

200. 241117:31132
P.13061992,75 145, 100 B 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

Epidemiologia dos acidentes causados por
Thalassophryne nattereri (niquim) no Estado do
Ceará e Estudo dos efeitos do veneno em rim isolado

PATRÍCIA EMÍLIA GOMES FACÓ

7
615.945
81272

Fortaleza-Ceará
2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**Epidemiologia dos acidentes causados por
Thalassophryne nattereri (niquim) no Estado do
Ceará e Estudo dos efeitos do veneno em rim isolado**

Patrícia Emília Gomes Facó

**Dissertação apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Patologia,
área de concentração em Patologia
Tropical como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia.**

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

Fortaleza-Ceará
2003

Facó, Patrícia Emília Gomes

Epidemiologia dos acidentes causados por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará e Estudo dos efeitos do veneno em rim isolado

Patrícia Emília Gomes Facó.- Fortaleza, 2003.

121f.:il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Patologia e Medicina Legal.

1.Niquim 2. *Thalassophryne nattereri* 3.Veneno de peixe 4. Perfusão renal

1.Título

CDC

.....

Epidemiologia dos acidentes causados por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará e estudo dos efeitos do veneno em rim isolado

Patrícia Emília Gomes Facó

Aprovada em 15.05.2003

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Helena Serra Azui Monteiro (Orientadora)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina
Presidente

Dra. Mônica Lopes Ferreira (Co-orientadora)
Laboratório de Imunopatologia
Instituto Butantan

Prof. Dalgimar Beserra de Menezes
Departamento de Patologia e Medicina Legal-UFC
Livre docente - UECE

Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins
Departamento de Análises Clínicas da UFC

Este trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisas Clínicas da
Universidade Federal do Ceará, com recursos desta unidade e
com o apoio financeiro da FUNCAP, FAPESP e CNPq

**“De que são feitos os dias?
- De pequenos desejos,
vagarosas saudades,
silenciosas lembranças.**

**Entre mágoas sombrias,
momentâneos lampejos:
vagas felicidades,
inatuais esperanças.**

**De loucuras, de crimes,
De pecados, de glórias,
- do medo que encadeia
todas essas mudanças.**

**Dentro dele vivemos,
dentro dele choramos,
em duros desenlaces
e em sinistras alianças...”**

(Cecilia Meireles)

Aos meus pais, Manoel e Valquíria, pelo amor, dedicação e exemplos de vida.

Aos meus avós, Iracema (In memorian) e João, pela paciência, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, pela amizade e convivência.

Ao meu esposo, pelo amor e companheirismo.

As minhas filhas, Ingrid e Luíze.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

que sempre esteve ao meu lado.

À Professora Helena Serra Azul Monteiro,

pelas orientações, confiança, amizade e por possibilitar o meu crescimento científico.

À Dra. Mônica Lopes Ferreira,

pela sua valiosa colaboração e disponibilidade para realização deste trabalho, com quem aprendi que ... se depende sempre de tanta muita diferente gente...

Ao professor Dalgimar Beserra de Menezes,

pela realização e orientação do estudo histológico, e pelo privilégio de poder compartilhar os seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Talapala Govindaswamy Naidu,

pela sua dedicada e incansável atuação junto à Coordenação do Mestrado em Patologia, e por me apresentar a imunopatologia.

Ao amigo Dr. Alexandre Havt Bindá,

que me apresentou e indicou para a Dra. Helena, pela imensurável contribuição para realização deste trabalho em todas as suas etapas.

Ao amigo e estudante de doutorado Paulo Sérgio Ferreira Barbosa,

pela sua colaboração na fase experimental e amizade.

À aluna de Medicina e bolsista Glaydcianne P. Bezerra,

pela pesquisa dos dados epidemiológicos apresentados neste trabalho.

À todos os bolsistas e funcionários do Laboratório de Farmacologia Clínica que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

À técnica de laboratório Maria Sílvia Helena Freire França,

cujos suporte técnico foi de fundamental importância.

Ao Farmacêutico-bioquímico Domingos Barreto de Oliveira,

pela execução dos ensaios bioquímicos.

À secretária Paula de Paz Palácio,
pela colaboração no período da pós-graduação.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Patologia e
Medicina Legal (DPML),
que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento
científico.

À FUNCAP,
pelo apoio financeiro

Enfim,
a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução
desta dissertação.

ÍNDICE

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Aspectos gerais sobre os animais marinhos venenosos e peçonhentos	1
1.2. Classificação taxonômica	2
1.3. O <i>Thalassophyine nattereri</i> ou Niquim	6
1.4. Epidemiologia	16
1.5. Tratamento	18
1.6. O Sistema renal	19
1.6.1. Características gerais	19
1.6.2. Morfologia renal	20
1.6.3. Alterações renais causadas por venenos	22
1.7. Importância e justificativa	25
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivos gerais	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Coleta de dados para o estudo epidemiológico	30
3.2. Animais experimentais para avaliar as alterações renais	30
3.3. Divisão dos Grupos de Animais	31
3.4. O Veneno	31
3.5. Substâncias utilizadas	32
3.6. Solução de perfusora e seu preparo	33
3.7. O sistema de perfusão renal	34
3.8. Preparo do sistema	38
3.9. Técnica cirúrgica	41
3.10. Protocolo experimental	43
3.11. Avaliação bioquímica	43
3.12. Histologia	44
3.13. Cálculo dos parâmetros renais	45
3.14. Estatística	47
4. RESULTADOS	
4.1. Resultados epidemiológicos	49
4.2. Estudo dos parâmetros funcionais renais	55

4.2.1. Avaliação do Grupo controle em rim isolado de rato	55
4.2.2. Avaliação do efeito do veneno do Niquim (<i>Thalassophryne nattereri</i>) em rim isolado nas concentrações de 0,3µg/mL , 1µg/mL e 3 µg/mL.	55
4.3. Avaliação histológica	86
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	101
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

