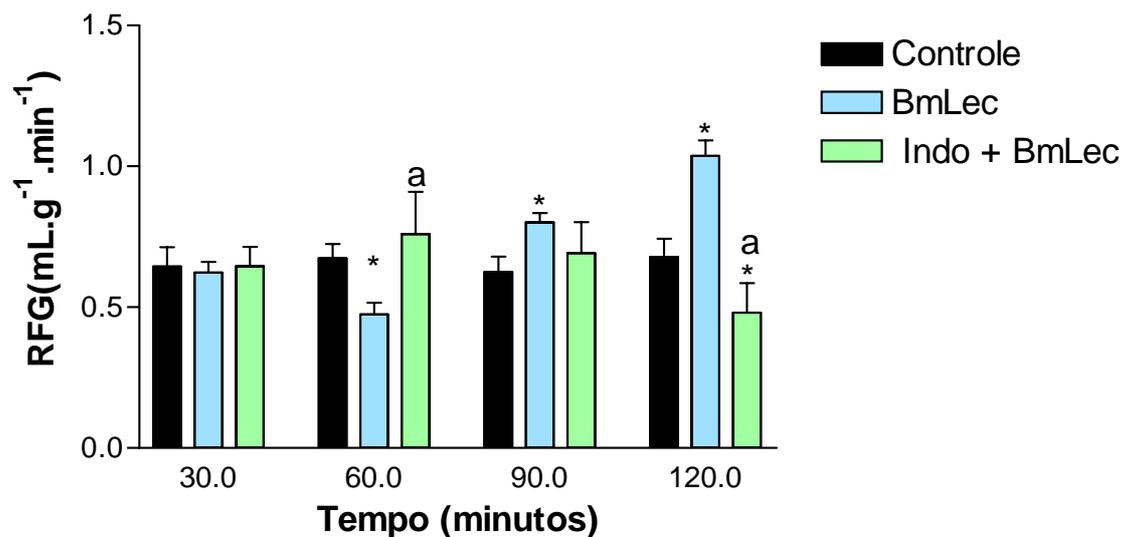
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	5,39 ± 0,57	5,58 ± 0,28	5,76 ± 0,59
60	5,56 ± 0,54	7,44 ± 0,51 *	5,56 ± 0,45 a
90	5,76 ± 0,65	8,13 ± 0,58 *	5,58 ± 0,43 a
120	5,46 ± 0,54	7,77 ± 0,30 *	5,66 ± 0,41 a

Figura 51 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



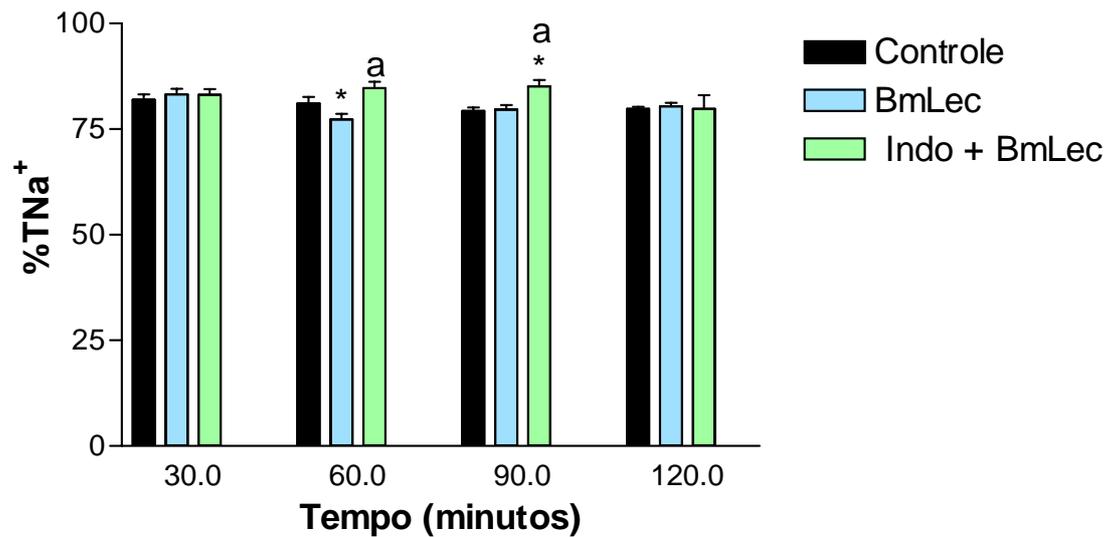
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	0,136 ± 0,008	0,130 ± 0,010	0,136 ± 0,009
60	0,136 ± 0,004	0,140 ± 0,014	0,126 ± 0,007 *
90	0,135 ± 0,007	0,199 ± 0,009 *	0,113 ± 0,007 *a
120	0,143 ± 0,008	0,237 ± 0,013 *	0,085 ± 0,007 *a

Figura 52 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados ($n = 6$) e o grupo controle ($n = 6$) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



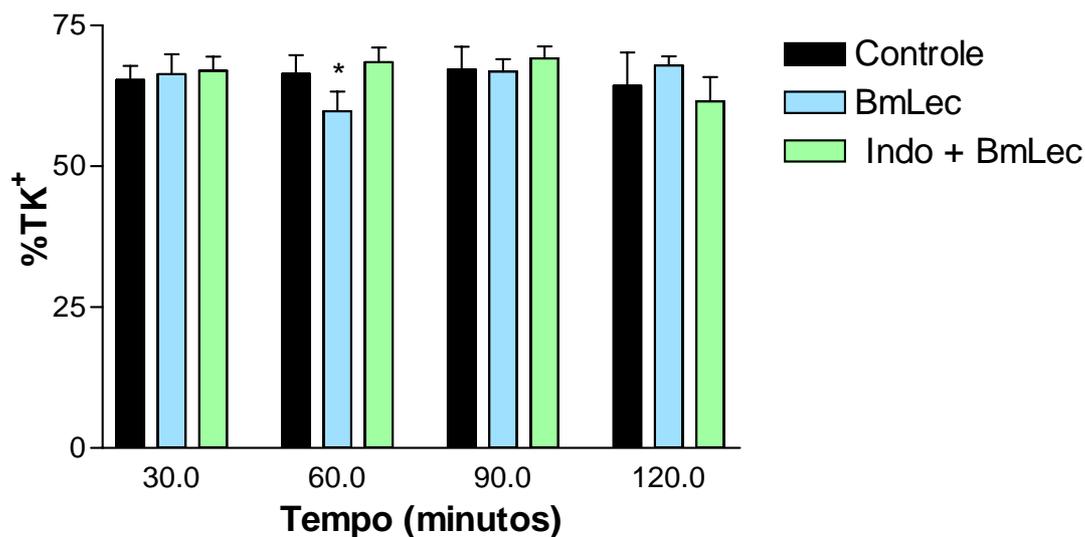
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	0,644 ± 0,069	0,623 ± 0,038	0,646 ± 0,068
60	0,673 ± 0,051	0,475 ± 0,041 *	0,760 ± 0,149 a
90	0,625 ± 0,054	0,801 ± 0,033 *	0,692 ± 0,110
120	0,678 ± 0,065	1,037 ± 0,055 *	0,481 ± 0,104 *a

Figura 53 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



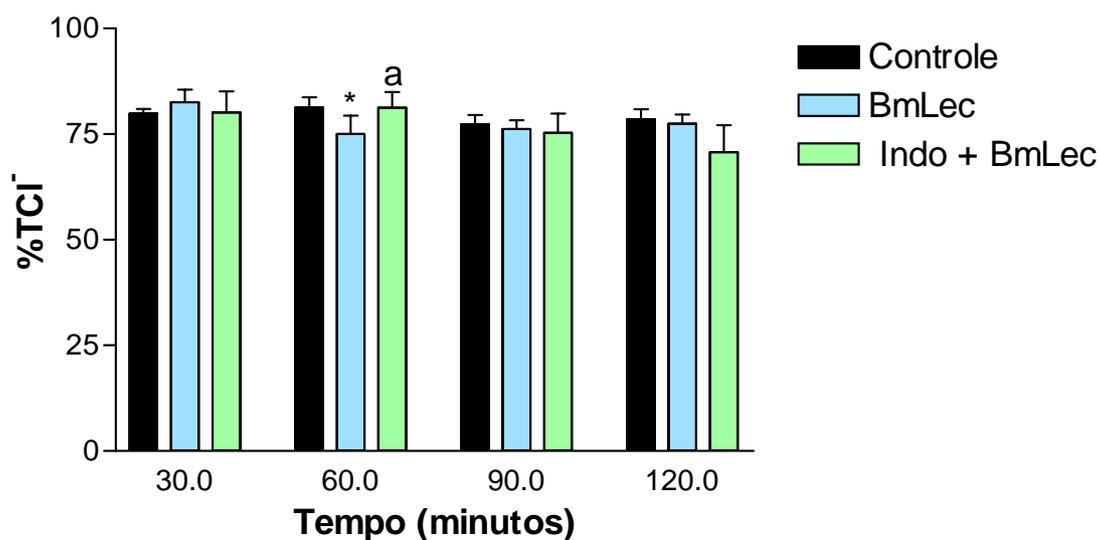
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	81,94 ± 1,24	83,18 ± 1,38	83,16 ± 1,27
60	81,11 ± 1,52	77,25 ± 1,36 *	84,70 ± 1,5 a
90	79,26 ± 0,90	79,59 ± 1,08	85,14 ± 1,5 *a
120	79,76 ± 0,56	80,35 ± 0,86	79,79 ± 3,25

Figura 54 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de sódio transportado (%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec



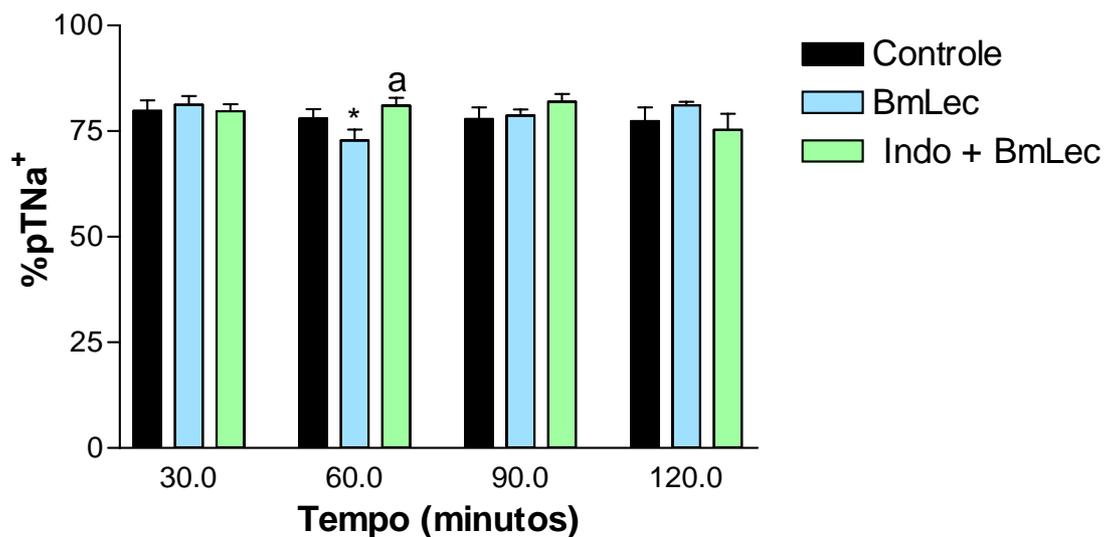
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	65,36 ± 2,47	66,34 ± 3,59	66,94 ± 2,55
60	66,38 ± 3,31	59,78 ± 3,49 *	68,49 ± 2,58
90	67,20 ± 4,04	66,87 ± 2,13	69,16 ± 2,10
120	64,28 ± 5,93	67,90 ± 1,65	61,50 ± 4,34

Figura 55 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de potássio transportado (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



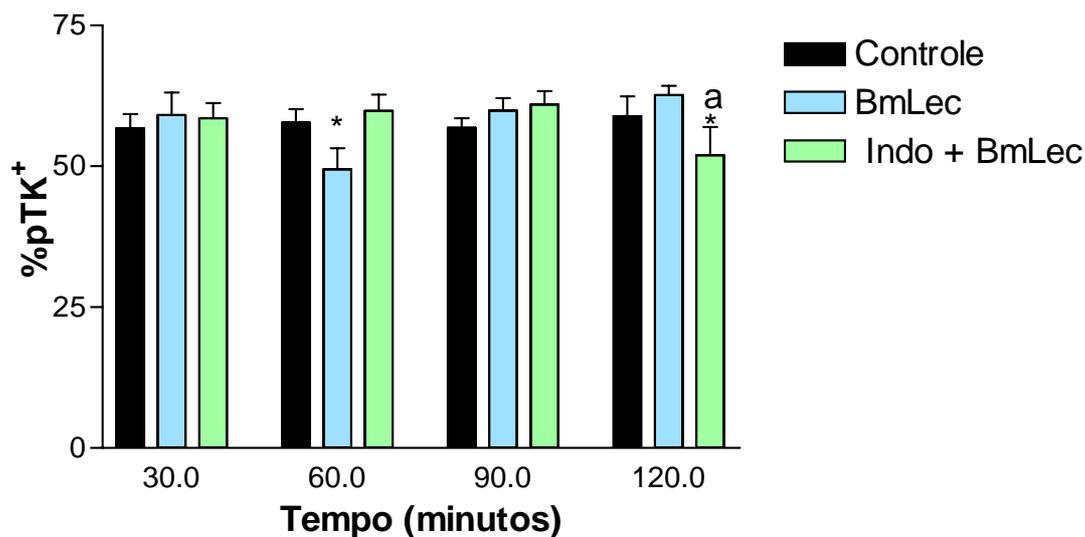
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+ mLec
30	79,90 ± 1,03	82,58 ± 2,96	80,16 ± 4,95
60	81,25 ± 2,44	75,02 ± 4,35 *	81,22 ± 3,72 a
90	77,32 ± 2,22	76,17 ± 2,15	75,30 ± 4,58
120	78,53 ± 2,33	77,46 ± 2,16	70,74 ± 3,02 *

Figura 56 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de cloreto transportado (%TCl). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



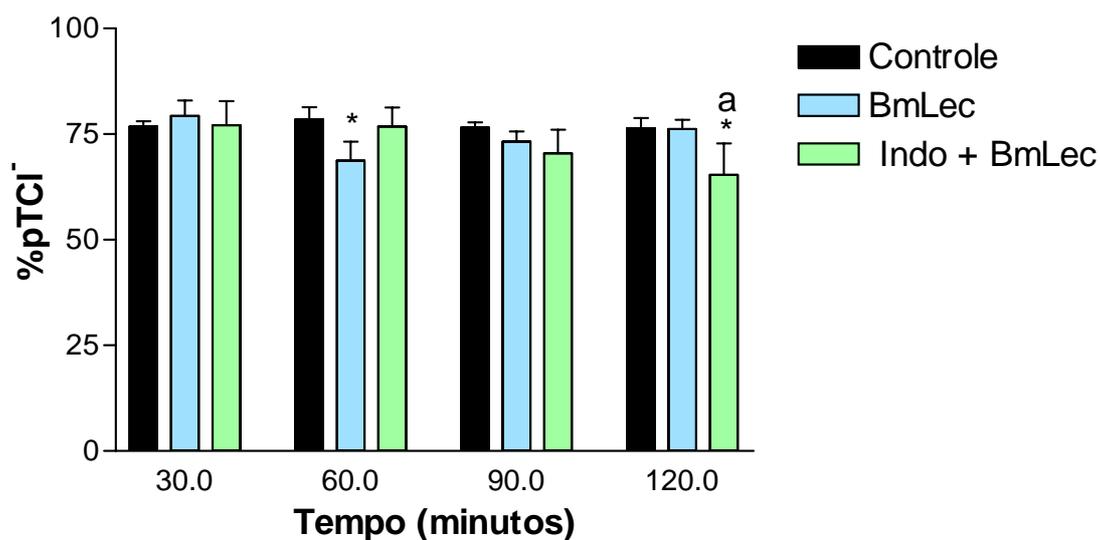
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	79,82 ± 2,47	81,21 ± 2,09	79,74 ± 1,60
60	77,97 ± 2,24	72,82 ± 2,57 *	81,07 ± 1,83 a
90	77,90 ± 2,69	78,67 ± 1,47	81,97 ± 1,82
120	77,41 ± 3,24	81,11 ± 0,87	75,26 ± 3,90

Figura 57 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



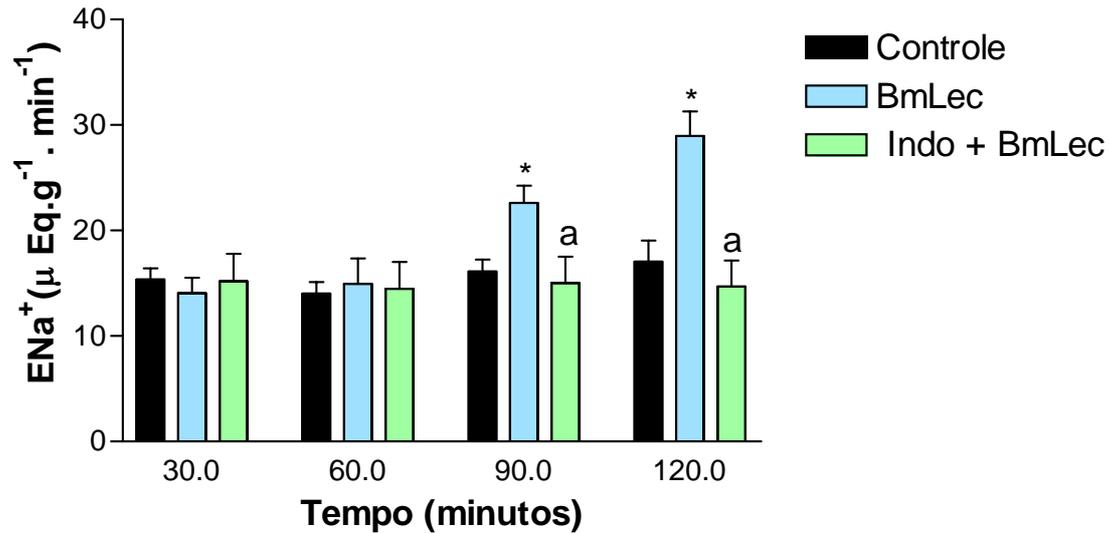
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	56,77 ± 2,50	59,09 ± 4,00	58,52 ± 2,67
60	57,75 ± 2,39	49,46 ± 3,73 *	59,86 ± 2,85
90	56,84 ± 1,67	59,88 ± 2,22	60,98 ± 2,38
120	58,92 ± 3,49	62,66 ± 1,63	51,96 ± 4,98 *a

