

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

Efeitos causados pelo veneno da *Bothrops moojeni* e de suas frações,  
miotoxinas I e II, em rim isolado de rato

PAULO SÉRGIO FERREIRA BARBOSA

FORTALEZA - CE  
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

tese  
6/12/02  
32Ma  
2002  
12/2

B<sub>211e</sub> Barbosa, Paulo Sérgio Ferreira

Efeitos causados pelo veneno da *Bothrops moojeni* e de suas frações miotoxina I e II em rim isolado de rato/ Paulo Sérgio Ferreira Barbosa. – Fortaleza, 2002.

114f.:il.

Orientadora: Profª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.

Curso de Pós Graduação em Farmacologia

1. *Bothrops* – Veneno 2. Nefrologia – Toxicologia. 3.  
Veneno de cobra. I- Título

CDD 615942

**ORIENTADORA:**

**Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**

**CO-ORIENTADOR**

**Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles**



**Dissertação apresentada a Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia**

---

**Paulo Sérgio Ferreira Barbosa**

**Dissertação aprovada em: 27 de março de 2002**

---

**Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**

---

**Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes**

---

**Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

### **AOS MEUS PAIS**

Pelo homem que eu sou

### **A MINHA ESPOSA, VERA**

Pelo amor, apoio e incentivo

### **JOÃO PAULO E CAMILLE**

Meus filhos, meus estímulos e minha vida

### **A PROF<sup>a</sup>. HELENA SERRA AZUL MONTEIRO**

Por acreditar em mim

### **ALEXANDRE HAVT**

Um irmão que eu ganhei

### **A PROF<sup>a</sup> GISELA COSTA CAMARÃO**

Pela Atenção, Compreensão e carinho, muito obrigado

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Manassés Claudino Fonteles pelos conselhos

Ao professor Marcos Toyama por acreditar em nosso grupo.

Ao professor Dalgimar Beserra de Menezes pela ajuda na confecção e fotografias nos estudos histopatológicos dos nossos experimentos.

Ao professor Lima Verde pela gentileza de nos ter cedido o veneno da serpente.

Ao bioquímico Domingos Barreto de Oliveira pela força e incentivo. O amigo das horas incertas.

À Técnica do laboratório Maria Silvia Helena Freire de França, pela paciência que teve comigo, nos experimentos em que me ajudou.

Ao meus amigos do grupo, Alice, Arlândia, Patrícia pela cooperação e companheirismo.

Aos estudantes de iniciação científica, Ederson, Iara, Lucília, Tais, Ticiania pela ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos do mestrado que de uma forma ou de outra me ajudaram neste 2 anos. Romero, Danielle, Rita, Regina, Ricardo Lira, Pedro Adriano e Sandra.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínica que sempre me trataram bem.

As secretárias da pós-graduação Silvia e Áurea pela presteza.

Ao CNPq e FUNCAP, pelo financiamento do trabalho que gerou esta dissertação



Dedico esta dissertação a senhora Luíza Meneses Cândido (avó)  
um exemplo de mulher, que teve uma vida pautada pela,  
HONESTIDADE, MORAL E DECÊNCIA,  
Partiu, mas deixou o legado para sua família.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>35</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>54</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**B.** - Bothrops

**CK** - Creatina kinase

**DL<sub>50</sub>** - Dose letal média, ou dose capaz de matar metade dos animais

**DTT** - ditioneitol

**ENa<sup>+</sup>** - Excreção de sódio

**EK<sup>+</sup>** - Excreção de potássio

**ECI<sup>-</sup>** - Excreção de cloro

**FU** - Fluxo urinário

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**IP** - Intraperitoneal

**PLA<sub>2</sub>** - fosfolipase A<sub>2</sub>

**PAF** - fator de agregação plaquetária

**PTH** - Fenilhidantoína

**PP** - Pressão de perfusão

**RVR** - Resistência vascular renal

**RFG** - Ritmo de filtração glomerular

**%TNa<sup>+</sup>** - Percentual de transporte tubular de sódio

**%TK<sup>+</sup>** - Percentual de transporte tubular de potássio

**%TCI<sup>-</sup>** - Percentual de transporte tubular de cloro

**%pTNa<sup>+</sup>** - Percentual de transporte tubular proximal de sódio

**%pTK<sup>+</sup>** - Percentual de transporte tubular proximal de potássio

**%pTCI<sup>-</sup>** - Percentual de transporte tubular proximal de cloro

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 01</b> – Serpente da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	<b>23</b>
<b>Figura 02</b> – Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação	<b>42</b>
<b>Figura 03</b> – Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado	<b>43</b>
<b>Figura 04</b> – Técnica cirúrgica (A = veia femural, B = ureter canulado e C = cânula arterial)	<b>47</b>
<b>Figura 05</b> - Cromatografia de troca iônica do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	<b>60</b>
<b>Figura 06</b> - HPLC fase reversa da fração da miotoxina I (Bmtx-I)	<b>61</b>
<b>Figura 07</b> - HPLC fase reversa da fração da miotoxina II (Bmtx-II)	<b>62</b>
<b>Figura 08</b> – Sequência de aminoácido N-terminal da miotoxina I (Bmtx-I) e miotoxina II (Bmtx II)	<b>63</b>
<b>Figura 09</b> – Bmtx-I e Bmtx II quando comparadas com outras miotoxinas fosfolipásica K49 e D49.	<b>64</b>
<b>Figura 10</b> – Histopatológico da Região do córtex renal apresentando intensa quantidade de material protéico, 5 $\mu$ g de miotoxina I (40X)	<b>94</b>
<b>Figura 11</b> – Histopatológico dos Glomérulos, túbulos e vasos apresentando intensa quantidade de material protéico, 5 $\mu$ g de miotoxina I (100X)	<b>94</b>

- Figura 12** – Histopatológico da região do córtex renal apresentando moderada quantidade de material protéico, 10 $\mu$ g de veneno (40X) 95
- Figura 13** – Histopatológico dos túbulos renais apresentando moderada quantidade de material protéico, 10 $\mu$ g de veneno (200X) 95
- Figura 14** – Histopatológico da região do córtex renal sem alterações, 5 $\mu$ g de miotoxina II (40X) 96
- Figura 15** – Histopatológico dos túbulos e glomérulos sem alterações, 5 $\mu$ g de miotoxina II (100X) 96

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **65**  
*Bothrops moojeni* na pressão de perfusão renal (PP)

**Tabela 2** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **67**  
*Bothrops moojeni* na resistência vascular renal (RVR)

**Tabela 3** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **69**  
*Bothrops moojeni* no fluxo urinário (FU)

**Tabela 4** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **71**  
*Bothrops moojeni* no ritmo de filtração glomerular (RFG)

**Tabela 5** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **73**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>)

**Tabela 6** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **75**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular proximal de sódio  
(%pTNa<sup>+</sup>)

**Tabela 7** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **77**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular de potássio  
(%TK<sup>+</sup>)

**Tabela 8** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **79**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular proximal de  
potássio (%pTK<sup>+</sup>)

**Tabela 9** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **81**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular de cloro (%TCl<sup>-</sup>)

**Tabela 10** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **83**  
*Bothrops moojeni* no percentual do transporte tubular proximal de cloro  
(%pTCl<sup>-</sup>)

**Tabela 11** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **85**  
*Bothrops moojeni* na excreção de sódio ( $\text{ENa}^+$ )

**Tabela 12** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **87**  
*Bothrops moojeni* na excreção de potássio ( $\text{EK}^+$ )

**Tabela 13** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **89**  
*Bothrops moojeni* na excreção de cloro ( $\text{ECl}^-$ )

**Tabela 14** - Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da **91**  
*Bothrops moojeni* no clearance osmótico ( $\text{Cosm}$ )

## LISTA DE GRÁFICO

- Gráfico 1-** Calibração do sistema. Velocidade da Bomba X Pressão de 48  
Perfusão.
- Gráfico 2-** Calibração do sistema. Velocidade da Bomba X Fluxômetro. 49
- Gráfico 3 –** Calibração do sistema. Velocidade da Bomba X Fluxo. 50
- Gráfico 4 -** Efeito na pressão de perfusão (PP) renal na ausência 66  
(controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL)  
e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.
- Gráfico 5 -** Efeito na resistência vascular renal (RVR) na ausência 68  
(controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL)  
e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.
- Gráfico 6 -** Efeito no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e 70  
presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e  
miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.
- Gráfico 7 -** Efeito no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência 72  
(controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL)  
e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.
- Gráfico 8 –** Efeito no percentual de transporte tubular de sódio 74  
(%TNa<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL),

miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 9** – Efeito no percentual de transporte tubular proximal de 76 sódio (%pTNa<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*

**Gráfico 10** - Efeito no percentual de transporte tubular potássio (%TK<sup>+</sup>) 78 na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 11** - Efeito no percentual de transporte tubular proximal de 80 potássio (%pTK<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 12** - Efeito no percentual de transporte tubular cloro (%TCl<sup>-</sup>) na 82 ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 13** - Efeito no percentual de transporte tubular proximal de 84 cloro (%Ptcl<sup>-</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 14** - Efeito na excreção de sódio ( $\text{ENa}^+$ ) na ausência (controle) **86** e presença do veneno bruto ( $10\mu\text{g/mL}$ ), miotoxina I ( $5\mu\text{g/mL}$ ) e miotoxina II ( $5\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 15** - Efeito na excreção de potássio ( $\text{EK}^+$ ) na ausência **88** (controle) e presença do veneno bruto ( $10\mu\text{g/mL}$ ), miotoxina I ( $5\mu\text{g/mL}$ ) e miotoxina II ( $5\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 16** - Efeito na excreção de cloro ( $\text{ECI}^-$ ) na ausência (controle) e **90** presença do veneno bruto ( $10\mu\text{g/mL}$ ), miotoxina I ( $5\mu\text{g/mL}$ ) e miotoxina II ( $5\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*.

**Gráfico 17** - Efeito na clearance osmótico ( $\text{Cosm}$ ) na ausência **92** (controle) e presença do veneno bruto ( $10\mu\text{g/mL}$ ), miotoxina I ( $5\mu\text{g/mL}$ ) e miotoxina II ( $5\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*.

### Abstract

Effects caused by *Bothrops moojeni* venom and of miotoxins I and II in rat isolated kidney

Paulo Sérgio Ferreira Barbosa (2002)

Master Degree

Department of Physiology and Pharmacology Federal University of Ceará

Acute failure renal is one the most common systemic complications after snakebite, however, its pathogenesis remains obscure. In this study we evaluated the renal effects of *Bothrops moojeni* venom and its miotoxins (Bmtx-I and BmtxII) in rat isolated perfused kidneys. The miotoxins were purified by ion-exchange chromatography and reverse phase HPLC. The crude venom (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and miotoxins (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added to the perfusion system 30 min after the start of perfusion. The renal effects were compared with a control group, perfused with modified Krebs-Henseleit solution alone. *B. moojeni* venom decreased the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), and the percent sodium, potassium and chloride tubular transport ( $\%T\text{Na}^+$ ,  $\%T\text{K}^+$ ,  $\%T\text{Cl}^-$ ). In contrast, the venom increased the urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), and the sodium, potassium and chloride excretion ( $\text{ENa}^+$ ,  $\text{EK}^+$ ,  $\text{ECl}^-$ ). The renal effects of myotoxin I were very similar to those of the venom, but there was an increase rather than a decrease in the PP and RVR. Myotoxin II had no effect on renal physiology, except for a transient decrease in  $\%T\text{K}^+$ . In conclusion, *Bothrops moojeni* venom caused intense alterations in renal physiology, including a drop in vascular resistance associated with diuresis, natriuresis and kaliuresis. Bmtx-I had an opposite effect to that of crude venom in PP and RVR. Bradykinin potentiating peptides in the venom could contribute to the decrease in vascular resistance. BmTx-I may have exerted its renal effects by indirectly increasing the calcium influx after damage to the cell membrane.

## Resumo

### Efeitos causados pelo veneno da *Bothrops moojeni* e de suas frações miotoxina I e II em rim isolado de rato

Paulo Sérgio Ferreira Barbosa. Dissertação de mestrado, 2002.

### Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará

A insuficiência renal aguda é uma das complicações mais frequentes causada pelo envenenamento por picada de serpente, contudo a sua patogênese permanece obscura. Em nossos estudos avaliamos o efeito renal causado pelo veneno da *Bothrops moojeni* e suas miotoxinas (Bmtx-I e BmtxII) na perfusão de rim isolado de rato. As miotoxinas foram purificadas por cromatografia de troca iônica e HPLC fase reversa. O veneno e as miotoxinas I e II na dosagem de 10µg/mL, 5µg/mL e 5µg/mL respectivamente foram adicionados no sistema de perfusão 30 minutos após o início do experimento. Os efeitos renais foram comparados com o grupo controle, onde os rins foram perfundidos somente com a solução de Krebs-Henseleit modificada. O veneno da *B. moojeni* diminuiu a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR) e percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloro (%TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup> e TCl<sup>-</sup>). Em contraste, o veneno aumentou o fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG) e a excreção de sódio potássio e cloro (ENa<sup>+</sup>, EK<sup>+</sup>,

ECl<sup>-</sup>). O efeito renal da miotoxina I foi similar ao do veneno, porém houve um aumento na PP e RVR. A miotoxina II não apresentou efeito fisiológico, exceto um efeito transitório com diminuição no %TK<sup>+</sup>. Concluímos que o veneno da *B. moojeni* causou intensa alteração na fisiologia renal, incluindo o aumento na resistência vascular associado com a diurese, natriurese e caliurese. Miotoxina I tem o efeito oposto ao do veneno na PP e RVR. Peptídeos potenciadores de bradicinina no veneno podem contribuir para a diminuição na resistência vascular. Os efeitos renais mostrados pela miotoxina I parecem estar relacionados com o aumento do influxo de cálcio causado por danos a membrana celular.

## Introdução

### 1. Serpentes peçonhentas brasileiras

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

#### 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, sendo vagarosa, sua 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 representadas pelas serpentes do gênero *Micrurus*

#### 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 situados 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. São vagarosas (Barraviera, 1991). São divididas em três gêneros *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* (Rage, 1977).

### 1.2.1) Gênero *Lachesis*

Representada no Brasil pela espécie *Lachesis muta*, subdivididas 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 apresenta uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçada (Grantsau, 1991). São conhecidas como surucucu, surucucu pico de jaca ou surucutinga. É a serpente venenosa de maior tamanho em toda América Latina, chegando a um comprimento de quatro (4) metros (Barraviera, 1991).

### 1.2.2) Gênero *Crotalus*

Representado por 26 espécies em todas às Américas (Norte, Central e Sul), porém no Brasil encontramos 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 e Mattison, 1995). Sua coloração é variável. Podemos encontrar as cores oliva-cinzenta, oliva, marrom-cinzenta até marrom, com manchas romboédricas pela linha dorsal, manchas com margens brancas e centro mais claro; lado ventral branco-amarelado até cinzento-amarelado (Grantsau, 1991).

### 1.2.2) 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 dos números de espécies há grande dificuldade na sua identificação por 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 e Fan,1992).

Principais espécies do gênero *Bothrops* existentes no Brasil (Belluomini, 1984; Campbell e Lamar 1989):

*Bothrops alternatus* - conhecida como urutu - cruzeiro. Encontrada em regiões mais elevadas e secas. É ágil, violenta, dando o bote meio 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 encontradas 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 ilhoa, 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 jararacussu* - conhecida popularmente por jararacuçu que significa "jararaca-grande". Encontrada nas regiões baixas e alagadiços, margem de rios e lagoas podem alcançar tamanho avantajado. É capaz de inocular até quatro mililitros de veneno, o que corresponde aproximadamente a um grama de veneno seco. Constitui 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.

*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.

Recentemente foi relatado a descoberta de uma nova espécie do gênero *Bothrops*, presente na ilha de Alcatraz, litoral norte do Estado de São Paulo chamada de Jararaca de Alcatrazes. A espécie deverá ser batizada como *Bothrops alcatraz* (Lima, 2001).

*Bothrops moojeni* - objeto de nosso estudo por isso iremos falar mais detalhadamente. 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 e Lamar 1979; Leloup 1984; Borges e 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 vitelogênese 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 01 – Serpente da espécie *Bothrops moojeni*

## 2) Características e ações do veneno da *Bothrops moojeni*

Estima-se que no Brasil por ano ocorram 20.000 casos de acidentes ofídicos, ocasionando 350 óbitos. A maioria destes casos deve-se às serpentes

dos gêneros *Bothrops* 90% e *Crotalus* 9%, sendo raro os acidentes causados por *Micrurus* e *Leptomicrurus* ou por ofídios do gênero *Lachesis* (Brasil, 1998).

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, e destes casos 128 foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* (Bicudo, 1994).

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 e 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 complicações em relação aos acidentes por *B. jararaca*. As hemorragias sistêmicas são pouco freqüentes 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 grave não impediu os aparecimentos de complicações (Kouyoumdjian e Polizelli, 1988 e Roodt et al., 1997).

Os venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* possuem muitas atividades biológicas, entre elas destacam-se a atividade hemorrágica, proteolítica, coagulante, edematogênica, fibrinopênica, trombocitopênica e

necrosante. Os efeitos se manifestam localmente e sistematicamente (Roodt et al., 1997).

Ferreira e colaboradores (1992), estudaram o veneno de 9 (nove) espécies de *Bothrops* e constataram que o veneno de *B. moojeni* apresentava baixas atividades hemorrágica, necrosante e coagulante, contudo possuíam ainda uma alta atividade hemolítica, fosfolipásica, miotóxica e edematogênica.

O acidente tem repercussão clínica devido às características coagulante e proteolítica de seu 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 de veneno inoculado 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 para a circulação com choque periférico e eventualmente óbito ( Kouyoumdjian, J A. E Kouyoumdjian, N. C. V., 1986).

O edema causado no acidente botrópico é mediado por metaloproteinase, fosfolipase A<sub>2</sub>, produtos eicosanóides e ativação de receptores alfa 1 e alfa 2 adrenérgicos (Ruiz de Torrent et al., 1999)

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 metaloproteinase (Varanda e Gianinni, 1994).

As metaloproteinases do veneno atuam diretamente sobre as estruturas dos vasos sanguíneos, provocando extravasamento do sangue (Ruiz de Torrent et al., 1999) sendo provável que neste efeito também participem enzimas com atividade proteolítica 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 fibroectina, laminina, colágeno e gelatina (Serrano et al., 1993).

Assakura e colaboradores (1985) isolaram uma metaloproteinase da *B. moojeni* denominada protease A. Esta metaloproteinase tem atividade proteolítica na caseína e a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  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- $\beta$  da insulina oxidada. Quanto a sua atividade hemorrágica, ela é considerada baixa (Reichl e 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 e colaboradores (1993) isolaram três glicoproteínas da *B. moojeni* sendo uma com característica de metaloproteinase denominada MPB e duas com característica de serinoproteinase 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 são a hidrólise do colágeno tipo I, gelatina e da fibrina, enquanto que o fibrinogênio sofre degradação de sua cadeia  $\gamma$  (Reich e Mandelbaum, 1993).

A *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 serinoproteínases incluem enzimas que transformam o fibrinogênio de mamífero em fibrina, ativando o fator de coagulação V e proteína C, liberando cinina do cininogênio e quebra do complemento C<sub>3</sub> na cascata do complemento (Petretski et al., 2000).

MSP I é uma serinoproteínase com atividade amidolítica e de agregação plaquetária. Enquanto MSP II a outra serinoproteínase, possui atividades esterolítica e amidolítica. Tanto a MSP I quanto a MSP II assim como a MPB são glicoproteínas destituídas de atividade hemorrágica. Elas hidrolisam fibrinogênio, fibrina, gelatina, colágeno I e fibronectina (Reichl e Mandelbaum 1993).

As enzimas trombina-símile ou tipo trombina estão presentes em número variado de espécies das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*. Apresentam ações hemostáticas e 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 degradado pela plasmina, ocasionando um quadro de diminuição da coagulação sangüínea (Russel, 1983 e Havt, 1999).

A ação mionecrótica se deve as miotoxinas de estrutura fosfolipásica (destituída ou não de atividade enzimática), que levam a transtornos vasculares e hemostáticos, podendo causar um processo tissular isquêmico levando a uma amputação de membro ou lesão músculo tendinosa permanente (Roodt et al., 1997).

Gutiérrez e colaboradores (1986) citam que a membrana celular do músculo se desestabiliza seletivamente com a ação das miotoxinas, provocando um rápido aumento na concentração de cálcio no citoplasma causado pelo influxo através dos canais de cálcio. Alterando de forma generalizada a membrana plasmática.

Villarroel e colaboradores (1978/79) estudando o veneno de sete serpentes do gênero *Bothrops* concluíram que a serpente *B. moojeni* induziu a maior ação necrótica em cobaias brancas. Ficando demonstrado que as áreas de necrose dependeram diretamente da quantidade de veneno inoculado e do tempo decorrido para administração do antiveneno.

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 A<sub>2</sub>. A atividade fosfolipásica é amplamente encontrada nos venenos botrópicos.

As serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox* apresentam alta atividade fosfolipásica (Vidal e Stoppani, 1971; Vidal et al., 1972). Contudo, já foram isoladas proteínas com atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> dos venenos de *Bothrops neuwiedi* (Vidal e Stoppani, 1971) *Bothrops asper* (Gutierrez et al., 1984), *Bothrops alternatus* (Nisenbom et al., 1986) e *Bothrops moojeni* (Reichl et al., 1989).

A fosfolipase A<sub>2</sub> hidrolisa as ligações 2 -acilas das fosfatidilcolinas e das fosfatidiletanolaminas com liberação dos ácidos graxos e formação de lisofosfolípidos como lisolectinas (Havt, 1999). Elas são divididas em dois grupos maiores sendo um intracelular ou citosólico (cPLA<sub>2</sub>), com alto peso molecular e encontrado em várias células, enquanto o outro é extracelular ou secretório (sPLA<sub>2</sub>), de baixo peso molecular e são encontrados nos venenos de serpentes e suco pancreático dos mamíferos (Glance et al., 1993 e 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 obtido dos venenos de serpentes da família *Crotalidea e Viperidea* bem como do líquido sinovial e das plaquetas de seres humanos; o terceiro grupo pode ser obtido através do veneno de vespas (Dennis 1994 e Pfeilschifter, 1995).

O segundo subgrupo de fosfolipase A<sub>2</sub> pode ser dividido em Asp-49 sPLA<sub>2</sub> (esta fosfolipase contém no resíduo de ácido aspártico um sítio de ligação para o íon Ca<sup>2+</sup> e possui alta atividade enzimática) ou proteína Lys-49 (contém uma lisina homóloga na posição 49 e tem pequena ou é destituída de atividade enzimática).

Ownby e colaboradores, (1999) após administração de PLA<sub>2</sub> de veneno de serpente ou porção de pâncreas em animais, observaram que usualmente a PLA<sub>2</sub>, comanda reação inflamatória local, principalmente degranulação de mastócitos aumentando a permeabilidade celular e formação de edema.

As PLA<sub>2</sub>, de veneno de serpentes são capazes de induzir efeitos biológicos severos como neurotoxicidade pré ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão e hipotensão (Kini e Iwanaga, 1986 e Soares et al., 1998)

Moura-Da-Silva e colaboradores (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-1 possuía uma alta atividade fosfolipásica, porém, Lomonte e colaboradores (1990) isolaram a miotoxina I e miotoxina II. Ambas apresentaram-se como Lys 49 PLA<sub>2</sub>-símile do veneno da *Bothrops moojeni* e são destituída de atividade PLA<sub>2</sub>, hemorrágica, anticoagulante e coagulante, porém poderia ter uma atividade necrótica grave na fibra do músculo esquelético, bem como um rápido e transitório edema de pata.

Além da ação hemolítica, enzimas com atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> também apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas e miotóxicas, dando origem à necrose e mioglobínúria (Fohlman e Eaker, 1977).

Ferreira e colaboradores (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 nos venenos *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).

### 3) ALTERAÇÕES RENAIIS

Durante um acidente ofídico uma das conseqüências que traz grande preocupação são as alterações renais, que foram descritas por vários autores, como a glomerulonefrite (Seedat et al., 1974), glomerulite e nefrite intersticial (Sant e Pundare, 1972), artrite e necrose tubular (Sitprija e Boonpucknavig., 1979), necrose cortical (Varagunam e Panabokke, 1970) e insuficiência renal (Raab e Kaiser, 1966). De todos, a mais relatada tem sido a insuficiência renal aguda.

Aung-khin (1978) após a injeção letal do veneno da *Russell's viper* em animais e 7 acidentes em pacientes, observou alterações nos rins 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 estavam preenchidas 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 e colaboradores (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 phospholipase A<sub>2</sub>.

A atividade fosfolipásica pode produzir prostaglandinas vasodilatadoras renais, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e PGG<sub>2</sub>, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese ou produz PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  cuja ação é vasoconstritora. Além das prostaglandinas, a PLA<sub>2</sub> através da ciclooxygenase, pode ativar o tromboxano A<sub>2</sub> que também possui ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (Bydlowski, 2000).

Endotelina (ET<sub>1</sub>) é um peptídeo de 21 aminoácidos que apresenta uma ação vasoconstritora renal, sendo secretado no compartimento basolateral do endotélio e 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 e Gopalakrishnakone, 1997; Aung-khin (1977) e Boer-lima et al., 1999).

A insuficiência renal aguda (IRA) descrita por vários autores (Amorim et al., 1969; Amorim e Melo, 1954; Silva et al., 1979; Shastry et al; 1977; Aung Khin 1978) é a principal causa de morte por acidentes com veneno ofídicos. Ocorrendo secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda (Seedat et al., 1974), necrose tubular aguda (Chugh et al., 1981) e necrose cortical renal (Date e Shastry, 1981), sendo usualmente atribuída ao sangramento, hipotensão, colapso circulatório, hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada (Soe-Soe, 1990).

Rabdomiólise é uma condição clínica freqüente no envenenamento, esta condição associada a mioglobínúria, 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 90 µg da miotoxina da serpente *Pseudechis australis* por via intramuscular em camundongos albinos, machos, pesando aproximadamente 20g 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 mioglobínúria 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 vasconstricção e diminuía o ritmo de filtração glomerular.

O mecanismo de ação hipotético realizado na cultura de células lisossômicas e células musculares esqueléticas *in vivo* sugeriu 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).

Em estudos usando como modelo rim isolado, Pirotzky e colaboradores (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 e colaboradores, 1995 e 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 e colaboradores (2001), concluíram que alterações nos parâmetros funcionais de pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR) em rim isolado de rato utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*, não foram promovida pelo Fator de Agregação Plaquetária (PAF).

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

No nosso trabalho procuramos estudar os efeitos causados pelo veneno da serpente *Bothrops moojeni* e de suas miotoxinas purificadas em rim isolado de rato.

## Objetivos Gerais

O nosso objetivo foi analisar os efeitos do veneno da *Bothrops moojeni* e de suas miotoxinas no sistema de perfusão de rim isolado de rato.