Lista de Figuras

Figura 01 – Fotografia de um exemplar de <i>T. nattereri</i>	10
Figura 02 –Aparelho inoculador do veneno de <i>T. nattereri</i>	11
Figura 03 – Locais onde o <i>T. nattereri</i> é encontrado	12
Figura 04 – Desenho ilustrativo da perfuração do tegumento e da liberação do veneno p pressão do tecido glandular.	14
Figura 05 – Acidentes provocados pelo <i>T. nattereri</i>	14
Figura 06 –Formas de ocorrência dos acidentes pelo <i>T. nattereri</i>	15
Figura 07 –Animal experimental	31
Figura 08 –Esquema do Sistema de Perfusão de Rim Isolado	37
Figura 09 –Fotos do Sistema de Perfusão de Rim Isolado	38
Figura 10 – Gráfico de Calibração Fluxômetro x Velocidade da bomba	39
Figura 11 – Gráfico de Calibração Fluxo x velocidade da bomba	40
Figura 12 – Gráfico de Calibração Pressão de perfusão x velocidade da bomba	40
Figura 13 – Técnica cirúrgica	42
Figura 14 – Procedência dos casos de envenenamento por <i>T. nattereri</i>	50
Figura 15 – Sexo do Acidentado no Envenenamento por <i>T. nattereri</i>	51
Figura 16 – Faixa Etária do Acidentado no Envenenamento por <i>T. nattereri</i>	52
Figura 17 – Evolução Clínica do Acidentado no Envenenamento por <i>T. nattereri</i>	53
Figura 18 – Pressão de perfusão (mmHg) na ausência (n=6) e presença (n=6) do veneno do <i>Thalassophryne nattereri</i> nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/ML.	59
Figura 19 – Resistência vascular renal (mmHg/ml.g ⁻¹ .min ⁻¹) na ausência (n=6) e na	61

presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL ,
1 µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 20 – Fluxo urinário (mL.g⁻¹.min⁻¹) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do 63
veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL

Figura 21 – Ritmo de filtração glomerular (mL.g⁻¹.min⁻¹) na ausência (n=6) e na 65
presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3
µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.

Figura 22 – Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (n=6) e na 67
presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de
0,3µg/mL, 1µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 23 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência 69
(n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de
0,3µg/mL , 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 24 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (n=6) e 71
na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3
µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 25 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) na 73
ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas
concentrações de 0,3µg/mL , 1µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 26 – Percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻) na ausência (n=6) e na 75
presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de
0,3µg/mL , 1µg/mL e 3 µg/mL.

Figura 27 – Percentual de transporte tubular proximal de cloro (%pTCl⁻) na ausência 77
(n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de
0,3µg/mL , 1 µg/mL, 3 µg/mL.

Figura 28 – Sódio excretado (µEq.g⁻¹.min⁻¹) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do 79
veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1µg/mL e 3
µg/mL.

Figura 29 – Potássio excretado (µEq.g⁻¹.min⁻¹) na ausência (n=6) e na presença (n=6) 81
do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1 µg/mL e 3
µg/mL.

Figura 30 – Cloro excretado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do <i>Thalassophryne nattereri</i> nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.	83
Figura 31 – Clearance osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do <i>Thalassophryne nattereri</i> nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.	85
Figura 32 – Avaliação histológica de rins perfundidos somente com solução de Krebs Henseleit modificada (controle), mostrando uma pequena quantidade de material protéico nos túbulos renais.	87
Figura 33 – Avaliação histológica dos rins perfundidos com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando uma moderada quantidade de material protéico no espaço urinário e túbulos renais. (x 40)	88
Figura 34 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos túbulos renais. (x 100)	89
Figura 35 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos glomérulos. (x 100)	90
Figura 36 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos glomérulos. (x 200)	91
Figura 37 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando um depósito moderado de material protéico no espaço urinário e túbulos renais. (x 40)	92
Figura 38 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos renais (cilindros eosinofílicos). (x 100)	93
Figura 39 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos e glomérulos (x 100)	94
Figura 40 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i> mostrando um glomérulo com depósito de material protéico. (x 100)	95
Figura 41 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de <i>T. nattereri</i>	96

nattereri mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos renais e espaço urinário. (x 40)

Figura 42 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno de *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos renais . (x 100) 97

Figura 43 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno de *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos glomérulos e túbulos renais . (x 100) 98

Figura 44 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno de *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos glomérulos e túbulos renais . (x 200) 99

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Animais marinhos que causam óbitos humanos	5
Tabela 02 – Números e % dos acidentes por <i>T. nattereri</i> segundo o intervalo de tempo entre o atendimento e o acidente	54
Tabela 03 – Pressão de Perfusão Renal (mmHg) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	58
Tabela 04 – Resistência Vascular Renal (mmHg/ml.g ⁻¹ .min ¹) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	60
Tabela 05 – Fluxo Urinário (ml.g ⁻¹ .min ¹) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	62
Tabela 06 – Ritmo de Filtração Glomerular (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	64
Tabela 07 – Percentual do Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	66
Tabela 08 – Percentual do Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	68
Tabela 09 – Percentual do Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	70
Tabela 10 – Percentual do Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	72
Tabela 11 – Percentual do Transporte Tubular Cloro (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.	74
Tabela 12 – Percentual do Transporte Tubular Proximal de Cloro (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe <i>T. nattereri</i> nas	76

concentrações de 0,3µg/mL, 1 µg/mL e 3µg/mL.

Tabela 13 – Excreção de Sódio ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL. 78

Tabela 14 – Excreção de Potássio ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL. 80

Tabela 15 – Excreção de Cloro ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL. 82

Tabela 16 - Clearance Osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL. 84

Lista de Abreviaturas

- Al_2SO_4 - Sulfato de Alumínio
- C – centígrados
- Ca^{++} - íon cálcio
- CaCl_2 - Cloreto de cálcio
- Cm – centímetros
- C.I.D. – coagulação intravascular disseminada
- CO_2 - Dióxido de carbono
- Cosm – Clearance osmótico
- FU – Fluxo urinário
- g – grama
- h – hora
- H.E. – Hematoxilina e Eosina
- IP – intraperitoneal
- I.R.A – insuficiência renal aguda
- i.v – intravenosa
- KCl – Cloreto de potássio
- Kg – quilograma
- l – litro
- Mm-milimolar
- MKHS – solução de Krebs-Henseleit modificada
- MgSO_4 - Sulfato de magnésio
- Mg – miligrama
- min. – minuto
- ml – mililitro
- μl – microlitro
- μm – micrometro
- N – Normal
- NaCl – Cloreto de sódio
- NaHCO_3 - bicarbonato de sódio
- NaH_2PO_4 – fosfato de sódio