Figura 58 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



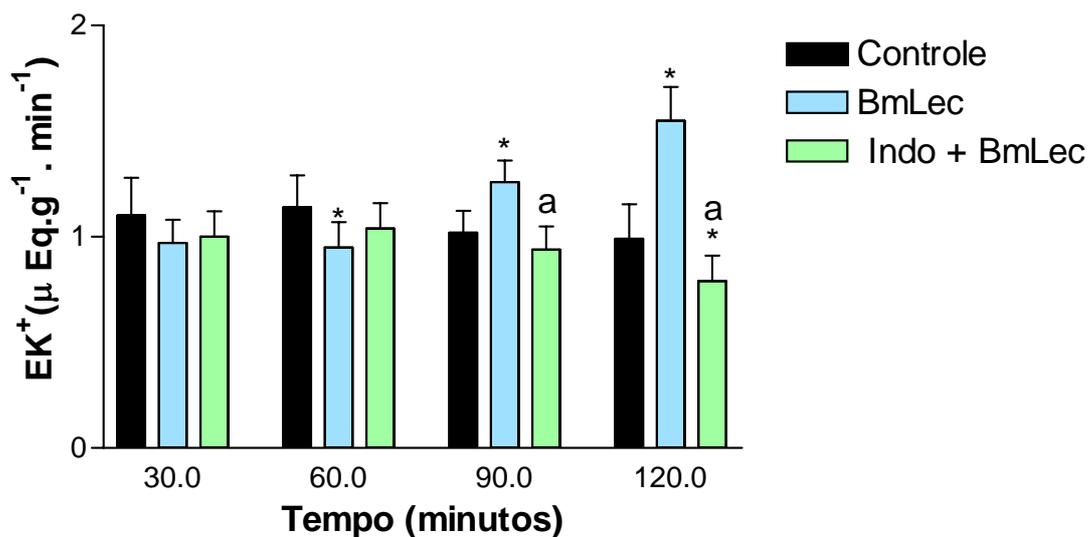
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	76,81 ± 1,25	79,33 ± 3,61	77,15 ± 5,65
60	78,49 ± 2,90	68,77 ± 4,53 *	76,83 ± 4,48
90	76,58 ± 1,20	73,18 ± 2,43	70,46 ± 5,56
120	76,36 ± 2,40	76,22 ± 2,15	65,38 ± 3,61 *a

Figura 59 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BmLec no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



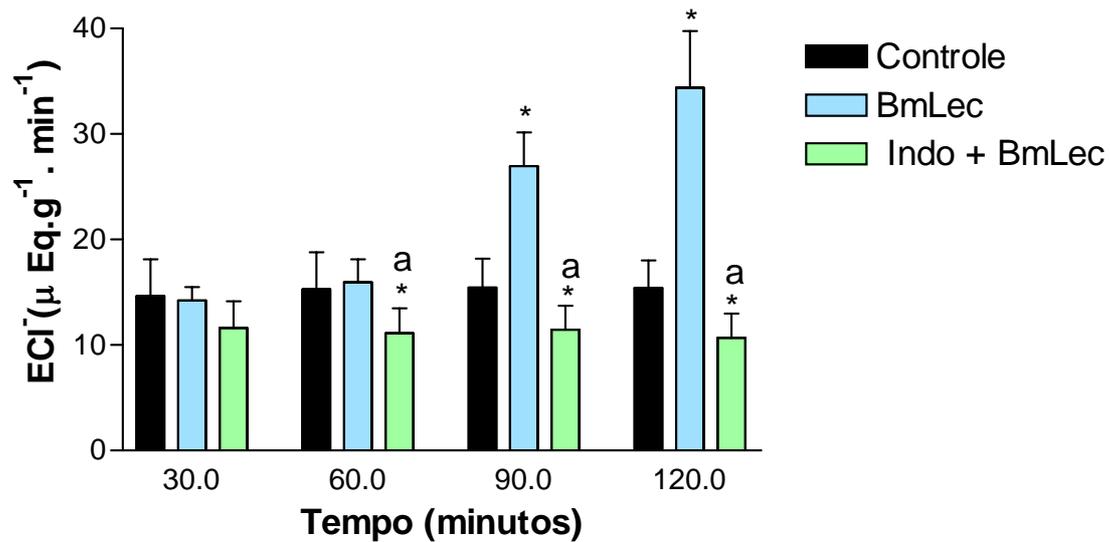
Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	15,34 ± 1,07	14,05 ± 1,47	15,18 ± 2,61
60	14,01 ± 1,10	14,96 ± 2,38	14,47 ± 2,53
90	16,13 ± 1,13	22,63 ± 1,61 *	15,03 ± 2,48 a
120	17,05 ± 1,99	28,96 ± 2,31 *	14,70 ± 2,46 a

Figura 60 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BmLec no sódio excretado (ENa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina + BmLec
30	1,10 ± 0,18	0,97 ± 0,11	1,00 ± 0,12
60	1,14 ± 0,15	0,95 ± 0,12 *	1,04 ± 0,12
90	1,02 ± 0,10	1,16 ± 0,10 *	0,84 ± 0,11 a
120	0,99 ± 0,17	1,45 ± 0,16 *	0,64 ± 0,12 *a

Figura 61 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BmLec no potássio excretado (EK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a= comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.



Tempo (minutos)	controle	BmLec	Indometacina+BmLec
30	14,65 ± 3,45	14,23 ± 1,25	11,60 ± 2,56
60	15,28 ± 3,52	15,96 ± 2,16	11,12 ± 2,36 *a
90	15,44 ± 2,75	26,96 ± 3,18 *	11,44 ± 2,29 *a
120	15,42 ± 2,61	34,39 ± 5,36 *	10,68 ± 2,29 *a

Figura 62 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BmLec no cloreto excretado (ECI). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6) e a = comparação entre os grupos *Bothrops moojeni* (BmLec) e indometacina (indo) + BmLec.

4.1.11 Lectina purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BjcuL)

Nossos resultados foram similares ao descritos por Havt (2003).

A lectina de *Bothrops jararacussu* causou um aumento significativo do fluxo urinário aos 60 minutos, seguido de uma diminuição aos 120 minutos (Figura 65)

O ritmo de filtração glomerular diminuiu aos 60 minutos persistindo até final de experimento (Figura 66)

A lectina promoveu a diminuição do transporte tubular de sódio, potássio e cloreto. (Figuras 67, 68 e 69).

A lectina promoveu a diminuição na excreção de potássio e o aumento na excreção de cloreto (Figuras 73, 74 e 75).

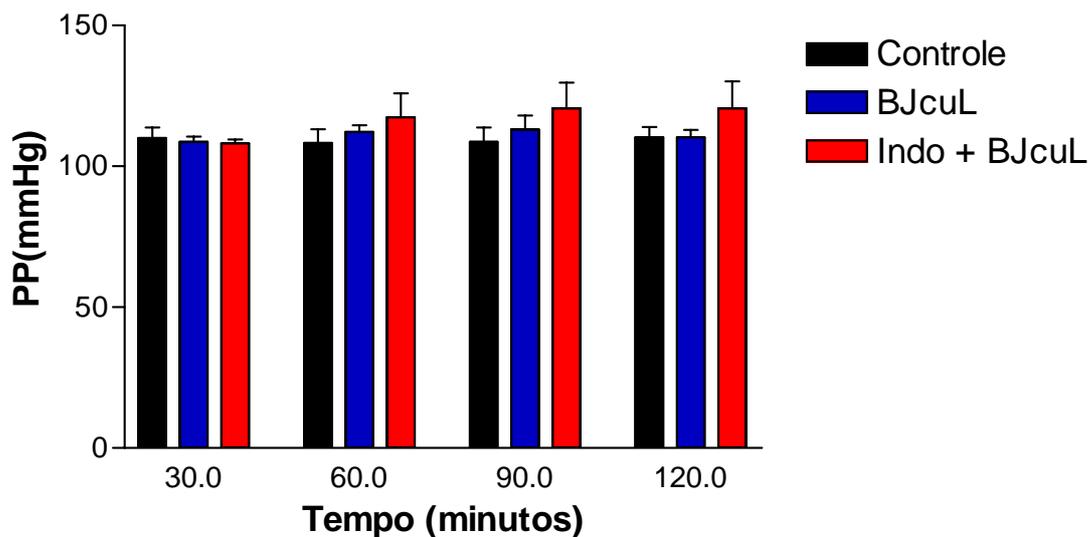
4.1.12 Lectina purificada da serpente *Bothrops jararacussu* (BjcuL) com indometacina

Indometacina com lectina da *Bothrops jararacussu* causaram uma diminuição no fluxo urinário aos 60 minutos e persistiu até o final do experimento enquanto que no ritmo de filtração glomerular aconteceu uma diminuição somente aos 120 minutos (Figura 65).

Quanto ao percentual de transportes tubulares foi observado um aumento somente no percentual de transporte tubular de sódio aos 60 minutos persistindo assim até aos 90 minutos (Figura 67).

Quanto ao percentual proximal tubulares foi observado aumento significativo no de sódio e potássio aos 60 persistindo até aos 90 minutos, enquanto que o transporte proximal de cloreto caiu aos 120 minutos (Figuras 70, 71 e 72).

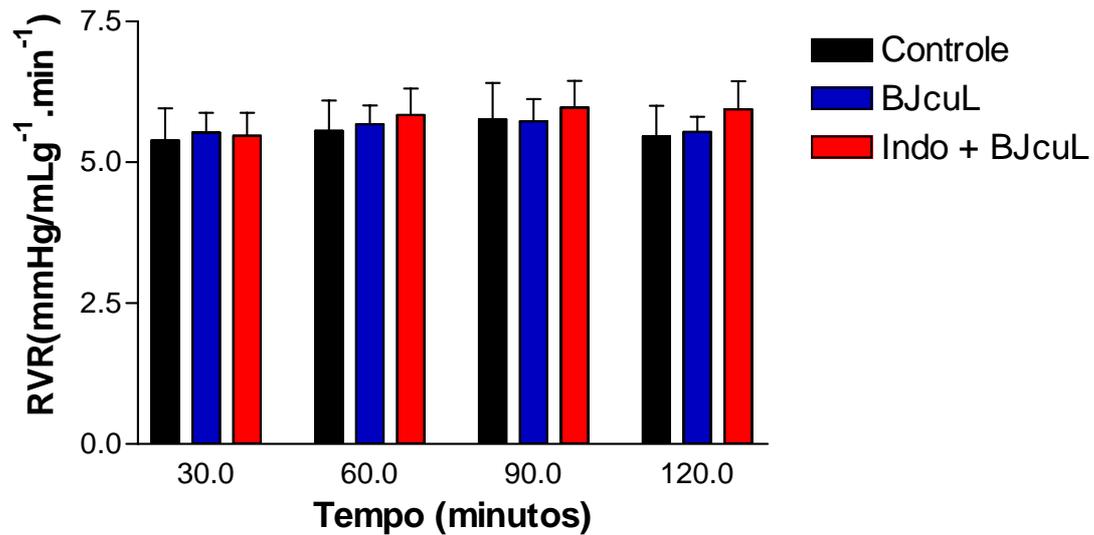
Com relação às excreções foi observada uma diminuição na excreção de potássio e cloreto aos 60 minutos persistindo até o final do experimento (Figuras 74 e 75).



Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	110,11 ± 3,7	108,70 ± 1,90	108,20 ± 1,40
60	108,27 ± 4,88	112,20 ± 2,30	117,40 ± 8,50
90	108,69 ± 5,09	113,00 ± 5,00	120,50 ± 9,20
120	110,28 ± 3,09	110,30 ± 2,60	120,50 ± 9,70

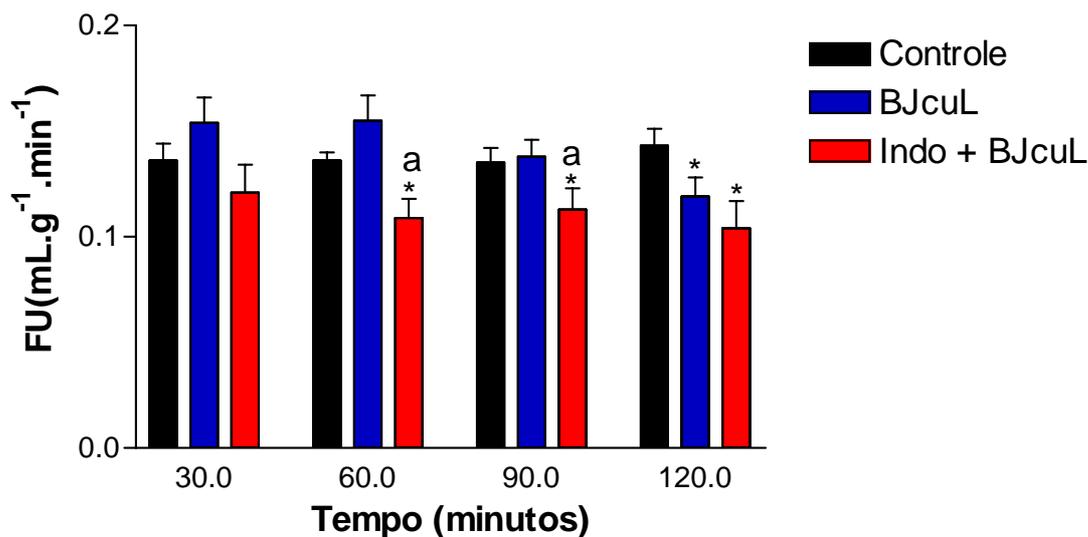
Figura 63 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL na pressão de perfusão (PP). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$.

* = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



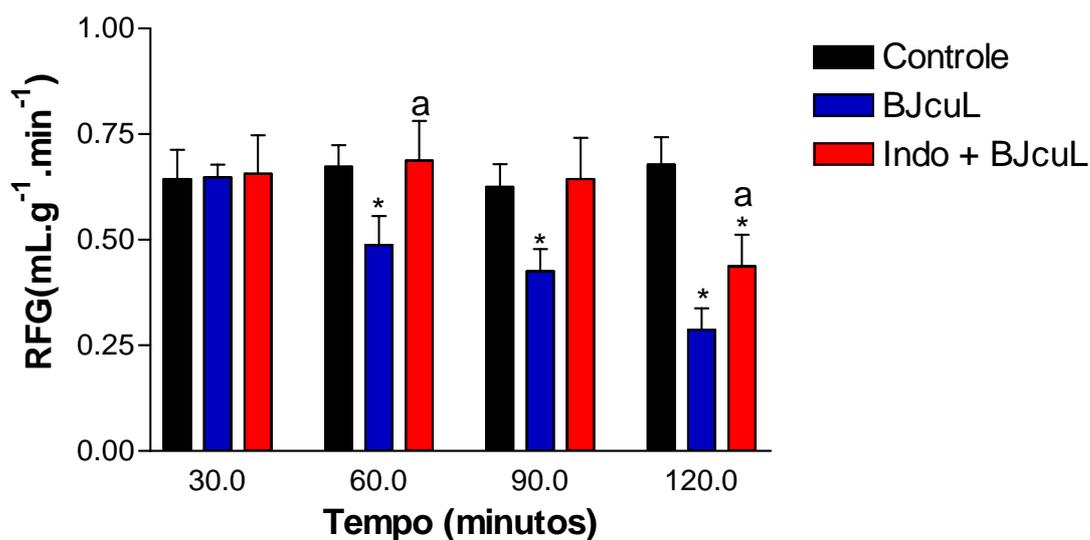
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina + BJcuL
30	5,39 ± 0,57	5,53 ± 0,35	5,47 ± 0,41
60	5,56 ± 0,54	5,68 ± 0,33	5,84 ± 0,47
90	5,76 ± 0,65	5,73 ± 0,39	5,97 ± 0,48
120	5,46 ± 0,54	5,54 ± 0,27	5,94 ± 0,50

Figura 64 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



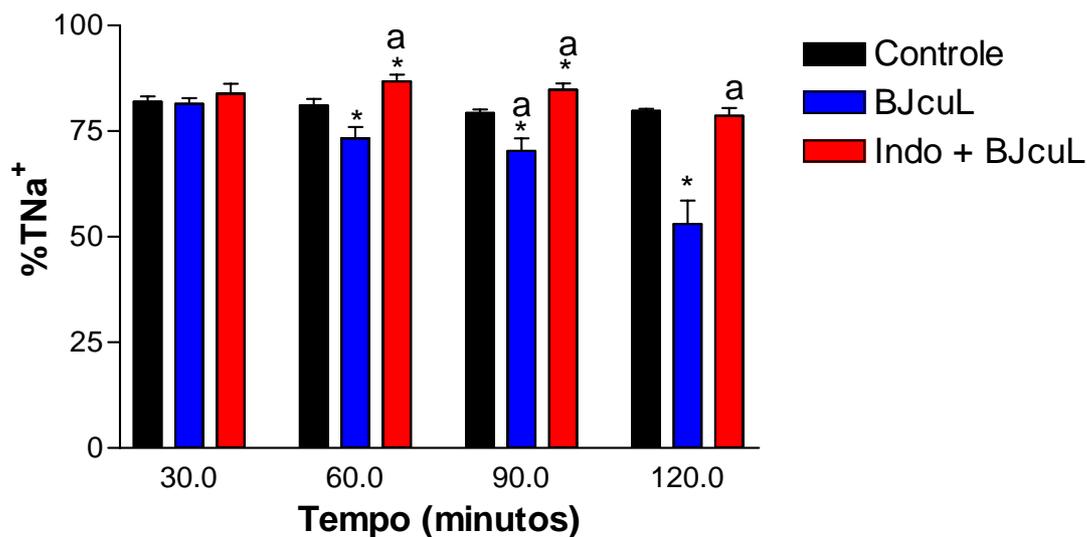
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	0,136 ± 0,008	0,154 ± 0,012	0,121 ± 0,013
60	0,136 ± 0,004	0,155 ± 0,012	0,109 ± 0,009 *a
90	0,135 ± 0,007	0,138 ± 0,008	0,113 ± 0,010 *a
120	0,143 ± 0,008	0,119 ± 0,009 *	0,104 ± 0,013 *