## Objetivos Específicos

1) Avaliar a toxicidade aguda através da  $DL_{50}$  do veneno da *Bothrops moojeni* proveniente do laboratório de ofidiologia da Universidade Federal do Ceará (LAROF)

2) Avaliar a ação do veneno bruto e suas frações miotoxina I e miotoxina II no sistema de rim isolado, comparando seus efeitos com o grupo controle e os grupos entre si.

3) Avaliar as alterações histopatológicas renais causadas pelo veneno e suas frações miotoxina I e miotoxina II após perfusão renal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O veneno utilizado em nossos experimentos foi fornecido pelo LAROF (Laboratório de Ofídico da Universidade Federal do Ceará), pela pessoa do Dr. Lima Verde. As frações do veneno foram isoladas no laboratório do departamento de Bioquímica da UNICAMP-SP (Universidade de Campinas) em colaboração com o Dr. Marco H Toyama.

### 1) Toxicidade Aguda (DL<sub>50</sub>)

Em nosso trabalho foram usados camundongos albinos pesando entre 25-30 g privado de alimento por toda à noite com água "ad libitum". Divididos em grupos com 10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas. O veneno foi aplicado por via intraperitoneal em dose decrescente de 18, 15, 12, 9, 6, 5, 4, 3 e 1 mg/kg.

### 2) Purificação do veneno da *Bothrops moojeni*

Para a purificação do veneno da *B. moojeni* e a obtenção da Miotoxina I e Miotoxina II foram utilizados os seguintes Métodos:

#### 2.1) Cromatografia Troca iônica em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Cerca de 200 mg do veneno total da serpente *Bothrops moojeni* foi dissolvida em tampão bicarbonato de amônia 50nM, após a homogeneização o veneno total foi então centrifugado a 10000 rpm (4500/g) por 1 minuto. O veneno clarificado foi então aplicado à coluna Protein Pack SP 5PW (0.78 cm x 7.0 cm) previamente equilibrada por 20 minutos com o mesmo tampão usado para o preparo do veneno total (bicarbonato de amônia, pH 7,8, 0,05 M). A eluição das frações do veneno foi feita usando-se gradiente linear (0.05 - 1.0 M) de bicarbonato de amônia, usando-se um fluxo contínuo de 4

mL/minuto. A detecção dos picos foi feita em um detector Uv/visível modelo 490 A (Waters) usando uma absorbância de 280 nM.

## **2.2) HPLC fase reversa**

As purificações das miotoxinas de *B. moojeni* por cromatografia de fase reversa foram feitas como descrito por Toyama et al., (1995).

Cinco miligramas da fração que apresentavam atividades de PLA<sub>2</sub> foram dissolvidas em 250µl de ácido trifluoracético 0.1%(v/v) (solvente A). A solução resultante foi clarificada por centrifugação e o sobrenadante aplicado ao µ-Bonpack C-18 column (0.78 cm x 30cm; Wasters 991-PDA System). As proteínas foram eluídas com um gradiente linear (0 - 100%) de 66.5% (V/V) acetronila em ácido trifluoracético 0,1% (solvente B), usando um fluxo de 2.0 mL/min. O padrão retirado foi monitorado a 280nM. e as frações coletadas foram liofilizadas e estocadas a -20°C

## **Redução da carboxy metilação da proteína**

Um miligrama de toxina purificada foi dissolvida em 6M de cloreto de guanidina (Merck, Darmstadt, Germany) contendo 0.4 M Tris-HCL e 2mM EDTA, a um pH final de 8.15, reduzido com DTT ( e carboxy-metilado com C<sup>14</sup>-ácido iodoacético ( Marangoni et al., 1995). A amostra foi disaliticada em coluna Sephadex G 25, usando como eluente da coluna ácido acético 1M a 25°C e o achado RC-toxin foi liofilizada.

## **Procedimento seqüencial**

A seqüência direta do N-terminal foi levada a cabo com a proteína reduzida carboximetilada que foi sequenciada usando um sequenciador gás líquido automático 477A Biosystem (Applied Biosystems). Os aminoácidos feniltioidantoína (PTH) foram identificados de acordo com o tempo de retenção dos 20 aminoácidos (PTH) padrões. Os Peptídeos contendo (14C)

CM-Cys foram monitorados por detectar a taxa de radio atividade usando contador de centilação líquida (Beckmann, model L-250).

### **Atividade PLA<sub>2</sub>**

A atividade de PLA<sub>2</sub> foi medida segundo o método descrito por Cho and Kézdy (1991) and Holzer and Mackessy (1996) e modificado para 96 poços. A mistura padrão do ensaio continha 200 µL de tampão (10 mM Tris-HCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 100mN Nacl, pH 8.0), 20µL do substrato, 20 µL de água e 20 µL da PLA<sub>2</sub> no volume final de 260 µL. Depois a adição de PLA<sub>2</sub> (20 µL), a mistura foi incubada por volta de 40 min a 37°C e as absorbâncias foram coletadas a cada 10 minutos de intervalos. A atividade enzimática foi expressa como a velocidade inicial de reação (V<sub>o</sub>) e calculada baseada no aumento na absorbância depois de 20 minutos. A inibição da atividade PLA<sub>2</sub> pelas Miotoxina I e II foi determinada por co-incubação de 2 proteínas (1:1, w/w) por 30 minutos a 37 °C, e analisada a atividade residual enzimática. O pH e a temperatura da PLA<sub>2</sub> foram determinadas por incubação das enzimas num tampão de diferentes pHs (4,5 - 9,5) e na solução tampão HCL-Tris, pH 8.0 a 37°C. Todos os ensaios foram feitos no triplicato e a absorbância a 425nM, foram medidos usando o SpectraMax 340 multiwell plate reader (molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### **Atividade Miotóxica**

Níveis de Creatina Kinase (CK) foram analisados usando o kit comercial (Merck Granutest 2.5 kit). As miotoxinas foram injetadas na quantidade de 50µL a uma concentração de 1µg/µL por via intramuscular em ratos Wistar machos pesando 90-110 g em um grupo de 6 ratos. Os controles receberam solução salina de 0,15 M NaCl por via intramuscular em quantidade similar ao do grupo testado, após 3 horas os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado pela veia cava abdominal dentro do tubo

que continha heparina como anticoagulante. O plasma foi armazenado a uma temperatura de 4°C por no máximo 12 horas antes de ser analisado.

### **3) Perfusão renal**

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".

#### **Grupos de animais**

Com a finalidade de avaliar os efeitos do veneno da *Brothrops moojeni*, como também de duas de suas frações a miotoxina I e miotoxina II, os animais foram dividido em quatro grupos com 6 animais cada. No grupo controle, os rins foram perfundidos com a solução de Kresb-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Nos demais 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 grupo, 1mg de veneno total liofilizado, enquanto que no terceiro e quarto grupos foi utilizada 0,5 mg das frações de miotoxina I e miotoxina II respectivamente.

O veneno e as frações liofilizadas foram diluídos em 1 mL de solução salina (0,9%) e adicionado ao sistema, na solução perfusora aos 30 minutos de cada experimento ficando com a dosagem de 10 µg/mL do veneno, enquanto que para as miotoxina I e Miotoxina II a dosagem foi de 5 µg/mL.

#### **Substâncias utilizadas na perfusão renal**

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as seguintes substâncias:

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

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

NaCl ( Synth)

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

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

Manitol (Reagen)

Uréia (Reagen)

KCl ( Merck)

Glicose ( Squibb)

Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)

Heparina (CEME)

Inulina (Sigma)

Pentobarbital Sódico ( Cristália)

### **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, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O = 3,2g, MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O = 5,8g e Uréia = 10g. 48 horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foi separada e acrescidos NaHCO<sub>3</sub> = 4,2g , CaCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O = 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 e 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.

### **O SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL**

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 pelo trabalho de Fonteles e Moreira Lima (1983), os quais adicionaram um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton e colaboradores (1974).

Neste sistema o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Hanseleit modificada e a oxigenação e adaptada ao sistema (Monteiro 1990).

O sistema de perfusão de rim isolado com recirculação (Figura 2) 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 $\mu$ m) - Filtra a solução perfusora;
- 6) Banho Maria - aquece o oxigenador ou o pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre 37 °C;

- 7) Fluxômetro - Mede o fluxo da solução;
- 8) Manômetro de mercúrio - Mede a pressão do perfusato;
- 9) Catabolhas - Retira as bolhas formadas evitando assim embolia no rim;
- 10) Oxigenador ou pulmão artificial - Promove as trocas gasosas (95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ )

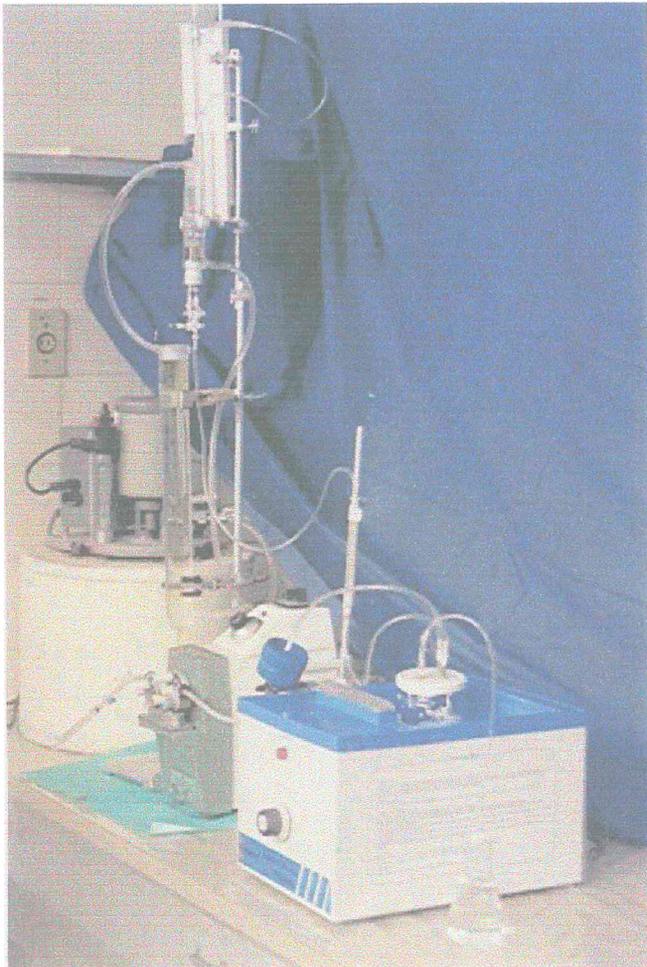


Figura 02 – Sistema de perfusão de rim isolado com recirculação

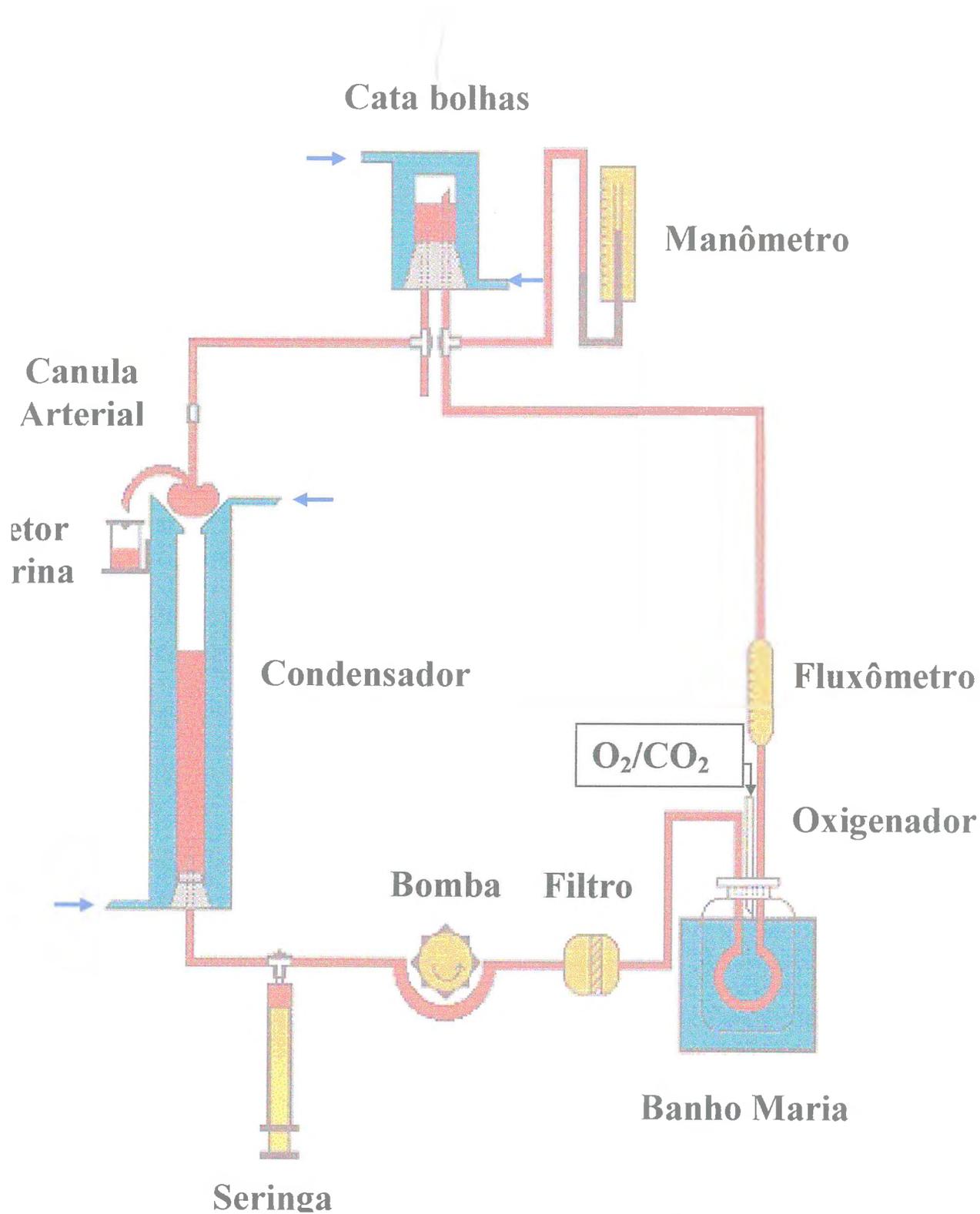


Figura 03 - Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação

## 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 temperaturas 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 nos quatro grupos tratados, 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 ( Gráficos 1,2 e 3).

## 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 (PE<sub>50</sub>). 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 introduzimos a cânula por 3 a 5 mm e fixamos cânula e artéria. Logo a seguir, o órgão foi isolado com pinças e seccionado, promovendo a retirada do rim e ureter. Devidamente liberado, o rim já aclopado ao sistema, passa por um período de adaptação *in vitro* de aproximadamente 30 minutos ( Figura 03).

### **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  $-20^{\circ}\text{C}$  para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e osmolaridade. Sempre aos 30 minutos do início do experimento, administramos veneno da *Bothrops moojeni* para os ratos do segundo grupo e miotoxina I e miotoxina II nos terceiro e quarto grupos respectivamente.

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.

#### • 4) 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.

#### 5) 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 $\mu$ 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.

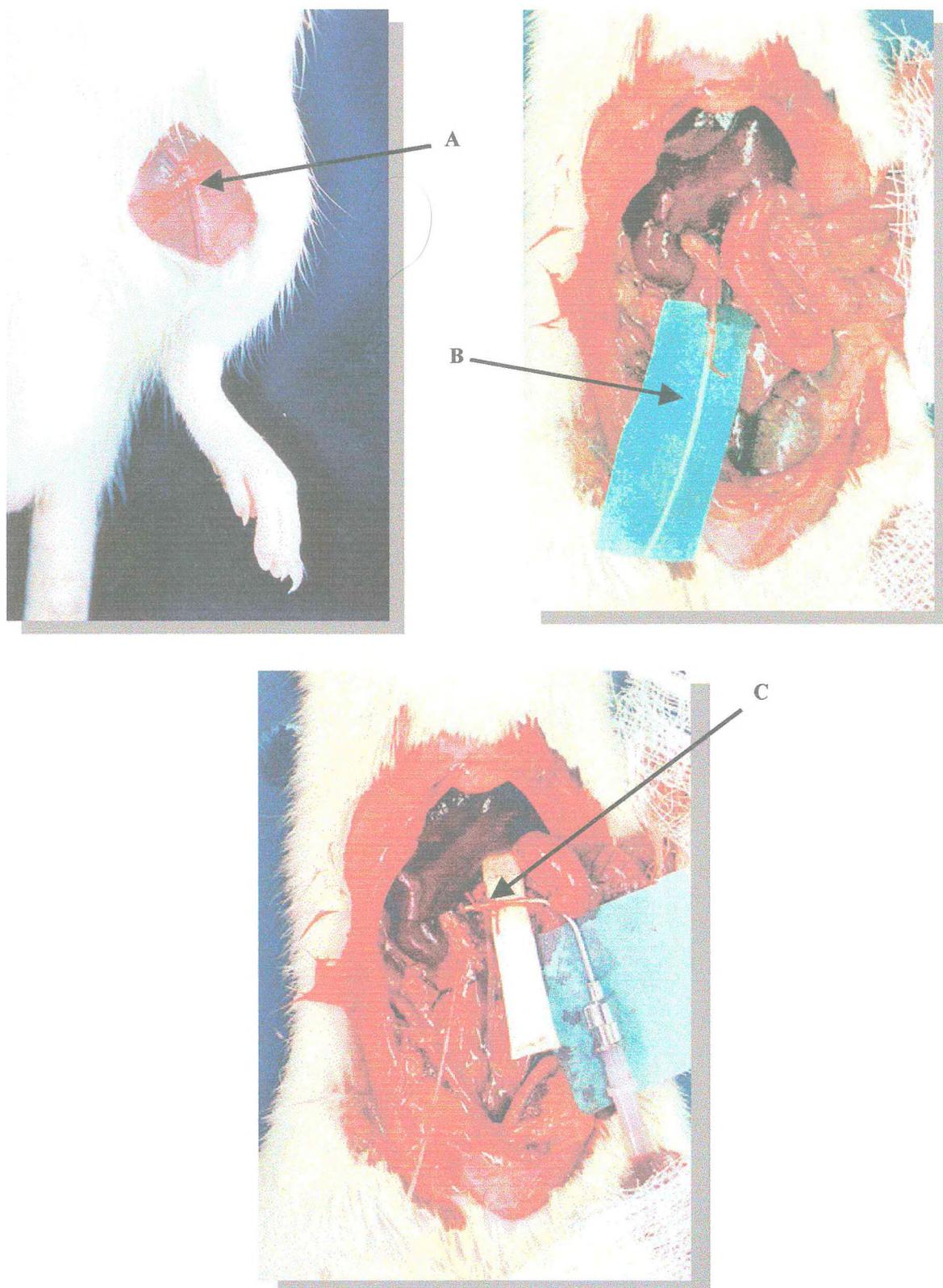


Figura 03 - Técnica cirúrgica ( A= veia femoral, B= ureter canulado e C= cânula arterial)

## Bomba X Pressão

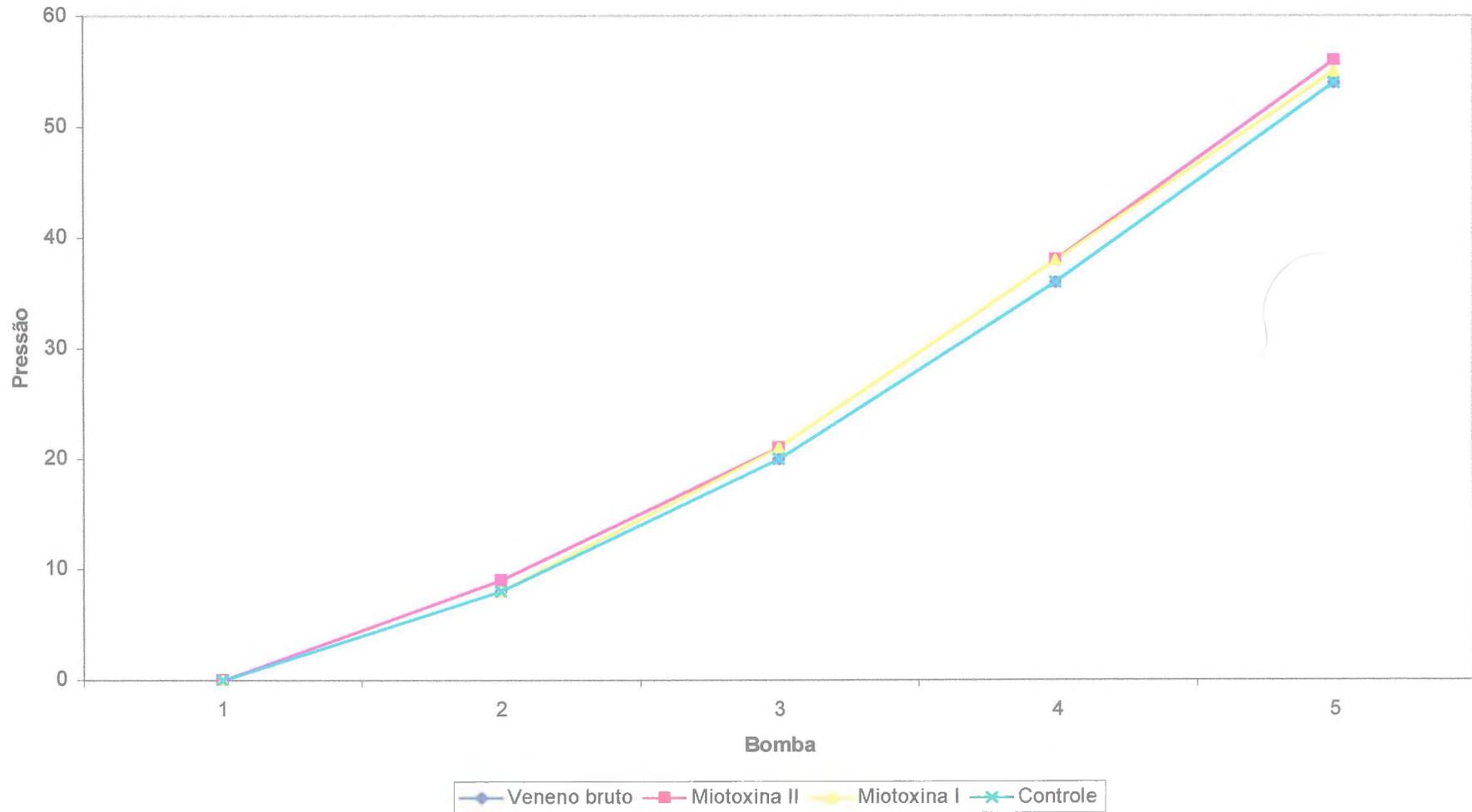


Gráfico 1 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Pressão de perfusão

### Bomba X Fluxômetro

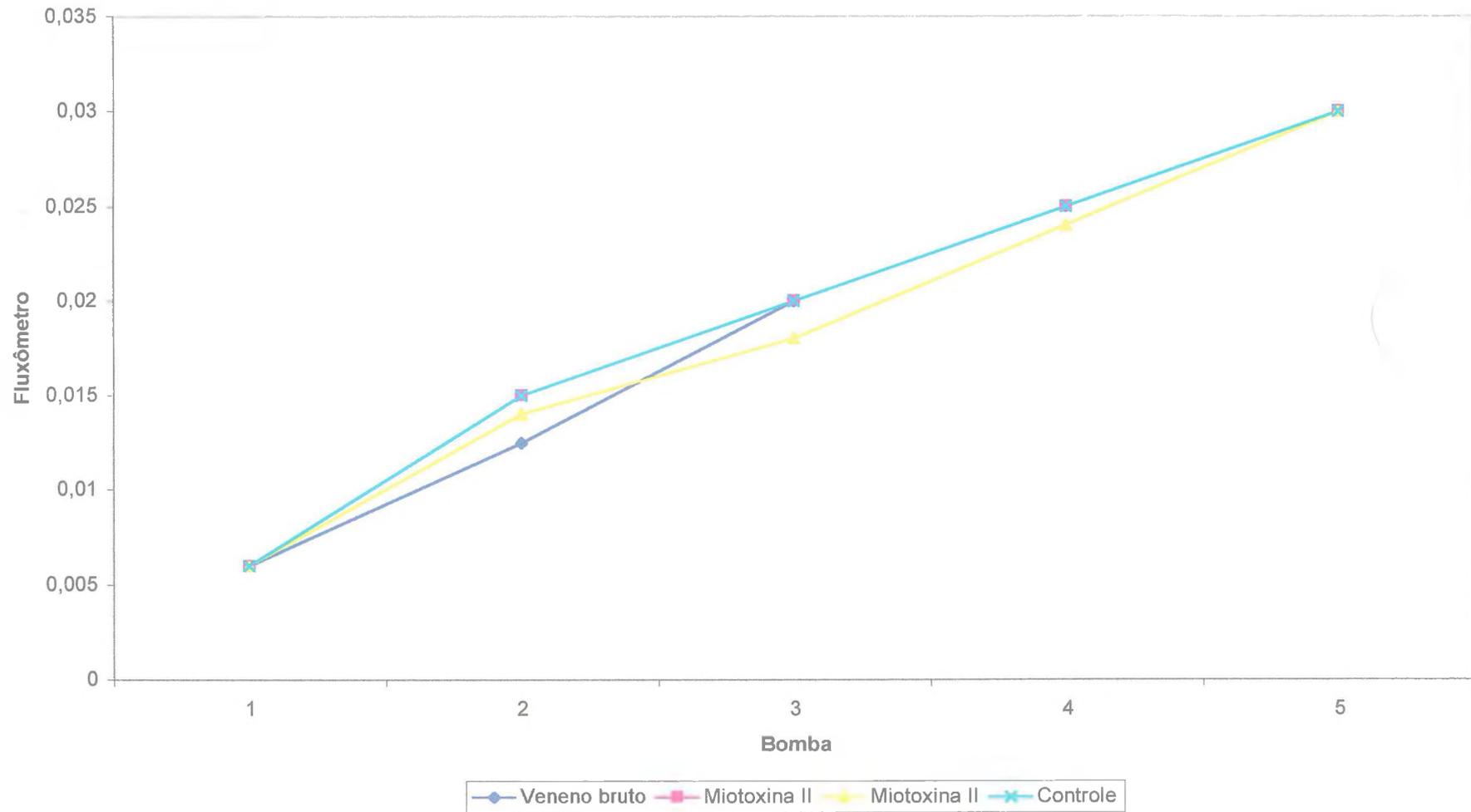


Gráfico 2 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxômetro

### Bomba X Fluxo

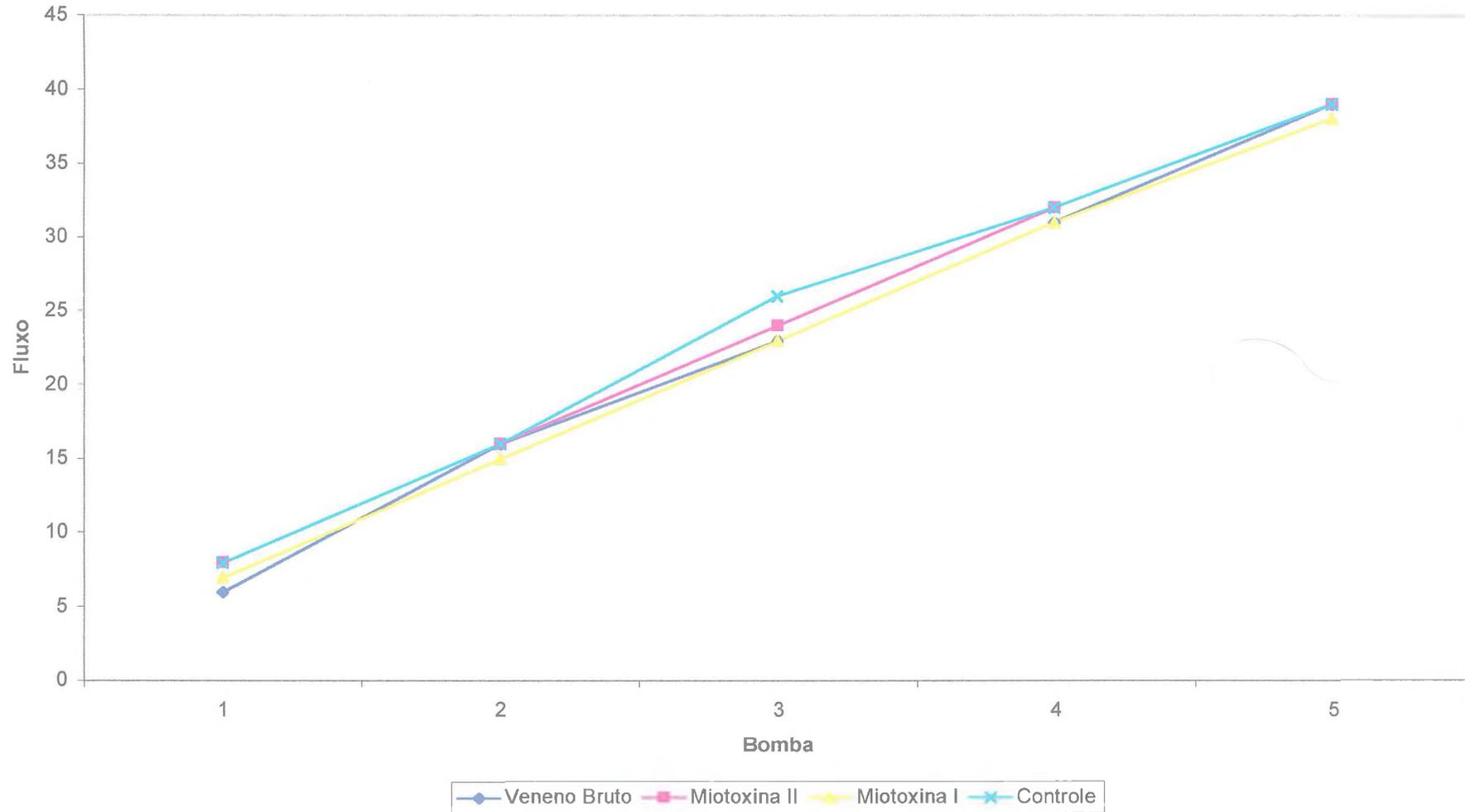


Gráfico 3 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba X Fluxo

## 6) CALCULO DOS PARÂMETROS RENAIIS

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 ( $\text{ml.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )=