O₂ - oxigênio

PP - pressão de perfusão

RFG - ritmo de filtração glomerular

Rpm - rotações por minuto

RVR- resistência vascular renal

%TNa⁺ - percentual de transporte tubular de sódio

%TK⁺ - percentual de transporte tubular de potássio

%TCI⁻ - percentual de transporte tubular de cloro

%pTNa⁺ - percentual de transporte tubular proximal de sódio

%pTK⁺ - percentual de transporte tubular proximal de potássio

%pTCI⁻ - percentual de transporte tubular proximal de cloro

%ENa⁺ - excreção de sódio

%EK⁺ - excreção de potássio

%ECI⁻ - excreção de cloro

T. nattereri - Thalassophryne nattereri



RESUMO

Epidemiologia dos acidentes causados por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará e Estudo dos efeitos do veneno em rim isolado

Patrícia Emília Gomes Facó, Dissertação de Mestrado, UFC, 2003.
Orientadora: Helena Serra Azul Monteiro
Mestrado em Patologia – Departamento de Patologia e Medicina Legal

O acidente causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* é responsável por um severo quadro de dor, edema e necrose no local da lesão. Representa um sério problema médico, econômico e social para a região nordeste do Brasil. Este veneno é pouco estudado e até o momento, não existe uma terapia específica para os acidentes causados por este peixe. Os objetivos deste trabalho foram analisar aspectos epidemiológicos dos acidentes causados pelo niquim no estado do Ceará no período de 1992 a 2002, bem como avaliar os efeitos renais, através da dosagem de alguns parâmetros séricos relacionados à função renal e análise histológica desse órgão. Foram registrados pelo Centro de Assistência Toxicológica do Ceará – CEATOX, 16 casos de envenenamento pelo *T. nattereri* no litoral do Ceará, no período de 1992 a 2002. A maioria dos acidentes (87,5%) ocorreu em praias da região metropolitana de Fortaleza, com apenas 12,5% dos casos tendo ocorrido em praias do interior. Com relação ao sexo, 15 (94%) eram do sexo masculino e 1(6%) do sexo feminino. Com relação a idade, 12 pacientes (75%) estavam na faixa etária de 21 a 40 anos, 3 (19%) tinham entre 41 e 60 anos e 1 (6%) estava na faixa de 1 a 10 anos. O tempo de exposição foi de 1 a 5 horas (4 pacientes), 6 a 12 (3 pacientes) e mais de 12 horas (4 pacientes) e 5 pacientes não conseguiram informar o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento. As manifestações clínicas mais comuns foram dor e edema local. Observou-se também isquemia, paralisia local, equimose e sensação de queimação na pele. O tratamento consistiu de anti-inflamatórios e analgésicos. Em alguns casos, foram utilizados anestésicos, água morna, lavagem cirúrgica e anti-histamínicos. Em 12 casos (75%) observou-se cura confirmada e em 2 (12%) cura não confirmada. Em dois casos a evolução foi ignorada. Acredita-se que número de acidentes ocorridos seja maior do que o encontrado devido a subnotificação. Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 220 a 270g, divididos em quatro grupos (n=6). Após a anestesia dos animais com pentobarbital sódico (50mg/Kg), o ureter direito foi canulado assim como a artéria mesentérica superior sem a interrupção do fluxo vascular. Os experimentos tiveram duração de 120 minutos a e cada intervalo de 10 minutos, amostras de urina e de perfusato foram coletadas para a

determinação dos níveis de inulina, sódio, potássio, cloro e osmolaridade. Foram empregadas doses de 0,3µg/ml , 1µg/ml e 3µg/ml de veneno liofilizado do peixe *Thalassophryne nattereri* para a avaliação da pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU), percentuais do transporte tubular de sódio, potássio e cloro (%TNa⁺ , %TK⁺ , %TCl⁻), percentuais do transporte tubular proximal de sódio, potássio e cloro (%pTNa⁺ , %pTK⁺ , %pTCl⁻), excreções de sódio, potássio e cloro (ENa⁺, EK⁺ e ECl⁻) e o clearance osmótico (Cosm). Observou-se um aumento significativo (p<0,05) nos parâmetros PP e RVR nas três concentrações utilizadas. Houve um aumento significativo no RFG , FU, ENa⁺, EK⁺ e Cosm nas doses de 0,3 e 1µg/ml nos tempos de 90 e 120 minutos. A dose de 3µg/ml causou uma redução significativa nos parâmetros RFG, FU, % TNa⁺, % TK⁺, % TCl⁻, %pTNa⁺, %pTCl⁻ aos 90 e 120 minutos, ocorrendo o mesmo fenômeno para este último parâmetro no tempo de 60 minutos nas doses de 0,3 e 3µg/ml. A dose de 1µg/ml causou um aumento significativo no ECl⁻ a partir dos 90 minutos, e no %pTK⁺ e ENa⁺ no tempo de 120 minutos. Os parâmetros % pTK⁺, EK⁺ e ECl⁻ sofreram uma redução significativa aos 90 minutos na dose de 3µg/ml. Foram observados cilindros eosinofílicos nos túbulos renais e material protéico no espaço urinário, não foi observado qualquer anormalidade a nível de vasos e interstício. Concluímos que o veneno do *T. nattereri* alterou a fisiologia renal no modelo de rim isolado, interferindo principalmente nos parâmetros vasculares. Os efeitos observados provavelmente foram promovidos por agentes miotóxicos ou por uma ação do veneno nas células renais causando a liberação de fatores vasoativos que poderiam aumentar a PP e a RVR e causar uma diminuição no transporte de eletrólitos em altas concentrações de veneno.