Figura 65 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



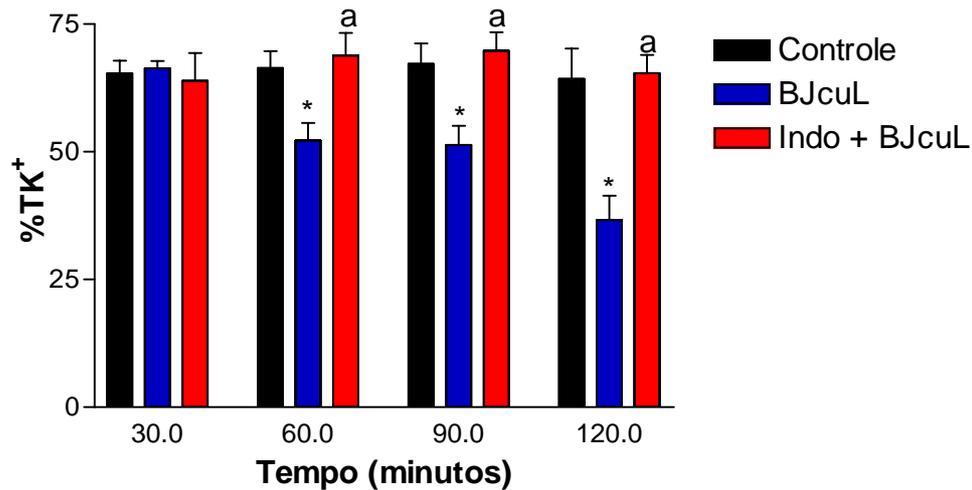
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	0,644 ± 0,069	0,648 ± 0,030	0,656 ± 0,091
60	0,673 ± 0,051	0,488 ± 0,068 *	0,687 ± 0,094 a
90	0,625 ± 0,054	0,425 ± 0,053 *	0,644 ± 0,097
120	0,678 ± 0,065	0,287 ± 0,051 *	0,437 ± 0,075 *a

Figura 66 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



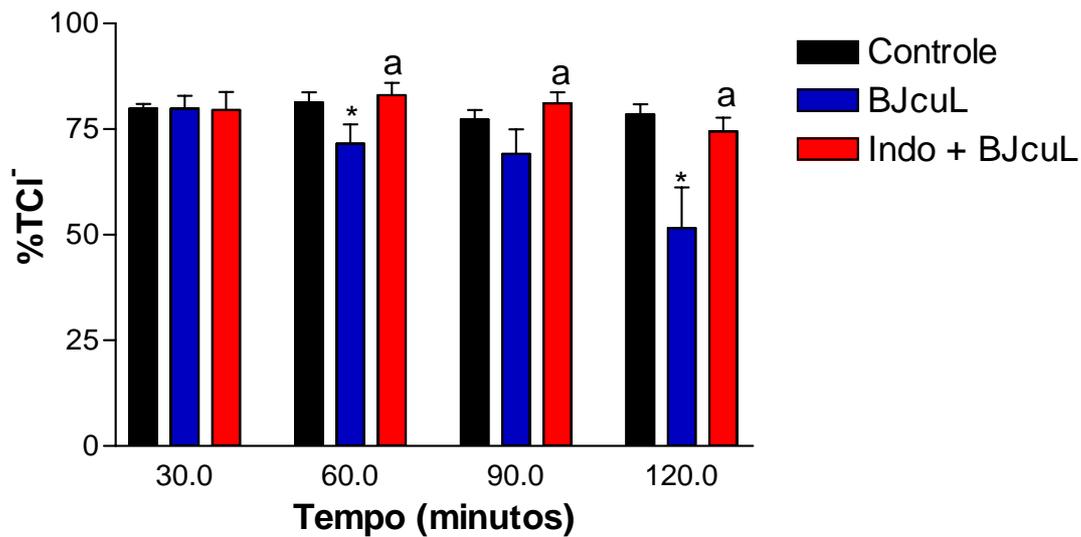
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	81,94 ± 1,24	81,43 ± 1,32	83,89 ± 2,28
60	81,11 ± 1,52	73,27 ± 2,70*	86,79 ± 1,55 *a
90	79,26 ± 0,90	70,28 ± 3,02*	84,83 ± 1,47 *a
120	79,76 ± 0,56	53,02 ± 5,50*	78,63 ± 1,81 ^a

Figura 67 - Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



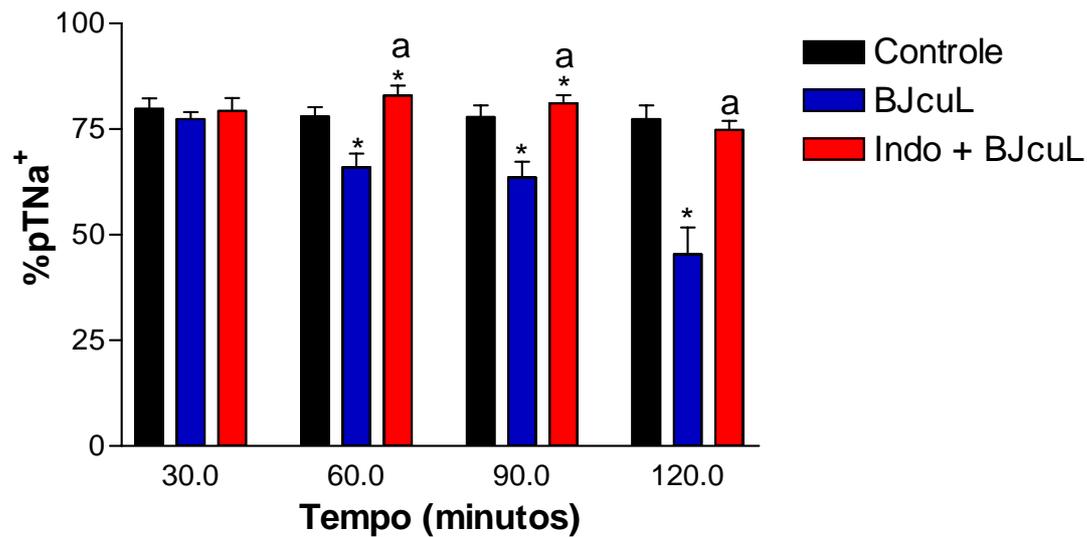
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	65,36 ± 2,47	66,34 ± 1,41	63,91 ± 5,43
60	66,38 ± 3,31	52,24 ± 3,41*	68,82 ± 4,46 a
90	67,20 ± 4,04	51,33 ± 3,74*	68,78 ± 3,62 a
120	64,28 ± 5,93	36,67 ± 4,72*	65,43 ± 3,53 a

Figura 68 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



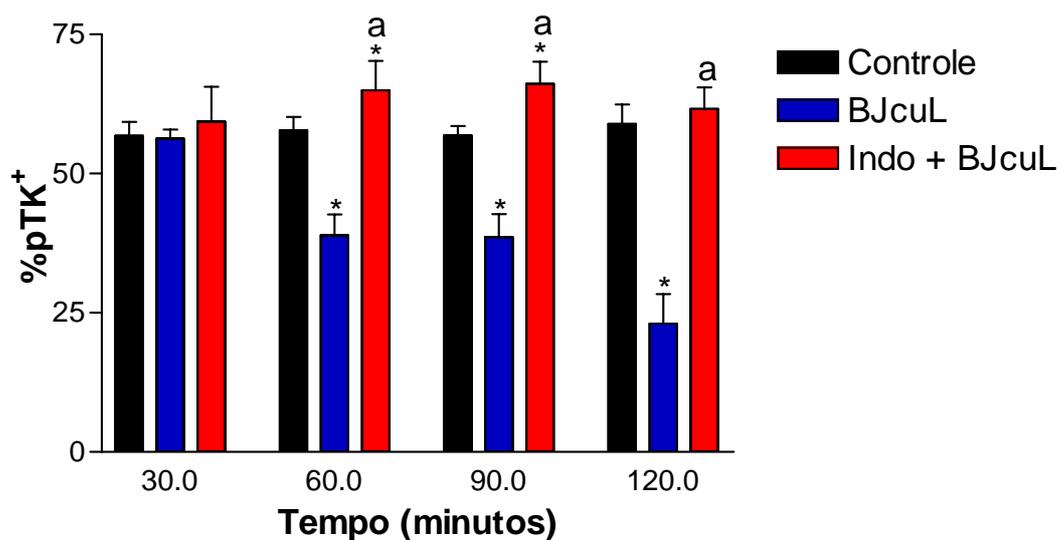
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	79,90 ± 1,03	79,84 ± 3,06	79,52 ± 4,24
60	81,25 ± 2,44	71,53 ± 4,57*	83,04 ± 2,92 a
90	77,32 ± 2,22	69,09 ± 5,83	81,14 ± 2,57 a
120	78,53 ± 2,33	51,52 ± 9,64*	74,48 ± 3,23 a

Figura 69 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



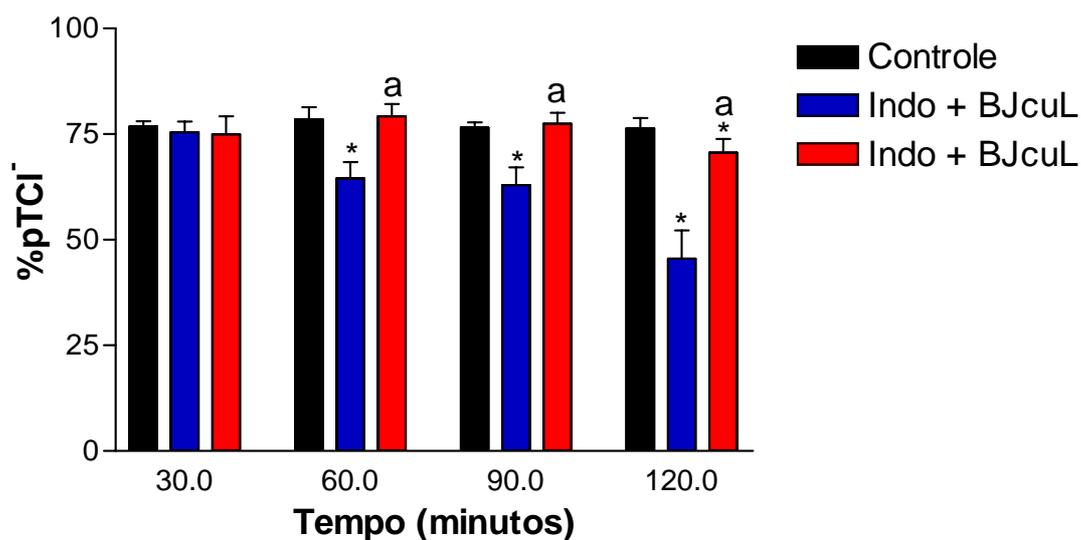
Tempo (min)	Controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	79,82 ± 2,47	77,36 ± 1,64	79,30 ± 3,09
60	77,97 ± 2,24	65,96 ± 3,27*	82,96 ± 2,31 *a
90	77,90 ± 2,69	63,53 ± 3,78*	81,15 ± 1,86 *a
120	77,41 ± 3,24	45,40 ± 6,31*	74,77 ± 2,18 a

Figura 70 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



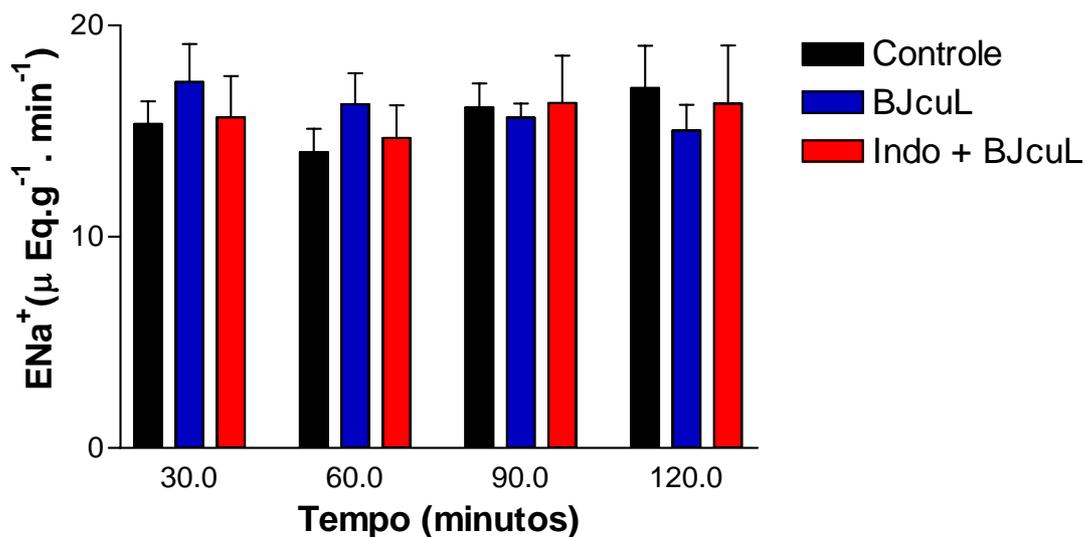
Tempo (min)	controle	BJcuL	Indometacina + BJcuL
30	56,77 ± 2,50	56,26 ± 1,64	79,30 ± 3,09
60	57,75 ± 2,39	38,93 ± 3,75*	82,96 ± 2,31 *a
90	56,84 ± 1,67	38,58 ± 4,16*	81,15 ± 1,86 *a
120	58,92 ± 3,49	23,06 ± 5,30*	74,77 ± 2,18 ^a

Figura 71 - Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



Tempo (min)	controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	76,81 ± 1,25	75,49 ± 2,50	74,94 ± 4,24
60	78,49 ± 2,90	64,58 ± 3,76*	79,22 ± 2,92 a
90	76,58 ± 1,20	62,96 ± 4,18*	77,46 ± 2,57 a
120	76,36 ± 2,40	45,50 ± 6,73*	70,62 ± 3,23*a

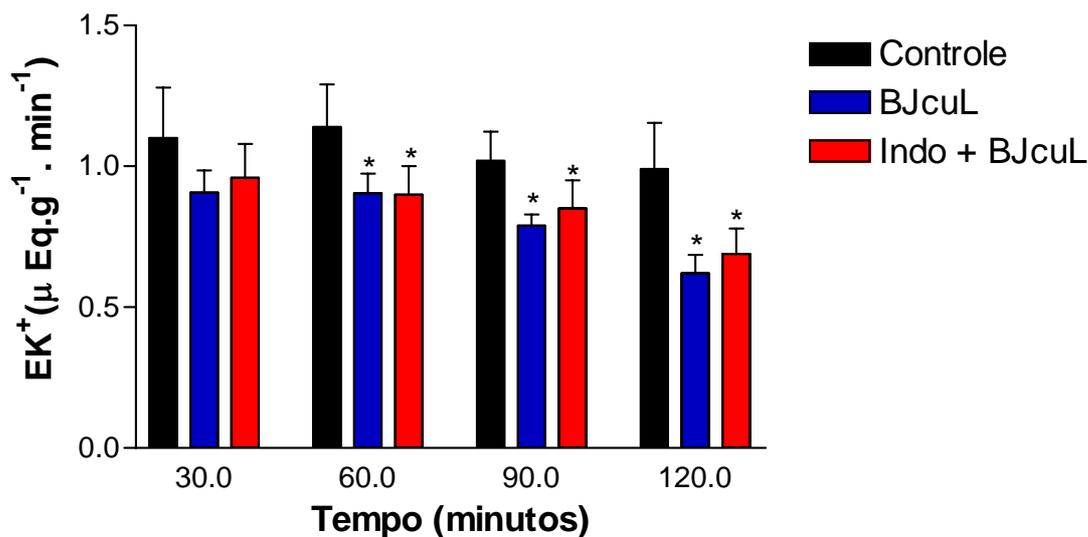
Figura 72 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 µg/mL) e indometacina (indo) (10 µg/mL) + BJcuL no percentual de transporte proximal tubular total de cloreto (%pTCl). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



Tempo (min)	controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	15,34 ± 1,07	17,33 ± 1,80	15,66 ± 1,94
60	14,01 ± 1,10	16,27 ± 1,47	14,67 ± 1,56
90	16,13 ± 1,13	15,65 ± 0,67	16,32 ± 2,26
120	17,05 ± 1,99	15,02 ± 1,23	13,31 ± 2,75

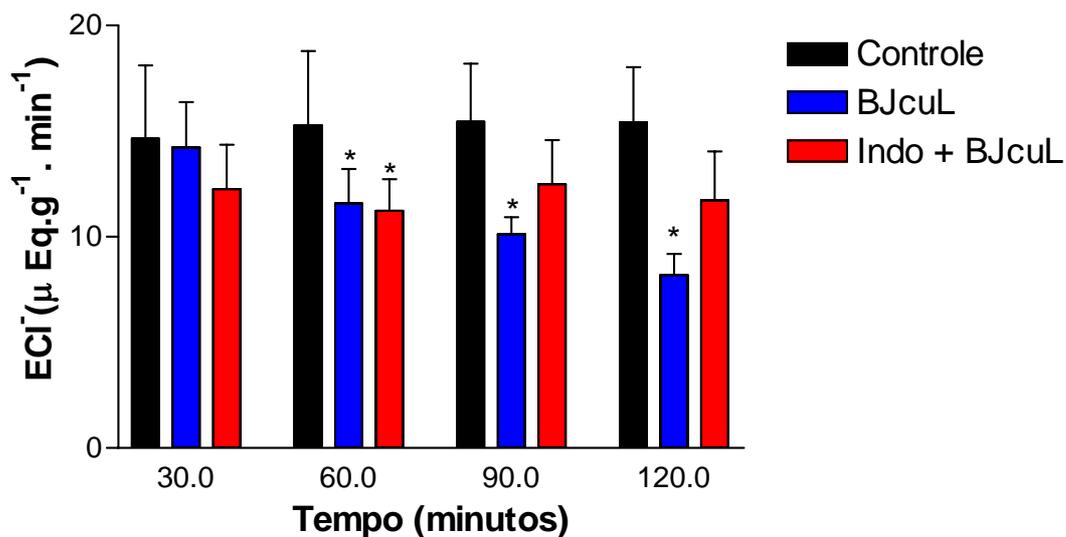
Figura 73 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BJcuL no sódio excretado (ENa⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05.

* = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



Tempo (min)	controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	1,10 ± 0,18	0,91 ± 0,08	0,96 ± 0,12
60	1,14 ± 0,15	0,90 ± 0,07*	0,90 ± 0,10 *
90	1,02 ± 0,10	0,79 ± 0,04*	0,85 ± 0,10 *
120	0,99 ± 0,17	0,62 ± 0,06*	0,69 ± 0,09 *

Figura 74 - Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BJcuL no potássio excretado (EK⁺). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com p<0,05. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).



Tempo (min)	controle	BJcuL	Indometacina+BJcuL
30	14,65 ± 3,25	14,23 ± 2,14	12,25 ± 2,11
60	15,28 ± 3,52	11,58 ± 1,63*	11,23 ± 1,50 *
90	15,44 ± 2,75	10,12 ± 0,80*	12,49 ± 2,09
120	15,42 ± 2,61	8,20 ± 1,00*	11,73 ± 2,31

Figura 75 – Efeitos renais promovidos pela lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) (10 μg/mL) e indometacina (indo) (10 μg/mL) + BJcuL no cloreto excretado (ECI). Os dados são expressos por média ± E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados (n = 6) e o grupo controle (n = 6).

4.1.13 Histologia

BthTx I, Bthtx II e BmLec apresentaram moderado acúmulos de materiais protéicos nos túbulos e glomérulos (Figuras 76, 77, 80, 81, 90 e 91). Essa alterações foram diminuídas com o uso da indometacina em BthTxI I e BthTx II (Figuras 78, 79, 82 e 83) e reveteu com BmLec (Figuras 92 e 93).

Indometacina reverteu alterações causada pelo BmTx I conforme observado por Barbosa 2002 (Figuras 84 e 85).

Tezosentan apresentou um moderado acúmulo de material protéico nos túbulos e glomérulos, além de degeneração hidrópico vacuolar (Figuras 86 e 87). Tais efeito não foi observado com uso da BmTx I. (Figuras 88 e 89).

BJcuL usado com indometacina causou discreto aumento de material protéico nos túbulos e glomérulos (Figuras 94)

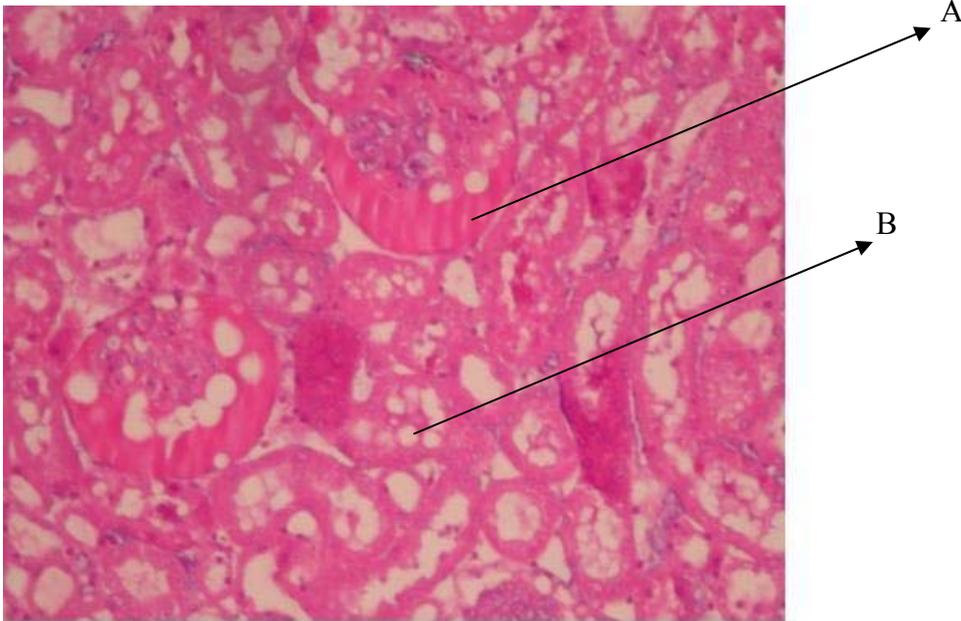


Figura 76 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BthTx I A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo.

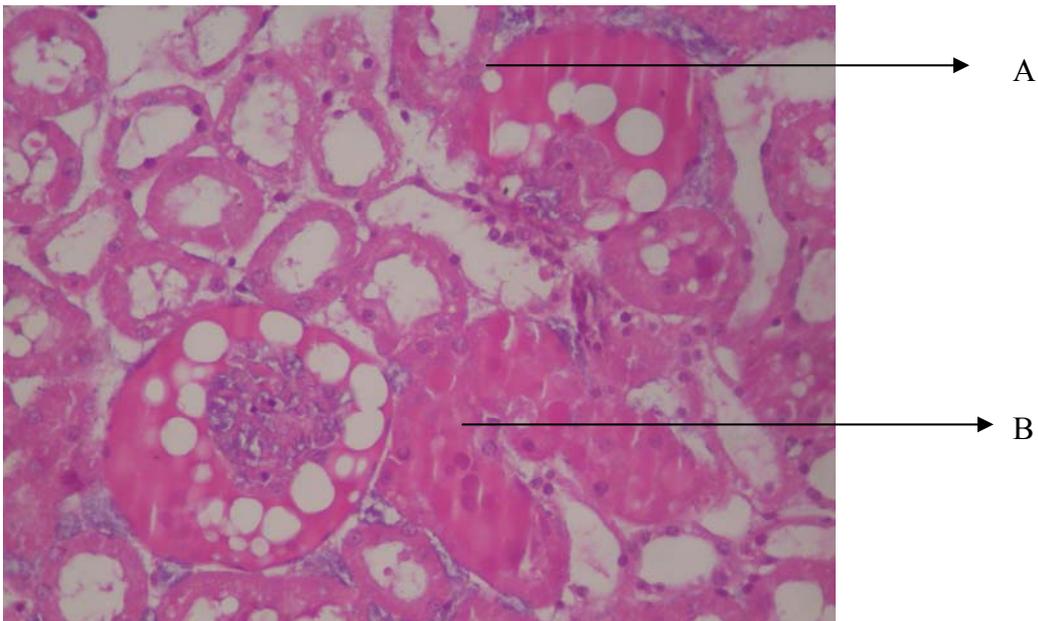


Figura 77 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BthTx I A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Túbulo com acentuado depósito de material proteico

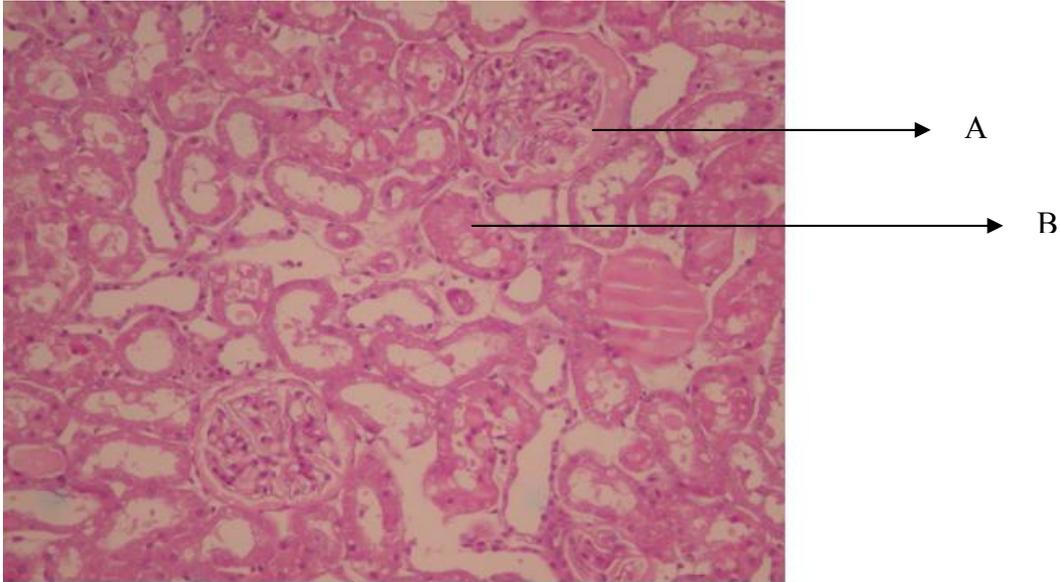


Figura 78 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BthTx II A. Glomérulo com moderado depósito de material protéico B. Túbulo com moderado depósito de material protéico

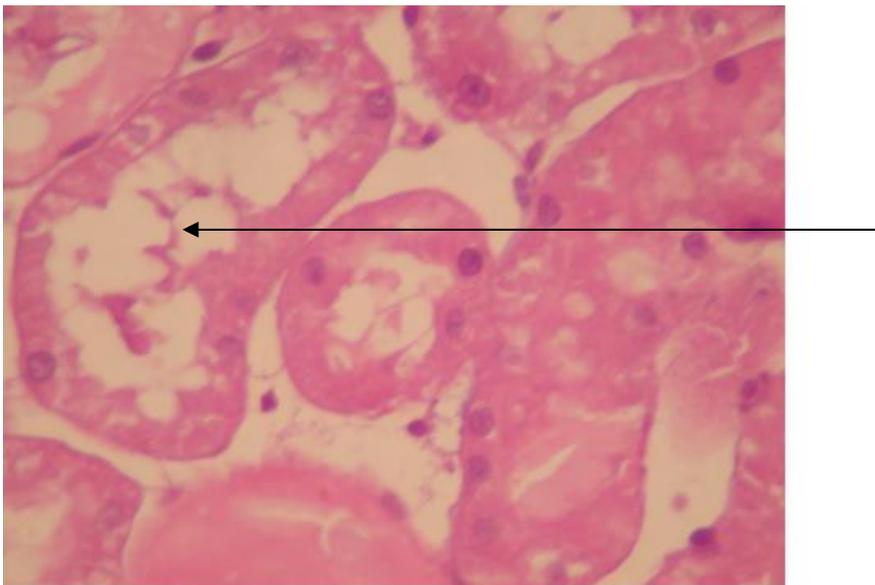


Figura 79 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BthTx II. A seta mostra Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo

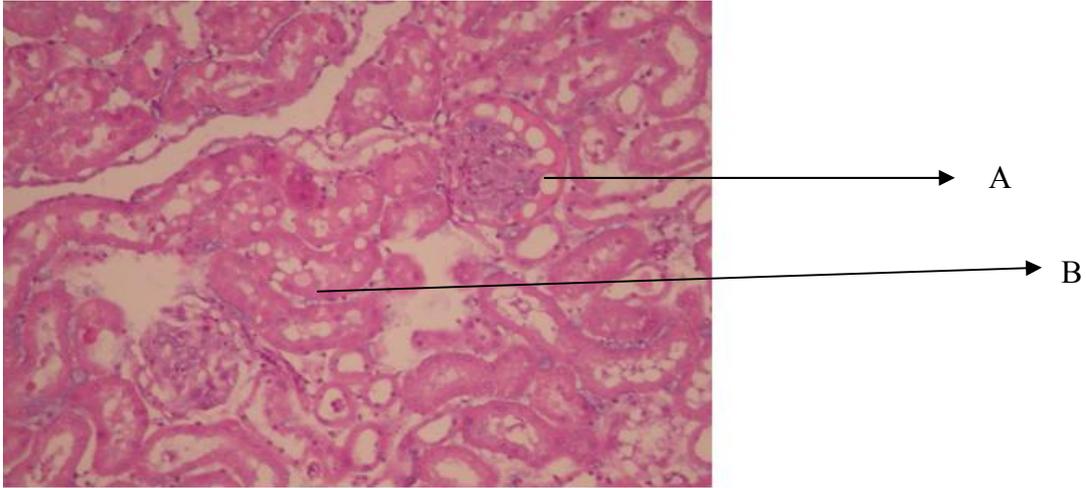


Figura 80 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BthTx I pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo

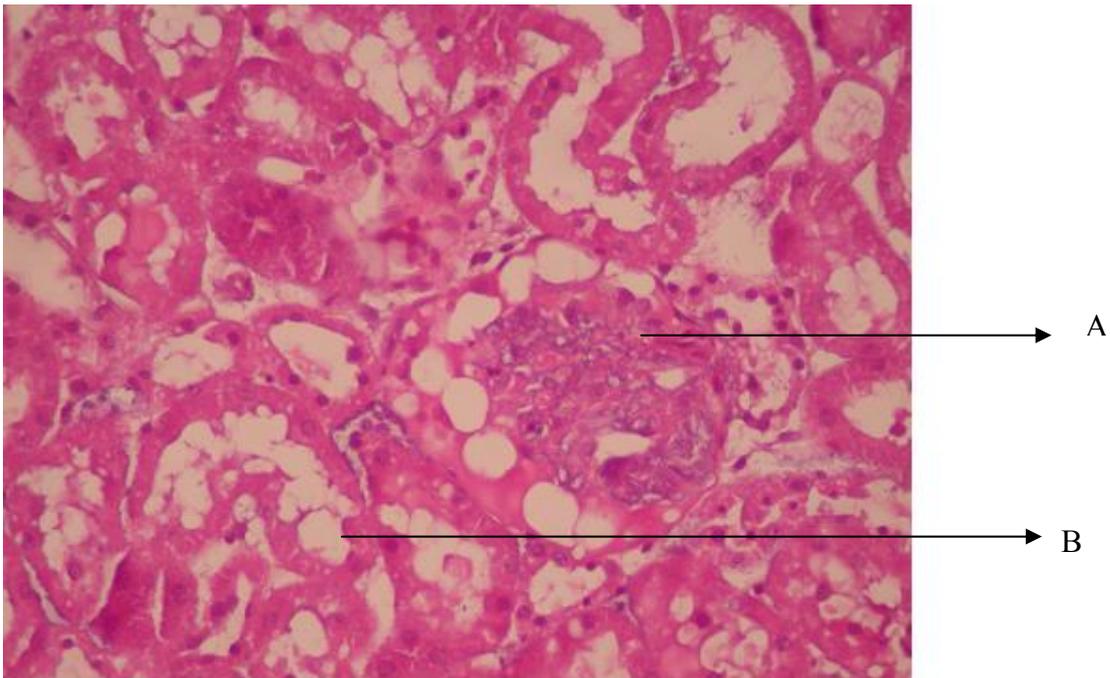


Figura 81 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BthTx I e pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. A. Glomérulo com acentuado depósito de material protéico B. Degeneração hidrópica vacuolar no túbulo

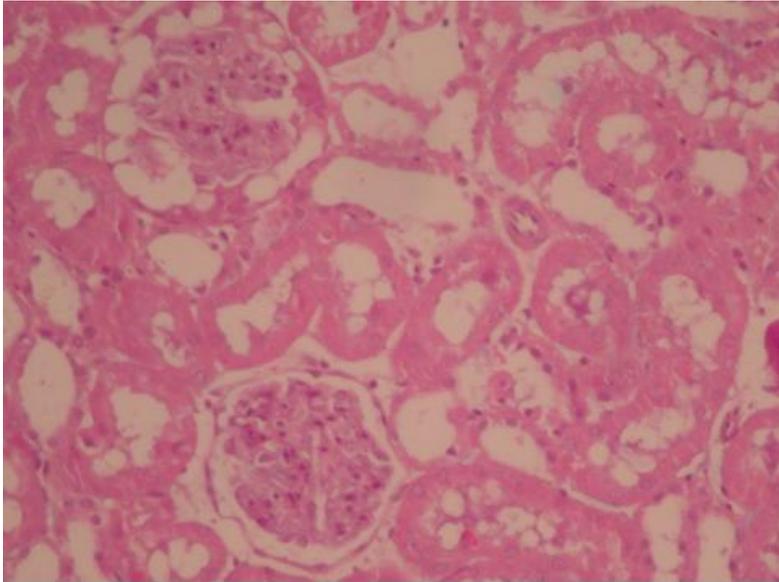


Figura 82 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BthTx II pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

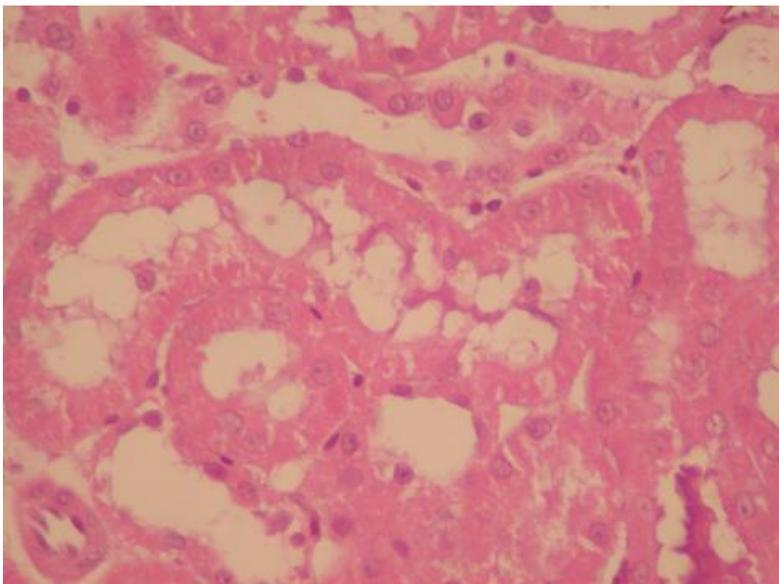


Figura 83 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BthTx II pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