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

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

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

RVR - resistência vascular renal ( $\text{mlHg/ml.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) =

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

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

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

DOUin = densidade ótica da inulina na urina

DOPin = densidade ótica da inulina no perfusato

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

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

$\text{PNa}^+$  = concentração de sódio no perfusato

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

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

$UNa^+$  = concentração de sódio na urina

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

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

$\%TNa^+$  - percentual de sódio transportado =

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

$C_{oms}$  - clearance osmótico ( $ml.g^{-1} .min^{-1}$ )=

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

$U_{osm}$  = osmoralidade urinária

$P_{osm}$  = osmoralidade do perfusato

$CH_2O$  - clearance de água livre ( $ml.g^{-1} .min^{-1}$ ) =

$$CH_2O = FU - C_{oms}$$

$dTNa^+$  - transporte distal de sódio ( $ml.g^{-1} .min^{-1}$ ) =

$$dTNa^+ = CH_2O \times PNa^+$$

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

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

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

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

%pTNa<sup>+</sup> - 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.

## 7) ESTATÍSTICA

utilizou-se um computador PC Pentium (333Hz) e programa Graphpad para análise estatística dos dados, expresso por média  $\pm$  EPM. Os valores dos parâmetros renais dos quatro grupos aqui avaliados foram comparados por ANOVA (bonferoni teste) e teste T Student pareado, com significância de \*  $p < 0,05$ . Enquanto na DL50 foram utilizados o teste de regressão linear e o método do probito.

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.

## RESULTADOS

Utilizou-se o Teste de Regressão Linear para determinar a toxicidade aguda  $DL_{50}$  que foi de  $5,61 \pm 0,44$  mg/kg enquanto que pelo método dos próbito (Miller e Tainter, 1948) a  $DL_{50}$  foi de 5, 298 mg/kg com intervalo de confiança de 95% (4,771 a 5,883).

### 1) Purificação das miotoxinas da *Bothrops moojeni*

Fosfolipases  $A_2$  básicas do veneno bruto da *B.moojeni* foram isoladas usando HPLC por cromatografia de troca iônica (Figura 04). As principais miotoxinas encontradas, possuíam uma massa molecular de 15 kDa, foram denominadas de miotoxinas I (Bmtx-I) e miotoxinas II (BmtxII) e foram eluídas no último pico no cromatograma usando bicarbonato de amônia na concentração de 0.6 M. A repurificação destas toxinas no HPLC fase reversa mostraram que as frações da *B.moojeni* foram purificadas em alta homogeneidade que foi confirmada por tricine PAGE-SDS eletroforese (Figura 05 e Figura 06).

A composição de aminoácidos dessas proteínas mostrou que, tanto Bmtx I e Bmtx II tinham 14 meia cisteína, que indicavam 7 pontes disulfídricas. O alto conteúdo das bases como lisina e arginina indicam que elas possuem um forte carácter básico (Figura 07).

Quando comparadas com outras  $PLA_2$  miotóxicas básicas, como PrtxI isoladas por Toyama et al ., (1999), Bthtx -I e miotoxina II da *Bothrops asper* ( Figura 08). Bmtx-I e Bmtx II mostram uma seqüência de aminoácido similar em aproximadamente 95%. Bmtx-I e Bmtx II não exibem alto grau de

homologia com asp 49 como outras miotoxinas encontradas nos venenos de outras serpentes.

## **Perfusão renal**

### **Grupo controle**

Este grupo perfundido somente com solução Krebs-Hanseleit modificada a 6g% (n = 6) apresentou todos os parâmetros fisiológicos dentro da normalidade (tabela 1 a 14 e gráfico 4 a 17) e foram comparados aos grupos tratados com veneno, miotoxina I e miotoxina II.

### **Veneno bruto**

Com relação ao grupo controle o veneno bruto apresentou uma diminuição na pressão de perfusão (PP) aos 60 minutos com significância aos 90 minutos permanecendo até do final experimento (tabela 1 e gráfico 4).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR), foi observado que o veneno causou uma diminuição deste parâmetro aos 60 minutos, porém como aconteceu na pressão de perfusão, esta diminuição foi significativa em relação ao grupo controle aos 90 minutos, persistindo até o final do experimento (tabela 2 e gráfico 5).

O veneno apresentou uma redução significativa no fluxo urinário (FU) aos 60 minutos conforme se pode observar na tabela 3 e gráfico 6, quando comparado ao grupo controle. Depois desta diminuição observou-se que aos 90 minutos acontece um aumento do fluxo, retornando a valor semelhante com o controle e um aumento significativo aos 120 minutos (tabela 3 e gráfico 6).

O efeito produzido no ritmo de filtração glomerular (RFG) foi uma diminuição significativa aos 60 minutos. Aos 90 minutos foi observado um aumento RFG retornando aos parâmetros normais, no terço final do experimento (120min) o RFG aumentou significativamente quando comparado ao grupo controle. (tabela 4 e gráfico 7).

Com relação ao percentual de transporte tubular de sódio ( $\%TNa^+$ ) observou-se uma queda a partir dos 60 minutos, sendo significativo aos 90 minutos permanecendo assim até o final dos experimentos (tabela 5 e gráfico 8).

Foi observado que no percentual de transporte tubular proximal de sódio ( $\%pTNa^+$ ) houve uma queda significativa aos 90 minutos, mantendo-se até o final do experimento quando comparado ao grupo controle (tabela 6 e gráfico 9)

O efeito produzido pelo veneno no transporte tubular de potássio ( $\%TK^+$ ), foi de queda significativa quando comparado ao grupo controle, aos 90 minutos persistindo até os 120 minutos (tabela 7 e gráfico 10).

O efeito do veneno com relação ao grupo controle no transporte tubular proximal de potássio ( $\%pTK^+$ ) foi de uma queda significativa somente aos 120 minutos (tabela 8 e gráfico 11).

Quanto ao percentual de transporte tubular de cloro ( $\%TCl^-$ ) foi observado uma queda significativa aos 90 minutos prosseguindo até os 120 minutos, quando comparado com o grupo controle (tabela 9 e gráfico 12).

O efeito produzido pelo veneno no percentual do transporte tubular proximal de cloro ( $\%pTCl^-$ ) foi estatisticamente significativo aos 90 minutos em relação ao grupo controle (tabela 10 e gráfico 13).

No parâmetro referente à excreção de sódio ( $\text{ENa}^+$ ) foi observada uma diminuição aos 60 minutos sendo estatisticamente significativo com relação ao controle, seguido a um aumento significativo aos 120 minutos (tabela 11 e gráfico 14).

Foi observada uma diminuição aos 60 minutos na excreção de potássio ( $\text{EK}^+$ ) ocasionado pelo veneno em comparação ao controle, com posterior aumento aos 120 minutos (tabela 12 e gráfico 15).

Com relação à excreção de cloro ( $\text{ECl}^-$ ), o veneno promoveu uma diminuição aos 60 minutos em relação ao controle, seguido de aumento ao final dos experimentos conforme (tabela 13 e gráfico 16).

Com relação ao clearance osmótico ( $\text{C}_{\text{osm}}$ ) o veneno bruto foi estatisticamente significativo ao grupo controle aos 120 minutos (tabela 14 e gráfico 17).

### **Miotoxina I (Bmtx-I)**

A miotoxina apresentou um aumento na pressão de perfusão (PP) inicialmente aos 60 minutos, mas sendo estatisticamente significativo aos 90 minutos permanecendo aumentada até o final do experimento (tabela 1 e gráfico 4).

Quanto ao efeito na resistência vascular renal (RVR) foi observado um comportamento similar ao gráfico de pressão de perfusão ou seja um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (tabela 2 e gráfico 5).

O aumento no fluxo urinário (FU) foi significativamente estatístico aos 120 min quando comparado com o grupo controle (tabela 3 e gráfico 6).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) aumentou com esta toxina aos 120 minutos somente com relação ao grupo controle (tabela 4 e gráfico 7).

O efeito causado pela miotoxina I no percentual de transporte tubular de sódio ( $\%TNa^+$ ) foi uma diminuição significativa em relação ao grupo controle aos 90 e 120 minutos (tabela 5 e gráfico 8).

No percentual do transporte tubular proximal de sódio ( $\%pTNa^+$ ) houve uma diminuição neste transporte quando comparado com o grupo controle aos 90 e 120 minutos (tabela 6 e gráfico 9).

Observou-se uma diminuição no transporte tubular de potássio ( $\%TK^+$ ) aos 60 minutos sendo progressiva até os 90 minutos, permanecendo neste patamar até o final dos experimentos (tabela 7 e gráfico 10).

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 (tabela 8 e gráfico 11).

Com relação aos efeitos produzidos no percentual de transporte tubular de cloro ( $\%TCl^-$ ) observou-se uma diminuição deste transporte com relação ao grupo controle (tabela 9 e gráfico 12).

Quando foi relacionado ao grupo controle no percentual do transporte tubular proximal de cloro ( $\%pTCl^-$ ), a miotoxina I apresentou uma queda significativa, que se inicia aos 60 minutos persistindo até o final do experimento (tabela 10 e gráfico 13).

Na excreção do sódio ( $ENa^+$ ) o aumento foi significativo, quando comparado com o grupo controle aos 90 minutos persistindo até o final do experimento (tabela 11 e gráfico 14).

A excreção de potássio ( $EK^+$ ) está aumentada aos 90 minutos quando comparado ao controle permanecendo assim até o final do experimento (tabela 12 e gráfico 15).

Na excreção de cloro ( $ECl^-$ ), observou-se um aumento significativo aos 90 e 120 minutos (tabela 13 e gráfico 16).

A miotoxina I tem um aumento significativo do clearance osmótico ( $C_{osm}$ ) somente aos 120 minutos (tabela 14 e gráfico 17)

### **Miotoxina II (Bmtx-II)**

Os resultados obtidos com a dose utilizada nos experimentos. A miotoxina II quando comparada com o grupo controle, somente alterou significativamente um parâmetro, que foi o percentual de transporte tubular de potássio ( $\%pTK^+$ ). Foi observada uma diminuição transitória aos 90 minutos. (Tabela 7 e Gráfico 10).

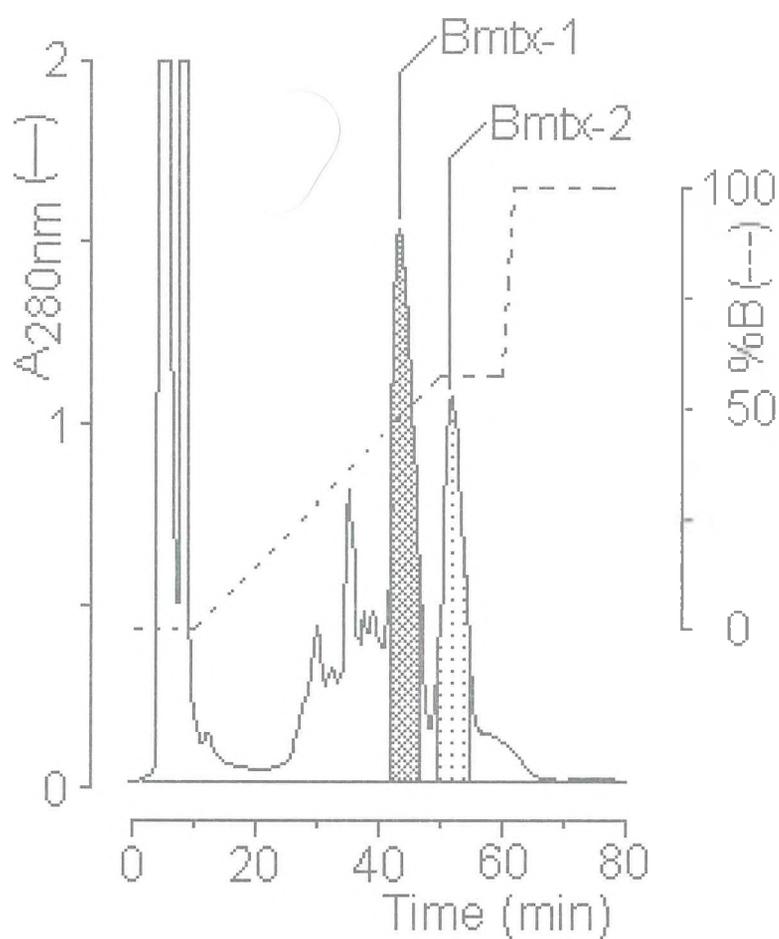


Figura 05 - Cromatografia de troca iônica do veneno de *Bothrops moojeni*, na coluna do Protein Pack SPW. As principais frações miotóxicas foram identificadas como miotoxina I (Bmtx-I) e miotoxina Bmtx II).

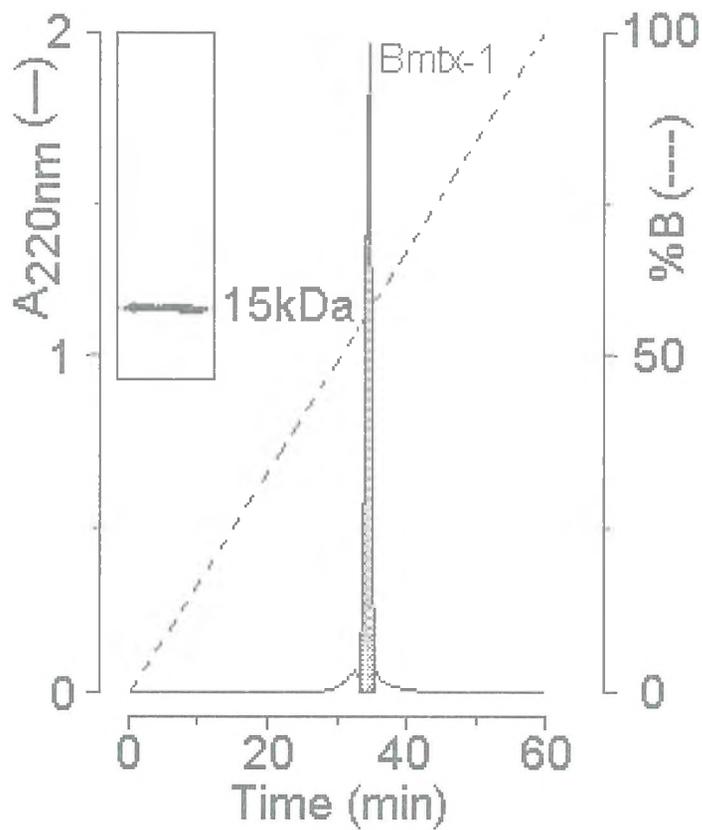


Figura 06 – A repurificação da miotoxina I (Bmtx-I) em HPLC fase reversa mostra a presença de um único produto de eluição (Bmtx-I). A eletroforese em gel de PAGE-SDS Tricina confirmou a homogeneidade molecular da fração como mostrada na figura ao lado.

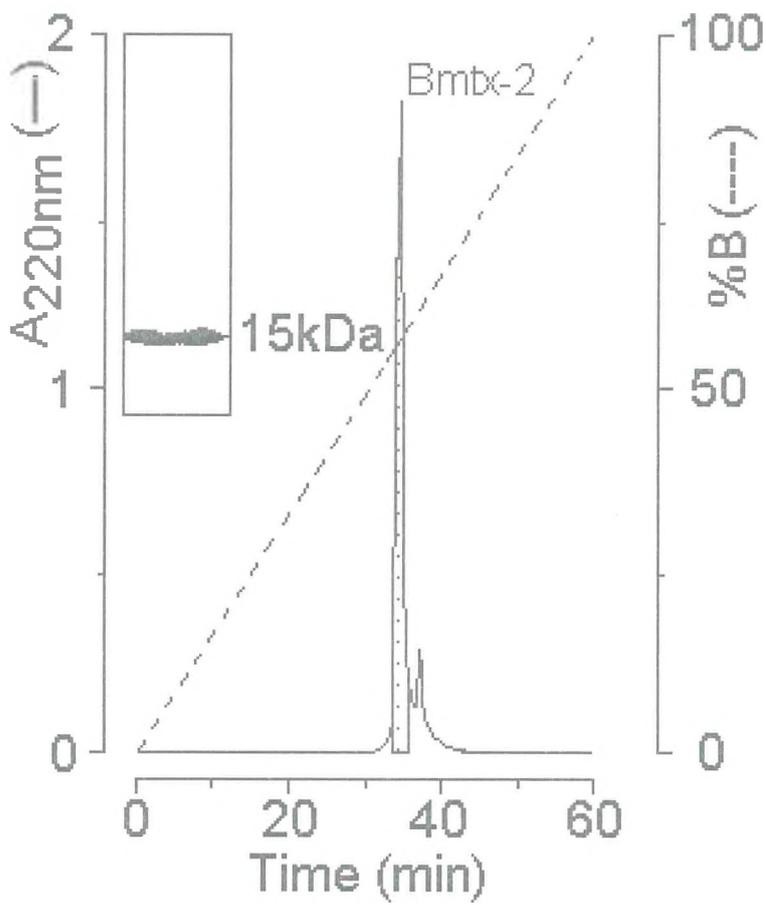
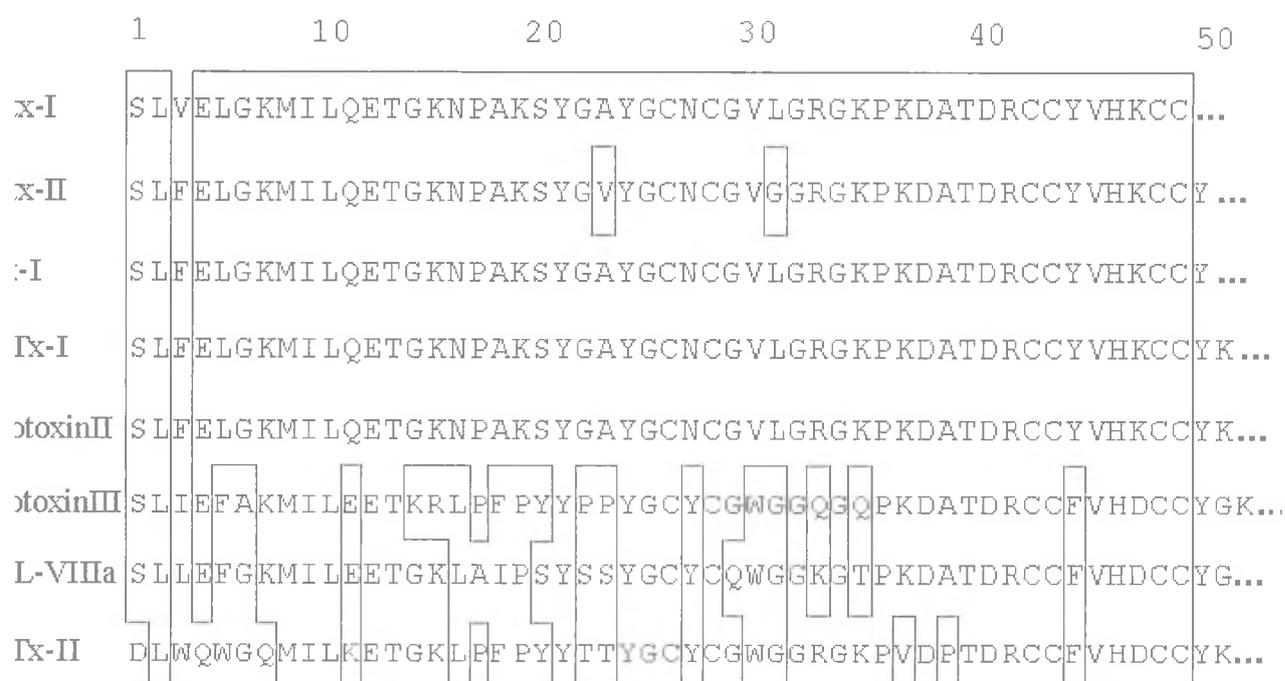


figura 07 - A repurificação da miotoxina II (Bmtx-II) em HPLC fase reversa mostra a presença de um único de eluição (Bmtx-II). A eletroforese em gel de PAGE-SDS Tricina confirmou a homogeneidade molecular da fração como mostrada na figura ao lado.

Amino acids	Bmtx-1	Bmtx-2
Asx *	13	14
Thr	6	7
Ser	4	4
Glx*	11	8
Pro	7	7
Gly	12	11
Ala	7	7
½ Cys**	14	14
Val	4	4
Met	1	1
Ile	3	3
Leu	12	12
Tyr	10	10
Phe	2	2
Lys	14	15
His	2	2
Arg	6	7
Trp****	1	1
Total	129	129

a 08 -Sequência de aminoácido N-terminal da miotoxina I (Bmtx-I) e miotoxina II (Bmtx II)



ra 09 - Bmtx-I e Bmtx II quando comparadas com outras miotoxinas fosfolipásica K49 e D49. O  
 ro indica a alta sequência de homologia.