Abstract

The accident caused by the fish *T. nattereri* is responsible for a severe clinical picture of pain, edema and necrosis at the site of the lesion. It Represents a serious medical, economic and social problem in the Northeast of Brazil. Its venom is poorly studied and at this moment, there is no specific treatment for the accidents caused by this fish. The objectives of this work were to analyze the epidemiological aspects of the accidents caused by niquim in the Ceara state in the period 1992 to 2002 and also evaluate the renal effects through the dosage of sequence parameters related with the renal physiology and histological analysis of that organ. In the period of 1992 to 2002, 16 cases of envenomation by *T. nattereri* occurred in the seaside of Ceara and were registered at CEATOX- Toxicological Assistance Center in this state. The majority of the accidents (87,5%) happened on the beaches of Fortaleza, and only 12,5% occurred out of town. Men (94%) predominated over women, with ages (75%) between 21 to 40 years and 19% were 41 to 60 years old. The time medical assistance from the accident varied from 1 to 5 hours (4 cases), from 6 to 12 hours (3 cases), above 12 hours in 4 cases and 5 patients didn't know inform the time between the accident and the medical assistance. The clinical picture more frequent was pain, edema and also ischemia, local paralysis, echymoses and burned skin sensation. Anti-inflammatory and analgesic drugs were used. In some cases, were used anesthetic, hot water, surgery wash and anti-histaminic. In 75% of cases cure was confirmed and 12% cure was not confirmed. Probably the number of the accidents is higher than it was found because the information system is not efficient. We used Wistar rats, weighing 220 a 270g, divided into 4 groups of 6 animals each. After the animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (50mg/Kg), and right ureter was cannulated like as the upper mesenteric artery, without interruption of the vascular flow. The experiments lasted for 120 minutes and samples of urine and perfusate were colleted every 10 minutes for further biological analysis of inulin, sodium, potassium, chloride and osmolality. We tested three different doses (0,3µg/ml , 1µg/ml and 3µg/ml) of *T. nattereri* fish venom for the evaluate of perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR), urinary flow (UF), sodium, potassium, and chloride tubular transport percentage (%TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻), sodium, potassium, and chloride proximal tubular transport percentage (%pTNa⁺, %pTK⁺, %pTCl⁻), sodium, potassium and chloride excretion (ENa⁺, EK⁺, ECl⁻) and osmotic clearance (Cosm). We observed a significant increase (p<0,05) in the parameters of PP and RVR in all three concentrations used. There is a statistic growth in the GFR, UF, ENa⁺, EK⁺ e Cosm using 0,3 and 1µg/ml at 90 and 120 minutes. The dose of 3µg/ml caused a significant

decrease in the GRF, UF, %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻, %pTNa⁺, %pTCl⁻, at 90 and 120 minutes, happening the same for this last parameter at 60 minutes in the doses of 0,3 and 3µg/ml. We found a significant increase in the ECl⁻ at the 90 minutes, and the %pTK⁺ and ENa⁺ at the 120 minutes. The %pTK⁺, EK⁺ and ECl⁻ diminished after 90 minutes in the dose of 3µg/ml. Even though we found eosinophilic casts in the renal tubules and proteinaceous material in the urinary space no abnormalities were seen in the renal vessels. We conclude that the *T. nattereri* venom altered the renal physiology in the isolated kidney model interfering especially in the vascular parameters. The effects observed, probably were promoted by myotoxic agents or for the venom action in the renal cells causing the release of vasoactive factors that could increase perfusion pressure and renal vascular resistance and decreases of electrolytes transport in higher doses.

1.1. Aspectos gerais sobre os animais marinhos venenosos e peçonhentos

Acidentes humanos com animais marinhos venenosos e peçonhentos datam da Antigüidade, mas o estudo científico ainda é negligenciado. Os animais são encontrados em maior quantidade e variedade nas águas quentes tropicais e subtropicais, as quais atraem as atividades humanas, principalmente das comunidades que dependem dos mares para obter o alimento ou como fonte de lazer (Lopes-Ferreira, 2000).

Sabe-se que o acidente humano por criaturas marinhas peçonhentas ocorre devido à interferência do homem de forma acidental ou intencional com o animal ou com o seu território. Nos últimos anos, toxinas como as de animais marinhos passaram também a ser estudadas, uma vez que a frequência e a gravidade dos acidentes geram importantes problemas de ordem médica, social e econômica (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998).

Uma grande quantidade de metabólitos é produzida pelos organismos marinhos, e suas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas, constituídas por moléculas simples como aminas ou moléculas mais complexas como esteróides, alcalóides, peptídeos ou proteínas. Para os organismos marinhos, a produção e composição de toxinas são fundamentais para a sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Porém, pouco se sabe sobre o papel destas toxinas complexas interações entre os organismos marinhos. Esta é uma área de

pesquisa ainda pouco explorada. Quase nada se conhece sobre o significado biológico e sobre a natureza química e farmacológica das toxinas marinhas (Lopes-Ferreira, 2000).

1.2. Classificação Taxonômica

Peixes venenosos ou **sarcotóxicos** são aqueles que possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos ou adquirem suas toxinas através da cadeia trófica, alimentando-se de organismos venenosos primários. Uma vez ingeridos, causam acidentes por ter toxinas na pele, músculos, vísceras e gônadas. As intoxicações mais encontradas são do tipo *tetrodontóxico*, *ciguatóxico* e *escombrótico* (Brasil, 1998).

O acidente tetrodontóxico é causado por peixes da família *Tetraodontidae*, popularmente conhecidos por baiacus (*Colomesus psittacus*, *Lagocephalus laevigatus*, *Diodon hystrix*, etc.), estes produzem a forma mais grave de envenenamento (Brasil, 1998).

Acidentes ciguatóxicos, também chamados ciguatera, representam a forma mais comum de envenenamento nos mares tropicais (Frenette & Maclean, 1988; Williamson, 1990), e são causados por mais de 300 espécies de peixes marinhos, entre outras, garoupa (*Cephalopholis argus*), barracuda (*Sphyraena barracuda*) e bicuda (*Sphyraena picudilla*). Todos comestíveis, estes peixes tornam-se tóxicos após a ingestão de diferentes fitoplânctons encontrados no mar, denominados dinoflagelados (Williamson, 1990).

O acidente escombrótico ou escombrotóxico é a forma de intoxicação onde ocorre a formação de uma toxina resultante da ação bacteriana, quando o peixe comestível é conservado em condições inadequadas. Nesse caso ocorre a formação da saurina, toxina com características semelhantes às da histamina (Williamson, 1992; Schvartsman, 1985).

As manifestações clínicas nas intoxicações denominadas tetrodontóxicas e ciguatóxicas são gastrointestinais (náuseas, dor abdominal, vômitos e diarreia) e neurológicas (Lopes & Argento, 1984). A sintomatologia neurológica aparece no início do quadro clínico, com sensação de formigamento na face, dedos das mãos e pés, fraqueza muscular, mialgias, vertigens, insônia, dificuldade de locomoção e distúrbios visuais. Com o agravamento das manifestações nervosas, aparecem convulsões, dispnéia, parada respiratória e morte, que pode ocorrer nas primeiras 24 horas. A recuperação clínica do envenenamento pode se estender de semanas a meses.