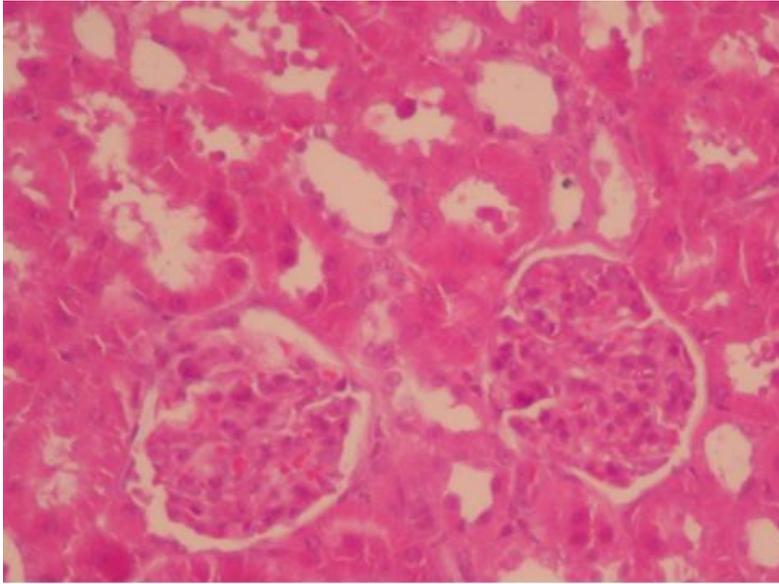


Figura 84 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BmTx I pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina glomérulos e túbulos com aparências normais

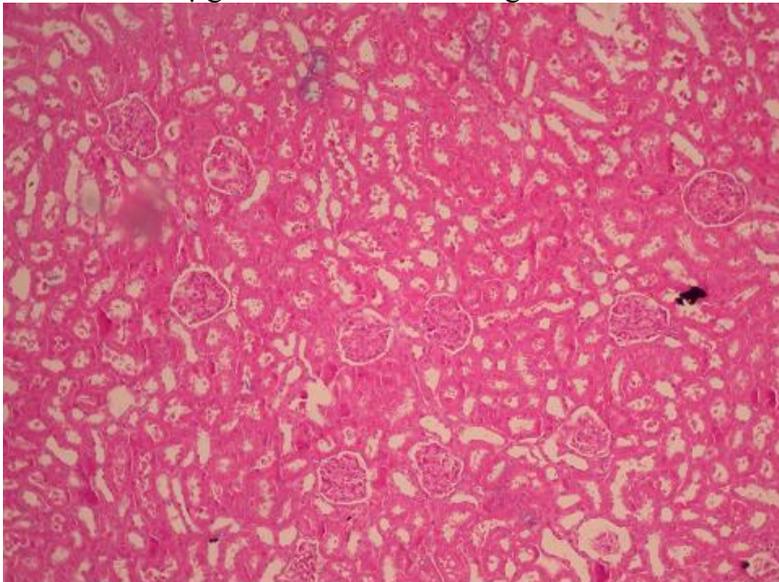


Figura 85 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com, 5 μ g/mL de BmTx I pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

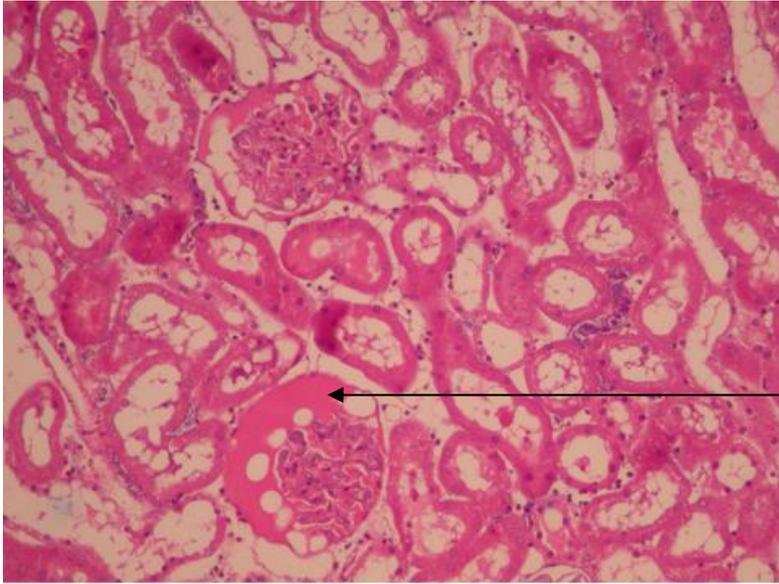


Figura 86 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10µg/mL de tezosentan a seta mostra glomérulo com acentuado depósito de material protéico

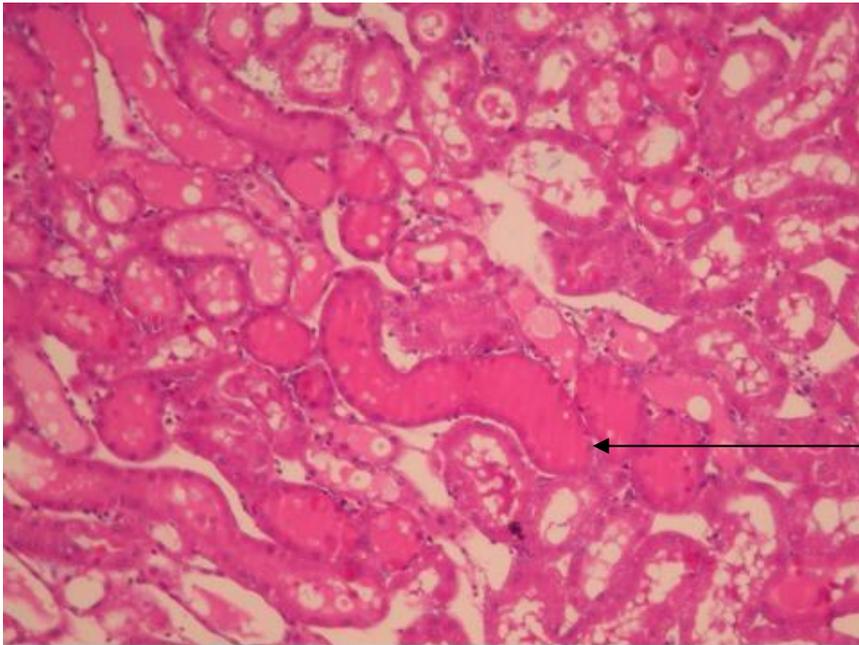


Figura 87 - Histopatológico da região da medula renal de rato tratado com 10µg/mL de tezosentan a seta mostra túbulos distal com com acentuado depósito de material protéico

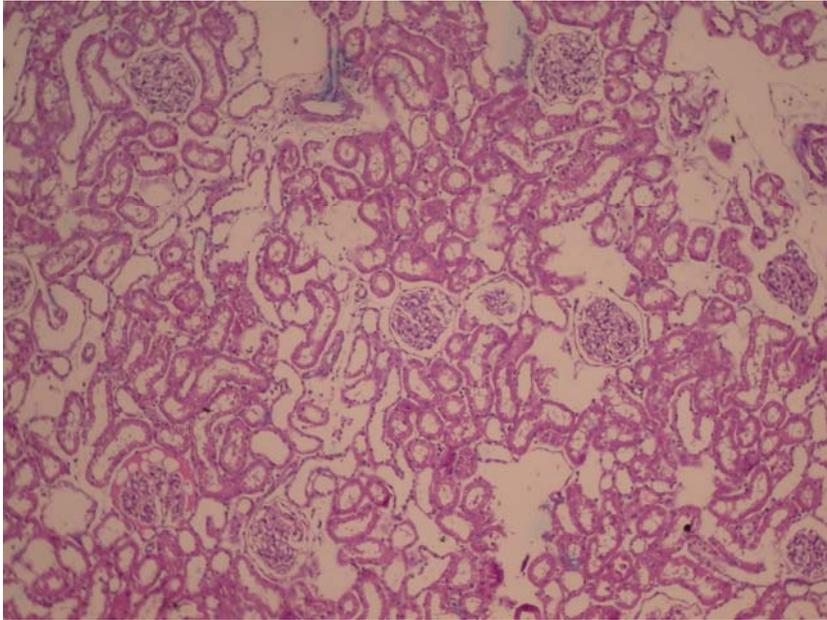


Figura 88 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BmTx I pré tratado com 10 μ g/mL de tezosentan. Glomérulos e túbulos com aparências normais

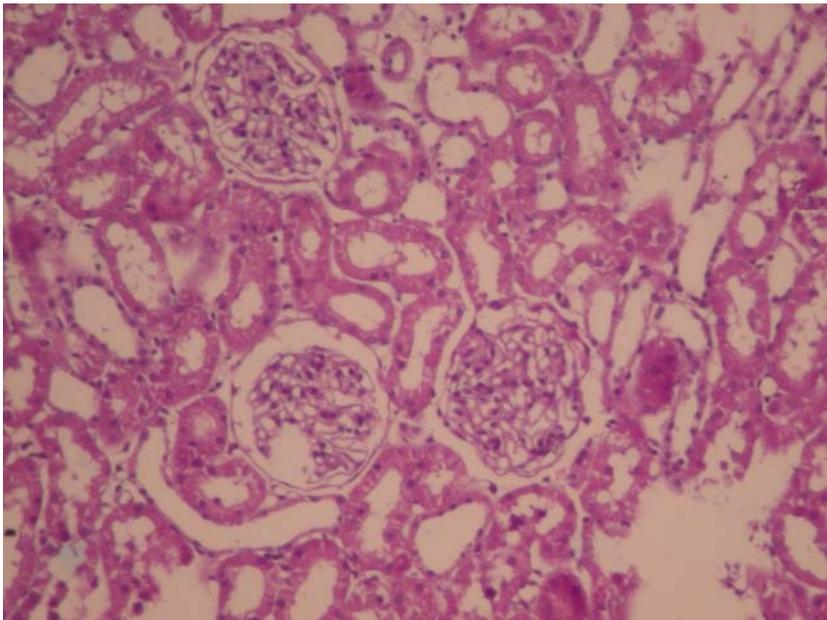


Figura 89 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 5 μ g/mL de BmTx I pré tratado com 10 μ g/mL de tezosentan. Glomérulos e túbulos com aparências normais

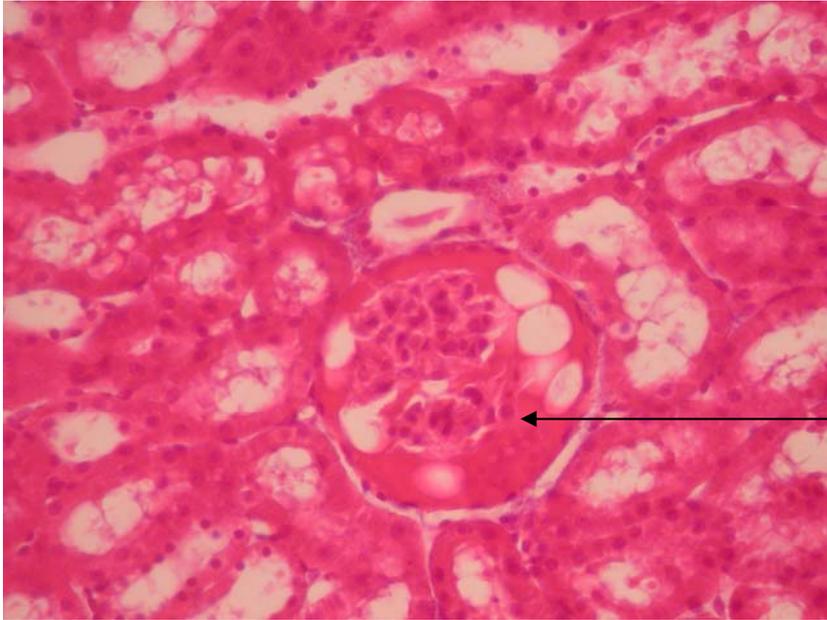


Figura 90 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10 μ g/mL de BmLec. A seta mostra glomérulo com acentuado depósito de material protéico

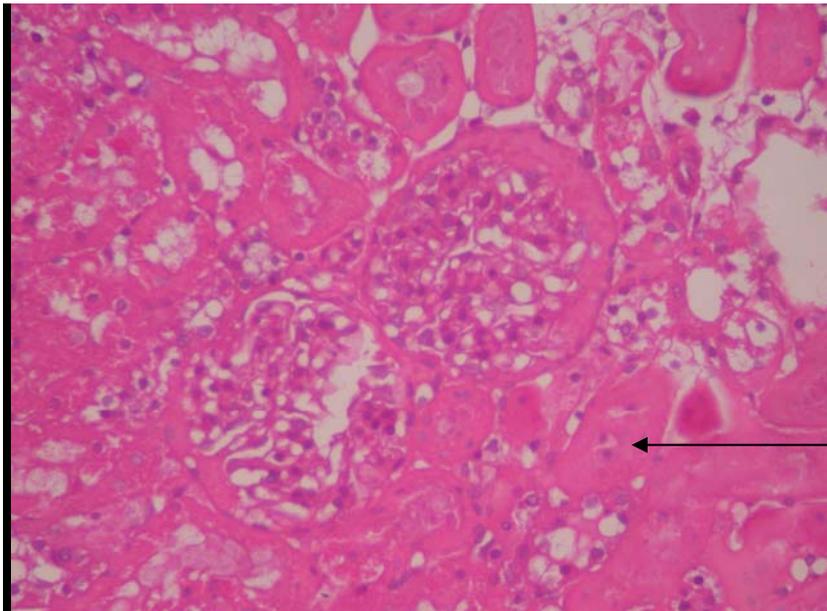


Figura 91 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10 μ g/mL de BmLec A seta mostra túbulos com acentuado depósito de material protéico

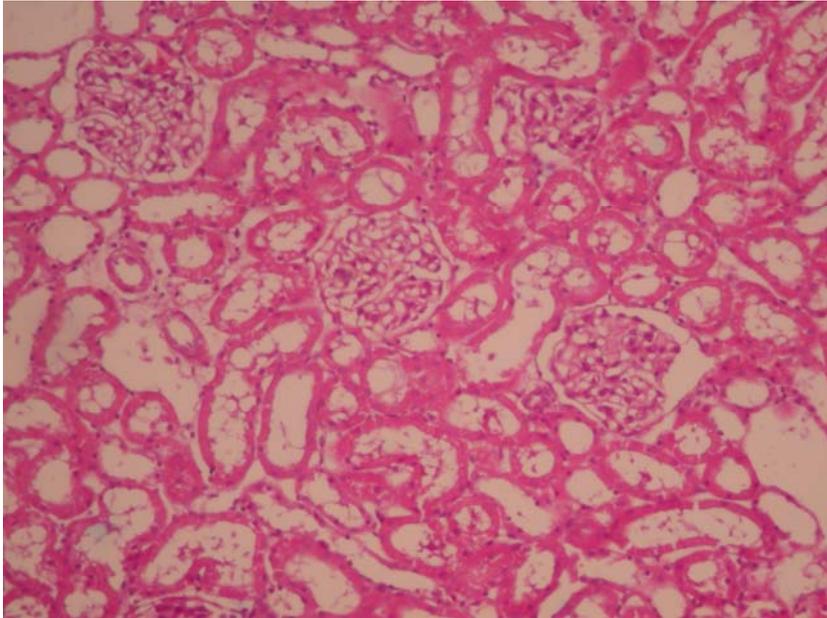


Figura 92 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10 μ g/mL de BmLec pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

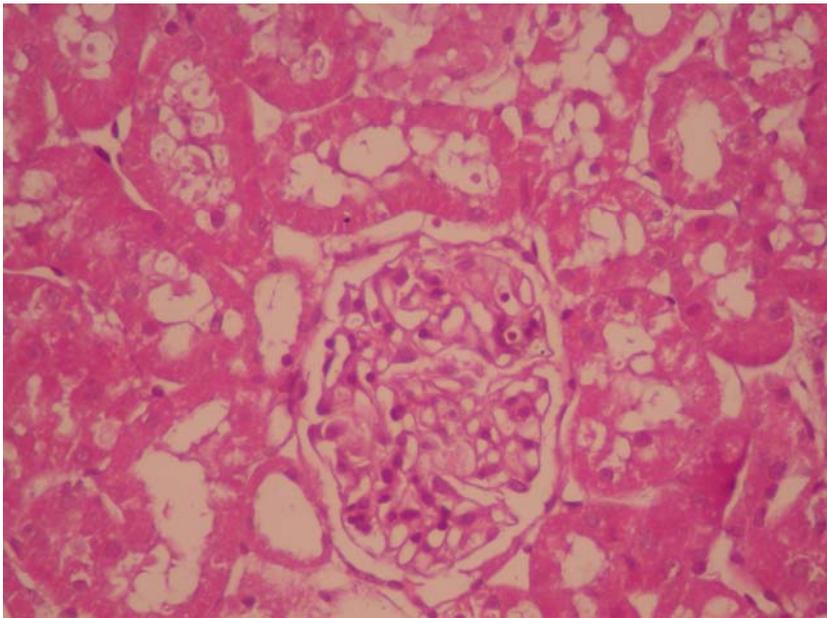


Figura 93 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10 μ g/mL de BmLec pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

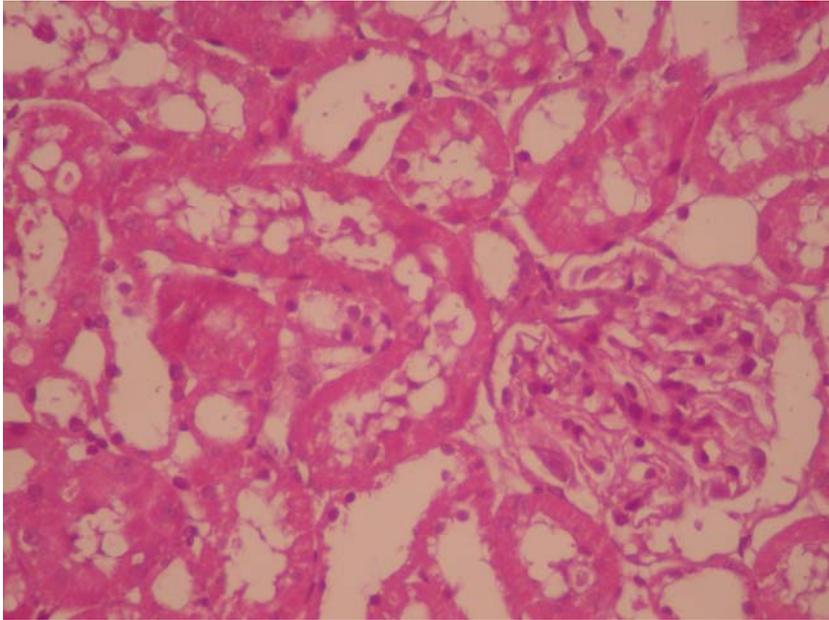


Figura 94 - Histopatológico da região do córtex renal de rato tratado com 10 μ g/mL de BJcuL pré tratado com 10 μ g/mL de indometacina. Glomérulos e túbulos com aparências normais

4.2 Leito mesentérico

4.2.1 uso da miotoxina I purificado do veneno da serpente *B moojeni* no leito mesentérico

Foi observado que a BmTxI não causou nenhuma alteração no leito vascular. Para mostrar viabilidade do leito após o uso da BmTx I, foi utilizado a fenilefrina e esta apresentou um aumento significativo da pressão (Figuras 95).