TABELA 1: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* na pressão de perfusão renal (PP)

Variáveis (mmHg)	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	117,4 ± 1,2	119,1 ± 0,6	116,6 ± 0,5	113,5 ± 0,8
Veneno	122,9 ± 4,6	95,4 ± 8,3	72,8 ± 6,9*	78,8 ± 7,1*
Miotoxina I	111,6 ± 3,5	138,1 ± 5,4	155,6 ± 4,8* <sup>a</sup>	169,2 ± 5,0* <sup>a</sup>
Miotoxina II	111,2 ± 2,0	113,3 ± 2,6	112,6 ± 2,3 <sup>b c</sup>	120,9 ± 2,6 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

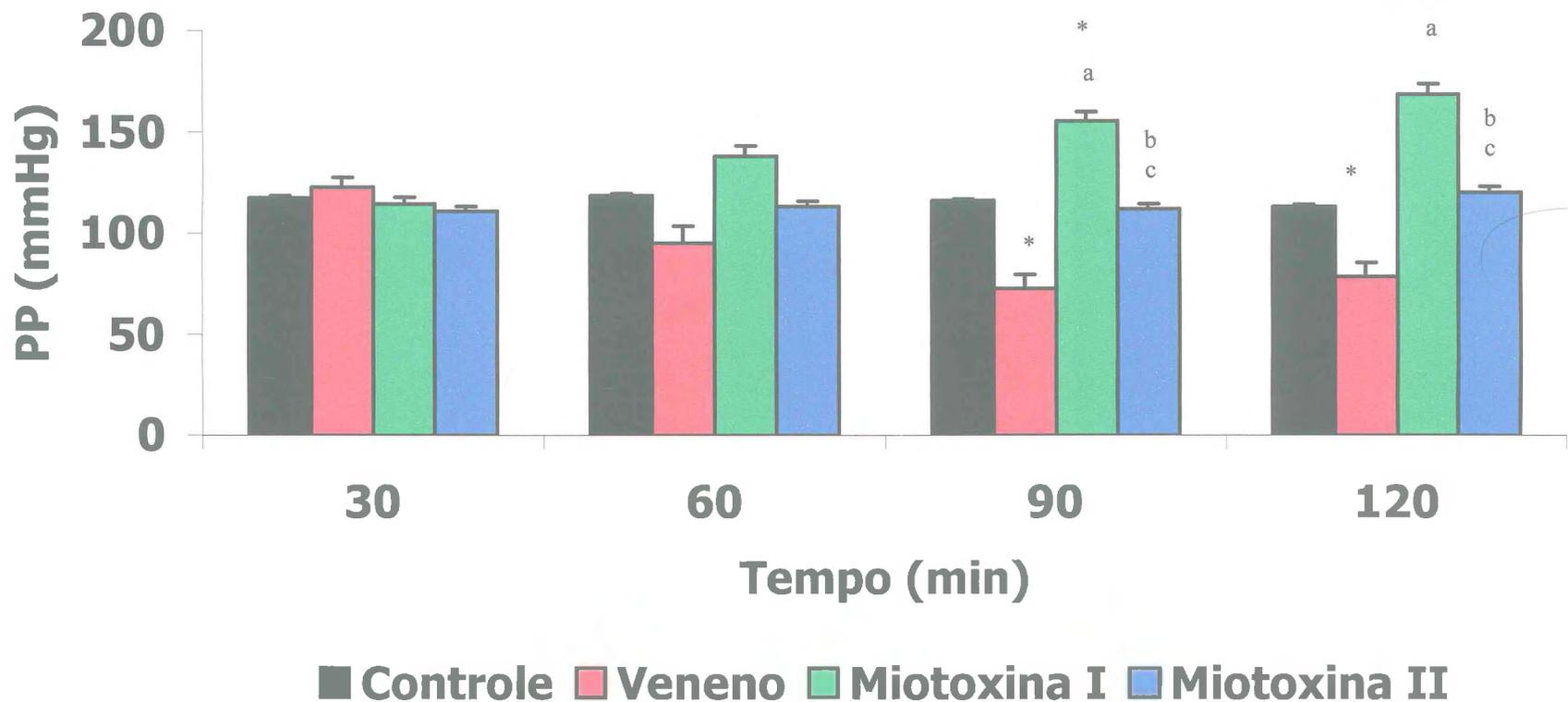


Gráfico 4 – Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10 $\mu$ g/mL), miotoxina I (5 $\mu$ g/mL) e miotoxina II (5 $\mu$ g/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 2: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* na resistência vascular renal

Variáveis (mmHg/ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	30	60	90	120
Controle	5,28 ± 0,04	5,54 ± 0,09	5,53 ± 0,07	5,22 ± 0,16
Veneno	5,21 ± 0,21	4,12 ± 0,39	3,20 ± 0,35*	3,47 ± 0,36*
Miotoxina I	5,03 ± 0,24	6,20 ± 0,30	6,98 ± 0,27* <sup>a</sup>	7,60 ± 0,31* <sup>a</sup>
Miotoxina II	5,02 ± 0,20	5,11 ± 0,21	5,07 ± 0,17 <sup>b c</sup>	5,44 ± 0,16 <sup>b c</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II

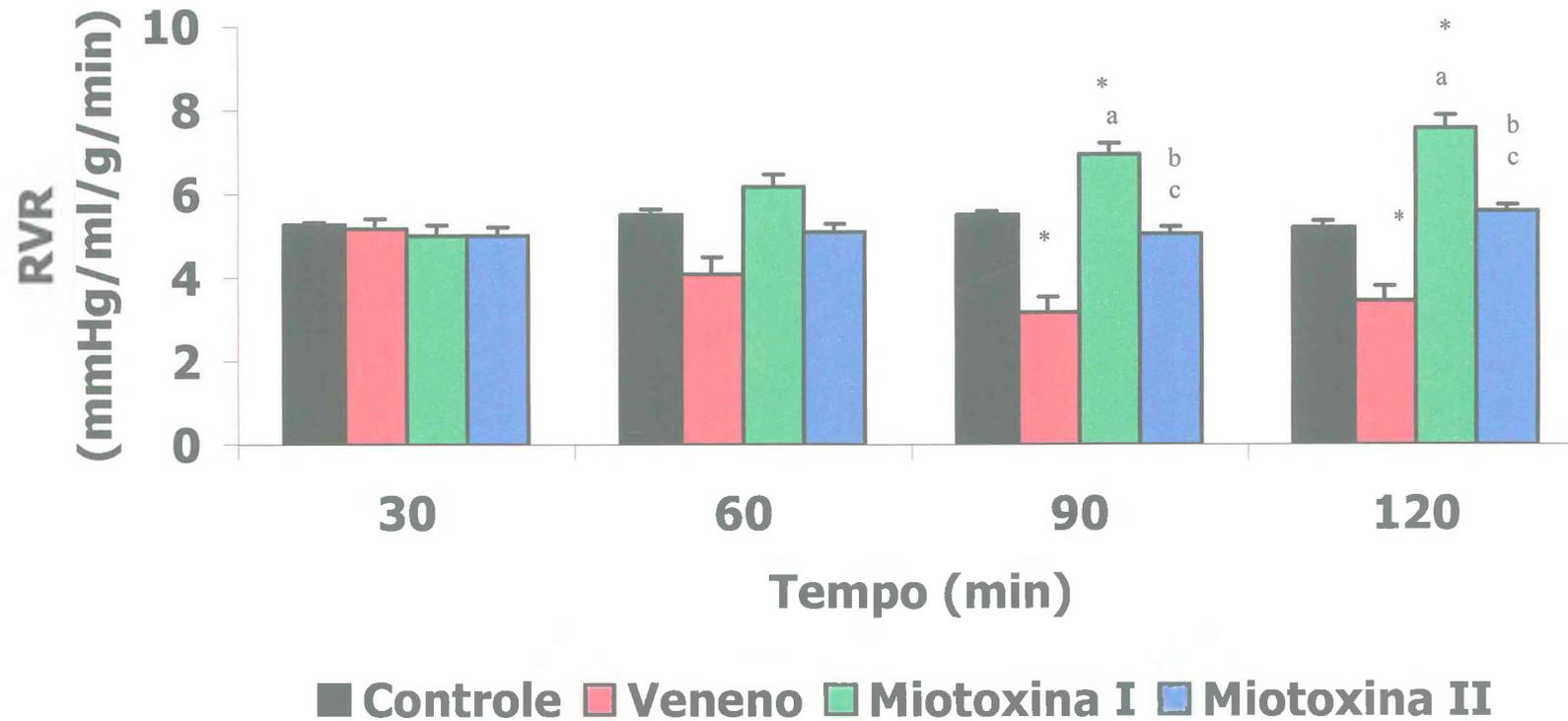


Gráfico 5 – Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10 $\mu$ g/mL), miotoxina I (5 $\mu$ g/mL) e miotoxina II (5 $\mu$ g/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 3

TABELA 3: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no fluxo urinário (FU)

Variáveis (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	30	60	90	120
Controle	0,129 ± 0,002	0,148 ± 0,003	0,159 ± 0,002	0,150 ± 0,002
Veneno	0,137 ± 0,013	0,066 ± 0,012*	0,151 ± 0,026	0,397 ± 0,039*
Miotoxina I	0,113 ± 0,009	0,164 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,236 ± 0,035	0,296 ± 0,037* <sup>a</sup>
Miotoxina II	0,112 ± 0,006	0,132 ± 0,007	0,144 ± 0,005	0,164 ± 0,010 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05.\*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

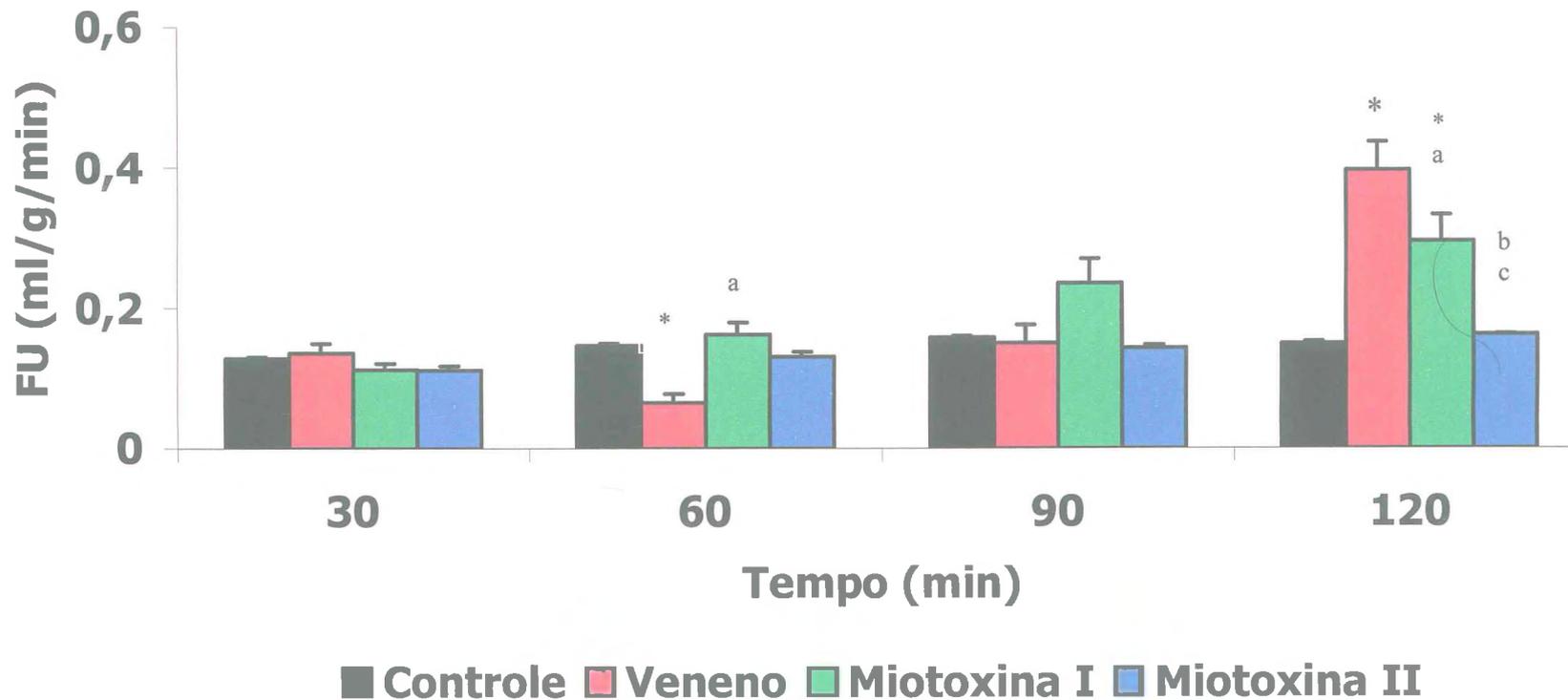


Gráfico 6 – Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 4: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no ritmo de filtração glomerular (RFG)

Variáveis (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	30	60	90	120
Controle	0,606 ± 0,032	0,625 ± 0,010	0,583 ± 0,038	0,617 ± 0,022
Veneno	0,649 ± 0,051	0,301 ± 0,063*	0,507 ± 0,120	1,512 ± 0,039 *
Miotoxina I	0,565 ± 0,032	0,623 ± 0,076	0,832 ± 0,192	0,886 ± 0,149 * <sup>a</sup>
Miotoxina II	0,548 ± 0,052	0,602 ± 0,043	0,567 ± 0,042	0,781 ± 0,091 <sup>b</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05.\*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

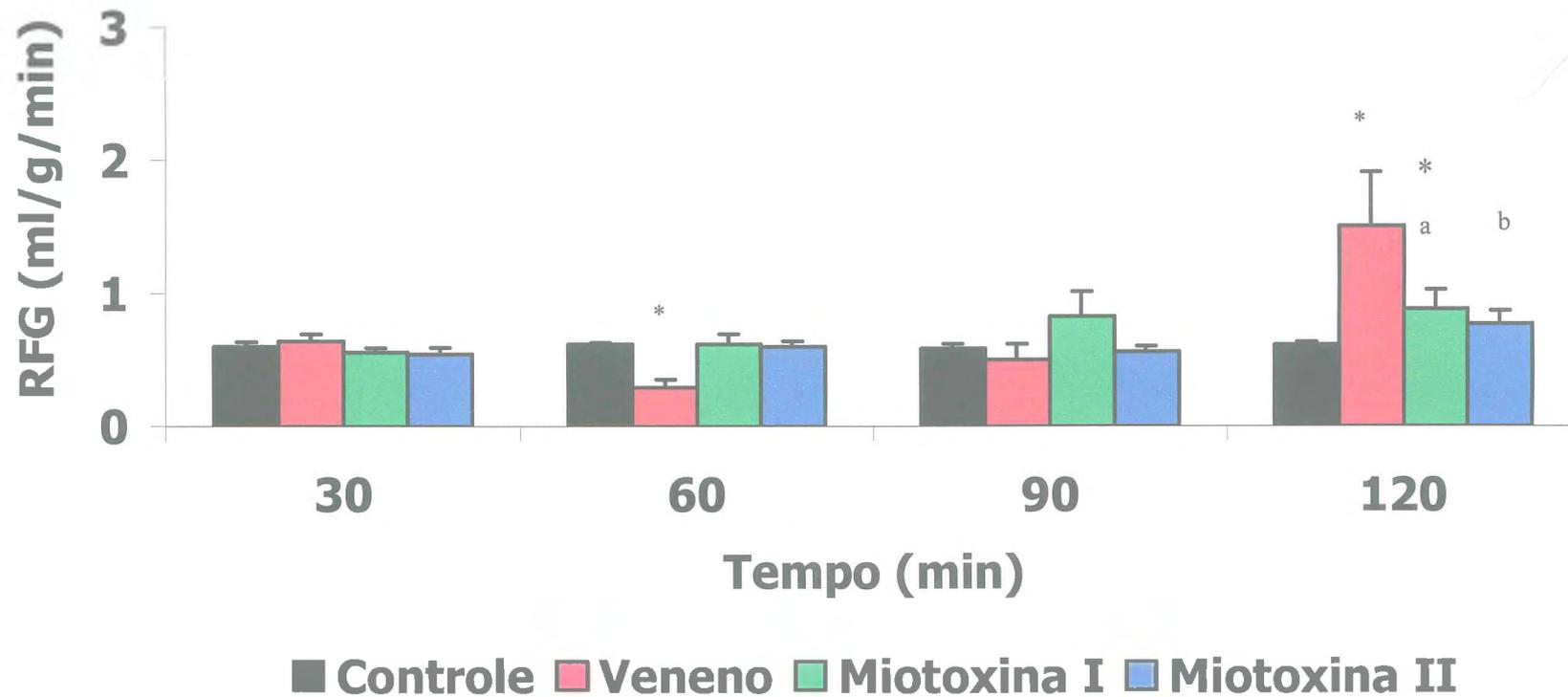


Gráfico 7 – Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II.

TABELA 5: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual do transporte tubular de sódio (TNa<sup>+</sup>)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	81,82 ± 0,21	81,95 ± 0,14	81,17 ± 0,25	81,21 ± 0,30
Veneno	82,12 ± 1,08	75,03 ± 2,59	62,05 ± 3,19 *	55,74 ± 4,58 *
Miotoxina I	84,27 ± 0,94	78,09 ± 1,44	70,70 ± 3,15 * <sup>a</sup>	66,43 ± 3,15 * <sup>a</sup>
Miotoxina II	80,38 ± 1,19	79,69 ± 1,23	76,27 ± 1,57 <sup>b c</sup>	79,34 ± 1,63 <sup>b c</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

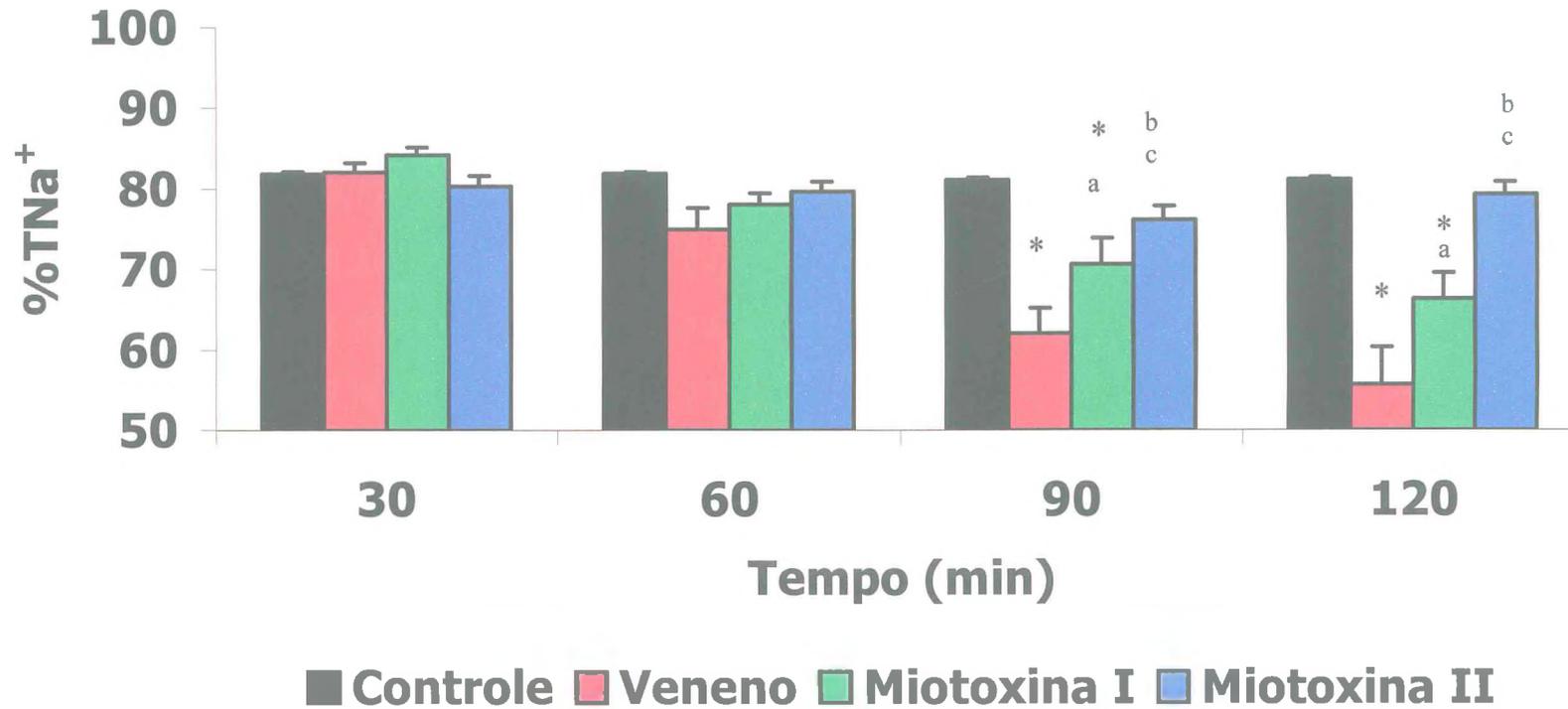


Gráfico 8 – Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/ml), miotoxina I (5µg/ml) e miotoxina II (5µg/ml) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p< 0,05. \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 6: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual transporte tubular proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	79,77 ± 0,60	78,37 ± 0,58	77,63 ± 0,46	76,89 ± 0,35
Veneno	80,33 ± 1,20	74,70 ± 2,39	61,80 ± 3,06 *	55,43 ± 4,58*
Miotoxina I	81,53 ± 1,16	74,29 ± 1,98	67,35 ± 3,94 *	63,40 ± 3,81*
Miotoxina II	77,80 ± 1,42	77,39 ± 1,46	73,48 ± 1,91 <sup>bc</sup>	77,19 ± 1,84 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

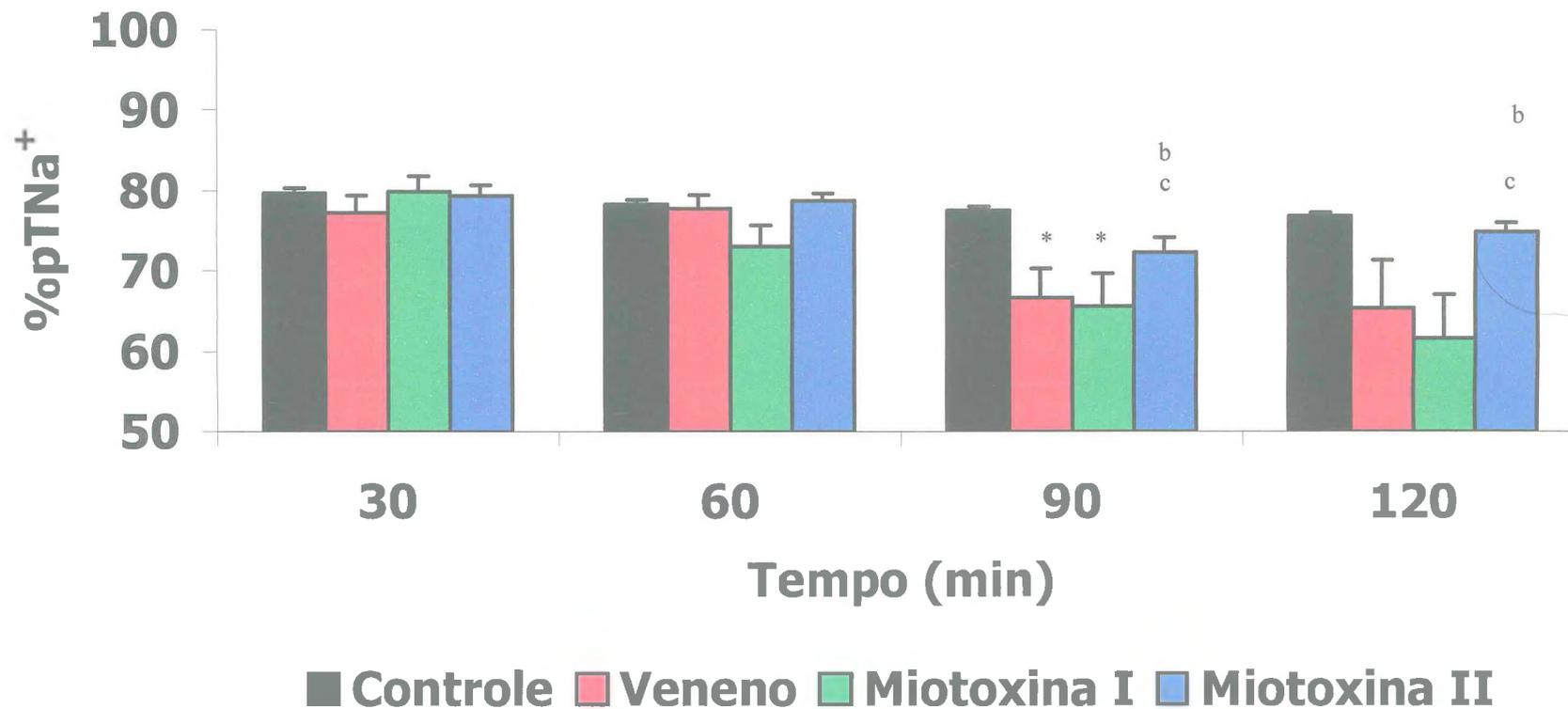


Gráfico 9 – Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 1: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual do transporte tubular de potássio (%TK<sup>+</sup>)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	72,99 ± 1,01	72,79 ± 0,53	75,22 ± 1,41	76,87 ± 0,44
Veneno	75,13 ± 1,64	69,70 ± 3,22	62,97 ± 3,31*	56,55 ± 4,42*
Miotoxina I	72,29 ± 1,98	61,50 ± 2,31*	49,24 ± 4,67* <sup>a</sup>	48,32 ± 4,30* <sup>a</sup>
Miotoxina II	73,35 ± 1,74	71,70 ± 2,09	66,61 ± 2,29* <sup>c</sup>	71,64 ± 2,29 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.



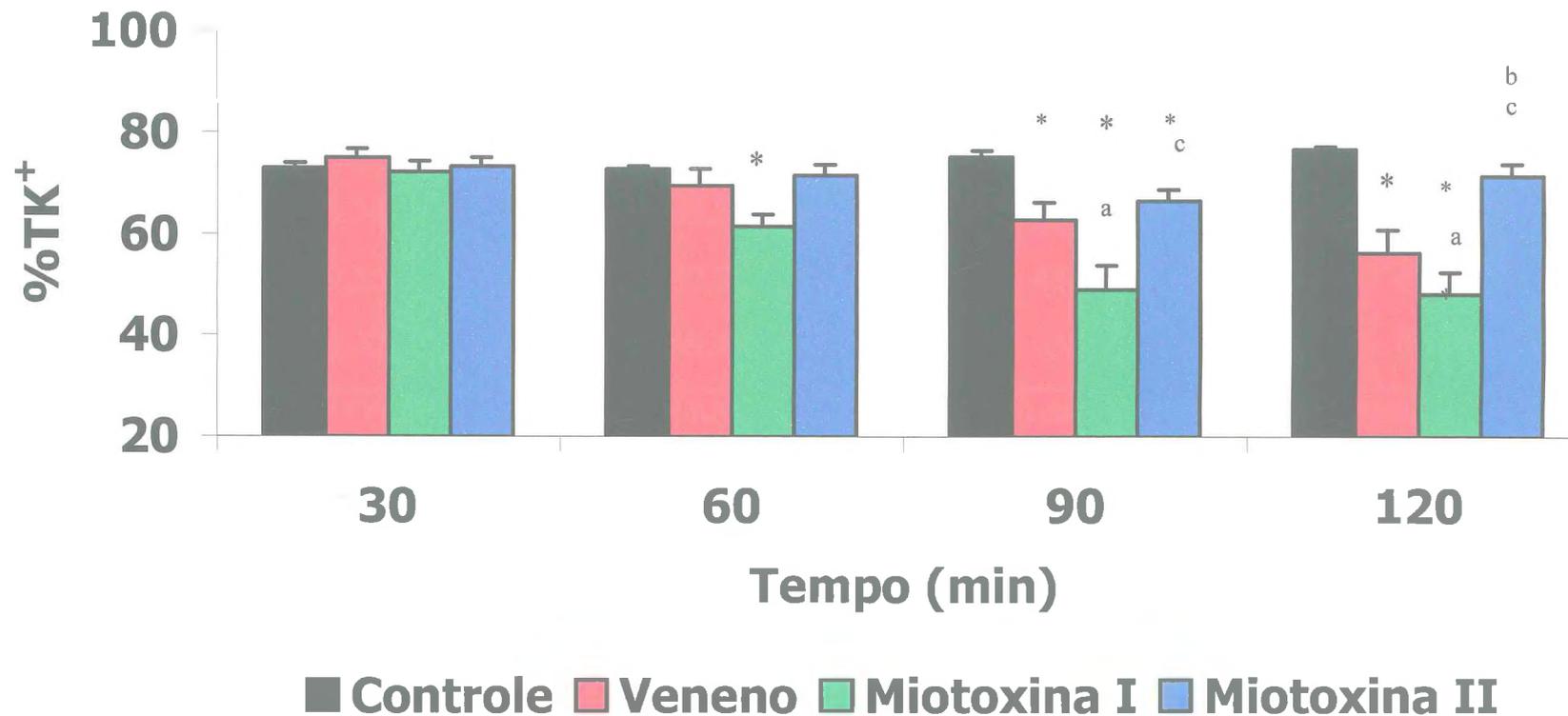


Gráfico 10 – Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 8: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual do transporte tubular proximal de potássio (%pTK<sup>+</sup>)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	71,33 ± 1,01	72,63 ± 0,53	68,84 ± 1,41	74,28 ± 0,44
Veneno	73,34 ± 1,72	69,37 ± 3,03	62,72 ± 3,18*	56,24 ± 4,43*
Miotoxina I	69,55 ± 1,89	57,70 ± 2,52 <sup>*a</sup>	45,89 ± 5,26 <sup>*a</sup>	45,29 ± 4,84 <sup>*a</sup>
Miotoxina II	70,77 ± 1,99	69,41 ± 2,30 <sup>c</sup>	63,82 ± 2,67 <sup>c</sup>	69,50 ± 2,52 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p < 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