Não existe um tratamento específico para os acidentes causados por peixes sarcotóxicos e, na inexistência de um antídoto, o tratamento dos sintomas se constitui em lavagem gástrica e no emprego de laxantes. A insuficiência respiratória e o choque são tratados por métodos convencionais. No acidente escombrótico é benéfico o uso de anti-histamínicos do tipo prometazina (Williamson, 1990).

Peixes peçonhentos ou **acantotóxicos** são aqueles que possuem glândulas cutâneas especializadas, associadas a ductos excretores. Nestes

animais, o aparelho inoculador pode apresentar-se incompleto ou estar ausente. Em contraste, os animais predadores são dotados de estruturas inoculadoras das peçonhas empregadas, principalmente, na captura de presas para alimentação. Todos os envenenamentos são resultados de uma resposta defensiva dos animais à interferência intencional ou acidental de humanos. A maioria dos envenenamentos acontece na região dos pés ou das mãos (Williamson, 1992).

Os venenos dos peixes peçonhentos apresentam propriedades farmacológicas e químicas notadamente diferentes das toxinas de outros animais. Isso porque a investigação se torna difícil em parte pela instabilidade das toxinas que, em muitas espécies, devem ser armazenadas a temperaturas abaixo de 20°C (Maretic, 1988). O estudo de venenos de peixes também é dificultado pela composição química peculiar dessas toxinas, que podem variar de uma espécie para outra, entre indivíduos de uma mesma espécie e até em um mesmo animal, dependendo da estação do ano (Maretic, 1988).

Na maior parte dos casos de envenenamento, o acidente ocorre através de ferimento por peixes que possuem aparelho traumatizante (peixes peçonhentos propriamente ditos). Estes se encontram principalmente na Classe Chondrichthyes, ordem *Rajiformes* (arraias) e na Classe Osteichthyes, nas famílias *Trachinidae*, *Scorpaenidae* e *Batrachoididae*.

Tabela 01 - Animais marinhos que causam óbitos humanos

I. Por Peçonhas

A. Invertebrados

1. Água-viva (*Chironex fleckeri*, *Chiropsolmus quadrigatus*)
2. Polvos de manchas aneladas azuis (Família Octopodidae)
3. Centáureas azuis (*Physalia* ssp.- apenas Oceano Atlântico)
4. Moluscos peçonhentos (Família Conidae)

B. Vertebrados

1. Cobras marinhas peçonhentas (Família Hydrophidae)
2. Peixes-escorpião, incluindo peixes-pedra (Família Scorpaenidae)
3. Arraias-lixá (Ordem Rajiformes)
4. Peixes-gato (Subordem Siluroidei)

II. Por Venenos

A. Peixes ciguatóxicos

B. Peixes tetrodontóxicos

C. Mariscos

D. Tartarugas marinhas

E. Vísceras de baleias, porcos-marinhos, ursos polares, morsas e focas

Fonte: Williamson, J., 1990

Os acidentes humanos provocados por peixes marinhos ou fluviais são denominados de ictismo.

Atualmente os trabalhos realizados com animais marinhos de importância médica, procuram, principalmente, descrever o aparelho traumatizante e a ação das toxinas e suas conseqüências no organismo do acidentado. Dentre os animais marinhos que mais têm sido estudados podemos citar: **Peixes** (destacando-se as famílias *Tetradontidae*, *Scorpaenidae*, *Batrachoididae*, *Dasyatidae* e *Ariidae*); **Cnidários** (medusas ou águas vivas, caravelas, corais e anêmonas); **Poríferos** (esponjas);

Equinodermos (ouriços-do-mar, as estrelas e as holotúrias ou “pepinos-do-mar”) e **Moluscos** (caramujos) (Williamson, 1990).

Os *Batrachoididae*, também conhecidos como “tobadfishes” (peixes-sapo), são peixes que habitam as águas da costa da América, Europa, África e Índia. Possuem pouco valor comercial, embora em alguns países sejam considerados como alimento. São animais marinhos ou fluviais, podendo ser encontrados em estuários, mas preferindo viver em águas turvas. Possuem um dos mais perfeitos aparatos de veneno, dentre todas as famílias de peixes venenosos, com glândulas de veneno conectadas a espinhos dorsais como descreveu Collette (1966). Embora a sistemática de identificação desses animais seja bastante discutida, encontram-se classificadas 15 espécies. Destas, pelo menos quatro são encontradas no Brasil: *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazônica* (Lopes-Ferreira, 2000).

1.3. O *Thalassophryne nattereri* ou Niquim

No Brasil, os trabalhos pioneiros com os *Batrachoididae* foram realizados por Fróes (1932, 1933). Nestes trabalhos, foram descritos o habitat e hábitos, a maneira pela qual o veneno é expelido e a correta identificação das espécies. Os primeiros trabalhos realizados com o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* estão descritos em três experiências realizadas:

Exp. I (Realizada em 24.11.1933 às 18 h. 30)

“Retirado um dos peixes do recipiente que os continha desde as 10 horas da manhã, quando haviam sido capturados, e postos o ventre (previamente raspado) de uma cobaia em contato com o dorso do niquim, não tardou que este reagisse de maneira habitual eriçando os acúleos vulnerantes; logo que sentimos o estremecimento provocado por essa reação, retiramos a cobaia e em vão buscamos encontrar o ponto correspondente a penetração do acúleo (ou dos acúleos) através da pele do ventre do animal de laboratório, atribuindo a dificuldade de determiná-lo com segurança ao fato de ter sido porventura parcial a penetração do instrumento vulnerante.

A cobaia ficou um pouco triste e pouco depois recusava alimentar-se, parecendo mais tarde com tendência a retomar os hábitos normais; isso nos fez pensar na possibilidade de não haver sido possivelmente alcançada pelo acúleo do niquim! No postrídio, porém, a parte do ventre previamente raspada apresentava uma mancha esverdeada e a parede abdominal parecia infiltrada; o animal mostrava-se triste e indiferente, permanecendo durante muito tempo na mesma posição em que o colocávamos. 36 horas após a inoculação manifestava-se paralisia progressiva dos membros posteriores e o ventre chegava a tocar o solo, tão infiltrado estava! Seis horas mais tarde já o animalzinho não conseguia mais mudar de posição e assim permaneceu inerte, até as 2 horas e 30 min (44 horas a contar da inoculação) quando entrou em rápida agonia. Toda a região em torno do ponto de inoculação continuava esverdeada e edemaciada, e os olhos tinham permanecido abertos, notando-se midríase – fenômeno este que também havíamos verificado no momento da inoculação (isto é, logo que o peixe reagira).