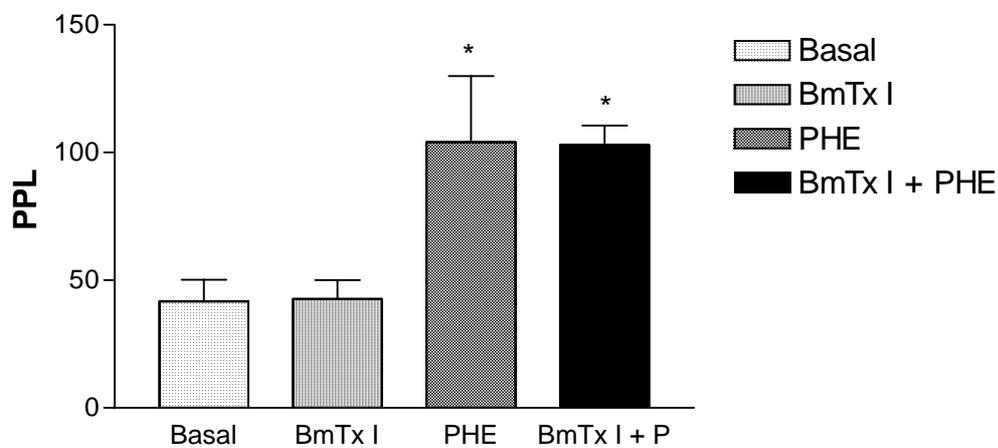


Figura 95 – efeitos vasculares em leito mesentérico da *Bothrops moojeni*. Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre o leito basal e o leito tratado (n = 4).

4.2.2 Uso da miotoxina I purificado do veneno da serpente *B.jararacussu* no leito mesentérico

Foi observado que a BthTxI não causou nenhuma alteração no leito vascular. Para mostrar viabilidade do leito após o uso da BthTx I, foi utilizado a fenilefrina e esta apresentou um aumento significativo da pressão (Figura 96).

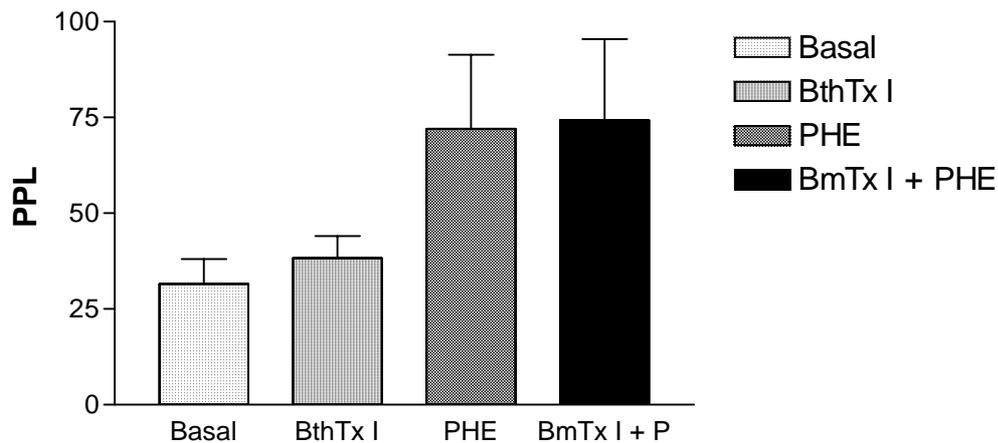


Figura 96 – efeitos vasculares em leito mesentérico utilizando-se a miotoxina I da *Bothrops jararacussu*. Os dados são expressos por média \pm E.P.M. Análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre o leito basal e o leito tratado (n = 4).

4.3 Efeito enzimático, antimicrobiano e miotóxicos da BthTx I e BthTx II

O veneno mostrou pouca atividade enzimática quando comparado com com miotoxina II da *Bothrops jararacussu* (BthTx II) no entanto essa atividade foi abolida na presença ρ BPB. BthTx I não mostrou nenhuma atividade enzimática na presença ou ausência do ρ BPB (Figura 11a) BthTx II mostrou alta atividade antimicrobiana, diminuindo em aproximadamente 86% do crescimento bacteriano, porém na presença do ρ BPB esta atividade diminui sensivelmente (Figura 11b). BthTx I apresentou pouca atividade bacteriana e não foi alterada na presença ρ BPB. Na microscopia por transmissão de eletron da bactéria *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae* mostrou uma larga e massiva destruição da membrana e parede celular com formação de vesículas induzida por BthTx I tratada ou não com ρ BPB (Figura 12). Enquanto bactéria tratada com BthTx II mostraram forte vacuolização citoplasmática com perda de citoplasma bem como das estruturas (Figura 12) esta atividade foi reduzida na presença do ρ BPB.

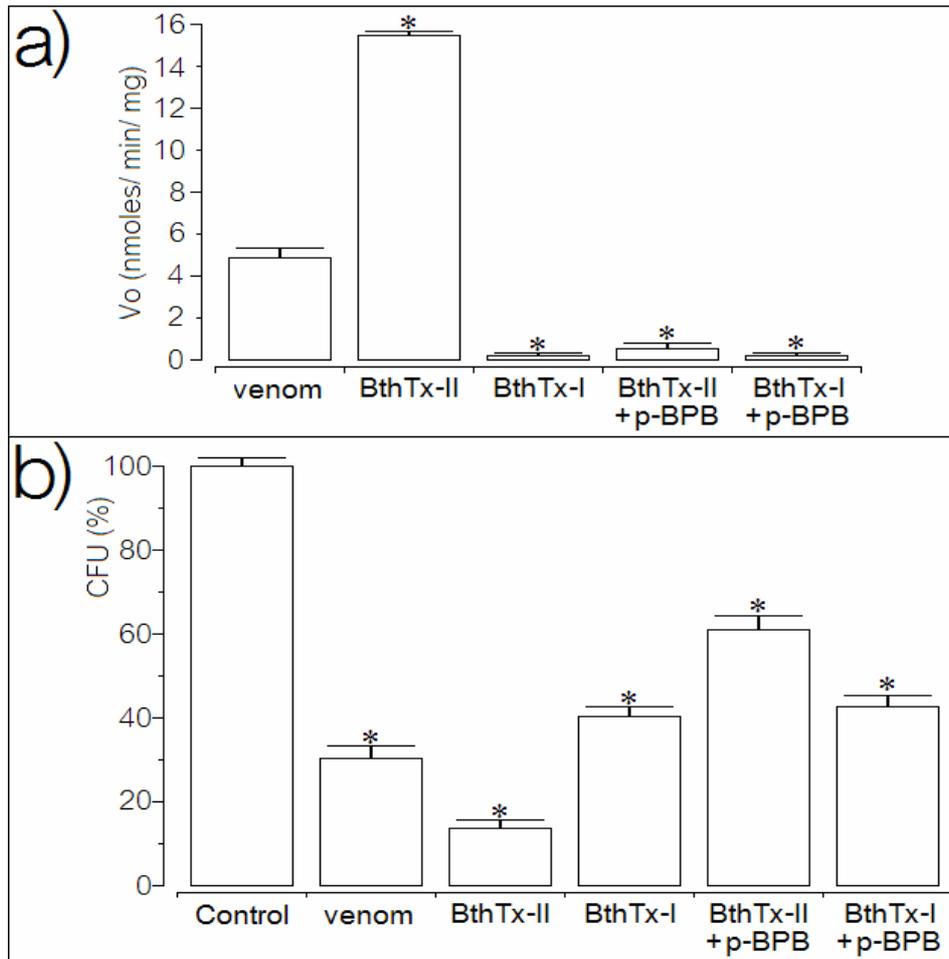


Figura 97- As atividades enzimáticas das duas PLA₂ foram realizadas na sua forma nativa e em presença da enzima incubada com p-BPB (inibidor específico da PLA₂). A significância dos dados foi medido por testes estatísticos ($P < 0.05$) (Figura 17a). Na figura 17b, temos a atividade antibacteriana do veneno total, da BthTx-II e I nativas e em presença do inibidor específico para PLA₂. Os ensaios de atividade antibacteriano foram realizados contra bactéria patogênica vegetal a *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*.

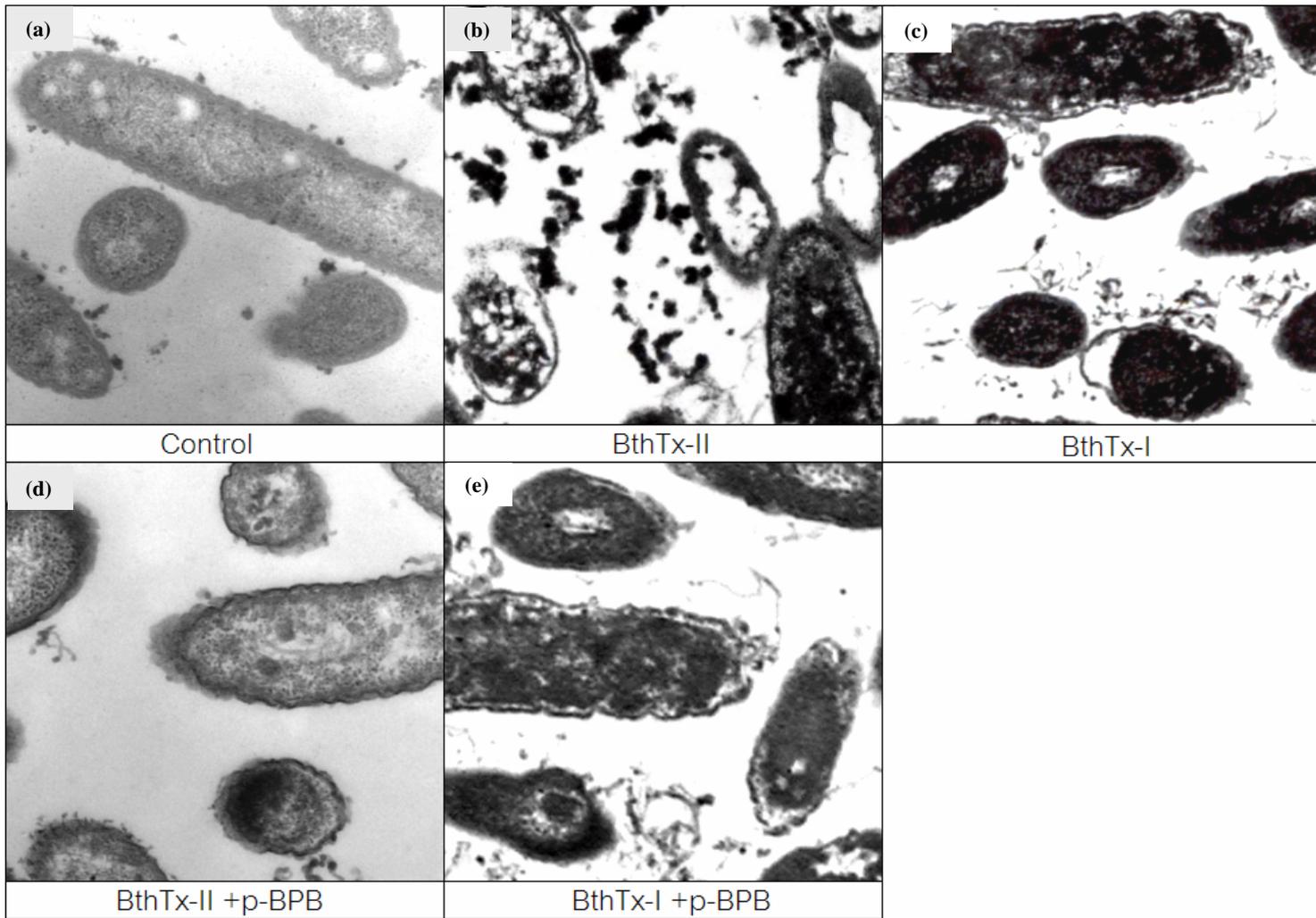


Figura 98 - Microscopia eletrônica de transmissão da *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* em presença das PLA2 miotóxicas nativas e em presença das PLA2 em presença da p-BPB.

4.4 Resumos dos principais efeitos causados pelas frações dos venenos de *Bothrops jararacussu* E *Bothrops moojeni* e bloqueadores destas frações

	PP	RVR	FU	RFG	%TNa ⁺	%TK ⁺	%TCI ⁻
Bthtx I	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Bthtx II	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Indometacina + BthTxI					↑	↓	
Indometacina + BthTx II	↑	↑	↑	↓		↓	↓
Tezosentan	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Indometacina + BmTx I	↑	↑	↑		↓	↓	↓
Tezosentan + BmTx I			↓	↓	↑	↑	
BmLec	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Indometacina + BmLec			↓	↓	↑		↓
Indometacina + BjuL			↓	↓	↑		

	%pTNa⁺	%pTK⁺	%pTCl⁻	ENa⁺	EK⁺	ECl⁻
Bthtx I	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Bthtx II	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Indometacina + BthTxI		↓	↓		↑	
Indometacina + BthTx II		↓	↓			↑
Tezosentan	↑	↑	↑	↑		
Indometacina + BmTx I	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Tezosentan + BmTx I		↑		↓	↓	↓
BmLec	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Indometacina + BmLec		↓	↓		↓	↓
Indometacina + BJcuL	↑	↑	↓		↓	↓

5 DISCUSSÃO

A BthTx-I e BthTx-II foram purificadas com alta homogenicidade molecular pela cromatografia de troca iônica. O pico com grau de pureza foram confirmados pelo HPLC de fase reversa, Tricine PAGE-SDS e espectrometria de massa. O Tricine PAGE-SDS bem como as espectrometria de massa mostraram uma evidente dimerização de BthTx-I e BthTx-II. A transição de monômero para dímero é típica das PLA₂ de veneno botrópico e aumentam a atividade enzimática em até 200 vezes, apesar de que em algumas desta PLA₂ possa ocorrer tetramerização como ocorre durante o protocolos de cristalização encontrada na BthTx-I ou *Bothrops godmani* (ARNI; WARD, 1996).

A alquilação causada na His 48 da estrutura primária da BthTx-II com ρ -bromophenacyl bromide (ρ -BPB) aboliu completamente a atividade enzimática desta PLA₂, porém não aboliu algumas atividade biológicas como mionecrose e a atividade antimicrobiana. No caso da alquilação BthTx-I com ρ -BPB não houve mudança no efeito antimicrobiano, no entanto diminui a mionecrose. Os resultados previamente descritos por Zhao et al. (1998) demonstram que ρ -BPB liga-se especificamente com His 48, no entanto outras regiões podem participar da interação entre ρ -BPB e PLA₂. K49 PLA₂ tem uma pequena diferença na organização celular dos resíduos de aminoácidos quando comparamos com D49 PLA₂ (CHIATO; WARD, 2003), assim a diferença observada entre BthTx-I e BthTx-II tratada com ρ -BPB envolve em particular um arranjo molecular encontrado no seu sítio catalítico. A atividade biológica severa encontradas nas PLA₂ isoladas não dependem da atividade catalítica, mas do domínio C-terminal como KKYRYYLKPLCKK encontrado entre os resíduos 115 e 129 da serpente *Bothrops asper* é importante para difundir a ação biológica desta proteína cataliticamente inativas. e a síntese de peptídeo feita de pequenos segmentos mostraram mionecrose, atividade citolítica e efeitos bactericidas (LOMONTE et al., 2003). Análise do domínio C-terminal das miotoxina II (*Bothrops asper*), BthTx-I e BthTx-II (*Bothrops jararacussu*) mostram uma sequência homologa. Páramos et al. (1998) demonstram que domínio C-terminal das fosfolipase básicas e atividade catalítica inativa na presença de Lys ou Arg nesta região é muito importante para o efeito bactericida desta PLA₂.

Nosso grupo descreve que o veneno da serpente *B. jararacussu* (10 μ g/mL) em rim isolado de rato causou intensa alteração na fisiologia renal. Este veneno diminuiu a pressão de perfusão renal, resistência vascular renal e os transportes tubulares de sódio potássio e cloreto, no entanto causou aumento do ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário (HAVT et al., 2001).

No nosso trabalho observa-se que a miotoxina I (BthTX-I) e miotoxina II (BthTX-II) da serpente *B. jararacussu* promoveram alterações renais similares ao encontrado no veneno, porém com efeitos opostos no parâmetro de pressão de perfusão e resistência vascular renal. Estes resultados sugerem que outros componentes do veneno, que não as miotoxinas são responsáveis pela diminuição destes parâmetros vasculares.

BthTx-I e BthTx-II tem estrutura e propriedades bioquímicas que devam induzir diferentes atividades, embora estas proteínas produzam os mesmos efeitos na fisiologia renal, mas por diferentes mecanismos.

A região do C-terminal, rica de lisina em algumas miotoxinas Lys49 PLA₂, seria a responsável pela atividade tóxica e citotóxica (GUTIERREZ; LOMONTE, 1997). Barbosa et al. (2002) demonstraram que as miotoxinas I e II purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* classificadas como Lys 49 PLA₂, portanto destituída da atividade fosfolipásica, somente a mitoxina I (BmTxI) na dose de 0,5µg/mL causou alteração renal. Eles concluíram que provavelmente a região do C-terminal, rica em lisina, poderia ser o responsável pelos efeitos causados por esta miotoxina uma vez que miotoxina II era destituída de uma região do C-terminal rica em lisina.