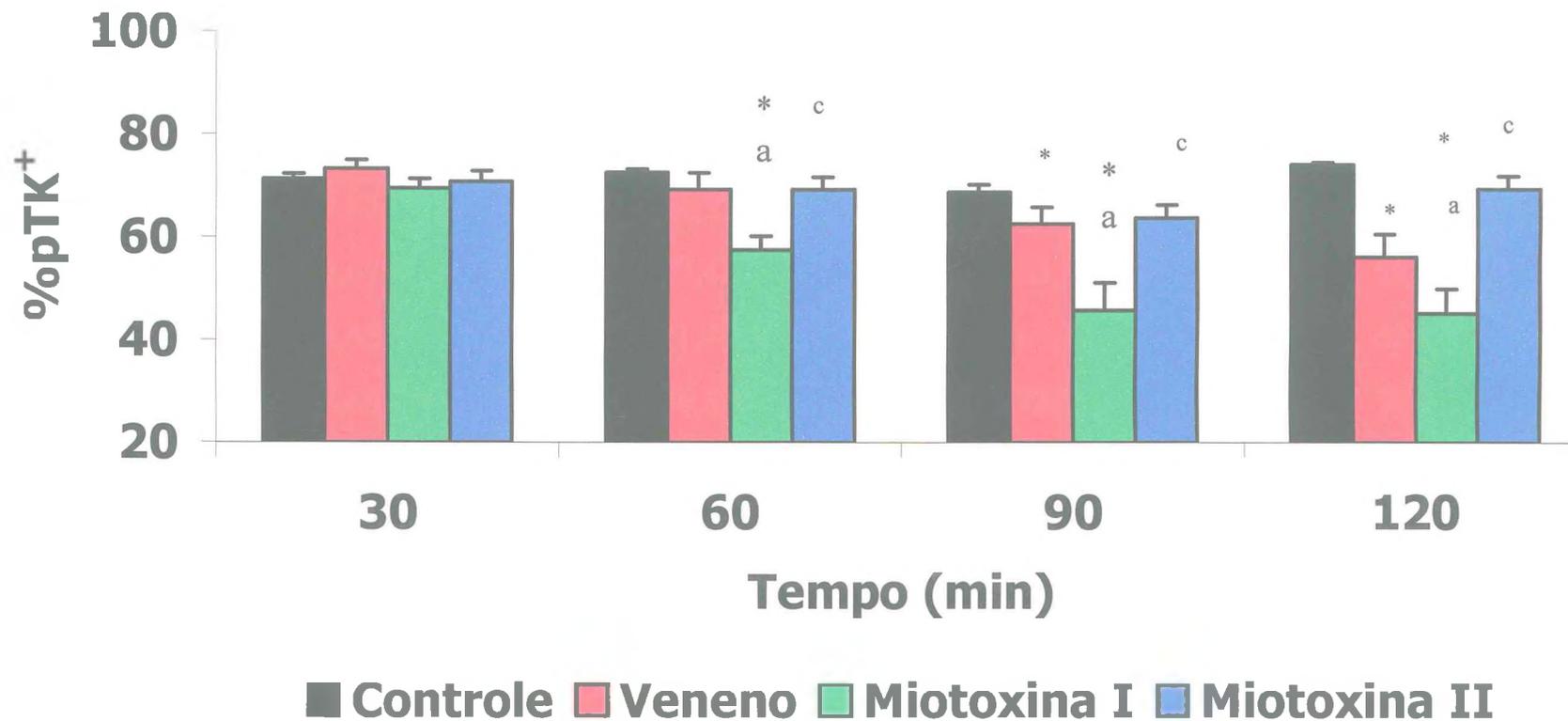


Gráfico 11 – Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%TK<sup>+</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 9: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual do transporte tubular de cloro (%TCI)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	79,85 ± 0,95	81,37 ± 1,87	78,45 ± 1,20	78,95 ± 1,65
Veneno	80,67 ± 2,13	77,48 ± 5,12	63,86 ± 7,69*	58,49 ± 10,10*
Miotoxina I	79,42 ± 3,60	71,46 ± 3,76	61,79 ± 5,53*	62,62 ± 5,86*
Miotoxina II	77,66 ± 2,93	76,89 ± 2,57	73,80 ± 2,98 <sup>bc</sup>	77,39 ± 2,89 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

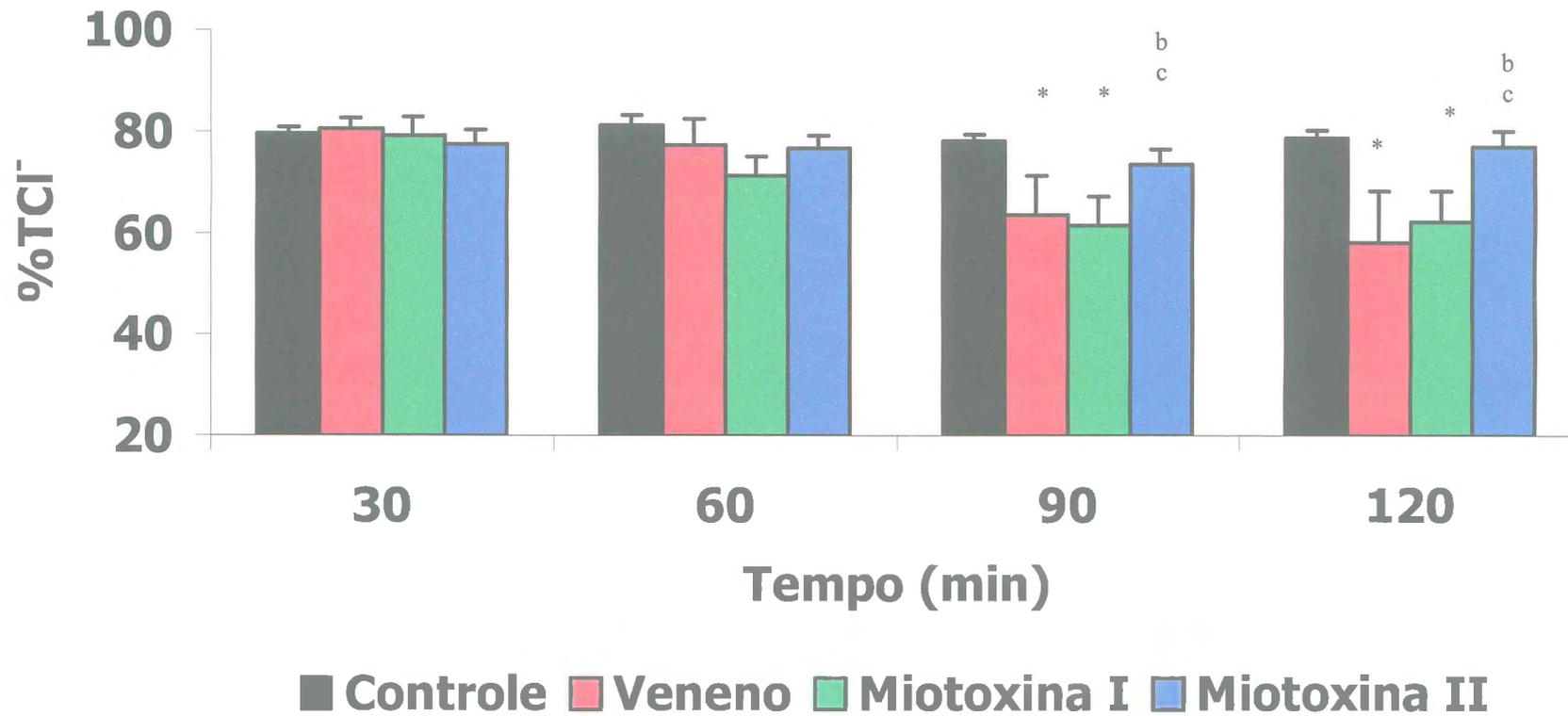


Gráfico 12 – Efeitos no percentual de transporte tubular de cloro (%TCl<sup>-</sup>) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com p< 0,05. \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 10: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no percentual do Transporte tubular proximal de cloro (%pTCl)

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	78,81 ± 0,65	80,50 ± 1,54	78,58 ± 0,35	78,03 ± 0,55
Veneno	78,93 ± 2,54	77,07 ± 4,57	63,03 ± 7,34*	58,39 ± 10,15*
Miotoxina I	76,69 ± 3,44	67,66 ± 4,61*	58,44 ± 6,85*	59,59 ± 6,93*
Miotoxina II	75,08 ± 3,30	74,59 ± 2,99	71,01 ± 3,54 <sup>bc</sup>	75,24 ± 3,29 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

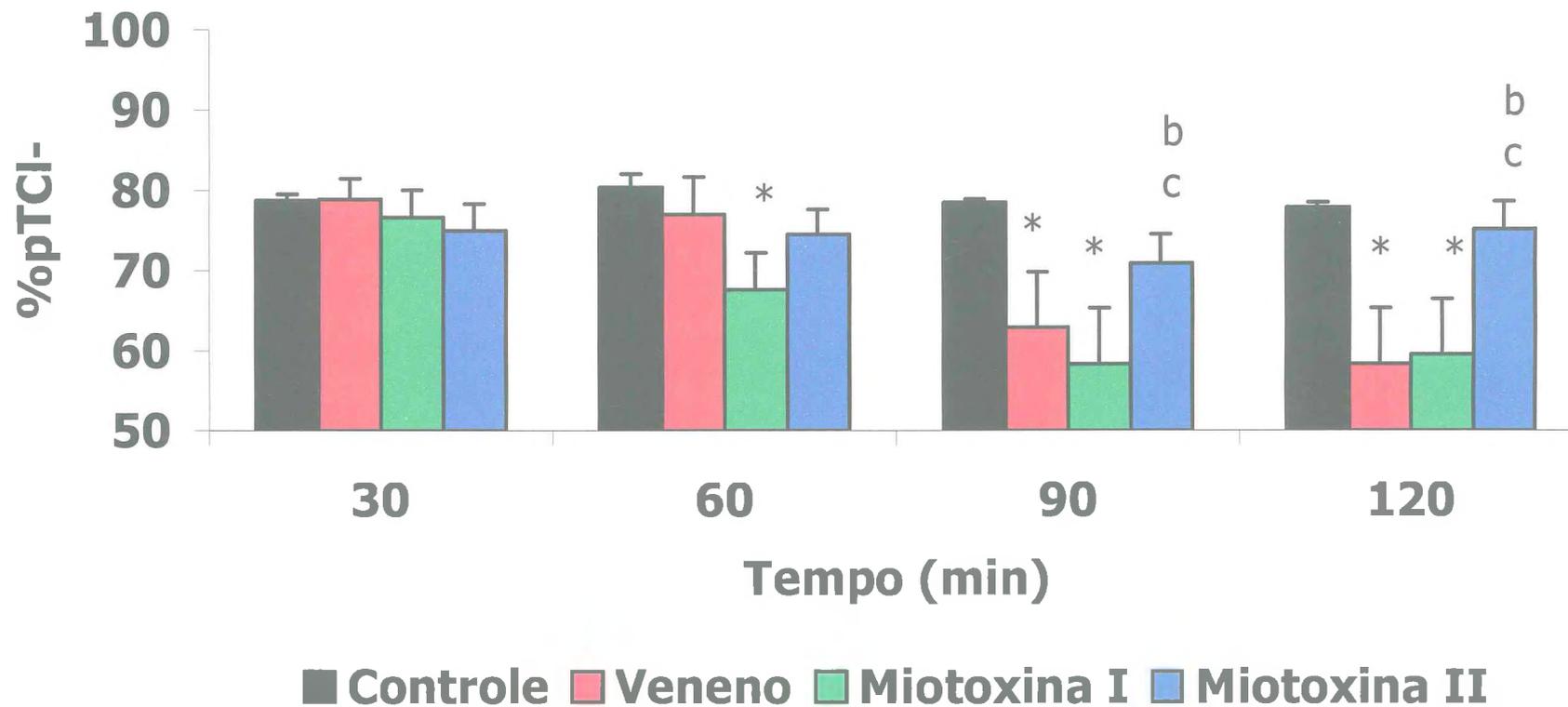


Gráfico 13 – Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de cloro (%pTCL) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10µg/mL), miotoxina I (5µg/mL) e miotoxina II (5µg/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 11: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* na excreção de sódio (ENa<sup>+</sup>)

Variáveis (μEq/g/min)	30	60	90	120
Controle	13,68 ± 0,58	12,87 ± 039	14,97 ± 0,40	15,18 ± 0,37
Veneno	11,68 ± 2,24	7,07 ± 2,53*	18,85 ± 7,03	50,15 ± 11,27*
Miotoxina I	11,18 ± 1,61	16,46 ± 3,06 <sup>a</sup>	25,50 ± 6,78*	33,78 ± 7,43* <sup>a</sup>
Miotoxina II	12,31 ± 1,21	14,16 ± 0,93	15,43 ± 0,56	17,73 ± 1,71 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p < 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

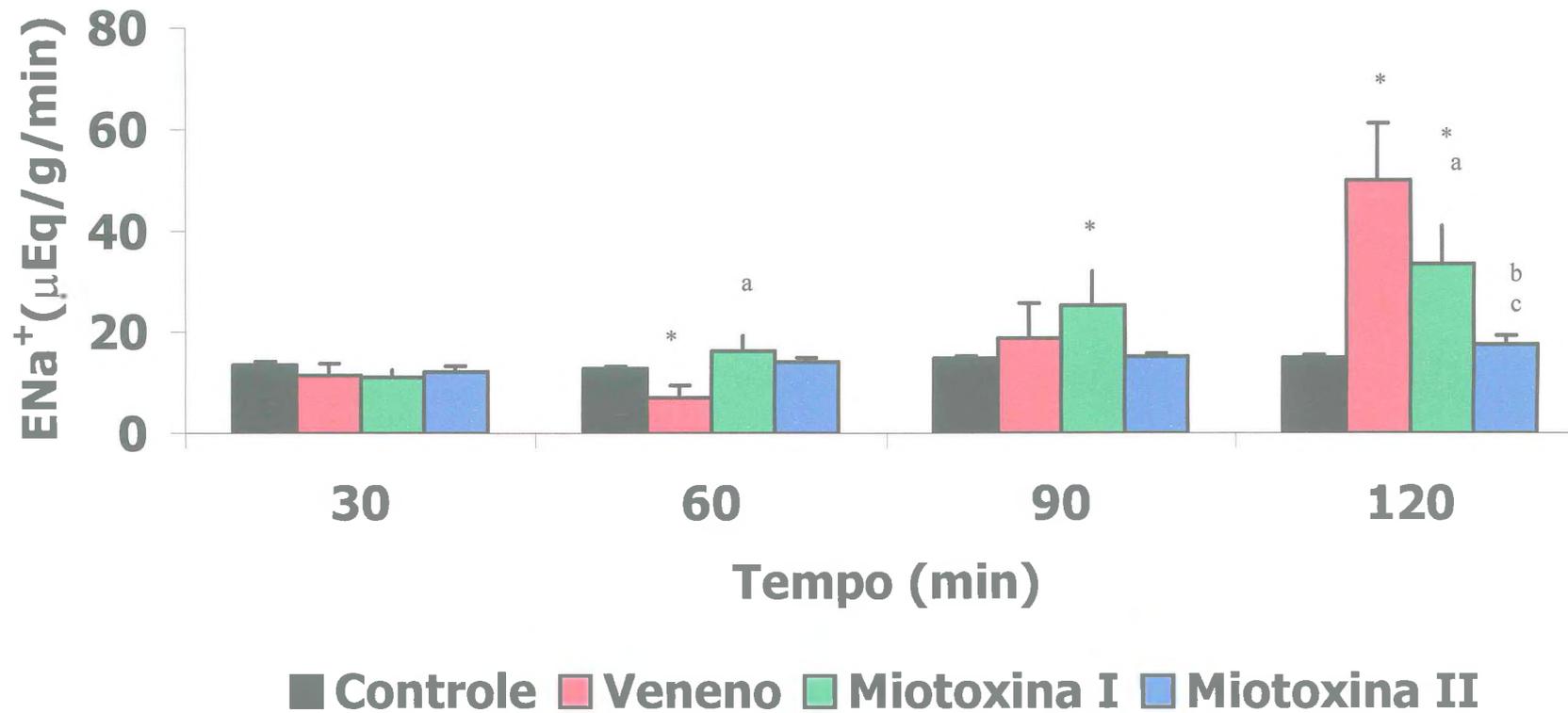


Gráfico14 – Efeitos na excreção de sódio ( $ENa^+$ ) na ausência (controle) e presença do veneno bruto ( $10\mu g/mL$ ), miotoxina I ( $5\mu g/mL$ ) e miotoxina II ( $5\mu g/mL$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 12: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* na excreção de potássio (EK<sup>+</sup>)

Variáveis (μEq/g/min)	30	60	90	120
Controle	0,77 ± 0,07	0,78 ± 0,08	0,79 ± 0,06	0,76 ± 0,17
Veneno	0,69 ± 0,14	0,34 ± 0,15*	0,63 ± 0,25	1,68 ± 0,43*
Miotoxina I	0,63 ± 0,094	0,90 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,24 <sup>*a</sup>	1,39 ± 0,27*
Miotoxina II	0,58 ± 0,08	0,66 ± 0,05	0,71 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p < 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

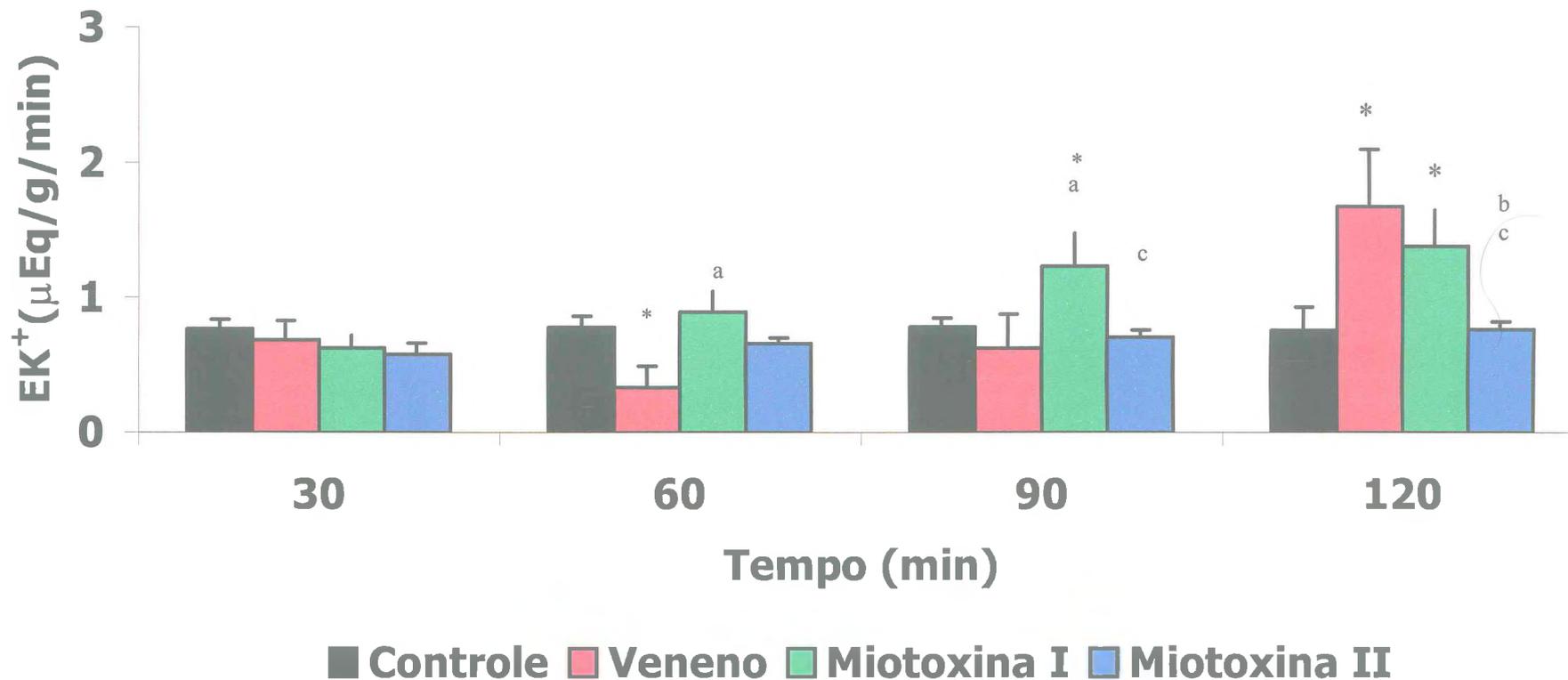


Gráfico15 – Efeitos na excreção de potássio ( $EK^+$ ) na ausência (controle) e presença do veneno bruto ( $10\mu g/mL$ ), miotoxina I ( $5\mu g/mL$ ) e miotoxina II ( $5\mu g/mL$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 13: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* na excreção do cloro

Variáveis ( $\mu\text{Eq/g/min}$ )	30	60	90	120
Controle	$14,65 \pm 3,45$	$15,28 \pm 3,52$	$15,44 \pm 2,75$	$15,42 \pm 2,61$
Veneno	$11,56 \pm 2,04$	$5,97 \pm 2,50^*$	$15,05 \pm 5,41$	$44,75 \pm 9,76^*$
Miotoxina I	$12,29 \pm 2,42$	$17,84 \pm 4,12^a$	$31,16 \pm 9,51^{*a}$	$37,07 \pm 9,55^{*a}$
Miotoxina II	$11,02 \pm 1,40$	$12,61 \pm 0,96$	$13,38 \pm 0,52^c$	$15,27 \pm 1,08^{bc}$

Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II.

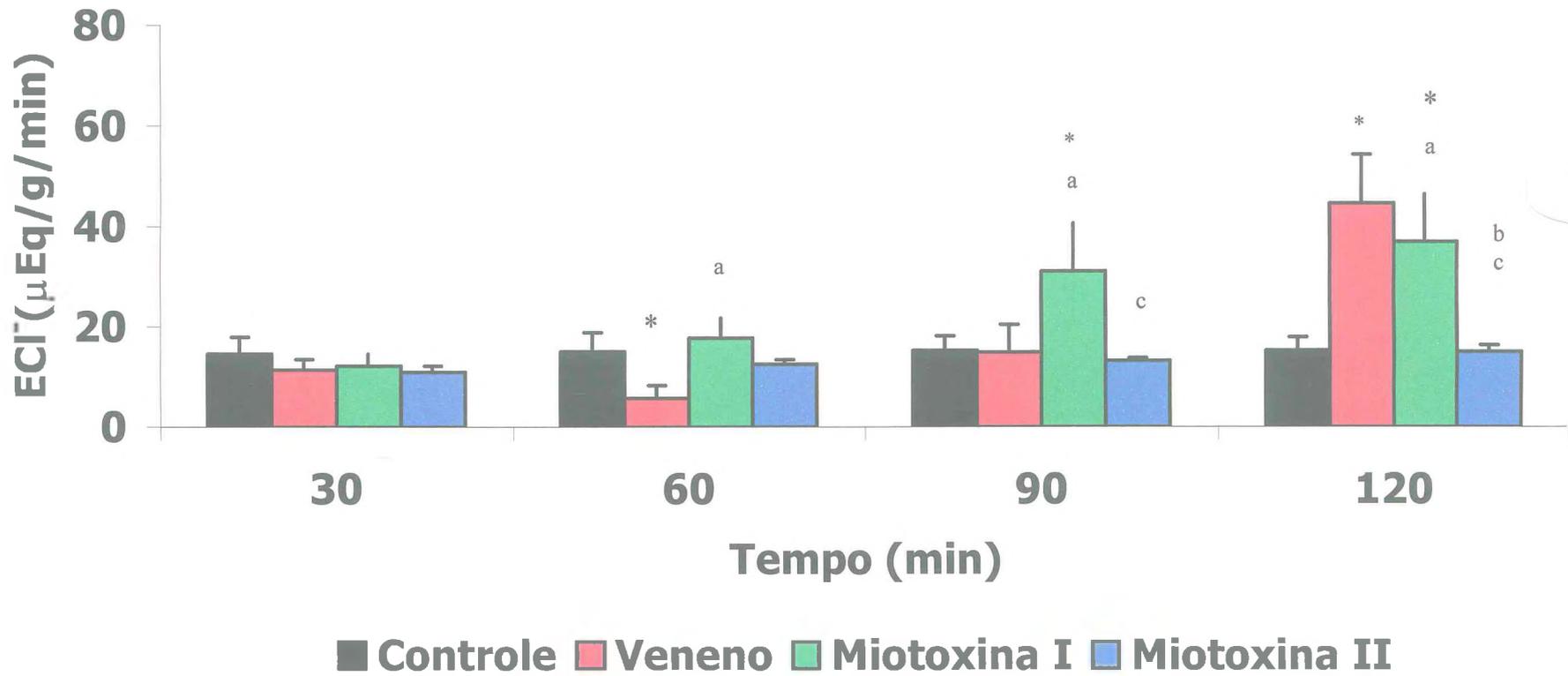


Gráfico 16 – Efeitos na excreção de cloro (ECI) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10 $\mu\text{g/mL}$ ), miotoxina I (5 $\mu\text{g/mL}$ ) e miotoxina II (5 $\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

TABELA 14: Efeito do veneno bruto, miotoxina I e miotoxina II da *B. moojeni* no clearance osmótico (Cosm)

Variáveis (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	30	60	90	120
Controle	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,001	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Veneno	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,38 ± 0,09*
Miotoxina I	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,06	0,28 ± 0,06 <sup>*a</sup>
Miotoxina II	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02 <sup>bc</sup>

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferoni t teste) com p < 0,05. \*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle; a = diferença estatística entre o veneno bruto e miotoxina I; b = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina II; c = diferença estatística entre a miotoxina I e miotoxina II .