A necropsopia demonstrou que havia edema pronunciado dos tecidos da parede abdominal, líquido peritoneal – não muito abundante, - fígado congesto e coração talvez (?) um pouco dilatado. Foi examinado o sangue; não havia hemólise, nem tampouco qualquer outra alteração digna de nota. Não se logrou observar febre”.

Exp. II (Realizada no mesmo dia que a anterior, às 18 h. 45)

“Outra cobaia foi inoculada nas mesmas condições que a anterior, sendo naturalmente utilizado um outro peixe. Imediatamente após a penetração de um dos acúleos vulnerantes dorsais, que deixou vestígios bem visíveis, houve aceleração dos batimentos cardíacos e dos movimentos respiratórios, com dispnéa evidente. Também observamos midríase.

Durante algum tempo ficou o animal imóvel e sem sair do lugar quando tocado; não tardou que se manifestasse paralisia – e progressivamente paralisia dos membros posteriores, recusando-se a cobaia alimentar-se, coisa que em condições normais jamais se observa! Na manhã do dia 25, aproximadamente 12 horas após a inoculação, fomos encontrar a cobaia imóvel e inteiriçada, de olhos muito abertos e pêlo eriçado; parecia uma estátua! Depois de observá-la durante alguns minutos, notando que não mudava de posição nem de atitude retirá-la da gaiola: Estava morta!

No ventre, em torno do ponto de inoculação via-se uma mancha esverdeada – semelhante à que observáramos na cobaia anteriormente inoculada: também havia edema, não muito pronunciado, da parede abdominal”.

Experiência III (Realizada no mesmo dia que as anteriores, às 18h. 55)

“Um pinto de dois meses, exposto ao ataque de outro niquim, que o perfurou duplamente no peito, com os acúleos dorsais, manifestou-se imediatamente sintomas alarmantes de violento envenenamento, projetando a cabeça para traz com um movimento brusco e dismétrico: produziram-se logo em seguida convulsões violentas, sucessivas, tetanizantes. Colocado no chão, começou o pobre galináceo a bater as asas, convulsivamente, durante 15 a 20 segundos e tombou inerte: Estava morto (cerca de um minuto, apenas, depois de inoculado)” !

Assim, Fróes concluiu que “quanto à ação do veneno não há dúvida de que ele tem efeito local e geral”. Ao lado de sintomas de irritação local intensa (sempre presente nos casos humanos), ocorrem fenômenos de

ataque violento ao sistema nervoso, tanto mais intensos quanto mais sensível o animal inoculado". A predominância quase exclusiva dos sintomas locais no homem é a grande desproporção que há, nestes casos, entre a quantidade do veneno injetado e o peso do corpo da vítima (Lopes-Ferreira, 2000).

O *Thalassophryne nattereri* pertence ao filo *Chordata*, a classe *Osteichthyes*, a ordem *Batrachoidiformes* e a família *Batrachoididae*. Conhecido popularmente como “niquim” (ni=feio, quin=espinhoso; do tupi guarani), “aniquim”, “miquim” ou “niquim-de-lama”. Apresenta pequenas dimensões, cerca de 12 a 15 cm. Possui olhos grandes e salientes, cabeça grande e boca rasgada, não possui escamas, estando todo o corpo protegido por um muco, espesso e viscoso (Figura 1). Lembra o aspecto de um batráquio, principalmente quando visto de frente (Fróes, 1932, 1933).



Figura 1 – Fotografia de um exemplar de *Thalassophryne nattereri* (niquim). Fonte: Lopes-Ferreira, 2000.

É considerado um peixe peçonhento por apresentar um aparelho inoculador de veneno que consiste em quatro espinhos (acúleos), sendo dois localizados na região do dorso (1º segmento da nadadeira dorsal), situados um após o outro na linha mediana, e dois laterais (Figura 2). Funcionam como arma de defesa, e no momento em que o peixe se sente agredido, eles

ericham-se de uma só vez, penetrando no agressor e inoculando o veneno (Fróes, 1932, 1933).