Soares et al. (2000a) demonstraram homologia muito grande de estrutura entre miotoxina I isolada da serpente *B. moojeni* e miotoxina I *B. jararacussu*, especialmente entre o C-terminal rico em lisina. Estes resultados sugerem que provavelmente o C-terminal da BthTX-I é o responsável pela alterações renais causada por esta miotoxina e que esses efeitos seriam indiretos, através de mediadores químicos, como foi demonstrado usando os ensaios com leito mesentérico para as duas miotoxinas.

A habilidade das Lys49 e Asp49 fosfolipases A₂ do veneno da serpente *Bothrops asper* para causar hiperalgesia foi investigada usando o teste de pressão na pata de ratos. Ambas as proteínas causaram hiperalgesia, Porém a indometacina reduziu a hiperalgesia causada Lys49 PLA₂, no entanto não interferiu com atividade nociceptiva causada pela Asp49 PLA₂. Em adição a síntese do peptídeo correspondente a seqüência do C-terminal da Lys49 PLA₂, causou hiperalgesia no mesmo tempo da miotoxina mas em magnitudes diferentes, enquanto que o peptídeo homologo sintetizado da Asp49 PLA₂ não mostrou nenhum efeito nociceptivo (CHARCUR et al., 2003).

Resultados similares foram descritos por Nunez et al. (2001), demonstraram que o peptídeo derivado da Lys49 da *B. asper* and *Agkistrodon piscivorus piscivorus* foram capaz de causar lise de células C2C12 na cultura de músculos esquelético e induziram edema na pata em ensaio de camundongos, enquanto os peptídeo derivado da miotoxina Asp49 não causaram

nenhuma alteração. Eles concluíram que Lys49 e Asp49 do grupo II PLA(2)s mostram ação miotóxica por mecanismos moleculares diferente.

Indometacina aboliu efetivamente os efeitos renais causados pela BthTX-I, no entanto ela reduziu parcialmente a resposta causada com BthTX-II. Estes resultados sugerem que eicosainoides são importantes mediadores nos efeitos renais promovidos BthTx-I, e provavelmente o C-terminal está envolvido na liberação deste mediadores e que outro mecanismo poderiam explicar as alterações promovidas por BthTX-II. O domínio de aminoácido básico presentes nas isoformas K49 PLA2 estão envolvidos na habilidade desta fosfolipase em se ligar aos receptores de membrana provavelmente em fosfolípido de membrana (LOMONTE et al., 2003). Por outro lado, miotoxina com atividade catalítica como Bthtx-II envolve um receptor protéico para se ligar na célula como acontece com as PLA₂ de pâncreas de bovino (LAMBEAU et al., 1999). Embora a discrepância de ação biológica de BthTx-I e BthTx-II envolva a região do C-terminal e sítio catalítico.

Endotelina é o mais potente peptídeo vasoconstrictor encontrado, tendo uma variedade de efeitos farmacológicos no sistema cardiovascular e em outros sistemas incluindo o renal (MASAKI,1998). Ela é 100 vezes mais potente do que a noradrenalina e 10 mais potente do que angiotensina II (ELLAHHAM et al., 2000).

A família da endotelina mostra uma estrutura similar de 21 resíduos de aminoácidos e é composta por endotelina 1 (ET1), endotelina 2 (ET2) e endotelina 3 (ET3) (CHENG, 2005).

A endotelina 1 é sintetizada e secretada pelo endotélio vascular do músculo liso, miócito cardíaco e célula mesangiais no rim. Endotelina 2 é expressa no rim, enquanto que endotelina 3 é liberada pelo intestino e glândula adrenal (MASAKI, 1998; SOROKIN; KOHAN 2003).

As endotelinas apresentam dois subtipos de receptores. Receptor de endotelina do tipo A com alta afinidade para ET1 e ET2 e receptor do tipo B apresenta afinidade similar para todos os membros da família de endotelina (MASAKI,1998).

Endotelina de origem circulatória ou local contribui para o aumento da resistência vascular renal. O rim é considerado o maior sítio de produção deste peptídeo, bem como o seu principal alvo. (CHENG, 2005).

A vasculatura renal é preferencialmente sensível aos efeitos vasoconstritores quando comparados com outros vasos. (BENIGNI et al., 1993).

Endotelina 1 é a principal isoforma produzida pelas células mesangiais no rim. Numerosos estímulos modulam transcrição gênica destas células incluindo substâncias

vasoativas, fatores de crescimento, citosinas e agonista de radicais de oxigênio.(HERMAN et al., 1998).

Tezosentan é um antagonista de receptor de endotelina I com alta afinidade para ambos os receptores (ETA e ETB r) (CLOZEL et al., 1999). Tezosentan causou diminuição na PP e RVR e aumentou RFG e o transporte tubular de sódio potássio e cloro em rim isolado de rato.

Indometacina é um inibidor inespecífico de ciclooxigenase, inibindo assim a formação de prostaglandina, prostaciclina e tromboxanos (GORDON; SAMUELS, 1995) seus efeitos em rim isolado de rato tem sido descrito por Martins et al. (1998), Monteiro e Fonteles (1999).

Barbosa et al. (2002) demonstraram que a miotoxina I uma toxina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (lys 49 PLA2) aumentou PP, RVR, FU e RFG, esta miotoxina também diminuiu o transporte tubulares de sódio, potássio e cloro, em rim isolado de rato.

Indometacina reduziu parcialmente a resposta observada BmTx I, este resultado sugere que eicosanóides estão envolvidos como mediadores destes efeitos renais por outro lado tezosentan bloqueou os efeito renais causado por BmTx I, sugerindo que a endotelina também estaria envolvida como mediador neste processo.

Simonson e Dunn (1990) mostraram que ET1 estimularia a atividade da ciclooxigenase resultando primariamente no aumento de PGE₂, com pequeno aumento de tromboxano A₂. Isto ocorreria via receptor de endotelina do tipo A em culturas de células mesangiais de rato (FUKUNAGA et al., 1996; HUGHES et al., 1995). Isto poderia explicar a reversão parcial causada pela indometacina e que provavelmente endotelina seria o principal mediador dos efeitos renais causado pela BmTxI.

Receptor de endotelina do tipo 1 fazem parte da família das proteínas G entra eles G_i, G_q, G_s e G_{α13} (DULIN et al., 1999; KITAMURA et al., 2002) tendo como resultados a modulação de variedade de sinais de cascata incluindo ciclooxigenase, citocromo P-450, óxido nítrico sintetase (NOS), serina/treonina quinase, tirosina quinase (SOROKIN; KOHAN 2003). Muitos destes caminhos são comuns para indução de endotelina por células mesangiais, ET-1 ativa fosfolipase C (JAFFER et al., 1990; SIMONSON et al., 1989a, 1989b) aumentando os níveis de proteína quinase C (SIMONSON; DUNN, 1991). Aumento dos níveis de trifosfato de inositol está associado com alcalinização via o aumento da troca Na⁺/H⁺ e aumento do Ca²⁺ intracelular (BADR et al., 1989; SIMONSON; DUNN, 1991; SIMONSON; ROONEY 1994; SIMONSON et al., 1989a). Este mecanismo poderia explicar o aumento do influxo de cálcio descrito por Kini e Iwanaga (1986) e sugerido por Barbosa et al. (2002) para os efeitos renais causados pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* (BmTxI).

Havt et al. (2005) reportam que a lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops pirajai* reduziu a PP, RVR, FU, RFG, e os transporte tubulares de sódio potássio e cloreto em rim isolado de rato. Estes resultados foram similar ao encontrado com o veneno da *Bothrops pirajai*, enquanto que a lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* mostrou uma diminuição FU, RFG e Transporte tubulares de sódio potássio e cloro (HAVT, 2003). Estes resultados foram similares ao encontrado com a lectina da *Bothrops pirajai*, porém sem alteração dos parâmetros de PP e RVR. Por outro lado a lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* mostrou um aumento na PP, RVR, FU, RFG e diminuição dos transportes tubulares de sódio potássio e cloreto, estes resultados foram similares aos encontrados pela miotoxina I da *Bothrops moojeni* (BARBOSA et al., 2002).

A despeito da considerável homologia estrutural das lectinas da *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* elas apresentam efeitos renais diferentes em rim isolado de rato.

A análise da seqüência de aminoácidos mostra dois aspectos interessantes, apesar de estas proteínas compartilharem uma identidade maior de 95%, portanto mostrando uma estrutura terciária similar, mas estas pequenas diferenças indicam que elas são cruciais para a diferenciação biológica, fisiológica da toxina.

Trabalhos recentes com lectinas de origem animal e vegetal demonstram que estas lectinas poderiam promover liberação de mediadores inflamatórios (ALENCAR et al., 1999; ASSURY et al., 2002) e que prostaglandinas poderiam interferir no transporte tubular de sódio potássio e cloreto (HAVT et al., 2005). Indometacina bloqueou as alterações causadas no transporte tubular de sódio, potássio e cloreto das lectinas de serpentes *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* sugerindo a presença de eicosanóides como um importante mediador dos efeitos tubulares causados pela lectinas.

O córtex renal normal produz grande quantidade de PGE₂ e PGI₂ e pouca quantidade de TXA₂ (FARMAN et al., 1987). PGE₂ e PGI₂ têm ação vasodilatadora no rim. Infusões intrarenal de prostaglandinas aumentaram o fluxo sanguíneo renal e produziram efeito natriurético, inibindo a reabsorção tubular de sódio e na alça ascendente de Henle reduziram o transporte tubular de cloro (SIMMONS et al., 2004).

Epitélio glomerular e células mesangiais têm a capacidade de sintetizar ambas as formas de PGI₂ e PGE₂. Estes prostanóides seriam responsáveis por influenciar o fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e liberação de renina. Tanto PGI₂ como PGE₂ sintetizado pelo cortex renal são importantes estimuladores para liberação de renina (OSBORN et al., 1984) e agentes vasoconstritores (SCHNERMANN, 2001).

Havt et al. (2003) usando modelo de rim isolado com lectinas vegetais *Canavalia ensiformis* e *Dioclea guianensis* sugeriram que o aumento na PP e RVR poderia ser promovida indiretamente por mediadores inflamatório liberado por células mesangial como prostaglandina e interleucina.. A lectina da *Bothrops moojeni* (BmLec) também aumenta PP e RVR, além do FU e RFG. Estes parâmetros foram bloqueados pela indometacina. Sugerindo a presença de eicosanóides nos efeitos vasculares e glomerulares provocados pela lectina da *Bothrops moojeni*.

Estudos *in vivo*, em rim isolado e na preparação isolada do aparelho justaglomerular têm demonstrado que administração de inibidores inespecíficos de ciclooxigenase, também bloqueiam a liberação de renina pela mácula densa sensitiva a diminuição NaCl (HARRIS, 1994).

Lectina de serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) reduziu o fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular na presença de indometacina e não ocorreu nenhuma alteração na PP e na RVR, sugerindo que alterações glomerulares ocasionadas por BJcuL foi independente do efeito vascular. BJcuL poderia antagonizar a liberação de renina bem como outro agente vasoconstritor mediado pela ciclooxigenase tubular e conseqüentemente a diminuição no transporte tubular de cloro.

O aumento da reabsorção tubular de sódio após a inibição da síntese de prostaglandina tem sido relatada em parte devido a estimulação da bomba Na⁺/K⁺ (RUBINGER et al., 1990) além disto Lee et al. (2004) demonstraram que a indometacina diminuiu a atividade da guanilato ciclase e aumentou oxido nítrico no rim. A potencialização dos efeitos glomerular observados pelo bloqueio da ciclooxigenase observado na BjcL e a diminuição deste efeitos causado por BmLec poderia ser causado pela diminuição da guanilato ciclase com aumento do óxido nítrico no rim.

6 CONCLUSÃO

BthTx I e BthTX II apresentam atividade antibactericida e promovem algumas alterações na fisiologia renal incluindo aumento na pressão de perfusão e resistência vascular renal bem como diurese, natriurese e kaliurese.

Os efeitos renais causados por BthTx I foram bloqueados pela indometacina, sugerindo a presença de eicosanóides como um importante mediador deste processo.

Os efeitos renais causado por BthTx II foram revertido parcialmente pela indometacina, sugerindo que outra regiões da miotoxina poderiam estar envolvidas independente de sua atividade catalítica enzimática.

O domínio C-terminal das miotoxinas poderia esta envolvido nas alterações renais ocorrida.

Tezosentan, antagonista de receptor de endotelina do tipo I, causou diminuição na pressão de perfusão, resistência vascular renal associado com o aumento do ritmo de filtração glomerular e transporte tubular de sódio potássio e cloro.

Tezosentan bloqueou todas as alterações renais causada pela miotoxina I purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*, ugerindo que endotelina seria o principal mediador responsável por estas alterações em rim isolado de rato ao lado da estimulação liberação de ciclooxigenase.

As lectinas tipo C, galactose específica, isoladas dos venenos de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu* interferem na função renal por diferentes mecanismos.

A lectina da *Bothrop moojeni* promove a liberação de mediadores Inflamatórios enquanto que, A lectina da *Bothrops jararacussu* poderia antagonizar a liberação de renina e de agente vasoconstritores mediados pela ciclooxigenase tubular bem como a redução no transporte de cloro.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S., FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.
- AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. **Amer. J. Path.**, v. 30, p. 479-499, 1954.
- AMORIM, M. F.; MELLO, R. F.; SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. **Mem. Inst. Butantan**, v. 34, p. 137-157, 1969.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B. GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venom: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**. v. 82, p. 755-763, 2000.
- ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L. D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) mummifer* snake venom, a new Lys 49 phospholipase A₂ homologue. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 32, p. 63-71, 2000.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p.827-841, 1996.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v. 23, p. 691-706, 1985.
- ASSREUY, A. M. S.; CALVETE, J. J.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; ROCHA-FILHO, D. R.; MELO, S. C. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol. Reprod.**, v. 67, p.1796-1803, 2002.
- ATODA, H.; HYUGA, M.; MORITA, T. The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 14903-14911, 1991.
- AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. **Toxicon**, v. 16, p.71-75, 1978
- BARBOSA, P. S. F.; HAVT, A.; FACÓ, P. E. G.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S. A. M.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. S.; MONTEIRO, H. S. A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and main miotoxins. **Toxicon**, v. 40, p. 1427-1435, 2002.
- BADR, K. F.; MURRAY, J. J.; BREYER, M. D.; TAKAHASHI, K.; INAGAMI, T.; HARRIS, R. C. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 336-342, 1989.

- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq. Bras. Med.**, v. 65, n. 4, p. 345-355, 1991.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. **J. B. M.**, v. 65, n. 4, p. 209-250, 1993.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do Gênero "Lachesis" In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap. 19, p.297.
- BARRAVIERA, B.; LAMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MEIRA, D. Acute phase reactions including cytokins in patients bitten by *Bothrops spp.* And *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **J. Venom Anim. Toxins**, v. 1, p. 11-22, 1995.
- BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e Medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v. 12, p. 82-95, 1984.
- BENIGNI, A.; ZOJA, C.; CORNA, D. A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. **Kidney Int.**, v. 44, p. 440-444, 1993.
- BICUDO, P. L. Acidentes ofídicos em medicina veterinária. In: BARRAVIERA, B. (Coord.) . **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. cap. 29, p.375-387.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; Da CRUZ-HOFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p 698-706, Nov. 1999.
- BORGES, R. C.; ARAÚJO A. F. B. Seleção de habitat entre duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B.neuwiedi* Wagler) (Serpente: viperidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 58, p. 591-601, 1998.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BOWMAN, R. H.; MACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and eletrolyte in perfused rat kidney. **Am. J.Physiol.**, v. 226, n. 2, p 426-430, 1974.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.
- BRUSÉS, J. L.; CAPASO, J.; KATZ, E.; PILAR, G. Specif in vitro biological activity of snake venom myotoxins. **J. Neurochem.**, v. 60, p. 1030-1042, 1993.
- BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B. A.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B.; BARRETO, O. C. O.; MARCONDES, M. Snake bite-induced acute failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 82-88, 1993.
- BULTRON, E.; GUTIERREZ, J. M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**. v. 31, p. 217-222, 1993.

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

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of latin america**. Ithaca: Cornell Univ. Press, 1979.

CALDERÓN, L.; LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 358, p. 343-350, 1998.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of latin america**. Ithaca: Cornell Univ. Press, 1989.

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, Apr. 2004.

CASTRO, H. C.; LEMOS, M. G.; BOM, C.; ZINGALI, R. B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon**, v. 41, p. 525-528, 2003.

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

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopatological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrop asper* (torciopelo) venom in mouse. **Toxicon**, v. 27, p. 1085-1093, 1989.

CHAVES, F.; LEÓN, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp 49 myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861-1869, 1998.

CHEN, Y. L.; TSAI, I. H. Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glicoprotein-Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 210, p. 472-477, 1995.

CHENG, J. W. M. Tezosentan in the management of decompensated heart failure. **Cardiol. Rev.**, v. 13, n. 1, p.28-34, 2005.

CHIATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipase A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, p. 869-883, 2003.

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

CHUGH, K. S.; AIKAT, B. K.; SHARMA, B. K.; DASH, S. C.; THOMAS MATHEW, M.; DAS, K.C. Acute renal failure following snakebite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 3-9, 1981.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin I: amino acid sequence and function. **Protein Chem.**, v. 12, p. 57-64, 1993.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; MOTA, I.; TALYOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cell. **Toxicon**, v. 39, p 1567-1573, 2001.

CLOZEL, M.; QIU, C.; OSTERWALDER, R.; ROECKEL, A.; BRUNEVAL, P.; HEUDES, D.; CLOZEL, J.P. 1999. Effects of nonpeptide endothelin receptor antagonists in rats with reduced renal mass. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 33, n. 4, p. 611-618, 1999.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 226, p. 103-121, 1977.

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

CORRÊA JR, M.C.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, p. 739-748, 2002

CRUZ-HÖFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca de ilhoa) venom and phospholipase A₂-containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 185-195, 2001.