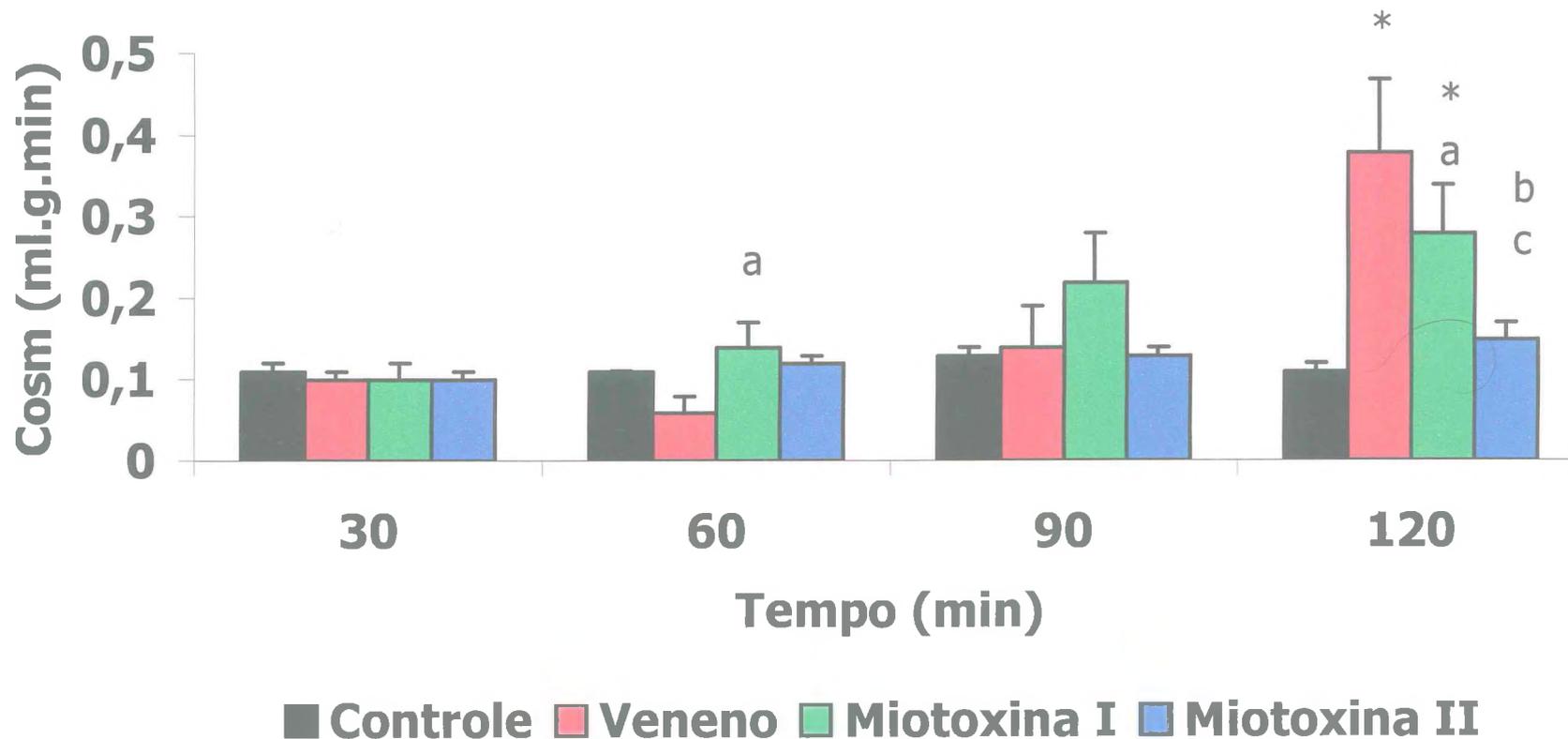


Gráfico 17 – Efeitos no clearance osmótico (Cosm) na ausência (controle) e presença do veneno bruto (10 $\mu$ g/mL), miotoxina I (5 $\mu$ g/mL) e miotoxina II (5 $\mu$ g/mL) do veneno de *Bothrops moojeni*. Dados expressos por média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA (Bonferoni t teste) com  $p < 0,05$ . \* = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle; a = diferença estatística entre veneno bruto e miotoxina I; c = diferença estatística entre miotoxina I e miotoxina II.

## **Histopatológico**

Foi observado aumento acentuado de depósito de material protéico nos glomérulos túbulos e interstício dos rins perfundido com a Miotoxina I (Figura 09 e 10). Enquanto que nos rins infundidos com veneno ocorreu apenas depósito moderado de material protéico (Figura 12 e 13). Os rins infundidos com Miotoxina II não sofreram alterações (Figura 14 e 15).

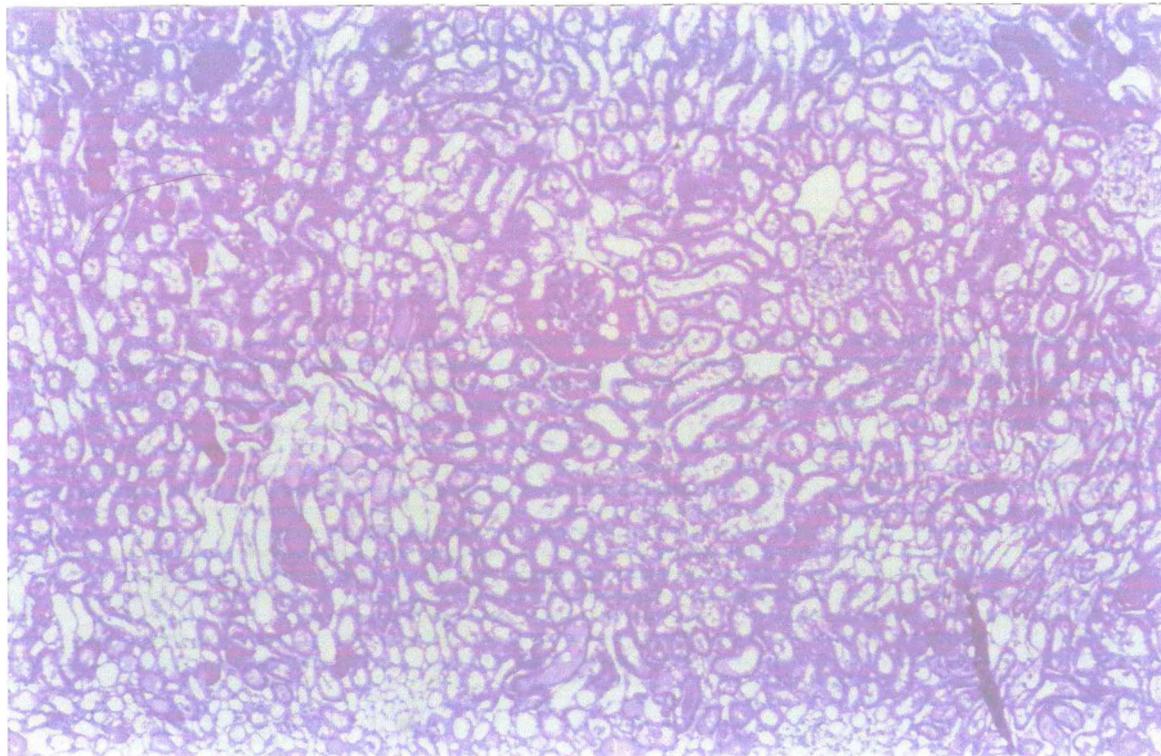


Figura 10 – Histopatológico da região do córtex renal apresentando intensa quantidade de material proteíco, 5 $\mu$  de miotoxina I (40X)

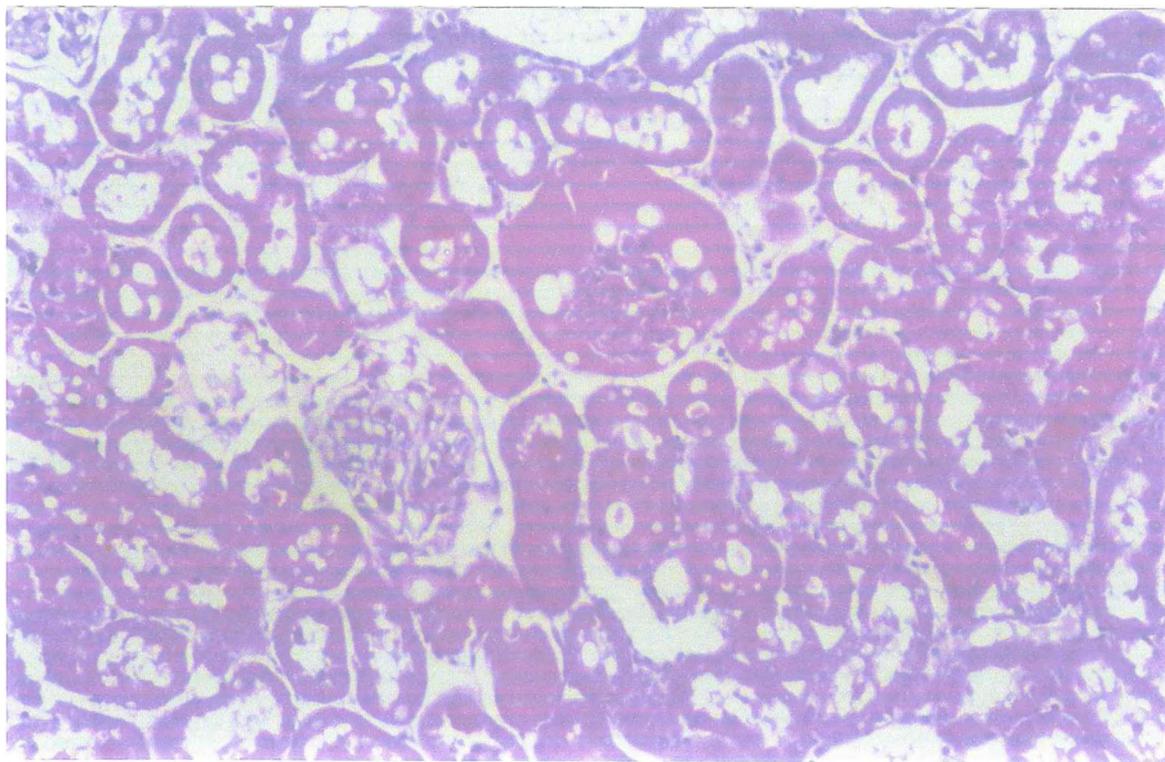


Figura 11 – Histopatológico dos glomerulos, túbulos e vasos apresentando intensa quantidade de material proteíco, 5 $\mu$  de miotoxina I (100X)

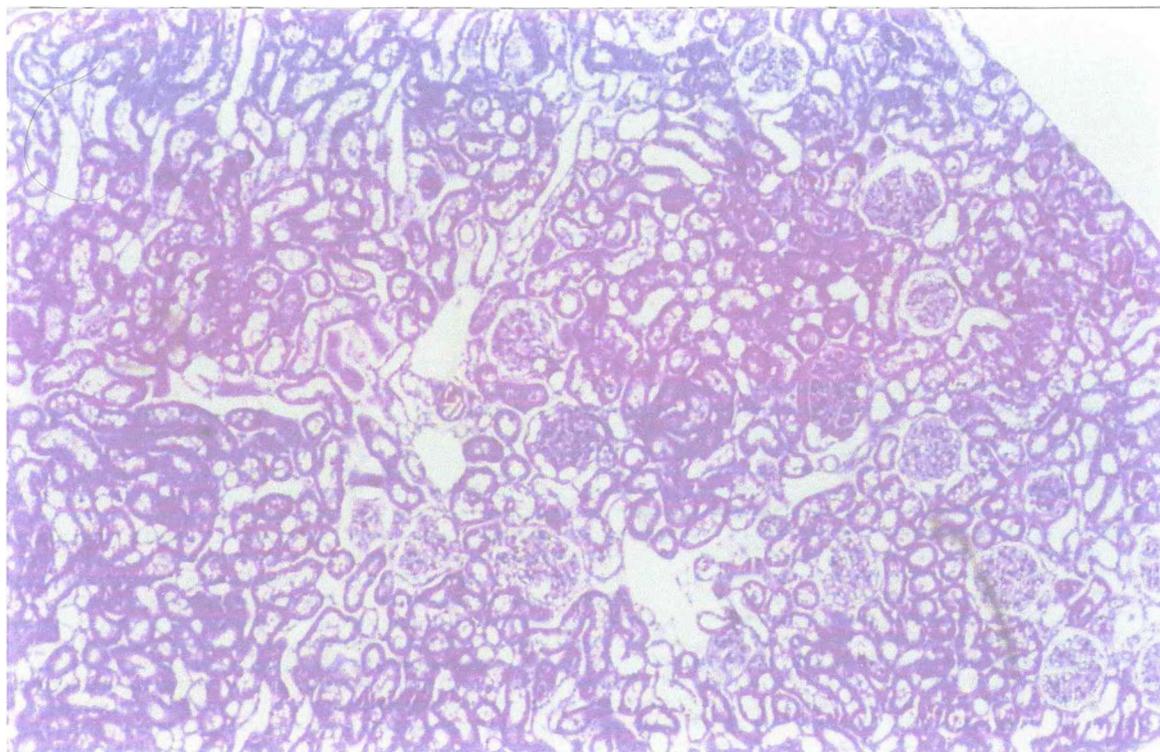


Figura 12 – Histopatológico da região do córtex renal apresentando moderada quantidade de material proteico, 10 $\mu$ g de veneno (40X)

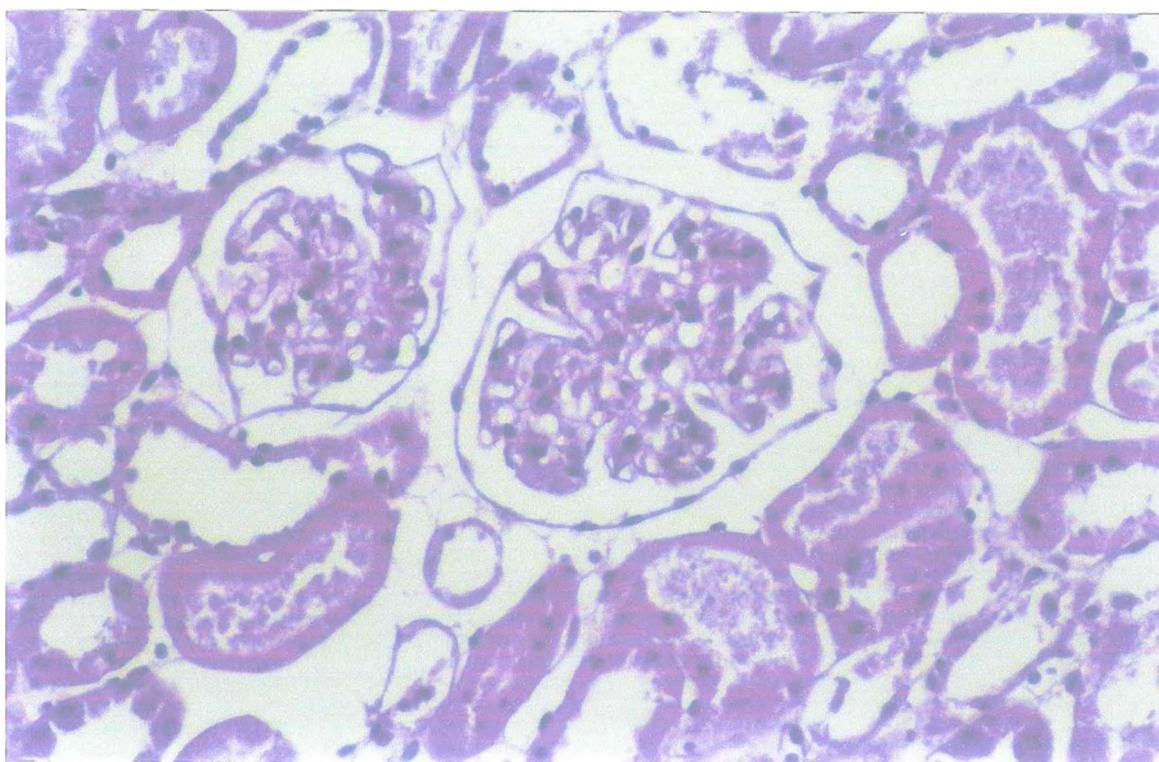


Figura 13 – Histopatológico dos túbulos renais apresentando moderada quantidade de material proteico, 10 $\mu$ g de veneno(200X)

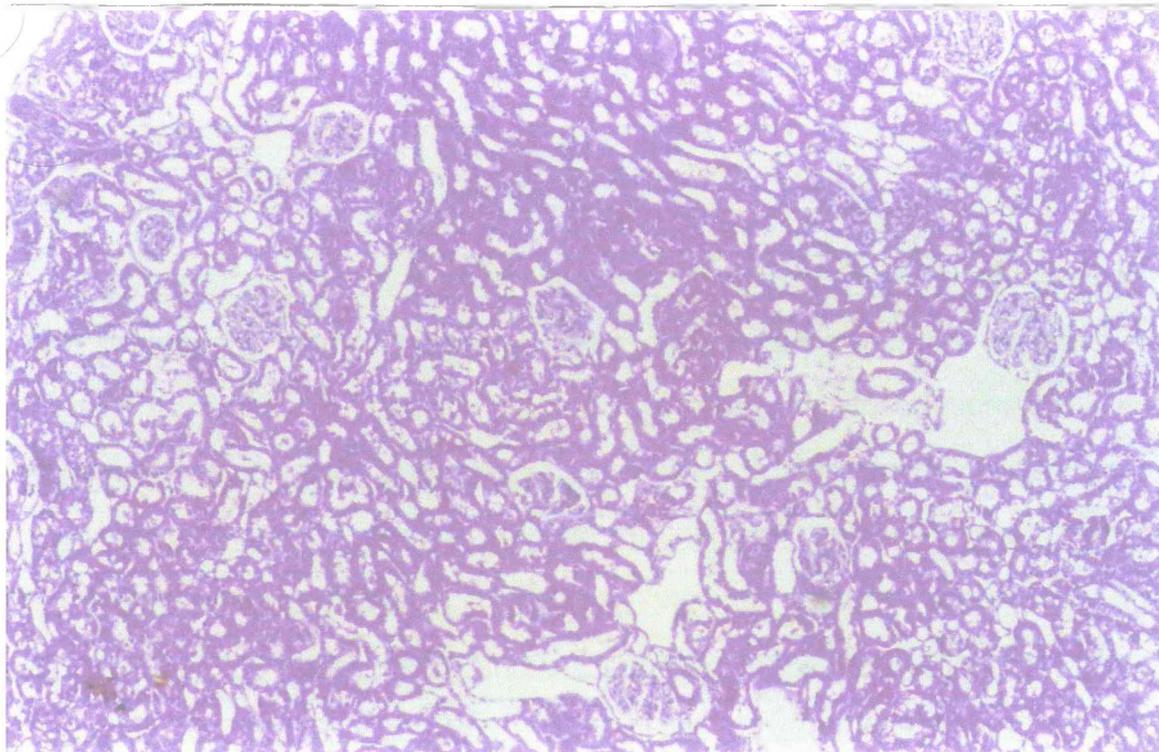


Figura 14 – Histopatológico da região do córtex renal sem alterações, 5 $\mu$ g de miotoxina II (40X)

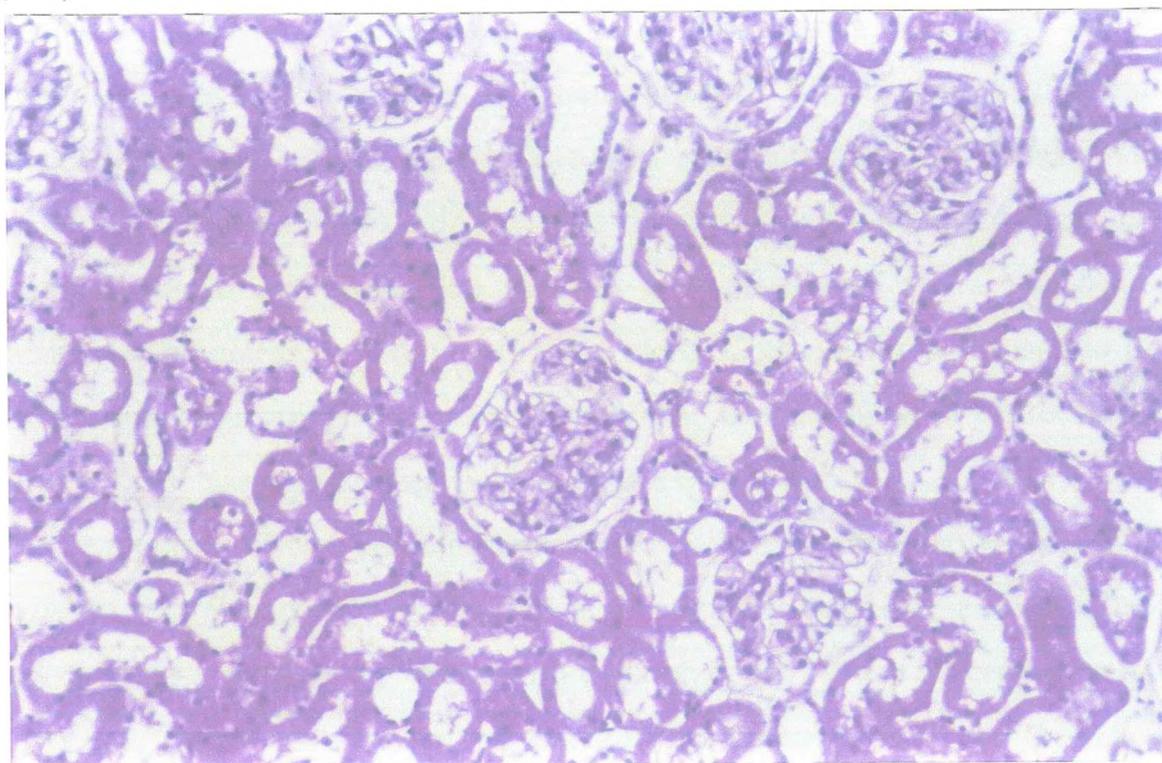


Figura 15 – Histopatológico dos túbulos e glomérulos apresentando sem alterações, 5 $\mu$ g de miotoxina II (100X)

## Discussão

Monteiro e Fonteles (1999), estudando o veneno de *Bothrops jararaca* no rim isolado de rato, observaram uma diminuição no fluxo urinário, na pressão de perfusão, no ritmo de filtração glomerular e do transporte tubular de sódio e potássio. Havt e colaboradores (2001), avaliando os efeitos renais do veneno da *Bothrops jararacussu* no rim isolado de rato, demonstraram queda da pressão de perfusão, resistência vascular renal e diminuição dos transportes iônicos tubulares de sódio e potássio, com um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário nos últimos 30 minutos de cada experimento.

Os resultados apresentam grande semelhança com os efeitos promovidos por *B. jararacussu*. O veneno bruto de *Bothrops moojeni* causou intensa redução da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, assim como uma queda temporária da excreção de sódio, potássio e cloro logo após a administração do veneno ao sistema. Foi observado ainda queda dos transportes tubulares de sódio, potássio e cloro. Contudo foi demonstrado um aumento do fluxo urinário do ritmo de filtração glomerular e da excreção dos íons sódio, potássio e cloro no final de cada experimento.

Moura-da-Silva e colaboradores (1991) descreveram que o veneno da *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* possuem alta atividade fosfolipásica e miotóxicas. Ferreira e colaboradores (1992) descreveram que o veneno de *B. jararacussu* e *B. moojeni* apresentaram alta atividade miotóxica quando comparados entre diversos venenos Botrópicos. O veneno da *B. jararaca* apresentou muito pouca atividade miotóxica.

A partir destes dados pode-se supor que o possível aumento do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular presente no final dos experimentos

com *B. moojeni* seja possivelmente provocado pela presença de atividade miotóxica deste veneno.

Boer-Lima e colaboradores (1999), mencionaram que a atividade proteolítica e fosfolipásica, encontradas no veneno da *B. moojeni*, foram as responsáveis pelos efeitos deletérios encontrados no epitélio renal. Estes autores afirmam que a atividade proteolítica deste veneno deve ter importante efeito citotóxico nos muitos tipos de células o que deve contribuir direta ou indiretamente para a nefrotoxicidade. Estes autores afirmaram ainda que o veneno de *B. moojeni* não causou queda da pressão arterial nem deposição de fibrina nos capilares renais.

Nossos experimentos são destituídos de sangue, portanto a ausência de fibrinogênio excluiria a ação de atividade coagulativa deste veneno nos nossos resultados. No entanto, foi obtido uma intensa queda da pressão de perfusão. Essa queda poderia reduzir o suprimento de ATP para as células (Ponraj e Gopalakrishnakone, 1997), associado ao influxo de íons cálcio, exercido pela desestabilização da membrana, causado pela ação das miotoxinas, que promoveria a ativação de proteínas fosfolipásicas. Essa ativação causaria os efeitos deletérios descritos por Boer-Lima e colaboradores em 1999. Em nossos resultados foi evidenciado não somente a queda da pressão de perfusão, mas também a queda do fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e da excreção dos íons sódio potássio e cloro, logo após a administração do veneno.

Estes resultados nos fizeram questionar qual seria o papel específico das miotoxinas presentes no veneno de *B. moojeni* no rim isolado. Ambas miotoxinas da *B. moojeni* foram obtidas com um alto grau de pureza usando uma cromatografia de step como mostrada por eletroforese e analisada por HPLC fase reversa. Ambas as proteínas exibem composição de aminoácidos

semelhante, entretanto a Bmtx II apresenta pouco caracter básico se comparado com Bmtx I. Este aspecto básico é evidenciado por diferente eluição destas frações na cromatografia de troca iônica.

A fosfolipase  $A_2$  é classificada em 4 grupos.  $PLA_2$  do veneno de serpente pertencem ao grupo I e II  $PLA_2$ s. O tipo II pode ser dividida em dois subgrupos: D-49 (Asp-49  $PLA_2$ ) que tem um resíduo de ácido aspártico ligando-se ao sítio do cálcio, possuindo alta atividade enzimática e K-49  $PLA_2$ -like (LYS-49  $PLA_2$ -like), esta tem um resíduo de lisina na posição 49 com baixa atividade enzimática (Selistre de Araújo et al., 1996). Bmtx-I e Bmtx II exibem um grau de homologia por volta de 95% quando comparado com o subgrupo K-49  $PLA_2$  e até 75% quando comparado com o outro subgrupo D-49  $PLA_2$ . Portanto, ambas as miotoxinas devem ser classificadas dentro do mesmo grupo de fosfolipase  $A_2$ -símile, destituídas de atividade enzimática (Lomonte, 1990).

Apesar das semelhanças estruturais entre as duas miotoxinas do veneno de *B. moojeni*, foram encontrados diferentes efeitos renais após testarmos ambas no sistema de perfusão de rim isolado de rato. A Bmtx-II causou alteração temporária no transporte tubular do íon potássio, porém, não afetou nenhum outro parâmetro por nós avaliado. Todavia, a Bmtx-I causou intensas modificações fisiológicas no rim isolado. Foram Observados aumento da PP e RVR, FU e RFG e na excreção dos íons sódio, potássio e cloro. O transporte tubular destes íons foi diminuído após a sua administração

Alguns efeitos renais promovidos pela Bmx-I foram semelhantes a alguns parâmetros observados após a administração do veneno bruto de *Crotalus durissus cascavella* (Martins et al., 1998). A principal fração do veneno Crotálico é a crotoxina, uma toxina fosfolipásica com alta atividade enzimática (Santoro et al., 1999). Daí, a Bmtx-I poderia induzir a formação de

TxA<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> que promoveriam a vasoconstrição capilar renal (Douglas 2001), explicando o aumento da PP, RVR, natriurese, caliurese e diurese. Porém, Lomonte e colaboradores (1990) afirmaram que as miotoxinas do veneno de *Bothrops moojeni* têm estrutura seqüencial semelhante as PLA<sub>2</sub> e que apresentam atividade fosfolipásica.