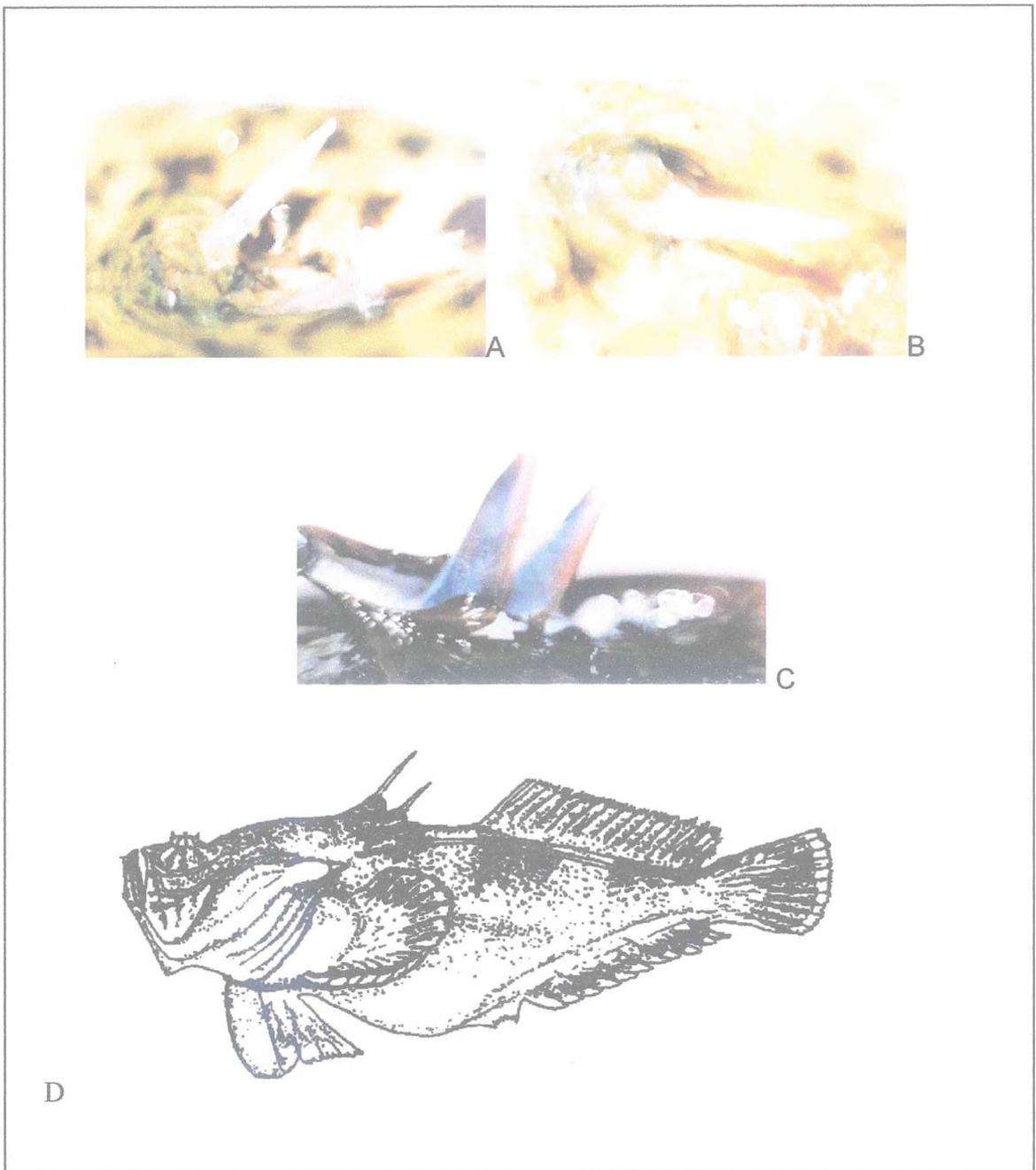


Figura 2 – Aparelho inoculador do veneno de *T. nattereri*
Espinhos dorsais (A) e ventrais (B), glândulas de veneno (C) e
(D) o niquim. Fonte: Lopes-Ferreira, 2000

realiza mimetismo, alimenta-se na maioria das vezes de caranguejos, moluscos e pequenos peixes, sendo ainda extremamente agressivo mesmo frente a outros animais maiores (Fróes, 1933). Habita águas marinhas e fluviais, vive entre rochedos ou plantas marinhas, encoberto pela areia ou lodo, em locais relativamente rasos, à beira-mar ou, menos frequentemente, à beira-rio (Figura 3). É muito resistente e permanece vivo até cerca de 12 horas, após ser retirado da água.



A



B

Figura 3 – Locais de ocorrência do *T. nattereri*
Lagoa Mundaú - Alagoas (A), Rio Jaguaribe – Fortim-CE (B)

Fonte: A- Lopes-Ferreira, 2000

O acidente provocado pelo *T. nattereri* ocorre através do contato com áreas corpóreas, o que permite a perfuração do tegumento e liberação do veneno por pressão sobre o tecido glandular (Figura 4). Os acidentes ocorrem, na maioria das vezes, na região plantar ou palmar (figura 5). Tais acidentes ocorrem quando as pessoas pisam inadvertidamente no peixe, quando tocado por catadores de mariscos ou então quando presos às redes de pesca ou nas redes dos currais de pesca (Figura 6).

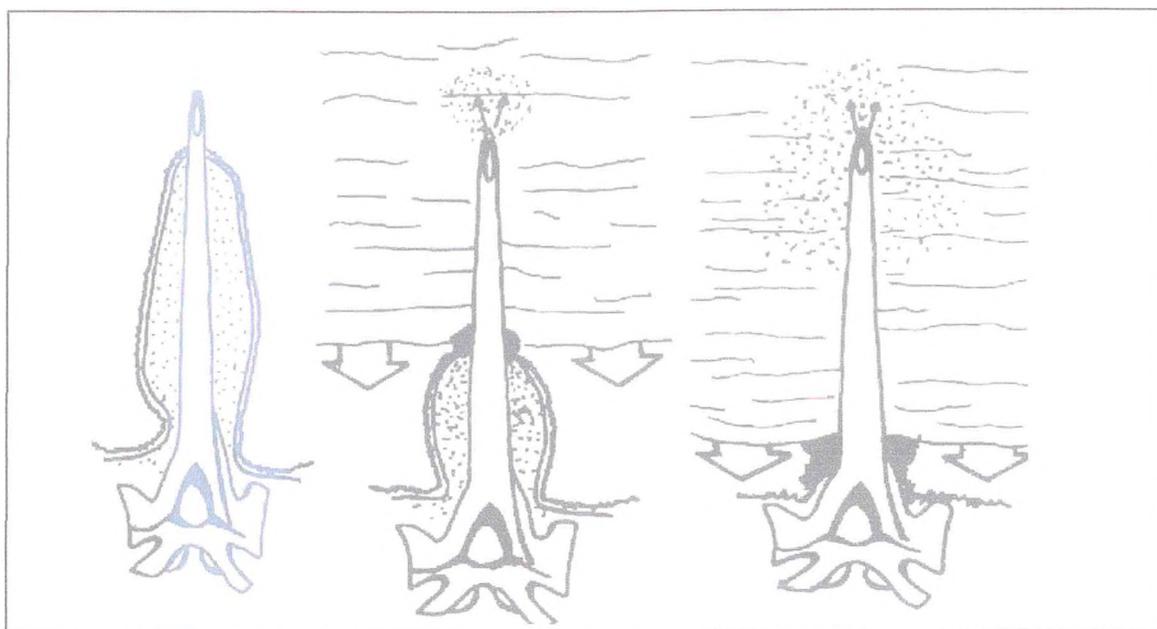


Figura 4- Desenho ilustrativo da perfuração do tegumento e da liberação do veneno por pressão sobre o tecido glandular.



Figura 5 – Acidentes provocados pelo *T. nattereri*
Na região palmar 6h após o acidente (A) e 24h após (B)

Fonte: Fonseca, L.A., 2000



Figura 6 – Formas de ocorrência dos acidentes pelo *T. nattereri*
(A) Quando os peixes se encontram presos às redes de pesca, (B) no momento em que os pescadores estão catando mariscos, (C) ou quando estão presos às redes de currais. Fonte: Lopes-Ferreira, 2000.

Os pacientes queixam-se sempre de dor intensa com irradiação para a raiz do membro, em seguida ocorrendo a instalação de reação inflamatória aguda no local atingido e mais tarde necrose, com difícil cicatrização. Na inexistência de um tratamento adequado, é comum a ocorrência de infecção bacteriana prolongada e em alguns casos há a necessidade de amputação do membro atingido (Auto, 1992).