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 CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E .C .T.; TOYAMA, M .H.; GIGLIO, J .R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipase A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-1785, 2000.

De CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, p. 833-839, 2004.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DHILLON, D. S.; CONDREA, E.; MARAGANORE, J. M.; HEINRIKSON, R. L.; BENJAMIN, S.; ROSENBERG, P. Compararison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p.1723-1730, 1987.

- DÍAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipase A₂ role of negatively charge phospholipids as potential membrane binding sites. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391, p. 56-64, 2001.
- DOUGLA, C. R. Patofisiologia da insuficiência renal aguda. In: DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia de sistema renal**. São Paulo: Robe Editorial, 2001. p. 272-274.
- DOUGLA, C. R. Patofisiologia do processo inflamatório. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). **Patofisiologia geral: mecanismo das doenças**. São Paulo: Robe Editorial, 2000. p. 549.
- DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. **Prog. Nucl. Acid Res.**, v. 45, p. 207-232, 1993.
- DRICKAMER, K. C-type lectin like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, p. 585-590, 1999.
- DULIN, N. O.; SOROKIN, A.; REED, E.; ELLIOTT, S.; KEHRL, J. H.; DUNN, M. J. RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to Galpha11. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 714-723, 1999.
- ELLAHAM, S. H.; CHARLON, V.; ABASSI, Z.; CALIS, K. A., CHOUCAIR, W. K. Bosentan and the endothelin system in congestive heart failure. **Clin. Cardiol.**, v. 23, n. 11, p.803-807, 2000.
- FARMAN, N.; PRADELLES, P.; BONVALET, J. P. PGE₂, PGF₂ alpha, 6-keto-PGF₁ alpha, and Tx_{B2} synthesis along the rabbit nephron. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. 53-59, 1987.
- FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. Toxic activities of venom from nine *Bothrops species* and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603-1608, Dec. 1992.
- 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.
- FOHLMAN, J.; EAKER, D. Isolation and characterization of a lethal myotoxic phospholipase A from the venom of the common sea snake *Enhydrina schistosa* causing myoglobinúria in mice. **Toxicon**, v. 15, n. 5, p.385-393, 1977.
- FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, v. 90, p.159-161, 1982.
- FONTELES, M. C.; MOEIRA-LIMA, A. A. Functional comparison of kidney perfused with fatty acid-free and albumin. **Braz Med. Biol. Res.**, v. 15, n. 4/5, p. 296, 1982.
- FONTEQUE, J. H.; BARROS FILHO, I. R.; SAKATE, M. Acidentes botrópico de interesse em animais domésticos. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v. 4, n. 3, p. 102-111, 2001.
- FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. cap 13, p. 149-160.

FUKUNAGA, M.; FUJIWARA, Y.; OCHI, S.; YOKOYAMA, K.; SHOJI, T.; FUKUHARA, Y.; ORITA, Y.; KAMADA, T.; BADR, K. F.; UEDA, N. Mechanism of induction of prostaglandin E2 production by endothelin 1 in cultured rat mesangial cells. **Exp. Nephrol.**, v. 4, n. 6, p. 340-349, 1996.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipase A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, p. 65-72, 2002.

GLASER, K. B.; MOBILIO, D.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. Secretory phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. **Trends Pharmac. Sci.**, v. 14, p. 92-98, 1993.

GORDON, M.C., SAMUELS, P. Indomethacin. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 38, n. 4, p. 697-705, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from snake venoms. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. London: Wiley, 1997. p. 321-352.

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, p. 182-186, 1974.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 667-668, 1968.

HARRIS, R. C.; MCKANNA, J. A.; AKAI, Y.; JACOBSON, H. R.; DUBOIS, R. N.; BREYER, M. D. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 2504-2510, 1994.

HAVT, A. **Toxicidade aguda e alterações hematológica e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, 1999.

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

HAVT, A. **Estudo comparativo dos efeitos biológicos promovidos por lectinas vegetais e animais**. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

HAVT, A.; BARBOSA, P. S. F.; 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. A. 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, Apr. 2003.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. 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, Jan. 2005.

HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, p. 1203, 1992.

HERMAN, W. H.; EMANCIPATOR, S. N.; RHOTEN, R. L.; SIMONSON, M. S. Vascular and glomerular expression of endothelin-1 in normal human kidney. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 275, p. 8-17, 1998.

HERZIG, R. H.; RATNOFF, O. D.; SHAINOFF, J. R. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 76, p. 451-465, 1970.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K-I. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 2320-2326, 1991.

HUGHES, A. K.; PADILLA, E.; KUTCHERA, W. A.; MICHAEL, J. R.; KOHAN, D. E. Endothelin-1 induction of cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 47, p. 53-61, 1995.

HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICH, H.; KAPUR, R.; BOMAN, H. G. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. **Eur. J. Biochem.**, v. 127, n. 1, p. 207-217, 1982.

HUMPHRIES, M. J.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of human melanoma cells. **Science**, v. 233, p. 467-470, 1986.

JAFFER, F. E.; KNAUSS, T. C.; POPTIC, E.; ABOUD, H. E. Endothelin stimulates PDGF secretion in cultured human mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 38, n. 6, p. 1193-1198, 1990.

KINI, R. N. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? **Toxicon**, v. 34, p. 1287-1294, 1996.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 14402-14407, 1987.

KINI, R. N.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure - Function relationship of phospholipase II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipase. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 295-305, 1986.

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure - Function relationship of phospholipase I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. **Toxicon**, v. 24, p. 527-541, 1986b.

KITAMURA, A.; KAGAMI, S.; URUSHIHARA, M.; KONDO, S.; YOSHIZUMI, M.; TAMAKI, T.; KURODA, Y. Endothelin-1 is a potent stimulator of $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 299, n. 4, p. 555-561, 2002.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; KOUYOUMDJIAN, N. C.V. Acidentes Ofídicos "estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto", **A revista do Clínico Geral**, p. 55-93, set. 1986.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos por *Bothrops moojeni*: relato de 37 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, n. 6, p. 424-432, nov./dez. 1988.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 4, p.162-170, 1999.

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.**, v. 343, p. 257-263, 1998.

LANDUCCI, E. C. T.; De CASTRO, R. C.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue pirotoxin-I in the rat and rabbit. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 1289-1294, 2000.

LEE, W. H.; DU, X. Y.; LU, Q. M.; CLEMETSON, K. J.; ZHANG, Y.; Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. **Thromb. Haemost.**, v. 20, p. 585-591, 2003.

LEE, J.; KIM, S. W.; JUNG, T. K.; OH, Y. W.; PARK, C. S.; MA, S. K.; KIM, N. H.; CHOI, K. C. Indomethacin decrease particulate guanylyl cyclase activity in rat kidney. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, p. 207-211, 2004.

LEITE, R. S.; FRANCO, W.; OWNBY, C. L.; SELISTRE-de-ARAÚJO, H. S. Effects of ACL myotoxin, a Lys 49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom, on water transport in the isolated toad urinary bladder. **Toxicon**, v. 43, n. 1, p. 77-83, Jan. 2004.

LELOUP, P. Observation sur la reproduction de *Bothrops moojeni* Hoge em captivité. **Acta Zool. Pathol. Antverp.**, v. 62, p. 173-201. 1975.

LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding in large scale. **Acta Zool. Pathol. Antverp.**, v. 78, p. 177-198, 1984.

LIMA, A. Ilha de São Paulo tem nova espécie de cobra. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 4 mar. 2001. *Ciência Zoologica*, p.19.

- LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, L. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1077, n. 3, p. 362-370, Apr. 1991.
- LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERELES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. A new muscle damaging toxin miotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733. 1989.
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**, v. 28, p. 1137-1146, 1990.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom analysis of edema formation, inflammatory cell and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105, 1993.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 41-45, Jan. 1994.
- 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.
- MACGREGOR, 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.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; JÚNIOR, E. O. G.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 36, p. 1441-1450, 1998.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M.; BARBOSA, P. S.F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D.O.; APRÍGIO, C. C.; QUEIROZ, M. G. R.; GUARNIERI, M. C.; HAVT, A.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 595-599, 2005.
- MATTISON, C. **The Encyclopedia of snakes**. London: A Blandford Book, 1995.
- MASAKI, T. The discovery of endothelins. **Cardiovasc. Res.**, v. 39, n. 3, p. 530-533, 1998.
- MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STABELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V.; A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, p. 215-223, 2004.

MEBS, D. Enzymes in snake venom: an overview. In: BAILEY, G. S. (Ed.). **Enzymes from snake venom**. Fort Collins, USA: Alaken, 1998. p. 1-10.

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

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos Nefrotóxicos do veneno *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato**: estudo de antagonistas de PAF e da indometacina. Tese (Doutorado)-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.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DIAZ, C.; LOMONTE, B; GUTIERREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, p. 651-660, 2005.

MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snake. **Toxicon**. v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

NAMBI, P.; CLOZEL, M.; FEUERSTEIN G. Endothelin and heart failures. **Heart Fail. Rev.**, v. 6, p. 335-340, 2001.

NOGUEIRA, C. C. História natural de *Bothrops moojeni* Hoge, 1996 (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) da Estação Ecológica de águas Emendadas, Brasília, Brasil central. In: SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 1998, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: IEMA; SEMATEC-DF, 1998. p. 9-28.

NISHIDA, S.; TERASHIMA, M.; SHIMAZU, T.; TAKASAKI, C.; TAMIYA, N. Isolation and properties of two phospholipases A2 from the venom of an Australian elapid snake (*Pseudechis australis*). **Toxicon**, v. 23, n. 1, p.73-85, 1985.

NÚÑEZ, C. E., ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of themyotoxicof the Lys49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys 49, but not from Asp49 myotoxin exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, p. 1587-1594, 2001.

OGILVIE, M. L.; BYL, J. W.; GARTNER, T. K. Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. **Thromb. Haemost.**, v. 62, p. 704-707, 1989.

OLIVEIRA, A. H. C.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺ - independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, v. 40, p. 6912-6920, 2001.

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

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; Da CRUZ-HOFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, v. 39, p. 1477-1485, 2001.

OWNBY, C. L.; BJARNANASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Am J. Path.**, v. 93, p.201-218, 1978.

OWNBY, C.L.; SELISTRE de ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ protein, **Toxicon**, v. 37, p. 411-415, 1999.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO,E. Bacterial activity of Lys40 and Asp49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: syntetic Lys49 myotoxin II- (115-129) peptideidentifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-461, 1998.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO,E. Bacterial activity of Lys40 and Asp49 miotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: syntetic Lys49 myotoxin II- (115-129) peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-461, 1998.

PENG, M.; LU, W.; BEVIGLIA, L.; NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P. Echicetin: a snake venom protein that inhibits binding of von Willebrand factor and alboaggregins to platelet glycoprotein Ib. **Blood**, v. 81, p. 2321-2328, 1993.

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, 1995a.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **AUTOR**. Biotechnology and genetic engineering reviews. **Local: editora**, 1998. v. 15, p. 199-228.

PFEILSCHIFTER, J. Regulation of synthesis and secretion of group II phospholipase A₂. In: GLASER, K. B.; VADAS, P. (Ed.). **Phospholipase A₂ in clinical inflammation**: molecular approaches to pathophysiology. New York: CRC press, 1995. v. 5, p. 93-124.

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

PONRAJ, D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Renal lesion in rhabdomyolysis caused by *Pseudechis australis* snake myotoxin. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1956-1969, 1997.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp 49 is not na absolute prerequisite for the enzymatic activity of low-Mr phospholipase A₂: purification characterization and computer modeling 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.

PUORTO, G. accidentes por cobras. In: SCHVARTSMAN, S. (Coord.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. cap. 13, p. 143-149.

RAAB, W.; KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p. 1017-1020, 1966.

RATCLIFFLE, P. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LEDINGHAM, J. G. G.; WARREL, D. A. Direct nephrotoxicity of *Russell's viper* venom demonstrated in the isolated perfused rat kidney. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p.312-319, 1989.

RAGE, J. Diversity of snakes. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling, 1997. p.34-47.

REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, v. 33, n. 2, p.187-194, 1993.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; BAMBIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Fuctional and histopathological renal changes induced in rats by *bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 407-416, 1989.

ROODT, A. R. de; DOLAB, J. A.; HAJOS, S. E.; FERNANDEZ, T.; SEGRE, L. Capacidad neutralizante de los sueros antioidicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caisaca, Lanzadera). **Medicina (Buenos Aires)**, v. 57, n. 6, p. 667-676, 1997.

ROSS, B. D. the isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.

RUBINGER, D.; WALD, H.; SCHERZER P.; POPOVTZER, M.M. Renal sodium handling and stimulation of medullary Na-K-ATPase during blockade of prostaglandin synthesis. **Prostaglandins**, v. 39, p. 179-94, 1990.

RUIZ DE TORRENT, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK, S.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **APPTLA**, v. 49, p. 177-183, 1999.

RUSSEL, F. E. **Snake venom poisoning**. New York: Scholium international Grat Neck, 1983.

SANT, S. M.; PUNDARE, N .M. Autopys study of cases of snake bite with special reference to renal lesion. **J. Postgrad. Med.**, v. 18, p. 181-188, 1972.

SELITRE DE ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C L. Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A₂ myotoxin; a higy conserved class of protein. **Toxicon**, v. 34, n. 11/12, p. 1237-1242, 1996.

SCHNERMANN, J. Sodium transport deficiency and sodium balance in gene-targeted mice. **Acta Physiol. Scand.**, v. 173, p. 59-66, 2001.

SEEDAT, Y. K.; REDDY, J.; EDINGTON, D. A. Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. **Nephron**, v. 13, p. 455-463, 1974.

SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA, T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 32, p. 6892-6897, 1993.

SERRANO, S. M. T.; MATOS, M. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom-i. Isolation and activity of two serine proteinase, MSP1 and MSP2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n.4, p. 471-481, 1993.

SHASTRY, J. C. M.; DATE, A.; CARMEN, R. H.; JOHNY, K. V. Renal failure following snake bite: a clinicopathological study of nineteen patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, n. 5, p. 1032-1038, 1977.

SCHUREREK, H. J.; LOHFERT, H.; HIERHOLZER, K. Na⁺ reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na⁺-load). **Pflugers Arch. Ges. Physiol.**, v. 319, p. 1285, 1970.

SILVA, O. A.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n. 2, p. 401-407, 1979.

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

SIMONSON, M. S.; WANN, S.; MENE, P.; DUBYAK, G. R.; KESTER, M.; DUNN, M. J. Endothelin-1 activates the phosphoinositide cascade in cultured glomerular mesangial cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 13, p. S80-S84, 1989a.

SIMONSON, M. S.; WANN, S.; MENE, P.; DUBYAK, G. R.; KESTER, M.; NAKAZATO, Y.; SEDOR, J. R.; DUNN, M. J. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 708-712, 1989b.

SIMONSON, M. S.; DUNN, M. J. Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 3, p. 790-797, 1990.

SIMONSON, M. S.; DUNN, M. J. Endothelins: a family of regulatory peptides. State-of-the-art lecture. **Hypertension**, v. 17, n. 6 pt 2, p. 856-863, 1991.

SIMONSON, M. S.; ROONEY, A. Characterization of endothelin receptors in mesangial cells: evidence for two functionally distinct endothelin binding sites. **Mol. Pharmacol.**, v. 46, p. 41-50, 1994.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: source, activities and applications. **Crit. Rev. Biochem.**, v. 19, p. 145-178, 1999.

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. In: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. cap. 28, p. 997-1018.

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

SOARES, A. M.; RODRIGUE, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, TOYAMA, M. H.; LOMBARD, F. R.; ARNI, A. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, myonecrotic activity and cristalization. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-514, 1998.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, 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 Lys 49 phospholipase A₂ 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 A₂ homologue from *ibothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, T.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES-SIMINI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, 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, n. 4, p.579-589, 2003.

TEIXEIRA, C. E. P.; LANDICCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHARCUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M., MARAGONI, S.; AMARAL, M. E. C.; VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C. Isolation and characterization of a convulxina-like protein from *Crotalus durissus collineatus* venom. **J. Protein Chem.**, v. 20, p. 662-671, 2001.

TSAI, L.H.; LIU, H.C.; CHANG, T. Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. **Biochim. Biophys. Acta.** v.6, p.94-99, 1987.

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

VARAGUNAM, T.; PANABOKKE, R. G. Bilateral cortical necrosis of the kidney following snake bite. **Postgrad. Med J.**, v. 46, p. 449-451, 1970.

- VARKI, A. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. **FASEB J.**, v. 4, p. 248-255, 1997.
- VIDAL, J. C. Bioquímica de los venenos ofídicos. **Bol. Assoc. Herpetológica Argent.**, v. 4, p. 6, 1988.
- WARREL, D. A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: BON, C.; GOYFLON, M. (Ed.). **Envenoming and their treatments**. Lyon: Edition foundation Marcel, 1996. p. 63-67.
- WEISS, J.; WRIGTH, G.; BECKER, A. C. A. P. A.; VAN DER BERGH, C. J.; VERHEIJ, H. M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* treated with the bactericidal/permeability-increasing protein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 4162-4167, 1991.
- WHATLY, R. E. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 6325-6333, 1989.
- WILLIES, T. W.; TU, A. T.; MILLER, C. W. Thrombolysis with a snake venom protease in rat model of venous thrombosis. **Thromb. Res.**, v. 53, p. 19-19, 1989.
- WILLINGER, C. C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRUNTHALER, G.; PFALLER, W. *In vitro* nephrotoxicity of *Russell's viper* venom. **Kidney Int.**, v. 47, p. 518-528, 1995.
- ZAGER, R. A. Rhabdomyolysis and myihemoglobinuric acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 49, p. 113-117, 1996.
- ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1523, 2001.
- ZHAO, H.; TANG, L.; WANG, X-Q.; ZHOU, Y.; LIN, Z. Structural of a snake venom phospholipase A2 modified by p-Bromophenacyl bromide. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 875-886, 1998.
- ZHANG, C.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Histopathological studies of the acute inflammation in synovial tissue of rat knee joint following intra-articular injection of PLA2 from Chinese Cobra (*Naja naja atra*) venom. **Toxicon**. v. 37, p. 783-799, 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, p. 10794-10802, 1993.

ANEXOS