Kini e Iwanaga (1986), comparando as seqüências estruturais de miotoxinas e fosfolipases de serpentes, sugeriram que um sítio catiônico associado com uma região hidrofóbica sejam os responsáveis pela miotoxicidade, indicando que a atividade fosfolipásica não é essencial para o efeito farmacológico das miotoxinas. Isto explicaria como uma miotoxina que não apresenta atividade enzimática poderia alterar a bicamada lipídica da membrana plasmática, promovendo uma desorganização celular e com isso o aumento do influxo de cálcio. Este seria o mecanismo farmacológico das miotoxinas. Diante de tais resultados sugerimos que o efeito da Bmtx-I pode ter afetado a fisiologia renal a partir de uma destas hipóteses descritas.

Nossos resultados apresentaram efeitos opostos na PP e RVR após a administração de Bmtx-I e do veneno bruto. Enquanto o veneno bruto causou a queda destes parâmetros, a miotoxina I causou intenso aumento. Isso nos faz sugerir que alguma fração presente no veneno bruto conseguiu impedir os efeitos vasoconstritores da miotoxina I. Bourgnuignon e colaboradores (2000) descreveram a existência de peptídeos potenciadores de bradicinina no veneno bruto de *Bothrops moojeni*. Estes potenciadores estão presentes em outros venenos botrópicos (Ferreira et al. 1970, 1992, 1998). Isto nos leva a crer que o efeito potenciador de bradicinina esteja relacionado com a queda da pressão de perfusão e RVR, mas não se pode explicar porque esta fração impediu o efeito exercido pela miotoxina I.

Nossa conclusão é que o veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* foi semelhante ao da *Bothrops jararacussu*. Causando alteração nos parâmetros renais por nós avaliados e que provavelmente fatores como peptídeos potenciadores de bradicinina, atividade fosfolipásica e atividade miotóxica deste veneno levaram ao quadro descrito em nossos resultados.

Embora as miotoxina I e miotoxina II apresentem o mesmo grau de homologia. A miotoxina I apresentou resultados similares ao veneno bruto da *Crotalus durissus cascavella*, o que nos faz suspeitar de que além da atividade proteolítica lesionando a membrana celular e ocasionando um maior influxo de cálcio para interior da célula, este efeito poderá estar associado a uma possível atividade fosfolipásica. Por outro lado a miotoxina II apresentou pequena atividade no rim isolado de rato.

## Conclusão

1) A toxicidade aguda ( $DL_{50}$ ) do veneno da *Bothrops moojeni* utilizando dois métodos diferentes, apresentaram resultados similares neste experimento:

2) O veneno da *Bothrops moojeni* apresentou diminuição na pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), e no transporte tubular de sódio, potássio e cloro ( $\% TNa^+$ ,  $\%TK^+$ ,  $\%TCl^-$ ). Aumento no fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG), excreção de sódio, potássio e cloro ( $ENa^+$ ,  $EK^+$ ,  $ECl^-$ ) e clearance osmótico ( $C_{osm}$ ). Portanto o veneno é diurético, natriurético, caliurético e reduz a pressão de perfusão em rim isolado de rato.

➡ Peptídeos potenciadores de bradicinina podem ser os responsáveis pelo o efeito acima

3) A miotoxina I da *Bothrops moojeni* apresentou diminuição no transporte tubular de sódio, potássio e cloro ( $\% TNa^+$ ,  $\%TK^+$ ,  $\%TCl^-$ ). Aumento da pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG), excreção de sódio, potássio e cloro ( $ENa^+$ ,  $EK^+$ ,  $ECl^-$ ) e clearance osmótico ( $C_{osm}$ ). Portanto a miotoxina I é diurético, natriurético, caliurético e aumenta a pressão de perfusão em rim isolado de rato.

➡ Além da atividade proteolítica aumentando o cálcio no interior das células, atividades fosfolipásicas podem estar envolvida.

4) A miotoxina II apresentou um pequeno efeito transitório no percentual do transporte tubular de potássio ( $\%TK^+$ ) na dose utilizada em rim isolado de rato.

## Referências Bibliográficas

- 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. Lessões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. **Mem. Inst. Butantan**, v. 34, p. 137-157, 1969
- 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.
- AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. **Toxicon**, v. 16, p.71-75, 1978
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do 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, cap 19, p.297, 1994
- BARRAVIERA, B.; LAMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MEIRA, D. Acute phase reactions including cytokins in patients bitten by *Bothrops spp.* And *Crotalus durisus 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

- BORGES. R. C.; ARAÚJO, A. F. B. Seleção de habitat entre duas espécies de jararaca ( *Bothrops moojeni* Hoge e *B.neuwiedi* Wagler) (Serpente: viperidae) **Revista Brasileira Biologia.**, v.58, p.591-601, 1998
- BICUDO, P, L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In:
- BOER-LIMA; 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, 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) **Revista Brasileira Biologia.**, v.58, 591-601, 1998
- BOURGUIGNOM, S. C.; PASE, F. S.; JR.; CALHEIROS, E. B.; JULIANO, M.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. *Bothrops moojeni* venom peptides containing bradykinin potentiating peptides sequence. **Prot. and Pept. Lett.**, v. 8, p. 21-26, 2000.
- BOWMAN, R. H.; MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O 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, 1998
- BYDLOWSKI, S. P. Bioquímica e fisiologia dos Eicosanóides. In: Douglas C.R. (edit). **Patofisiologia geral, mecanismo das doenças**, São Paulo: robe editorial., p. 528-529, 2000
- CAMPBELL J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin america. **Cornell Univ. Press**, Ithaca, 1979
- 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

- CAMPBELL J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin america. **Cornell Univ. Press**, Ithaca, 1989
- 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.
- 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 A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-1785, 2000
- 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.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **J Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060. 1994
- DOUGLA, C. R. Patofisiologia da insuficiência renal aguda. In: Dougla C.R. **Patofisiologia de sistema renal**. São Paulo: Robe editorial., p. 272-274, 2001
- DOUGLA, C.R. Patofisiologia do processo inflamatório. In: Douglas C.R. (edit). **Patofisiologia geral, mecanismo das doenças**. São Paulo: Robe editorial., p. 549, 2000
- 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, 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.
- FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDÁ, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-

potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein Chem.**,v. 17; p. 285-289, 1998.

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

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, p.387-397, 1977.

FONTELES, M. C. **Efeito do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídios endogénos no transporte de sódio e função renal.** Fortaleza, 1980. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, v. 90, p. 150-161, 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,HW. Acidente botrópico. In: Schvartsman S (edit), **plantas venenosas e animais peçonhentos**, 2 ed, São Paulo: Sarvier, Cap 13,p. 149-160, 1992

- GLASER, K. B.; MOBILIO, D.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and inhibition. **Trends Pharmac. Sci.**, v. 14, p. 92-98, 1993
- GRANTSAU, R. As cobras venenosas do Brasil. 1<sup>a</sup> ed.. Bandeirante S.A. Gráfica e Editora São Bernardo do Campo, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G.V. Isolation and partial characterization of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-128, 1984.
- HANSON, R.W.; BALLARD, F.J. citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin, **J. Lipid. Res.**,v. 9, p. 667-668, 1968.
- HAVT, A. **Toxicidade aguda e alterações hematológica e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos.** Dissertação de metrado, Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. 1999
- HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF blockers. **Toxicon**
- HOGUE, A . R. , ROMANO, S. A . Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem. Inst. Butantan .** v. 36, p. 109, 1972.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An Aqueous Endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v.35, p. 1149-1155, 1996
- KINI, R. M.; IWANAGA, S. Struture - Function relationship of phospholipase II: Charge densty distribution and the myotoxicity of presynaptically neuroxic phospholipase. **Toxicon**, v 24, n.9, p. 295-905. 1986
- 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 ,setembro, 1986

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

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**, Paulo, 4 março de 2001. *Ciência Zoologica*. P A.19. 2001

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

MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J.R.; da SILVA, C.A.; CARNEIRO, M.; GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of Ts TX-V, an  $\alpha$  toxin from *Tytyus Serrulatus* scorpion venom, and its effect on K<sup>+</sup> permeability of  $\beta$ - cells from isolated rat islets of langerhans. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1243, p. 309-314, 1995

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

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

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

MOREIRA LIMA, A. A. **Estudo dos efeitos das toxinas do *V. cholerae* e *E. coli* no rim isolado de rato.** Fortaleza, 1983. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará

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

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.; MOTA, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, v.29, n.12, p. 1471-1480, 1991

MOURA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from different *Bothrops* Species. **Toxicon**, v. 28, p. 1293-1301, 1991

NAMBI, P.; CLOZEL, M.; FEUERSTEIN G. Endothelin and heart failures. **Heart Fail ver**, 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. Pp. 9-28 in pesquisas em unidades de conservação, **Anais do Seminário.** Brasília, IEMA, SEMATEC-DF. 1998

NIENBOM, H. E.; PERRAZO, J. C.; MONSERRAT, A. I.; VIDAL, J. C. Contribution of phospholipase A<sub>2</sub> to lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**, v. 24, p 807-815, 1986

- OWNBY, C. L.; BJARNANASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Am J. Path.** V.93, p.201-218, 1978
- PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v. 33, p. 1293-1300, 2000
- PFEILSCHIFTER, J. Regulation of synthesis and secretion of group II phospholipase A<sub>2</sub>. In: Glaser, K.B., Vadas, P. (Eds), **Phospholipase A<sub>2</sub> in clinical inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology**, v. 5. CRC press, New York, p. 93-124, 1995
- 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
- PONRAJ, D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Renal lesion in rhabdomyolysis caused by *Pseudechis australis* snake myotoxin. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1956-1969, 1997
- PUORTO, G. acidentes por cobras in: SCHVARTSMAN, S. ( coord.) **Plantas venenosas e Animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, Cap. 13, p. 143-149, 1992.
- RAAB, W., KAISER,E. Nephrotoxic action of snake venoms. **Mem. Inst. Butantan** v. 33, n. 3, p. 1017-1020, 1966.
- RAGE, J. Diversity of snakes. In: Bauchot, R (edit) **Snakes a Natural History**. New York: Sterling Publishing Co., p.34-47, 1997
- REICHL, A. P.; SERRANO, S. M. T.; MANDELBAUM, F. R Isolation and properties of a phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, p. 225-237,1989.

- 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
- ROODT de, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETIIAN, J. C. H.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J. C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon** ,v 38, n.6,p. 865-873, 2000
- ROODT de , A. R.; DOLAB, J. A.; HAJOS, S. E.; FERNANDEZ, T.; SEGRE, L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofidicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caisaca, Lanzadera). **Medicina (Buenos Aires)**, v. 57, n.6, p. 667-676, 1997
- ROSS, B. D.; EPSTEIN, F. H.; LEOF, A. Sodium reabsortion in the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.** v. 225, n. 5, p.1165-1171, 1973.
- ROSS, B. D. the isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.
- 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.
- SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake ( *Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. and Physiol.**, v.122, p. 61-73, 1999

- SELITRE DE ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C L. Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin; a highly conserved class of protein. **Toxicon**, v.34, n11/12, p. 1237-1242, 1996
- SANT, S. M.; PUNDARE, N .M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to renal lesion. **J. Postgrad. Med.**, v 18, p. 181-188, 1972
- 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.
- 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
- SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinase from *Bothrops moojeni* (Caissaca) Venom- II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP2. **Toxicon**, v 31, n. 4, p. 483-492, 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<sup>+</sup> reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na<sup>+</sup>-load) **Pflugers Arch. Ges. Physiol.**, v. 319, p. 1285, 1970
- SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K-I.; YAMAGUCHI, Y.; ODA, N.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H.; KISHINO, J.; ARITA, H.; OHNO. M. Lysine -49 phospholipase from *Trimeresurus*

*flavoviridis* venom are membrane acting enzymes. **J. Biochem.**, v. 118, p. 1037-1044, 1995

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

SITPRIJA, V. BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. IN: LEE, C.Y.(edit) snake venoms, New York: springr-verlag 1979. Cap 28, p.997-1018.

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

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

SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; ANAI, K.; MARUYAMA, M. Activation of single-chain urokinase- type plasminogen activator by a hemorrhagic metalloproteinase, jararafibrase I, in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**. v.36, n.7, p. 993-1000, 1998

TOYAMA, M. H; MANCUSO, L. C.; GIGLIO, J. R.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI S.S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II ; two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: n-terminal. **Biochem. Mol. Biol. int.**, v. 37, n. 6, p. 1047-1055,1995.

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, cap 14, p 205-223, 1994

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

VIDAL, J. C.; STOPPANI, A. O. M. Isolation and purification of two phospholipase A from Bothrops venoms. **Archs. Biochem. Biophys.**, v. 145, p. 543-552, 1971.

VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. M. A. General procedure for the isolation and purification of phospholipases A<sub>2</sub> isoenzymes from Bothrops venom. **Acta. Physical. Latino Am.**, v.23, p91-104, 1972

VIDAL J. C. Bioquímica de los venenos ofídicos. **Bol. Assoc. Herpetológica Argent**, v. 4, p.6, 1988

(Abstract). 1989.

WHATLY, R. .E. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. **J. biol. Chem.**, v. 264, p. 6325-6333, 1989

ZAGER, R.A. Rhabdomyolysis and myihemoglobinuric acute renal failure. **Kiney Int.**, v. 49, p. 113-117, 1996

## Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins

P.S.F. Barbosa<sup>a</sup>, A. Havt<sup>a</sup>, P.E.G. Facó<sup>b</sup>, T.M. Sousa<sup>c</sup>, I.S.A.M. Bezerra<sup>d</sup>,  
C. Fonteles<sup>e</sup>, M.H. Toyama<sup>d</sup>, S. Marangoni<sup>e</sup>, J.C. Novello<sup>e</sup>, H.S.A. Monteiro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará,  
Rua Cel Nunes de Melo 1127, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pathology, Federal University of Ceará, Rua Monsenhor Furtado SN,  
Bairro Rodolfo Teófilo, CEP 60441-750, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>c</sup>Department of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Av. Parajana, Campus do Itaperi, 1700, 60740 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>d</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP),  
Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

<sup>e</sup>Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP),  
Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 12 December 2001; accepted 21 May 2002

✉

Renal failure is one of the most common systemic complications after snakebite; however, its pathogenesis remains unclear. In this study we evaluated the renal effects of *Bothrops moojeni* venom and its myotoxins (Bmtx-I and Bmtx-II) in rat perfused kidneys. The myotoxins were purified by ion-exchange chromatography and reverse phase HPLC. The whole venom (10 µg/ml) and myotoxins (5 µg/ml) were added to the perfusion system 30 min after the beginning of each perfusion. The effects were compared to a control group perfused with modified Krebs–Henseleit solution alone. *B. moojeni* venom increased the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), and the percent sodium, potassium and chloride tubular reabsorption (%TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup>, %TCl<sup>-</sup>). In contrast, the venom increased the urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), sodium, potassium and chloride excretion (ENa<sup>+</sup>, EK<sup>+</sup>, ECl<sup>-</sup>). The renal effects of myotoxin I were very similar to those of whole venom, but there was an increase rather than a decrease in the PP and RVR. Myotoxin II had no effect on renal function, except for a transient decrease in %TK<sup>+</sup>. In conclusion, *B. moojeni* venom caused intense alterations in renal function, including a drop in vascular resistance associated with diuresis, natriuresis and kaliuresis. Bmtx-I had an opposite action compared to whole venom, showed in the parameters of PP and RVR. Bmtx-II had a mild effect in %TK<sup>+</sup>. The inability of Bmtx-II to induce the renal effect similarly to Bmtx-I should be explained by the absence in the Bmtx-II of a minimal lysine rich region. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

\* *Bothrops moojeni*; Perfused kidney; Myotoxin

### Introduction

Renal effects of snake venoms represent a serious complication in snake bite victims, especially in cases of renal failure, which result from acute tubular necrosis

(Amaral et al., 1985) or glomerulonephritis (Rezende, 1989). The pathogenesis of the renal alterations following envenomation by *Bothrops* species is not well defined. Many mechanisms have been proposed to explain these lesions, including a direct nephrotoxic effect; caused by the proteolytic activity of the venom, disseminated intravascular coagulation, and the release of vasoactive substances (Amaral et al., 1986).

Barraviera and coworkers (1995) reported that kidney

\* Corresponding author. Fax: +55-85-288-8333.

E-mail addresses: serrazul@truenet-cc.com.br (H.S.A. Monteiro), havt@speeder.com.br (A. Havt).

0025-5414/\$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.  
PII: S0025-5414(02)00156-3



cells could release prostaglandin, cytokines, bradykinin, complement fractions and platelet activating factor (PAF). Koepfen and Stanton (1997), stated that bradykinin, by stimulating the liberation of nitric oxide from renal endothelium, could promote the increase of the glomerular filtration rate (GFR).

Pirozky and coworkers (1984), using the isolated perfused rat kidney model, demonstrated that the kidney was able to produce histamine, serotonin and PAF. Using the same method, Monteiro and Fonteles (1999) concluded that *Bothrops jararaca* venom caused direct acute nephrotoxicity and PAF appeared to be involved. Havt et al. (2001) tested the *B. jararacussu* venom and suggested that the increase in GFR and urinary flow (UF) were independent from the vasoactive parameters, perfusion pressure (PP) and renal vascular resistance (RVR), being promoted by PAF.

Boer-Lima and coworkers (1999) reported various histopathological renal alterations following the intravenous inoculation of *Bothrops moojeni* venom. They showed that the nuclei of the various proximal tubular cells presented pyknosis with clumping of chromatin material. They also noticed loss of proximal brush border, cytoplasmatic vacuolation and, in some tubules, degeneration and desquamation of necrotic cells. In conclusion, they suggested that these alterations were possibly caused by the proteolytic and PLA<sub>2</sub> activities of the venom.

In this work, we examined the renal effects of *B. moojeni* venom and two PLA<sub>2</sub>-like myotoxins isolated from this venom in rat isolated perfused kidneys.

## 2. Material and methods

### 2.1. Venom, chemicals and reagents

*B. moojeni* venom was collected from adult specimens maintained in the Regional Snake Laboratory of Fortaleza (LAROF). All chemicals and reagents used in this work were of analytical or sequencing grade.

### 2.2. Ion-exchange HPLC chromatography

*B. moojeni* venom (20 mg) was loaded onto a Protein Pack SP 5PW column (0.78 cm × 7.0 cm) at a flow rate of 1.0 ml/min. The proteins were eluted using a linear gradient (0.05–1.0 M) of ammonium bicarbonate and the elution profile was monitored at 280 nm. Fractions containing PLA<sub>2</sub> activity were pooled, lyophilized and stored at –20 °C.

### 2.3. Reverse phase HPLC

Further purification of the *B. moojeni* myotoxins following ion-exchange chromatography was done as described by Toyama et al. (1995). Five milligrams of the PLA<sub>2</sub> fraction were dissolved in 250 µl of 0.1% (v/v)

trifluoroacetic acid (solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation and the supernatant applied to a µ-Bondapak C-18 column (0.78 cm × 30 cm; Waters 991-PDA system). Proteins were eluted with a linear gradient (0–100%) of 66.5% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (solvent B), at a flow rate of 2.0 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and the fractions were collected, lyophilized and stored at –20 °C.

### 2.4. Reduction and carboxy methylation of proteins

One milligram of both purified myotoxins were dissolved in 6 M guanidine chloride (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.1 M Tris-HCl and 2 mM EDTA (final pH 8.15), then reduced with DTT and carboxy-methylated with <sup>125</sup>I-iodoacetic acid (Marangoni et al., 1995). Desalting was done on a Sephadex G-25 column in 1 M acetic acid at 25 °C and the eluted RC toxin was lyophilized. Each protein was then enzymatically and chemically digested.

### 2.5. Protein sequencing

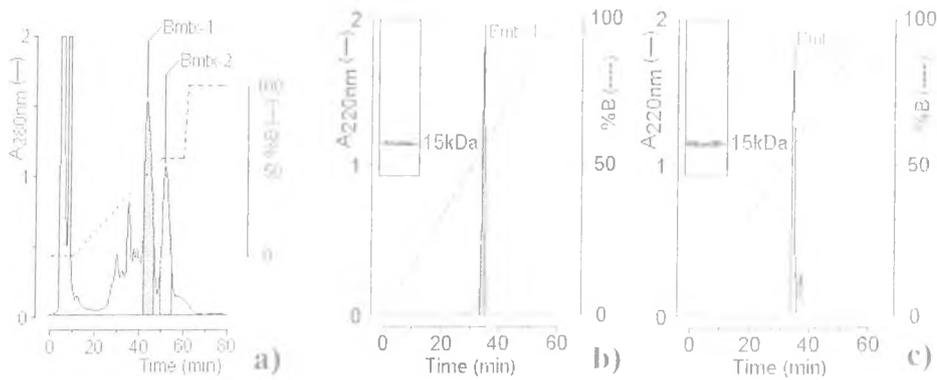
Direct sequencing from the N terminal was done with the reduced and carboxymethylated protein and with peptides isolated from the RC-MP-III-IR, using an Applied Biosystem 477 A automatic sequencer. The phenylthiohydantoin (PTH) amino acids were identified according to their retention times compared to those of the 20 PTH amino acid standards. Peptides containing (EIC) CM-Cys were monitored using a liquid scintillation counter (Beckman, model LS-250).

### 2.6. PLA<sub>2</sub> activity

PLA<sub>2</sub> activity was measured using the assay described by Cho and Kézdy (1994) and Holzer and Mackessy (1996), modified for 96-well plates. The standard assay mixture contained 200 µl of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 µl of substrate (1-nitro-3-octanoyloxy) benzoic acid, 20 µl of water and 20 µl of PLA<sub>2</sub> in a final volume of 260 µl. After the addition of PLA<sub>2</sub> (20 µg), the mixture was incubated for up to 10 min at 37 °C, with the absorbance being read at 10 min intervals. The enzyme activity—expressed as the initial velocity of the reaction (V<sub>0</sub>), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. All assays were done in triplicate and the absorbances at 425 nm were measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### 2.7. Myotoxic activity

Creatine kinase (CK) was assayed in a single channel analyzer using a commercial kit (Merck, Gramtest 2.5 kit). The myotoxins (1 µg/µl, 50 µl) were injected i.m. into the



(a) Ion-exchange chromatography of *B. moojeni* venom on a Protein Pack SP SPW column. The main myotoxic fractions obtained are designated as Bmtx-I and II. (b) Reverse phase (C18) HPLC of fraction Bmtx-I from the ion exchange step. Inset: tricine SDS-PAGE profile of Bmtx-I protein (r). (c) Reverse phase (C18) HPLC of fraction Bmtx-2 from the ion exchange step. Inset: tricine SDS-PAGE profile of reduced Bmtx-2 protein (r).

strocnemius muscle of male Wistar rats (90–110 g). Control rats received an equal volume of 0.15 M NaCl. After 3 h, the rats were anesthetized and blood was collected from the abdominal vena cava into tubes containing citric acid as anticoagulant. The plasma was stored at 4 °C maximum of 12 h before assaying.

#### Renal perfusion

Male Wistar rats (240–280 g), were fasted for 24 h with free access to water. The rats were anesthetized with pentobarbitone (50 mg/kg, i.p.), and after careful dissection of the right kidney, the right renal artery was cannulated via the mesenteric artery without interrupting the flow as described by Bowman (1970) and modified by Vasquez et al. (1983). The perfusate consisted of a modified Henseleit solution (MKHS) of the following composition (in M): 2.36 NaCl, 0.09 KCl, 0.023  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.023  $\text{7H}_2\text{O}$ , 0.025  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and 0.025  $\text{NaHCO}_3$ . Six ml of bovine serum albumin (BSA) was added to 100 ml of MKHS, and dialyzed for 48 h at 4 °C against 10 volumes of MKHS. Immediately before the beginning of perfusion protocol, 100 mg of urea, 50 mg of inulin and 10 mg of glucose were added to every 100 ml of perfusate. The pH was adjusted to 7.4. In each experiment, 100 ml of MKHS were recirculated for 120 min. A period of 30 min was allowed for blood washout. The perfusion pressure was kept at 120–130 mmHg during the first 30 min by adjusting the flow rate of the peristaltic pump. Thereafter, the pressure varied according to the sample collection. Samples of urine and perfusate were collected at 30 min intervals for analysis of the chloride content (using a chloride kit), sodium and potassium levels (by flame photometry); inulin, as described by Wasler et al. (1955) and creatinine, as described by Fonteles et al. (1983) and osmolality, which was measured in a vapor pressure osmometer (Wescor SA). *B. moojeni* venom (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and myotoxins

(5  $\mu\text{g/ml}$ ) were added to the system 30 min after the start of perfusion. The GFR, the fractional percent sodium ( $\% \text{TNa}^+$ ), potassium ( $\% \text{TK}^+$ ) and chloride ( $\% \text{TCl}^-$ ) tubular transport, the excretion of sodium ( $\text{E}(\text{Na}^+)$ ), potassium ( $\text{E}(\text{K}^+)$ ) and chloride ( $\text{E}(\text{Cl}^-)$ ), UF and RVR were determined using a conventional clearance formulae as described in detail elsewhere (Martinez-Maldonado and Opava-Sützer, 1978). The results were averaged over each of four 30 min periods (30, 60, 90 and 120 min) and are shown as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys. All groups were compared to the control group, in which the kidneys were perfused with MKHS alone. Statistical analysis was done using one-way ANOVA and the Bonferroni *t* test with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Purification of *B. moojeni* myotoxins

The basic PLAs in *B. moojeni* venom were isolated using ion-exchange HPLC (Fig. 1(a)). The two myotoxins, Bmtx-I and Bmtx-II were the last peaks eluted in the chromatogram at an ammonium bicarbonate concentration of 0.6 M. Further purification of these toxins by reverse phase HPLC showed that the fraction obtained was homogenous, as confirmed by Tricine SDS-PAGE (Fig. 1(b,c)).

The amino acid composition of these proteins showed that both myotoxins had 14 half cysteines, which indicated the presence of seven disulfide bridges. The high content of Lys and Arg indicated that both proteins were strongly basic (Fig. 2). The N-terminal amino acid sequence of the two myotoxins showed around 95% homology with other basic myotoxic PLAs, such as PrtX-I isolated by Toyama et al. (1998), BhtX-I from *B. jararacussu* and myotoxin II from *B. asper* (Fig. 3). Bmtx-I and II did not show high homology

Amino acids	Bmtx-1	Bmtx-2
Asx*	13	14
Thr	6	7
Ser	4	4
Glx*	11	8
Pro	7	7
Gly	12	11
Ala	7	7
½ Cys***	14	14
Val	4	4
Met	1	1
Ile	3	3
Leu	12	12
Tyr	10	10
Phe	2	2
Lys	14	15
His	2	2
Arg	6	7
Trp***	1	1
Total	129	129

Fig. 2. Amino acid composition of Bmtx-I and Bmtx-II. \* These amino acids were determined as a acid form of glutamate and aspartate and glutamic and aspartic acid, after 24 h of acid hydrolysis. \*\* These amino acids were determined after treatment of these proteins as oxidized cysteine. \*\*\* These amino acid content were determined using a differential treatment as determined by Waters (Waters) user manual.

with other Asp 49 PLA<sub>2</sub>. The Bmtx-I complete amino acid sequence was previously determined by Soares et al. (2000). Bmtx-II complete amino acid sequence determined in this article presents a 90% sequence homology with other Lys 49 bothropic PLA<sub>2</sub>. This protein presents several high-conserved region, but the C-terminal region was the most variable region than to other Lys 49 PLA<sub>2</sub> (Fig. 3).

### 3.2. PLA<sub>2</sub> and myotoxic activities

The whole venom presented a high PLA<sub>2</sub> activity when compared to both myotoxins. However, these myotoxins and the whole venom had a high myotoxic activity, demonstrated by creatine kinase assay (Table 1).

Table 1  
PLA<sub>2</sub> and myotoxic activity of the whole venom of *B. moojeni* and its both myotoxins (Bmtx-I and Bmtx-II)

	PLA <sub>2</sub> activity (nmol/min/mg)	Myotoxic activity (nmol/min/mg)
Control	0.00	156.51 ± 15.06
Whole venom	78.56 ± 5.26	1351.15 ± 215.36
Myotoxin I (Bmtx-I)	2.42 ± 0.56	1836.89 ± 252.26
Myotoxin II (Bmtx-II)	3.56 ± 1.23	856.56 ± 125.65

The PLA<sub>2</sub> activities were expressed as a nmoles/min/mg. All experiments were carried out in the same incubation condition. The results are the medium of  $n = 5$  experimental protocols. The myotoxic effect was determined as medium of  $n = 4$  animals.

### 3.3. Renal effects of *B. moojeni* venom

*B. moojeni* venom (10 µg/ml) produced a significant drop in PP (Fig. 4) and RVR (Fig. 5) at 90 min. Whereas, UF and GFR decreased at 60 min and increased in the period of 120 min (Figs. 6 and 7). The venom also reduced sodium, potassium and chloride tubular transport in 90 and 120 min. In contrast, sodium, potassium and chloride excretion, decreased in 60 min, then increased markedly in 120 min (Table 2).

### 3.4. The renal effects of *B. moojeni* myotoxins

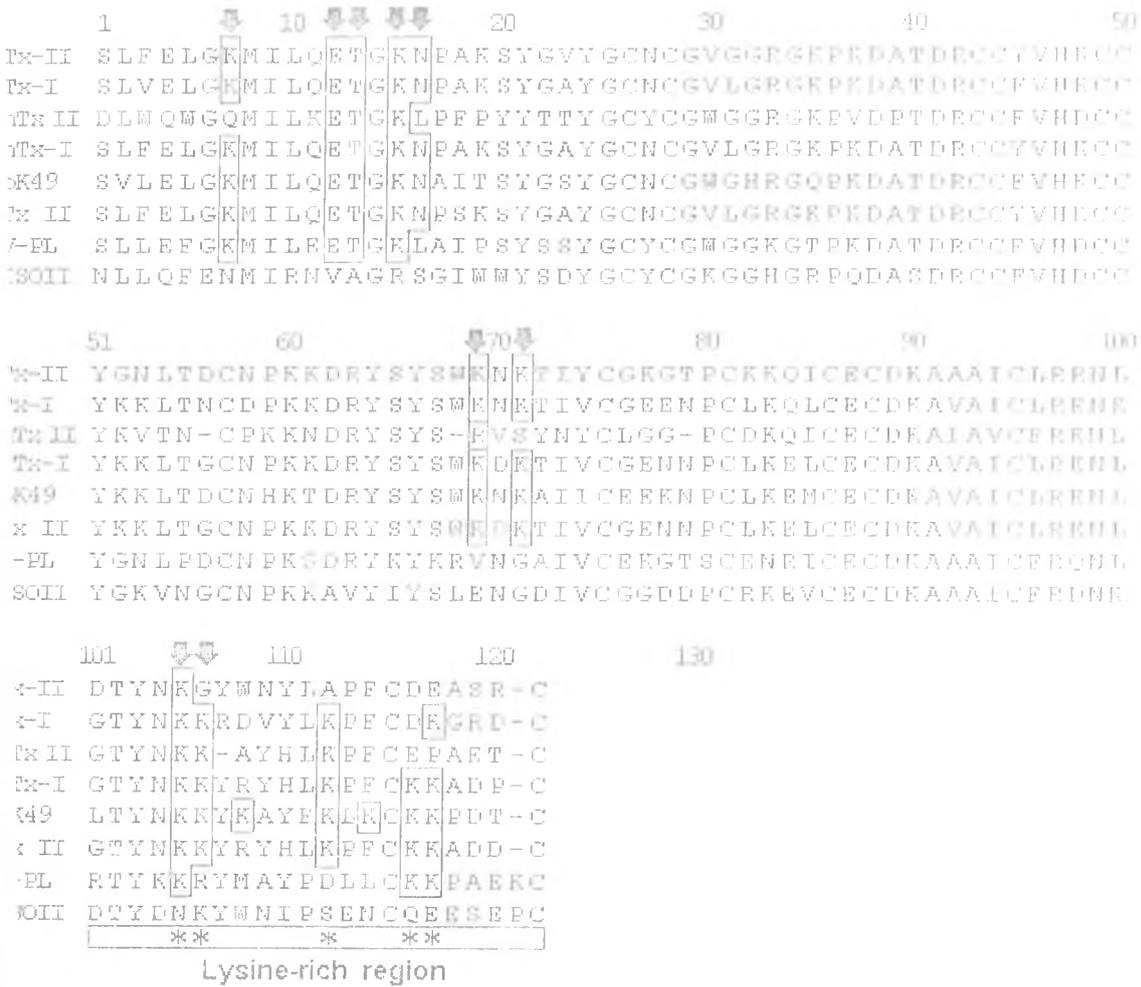
Bmtx-I (5 µg/ml) increased the PP (Fig. 4) and RVR (Fig. 5) in 90 and 120 min, whereas the GFR and UF increased in 120 min (Figs. 6 and 7). Bmtx-I also reduced the sodium and chloride transport in 90 and 120 min, but potassium reabsorption decrease in 60, 90 and 120 min. Sodium, potassium and chloride excretion were increased in 90 and 120 min (Table 2).

Bmtx-II (5 µg/ml) had little effect of renal physiology, with a decrease in potassium tubular reabsorption only at 90 min; the other renal parameters were unaffected by this toxin (Table 2).

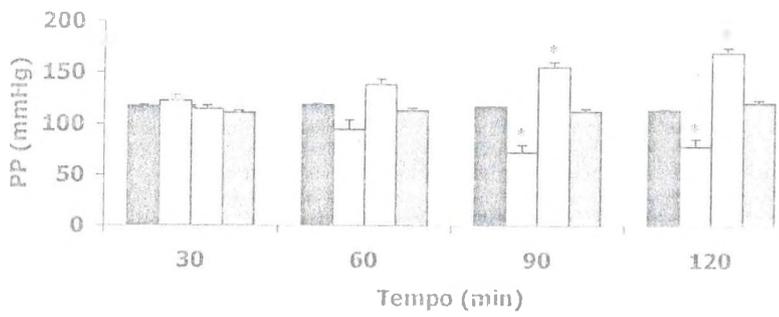
## 4. Discussion

Monteiro and Fonteles (1999) reported that *B. jararaca* venom reduced the PP, UF, GFR, sodium and potassium tubular transport in rat isolated perfused kidney. Hayt et al. (2001), used the same model to show that *B. jararacussu* venom also reduced the PP and RVR, but increased the UF and the GFR. This venom also reduced the sodium and potassium tubular transport (Hayt et al., 2001).

The renal responses to *B. moojeni* venom in the isolated kidney were similar to those seen with *B. jararacussu*. *B. moojeni* venom reduced the PP and RVR, whereas the GFR and UF were increased in the final 30 min of the experiments. There were also observed reductions in sodium, potassium and chloride tubular transport. These results suggest that the venoms of *B. moojeni* and *B. jararacussu* may contain other components that could be



amino acid sequence alignment of BmTx-II from *B. moojenii* venom with other PLA<sub>2</sub> sequences. BmTx I, myotoxin I from *B. moojenii* et al., 2000; BmTx-I and BmTx-II from the *B. jararacussu* that were sequenced by Cintra et al. (1993) and Pereira et al. (1998), by App K49 PLA<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Maraganore and Heimikson, 1993); P-Tx II K49 PLA<sub>2</sub> from the *B. pirajai* et al., 2000; VRV-PL-VIIIa (Gowda et al., 1994) and TGISOII, PLA2 from *Trimastix gramineus* (Iwagawa et al., 1993).



effects of *B. moojenii* venom (10 µg/ml), myotoxins I (5 µg/ml) and myotoxin II (5 µg/ml) on the PP of rat isolated perfused kidneys, are expressed as the mean ± SEM of six kidneys in each group. \*p = 0.05 compared to the corresponding control group for each

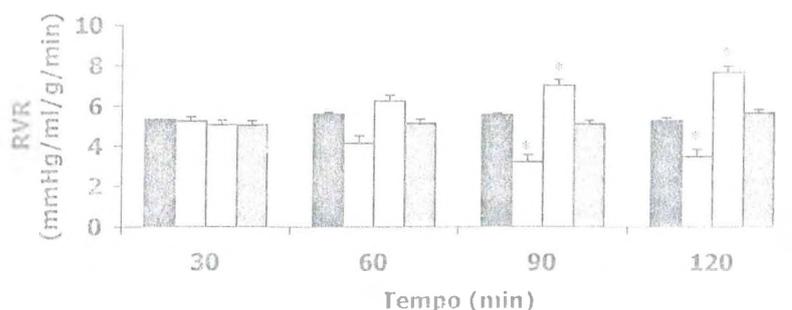


Fig. 5. The effects of *B. moojenii* venom (10  $\mu$ g/ml), myotoxins I (5  $\mu$ g/ml) and myotoxin II (5  $\mu$ g/ml) on the RVR of rat isolated perfused kidneys. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys in each group. \*  $p < 0.05$  compared to the corresponding control group for each interval.

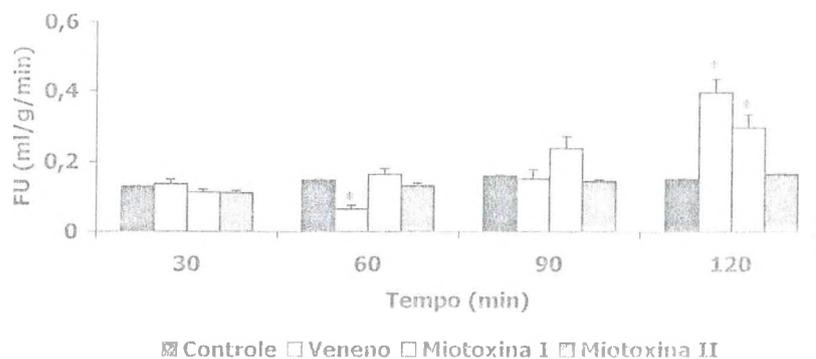


Fig. 6. The effects of *B. moojenii* venom (10  $\mu$ g/ml), myotoxins I (5  $\mu$ g/ml) and myotoxin II (5  $\mu$ g/ml) on the UF of rat isolated perfused kidneys. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys in each group. \*  $p < 0.05$  compared to the corresponding control group for each interval.

responsible for the increasing in UF and GFR despite the reduction in vascular resistance.

The primary sequence revealed conserved amino acids residues of Lys 49 PLA<sub>2</sub> myotoxins for both PLA<sub>2</sub> used in his experiments, such as Lys 7, Glu 12, Thr 13, Lys 15, Asn 6, Lys 69, Lys 71 and Lys 104. These amino acids are responsible for the myotoxicity induced by Lys 49 PLA<sub>2</sub> (Selistre de Araújo et al., 1996). Both proteins showed a

high homology in the calcium binding loop and the catalytic site to active PLA<sub>2</sub>, but in case of Bmtx-I and Bmtx-II the replacement of Asp 49 by Lys 49 was probably the most important exchange for loss of catalytic activity as also suggested in the previous report by Toyama et al. (2000).

Despite their considerable structural homology, Bmtx-I and Bmtx-II differed in their effects in the rat perfused kidney, with Bmtx-II producing only mild changes in

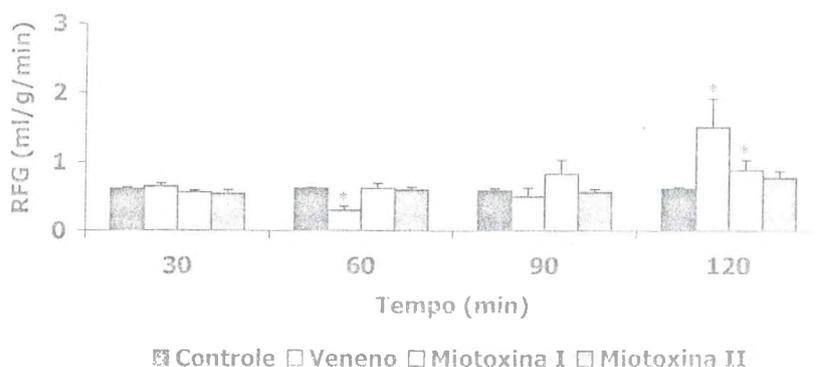


Fig. 7. The effects of *B. moojenii* venom (10  $\mu$ g/ml), myotoxins I (5  $\mu$ g/ml) and myotoxin II (5  $\mu$ g/ml) on the GFR of rat isolated perfused kidneys. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys in each group. \*  $p < 0.05$  compared to the corresponding control group for each interval.

Fig. 2. Effects of venom and myotoxins I and II on renal tubular transport of sodium, potassium and chloride in rats. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys in each group. Venom and myotoxins were added 30 min after the start of the experiment. \*  $p < 0.05$  compared to the control at each time.

Parameters	Time (min)			
	30	60	90	120
<b>Sodium</b>				
Control	81.8 $\pm$ 0.2	82.0 $\pm$ 0.1	81.2 $\pm$ 0.3	81.2 $\pm$ 0.5
Venom (10 $\mu$ g/ml)	82.1 $\pm$ 1.0	75.0 $\pm$ 2.6	62.1 $\pm$ 3.2*	55.7 $\pm$ 4.6*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	84.2 $\pm$ 0.9	78.0 $\pm$ 1.4	70.7 $\pm$ 3.1*	66.1 $\pm$ 3.2*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	80.3 $\pm$ 1.1	79.6 $\pm$ 1.2	76.2 $\pm$ 1.6	79.3 $\pm$ 1.6
<b>Potassium</b>				
Control	72.99 $\pm$ 1.01	72.79 $\pm$ 0.53	75.22 $\pm$ 1.11	76.87 $\pm$ 0.11
Venom (10 $\mu$ g/ml)	75.13 $\pm$ 1.64	69.70 $\pm$ 3.22	62.97 $\pm$ 3.31*	56.85 $\pm$ 1.12*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	72.29 $\pm$ 1.98	61.50 $\pm$ 2.31*	49.21 $\pm$ 4.67*	48.32 $\pm$ 1.30*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	73.35 $\pm$ 1.74	71.70 $\pm$ 2.09	66.61 $\pm$ 2.29*	71.61 $\pm$ 1.39
<b>Chloride</b>				
Control	79.85 $\pm$ 0.95	81.37 $\pm$ 1.87	78.15 $\pm$ 1.20	78.95 $\pm$ 1.68
Venom (10 $\mu$ g/ml)	80.67 $\pm$ 2.13	77.18 $\pm$ 5.12	65.86 $\pm$ 7.69*	58.49 $\pm$ 10.10*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	79.12 $\pm$ 3.60	71.16 $\pm$ 3.76	61.79 $\pm$ 5.53*	62.62 $\pm$ 5.86*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	77.66 $\pm$ 2.93	76.89 $\pm$ 2.57	73.80 $\pm$ 2.98	77.39 $\pm$ 2.89
<b>Sodium excretion</b>				
Control	13.68 $\pm$ 0.58	12.87 $\pm$ 0.39	14.97 $\pm$ 0.40	15.18 $\pm$ 0.37
Venom (10 $\mu$ g/ml)	11.68 $\pm$ 2.24	7.07 $\pm$ 2.53*	18.85 $\pm$ 7.93	50.15 $\pm$ 11.27*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	11.18 $\pm$ 1.61	16.16 $\pm$ 3.06	25.50 $\pm$ 6.78*	33.78 $\pm$ 7.13*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	12.31 $\pm$ 1.21	14.16 $\pm$ 0.93	15.43 $\pm$ 0.56	17.73 $\pm$ 1.71
<b>Potassium excretion</b>				
Control	0.77 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.17
Venom (10 $\mu$ g/ml)	0.69 $\pm$ 0.14	0.34 $\pm$ 0.15*	0.63 $\pm$ 0.25	1.68 $\pm$ 0.13*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	0.63 $\pm$ 0.09	0.90 $\pm$ 0.15	1.24 $\pm$ 0.21*	1.39 $\pm$ 0.22*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	0.58 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.05
<b>Chloride excretion</b>				
Control	14.65 $\pm$ 3.45	15.28 $\pm$ 3.52	15.11 $\pm$ 2.75	15.12 $\pm$ 2.61
Venom (10 $\mu$ g/ml)	11.56 $\pm$ 2.04	5.97 $\pm$ 2.19*	15.05 $\pm$ 5.11	11.75 $\pm$ 9.76*
Bmtx I (5 $\mu$ g/ml)	12.29 $\pm$ 2.42	17.81 $\pm$ 1.11	31.16 $\pm$ 9.51*	37.07 $\pm$ 9.55*
Bmtx II (5 $\mu$ g/ml)	11.02 $\pm$ 1.40	12.61 $\pm$ 0.96	13.38 $\pm$ 0.52	15.27 $\pm$ 1.07

Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of six kidneys in each group. Venom and myotoxins were added 30 min after the start of the experiment. %TNa<sup>+</sup> = percent sodium tubular transport, %TK<sup>+</sup> = percent potassium tubular transport, %TCl<sup>-</sup> = percent chloride tubular transport, E:Na<sup>+</sup> = sodium excretion, E:K<sup>+</sup> = potassium excretion and E:Cl<sup>-</sup> = chloride excretion. \*  $p < 0.05$  compared to the control at each time.

renal tubular transport in 90 min. Bmtx-I had a marked effect on renal physiology where we could find increases in renal UF, GFR and sodium, potassium and chloride excretion, but decreases in sodium, potassium and chloride transport.

Like some Lys 49 PLAs, the C-terminal lysine rich region is responsible for several toxic and cytotoxic activities as described by Arni and Ward (1996) and Gutiérrez and colleagues (1997). In primary structure of Bmtx I this C-terminal lysine rich region is highly conserved, but in the primary structure of Bmtx II this region is absent. Thus this C-terminal lysine rich region found in the Bmtx I may be plays an important role in the renal toxicity induced by this PLAs. The renal responses to Bmtx-I were very similar to those

caused by *C. d. cascavella* venom in rat isolated kidney (Martins et al., 1998). The main toxin in South American *Crotalus durissus* venoms is crotoxin, a PLA<sub>2</sub> with high enzymatic activity (Santoro et al., 1999). In contrast, both myotoxins isolated from *B. moojeni* venom had 98% sequence homology with K-49 PLA<sub>2</sub> (low enzymatic activity) and 75% homology with D-19 PLA<sub>2</sub> (high enzymatic activity).

Based on a comparison of the sequences of myotoxins and phospholipases from snake venoms, Kini and Iwanaga (1986) suggested that a cationic site associated with a hydrophobic region is responsible for myotoxicity, and independent of PLA<sub>2</sub> activity. These data showed that PLA<sub>2</sub> activity is not essential for the pharmacological action of

myotoxins. The same authors also suggested that the myotoxins, which do not present PLA<sub>2</sub> activity, could cause its damage by disorganizing lipid bilayers and consequently affecting calcium influx and promoting myonecrosis.

There were some differences between the renal effects promoted by the venom and Bmtx-I. While PP and RVR increased after administration of BmTx-I, the venom reduced these parameters. Thus, the venom probably contains other components responsible for this reduction. Bourguignon and coworkers (2000) reported that *B. moojeni*, like the venom of other species of this genus (Ferreira et al., 1970, 1992, 1998), contains bradykinin-potentiating peptides, which could have possibly contributed to the decrease in PP and RVR seen with the renal effects promoted by the whole venom.

In conclusion *B. moojeni* venom caused intense alterations in renal physiology, including a drop in RVR associated with diuresis, natriuresis and kaliuresis. Bmtx I promoted similar effects to the venom. However, RVR and PP were increased, in contrast to the effect seen for the whole venom. Bmtx-I possibly have exerted its renal effects by enhancing calcium influx explained by the mechanism described by Kini and Iwanaga (1986), but our data could not prove this possibility. Bmtx-II did not alter renal function except for a temporary decrease in potassium transport. The mild effects promoted by Bmtx-II could be explained by the lack of the C-terminal lysine rich region, but our data could not prove such affirmative. Further studies should improve our understandings of the effects promoted by *B. moojeni* and its myotoxins in the pathogenesis of the renal alterations.

## Acknowledgments

The authors thank Maria Sílvia Helena Freire França and Míngos Barreto Oliveira for technical assistance. This research was supported by CNPq, FUNCAP, FAPESP and FEP-UNICAMP.

## References

- Arnal, C.F.S., Da Silva, A., Godoy, P., Miranda, D., 1985. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23, 877–885.
- Arnal, C.F.S., Rezende, N.A., Silva, O.A., Ribeiro, M.M.F., Magalhães, R.A., Reis, R.J., Carneiro, J.G., Castro, J.R.S., 1986. Insuficiência renal aguda secundária a acidente ofídico botrópico e crofálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 28, 220–227.
- Barrett, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A<sub>2</sub>: a structural review. *Toxicon* 34, 827–841.
- Bourguignon, B., Lantente, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Meira, J., 1995. Acute phase reactions including cytokins in patients bitten by *Bothrops* spp. and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom Anim. Toxins* 1, 11–22.
- Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A.R., Cruz-Hölling, M.A., 1999. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 698–706.
- Bourguignon, S.C., Passo, F.S. Jr., Calheiros, F.B., Juliano, M., Aguiar, A.S., Melgarejo, A.R., Giovanni De Simone, S., 2000. *Bothrops moojeni* venom peptides containing bradykinin-potentiating peptides sequence. *Protein Pept. Lett.* 8, 21–26.
- Bowman, R.H., 1970. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* 245, 1601–1612.
- Cho, W., Kézdy, F.J., 1991. Chromogenic substrates and assay of phospholipase A<sub>2</sub>. *Meth. Enzymol.* 197, 75–79.
- Cintra, A.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R., 1993. Bothropstoxin I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* 12 (1), 57–61.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J., 1970. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9, 2583–2594.
- Ferreira, L.A.B., Henriques, O.P., Lebrun, I., Barista, M.B.C., Prezoto, B.C., Andreoni, A.S.S., Zelnik, R., Habermehl, G., 1992. A new bradykinin potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacussu) (tapiete, unutu dourado). *Toxicon* 30, 33–40.
- Ferreira, L.A., Galle, A., Ráida, M., Schrader, M., Lebrun, I., Habermehl, G., 1998. Isolation, analysis and properties of three bradykinin potentiating peptides (BPP II, BPP III and BPP V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.* 17, 285–289.
- Fonteles, M.C., Cohen, J.L., Black, A.J., Wertheim, S.J., 1983. Support of kidney function by long fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244, 235–246.
- Fugawa, T., Nose, T., Shimohigashi, Y., Ogiwara, T., Nakajima, K., Chang, C.C., Ohno, M., 1993. Purification, sequencing and characterization of single amino acid substituted phospholipase A<sub>2</sub> isozymes from *Timonius gambucus* (green habu snake) venom. *Toxicon* 31 (8), 957–967.
- Gowda, V.L., Schmidt, J., Middlebrook, J.L., 1991. Primary sequence determination of the most basic myonecrotic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Viperia russelli*. *Toxicon* 32 (6), 665–673.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1421.
- Havt, A., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.V., 2001. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PM-1. *Toxicon* 39 (12), 1811–1816.
- Holzer, M., Mackessy, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon* 35, 1149–1153.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986. Structure–function relationship of phospholipase B: Charge density distribution and the myotoxicity of pre-synaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24 (9), 895–905.
- Koepfen, B.M., Stanton, B.A., 1997. Glomerular filtration and renal blood flow. In: Koepfen, B.M., Stanton, B.A. (Eds.), *Renal Physiology*, 2nd ed. Mosby, St Louis, pp. 31–35, Chapter 3.
- Marangoni, J.M., Heimikson, R.J., 1993. The lysine D phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Aekistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 268 (8), 6061.
- Marangoni, S., Foyama, M.H., Arantes, J.C., Giglio, J.R., da Silva, C.A., Carneiro, E.M., Gonçalves, A.A., Oliveira, B., 1995.

- no acid sequence of TsTX-V, an  $\alpha$ -toxin from *Tityus datus* scorpion venom, and its effect on  $E^+$  permeability of cells from isolated rat islets of Langerhans. *Biochem. Biophys. Acta* 1243, 309–314.
- z-Maldonado, M., Opava-Stitzer, S., 1978. Free water reabsorption curves during saline, mannitol, glucose and urea. *Physiol.* 280, 487–497.
- Almeida, A.M.C., Monteiro, H.S.A., Junior, E.O.G., Menezes, D.B., Fonteles, M.C., 1998. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36, 1441–1450.
- Almeida, A.M.C., Monteiro, H.S.A., Fonteles, M.C., 1999. The effect of *Bothrops roraimae* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. *Pharmacol. Toxicol.* 85, 198–200.
- Almeida, A.M.C., Novello, J.C., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Landucci, L., Oliveira, B., Marangoni, S., 1998. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçú) venom with low phospholipase A2 activity. *J. Protein Chem.* 17 (4), 381–386.
- Almeida, A.M.C., Bidault, J., Burtin, C., Glubery, M.C., Benveniste, J., 1994. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, vasoactive amines from isolated rat kidney. *Kidney Int.* 25, 404–410.
- Almeida, A.M.C., Fonteles, M.C., 1989. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. J. Biol. Res.* 22, 407–416.
- Almeida, A.M.C., Fonteles, M.C., Sousa-e-Silva, M.C.C., Gonçalves, J.R.C., Almeida-Filho, S.M., Cardoso, D.F., Laporta-Ferreira, I.L., Saiki, M., Fonteles, C.A., Sano-Martins, I.S., 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 61–73.
- Selistre de Araújo, H.S., White, S.P., Ownby, C.L., 1996. Sequence analysis of Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins: a highly conserved class of protein. *Toxicon* 34, 1237–1242.
- Soares, A.M., Andrião-Fescaro, S.H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Marangoni, S., Toyama, M.H., Arni, R.K., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (Caiçassa) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373 (1), 7–15.
- Toyama, M.H., Mancuso, L.R., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira, B., Marangoni, S., 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins I and II: two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal sequence. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 1047–1055.
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R., Marangoni, S., 1998. The amino acid sequence of piratoxin I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J. Protein Chem.* 17, 713–718.
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R., Marangoni, S., 2000. Amino acid sequence of piratoxin II, a myotoxic Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochimie* 82 (3), 245–250.
- Wessler, M., Davidson, D.G., Orloff, J., 1955. The renal clearance of alkali stable inulin. *J. Clin. Invest.* 34, 1520–1523.