Lopes-Ferreira e colaboradores (1998) descreveram os efeitos locais e sistêmicos provocados pela inoculação subcutânea do veneno do peixe *T. nattereri* em camundongos. Os animais apresentaram edema, sinais de alterações do sistema nervoso como movimentos rotacionais, ereção pilórica, convulsão e morte. Tais autores afirmaram que possivelmente alterações neurológicas e letalidade não foram encontradas nos acidentes humanos em virtude da relação quantidade de veneno inoculada pelo peixe e o peso da vítima.

1.4. Epidemiologia

Pouco se sabe sobre a epidemiologia dos acidentes causados pelo *Thassophryne nattereri*. A inexistência de um tratamento específico e a falta de notificação dos acidentes provavelmente contribuem para essa situação.

É sabido que acidentes provocados pelo *T. nattereri* ocorrem constantemente na orla nordestina, como descrito no trabalho de Almeida e

Rocha (1989) que descreve acidentes ocorridos no período compreendido entre 1982 e 1987, mostrando que a maioria dos acidentes com animais marinhos, na região metropolitana de Salvador e adjacências, é provocado pelo *T. nattereri* e os meses de maior ocorrência fevereiro, março e agosto (Lopes-Ferreira, 2000).

Os trabalhos de Auto (1992) também relatam acidentes ocorridos com o *T. nattereri* no Estado de Alagoas. Estes trabalhos demonstram que o *T. nattereri* causa uma das formas de ictismo mais importantes levando a acidentes que resultam em um sério problema econômico e social, agravados pela inexistência de um tratamento eficiente (Lopes-Ferreira, 2000).

Relato de Haddad Jr *et al.* (2003) registraram 28 acidentes pelo *T.nattereri* em Salinópolis (Pará) e 17 casos na região de Vaza-Barris (Aracaju-SE). Nos casos relatados não foram observadas manifestações sistêmicas, embora tenham sido observadas dor intensa e necrose ocasional, provocando incapacitação da vítima.

No período de 1992 a 2002 foram registrados, pelo Centro de Assistência Toxicológica do Ceará – CEATOX, casos de envenenamento pelo *T. nattereri* no litoral do Ceará cujas manifestações clínicas mais comuns foram dor e edema local. (Bezerra *et al*, 2003).

1.5. Tratamento

Apesar do aumento significativo do número de notificações de acidentes com animais marinhos, não existe nenhum tratamento específico para o envenenamento causado pelo *T. nattereri*. Alguns tratamentos domésticos consistem em colocar o membro afetado em água quente, a uma temperatura tão alta quanto o paciente possa agüentar (Halstead, 1971).

O uso de drogas antiinflamatórias utilizadas no tratamento do envenenamento tais como a indometacina, a dexametasona, antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais, respectivamente, não inibiram a sintomatologia causada pelo acidente do *T. nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 2002).

Na maioria dos casos de envenenamento causados por este peixe, o que se observa é um tratamento generalizado consistindo de lavagem cirúrgica e de bloqueio local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor visando não apenas o alívio da dor bem como a limpeza e a remoção de corpos estranhos, o uso de dreno, de antibióticos e de analgésicos.

Atualmente, encontra-se em estudo no Instituto Butantan, um antissoro para ser utilizado no envenenamento humano causado pelo *T. nattereri*, como forma eficiente de tratamento, evitando as graves seqüelas deixadas pelo acidente.

1.6. O Sistema Renal

1.6.1. Características gerais

Os rins contribuem para a manutenção da homeostase corpórea, produzindo a urina, através da qual são eliminados diversos resíduos do metabolismo, além de água, eletrólitos e não-eletrólitos em excesso no meio interno (Ganong, 1989).

Segundo Guyton e Hall (1998), os rins desempenham múltiplas funções tais como:

- Regulação de Equilíbrio Hidroeletrólítico;

- Regulação da Osmolaridade dos Líquidos Corporais e das Concentrações de eletrólitos;

- Regulação do Equilíbrio Ácido-Básico;

- Excreção de produtos da Degradação Metabólica e Substâncias Químicas estranhas;

- Regulação da Pressão Arterial;

- Secreção de Hormônios;

- Gliconeogênese;

Sabe-se que, na presença de doença renal crônica ou na insuficiência renal aguda, essas funções homeostáticas encontram-se comprometidas e verifica-se rápida ocorrência de graves anormalidades no volume e na composição dos líquidos corporais (Bulger *et al.*, 1982).

1.6.2. Morfologia Renal

Os rins localizam-se na parede posterior do abdome, fora da cavidade peritoneal. O rim tem a forma de um grão de feijão com uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa o hilo, por onde passam a artéria e a veia renais, os vasos linfáticos, o suprimento nervoso e o ureter que transporta a urina do rim para a bexiga, onde será armazenada até ser excretada.

O rim é constituído por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, uma zona cortical e uma zona medular. A medula renal é dividida em massas de tecido em forma de cone, denominadas pirâmides renais ou de Malpighi, cujas bases e lados entram em contato com a zona cortical e cujos vértices fazem saliência nos cálices renais. Essas saliências são as papilas (Junqueira e Carneiro, 1995).

A zona cortical é contínua e ocupa o espaço deixado pelas pirâmides de Malpighi. O rim apresenta lobos e lóbulos, embora de delimitação difícil. Cada lobo é formado por uma pirâmide de Malpighi e pelo tecido cortical que recobre sua base e seus lados. O tecido cortical que cobre os lados da pirâmide de Malpighi constitui as colunas renais de Bertin. Um lóbulo é formado por um raio medular e pelo tecido da zona cortical que lhe fica em volta, delimitado pelas arteríolas interlobulares (Junqueira e Carneiro, 1995).

Os rins são constituídos pela associação de numerosas unidades funcionais, ou néfrons. Cada néfron é formado por uma parte dilatada, o corpúsculo de Malpighi, pelo túbulo contorcido proximal, pelas partes delgada e espessa da alça de Henle e pelo túbulo contorcido distal.

O corpúsculo de Malpighi é formado por um tufo de capilares (glomérulo) envolvidos pela cápsula de Bowman, que possui dois folhetos, um interno, acoplado aos capilares, e outro externo, formando os limites do corpúsculo de Malpighi. Entre os dois folhetos da cápsula de Bowman existe o espaço capsular, que recebe o líquido filtrado da parede dos capilares e do folheto visceral (Douglas, 2001).

Cada corpúsculo de Malpighi tem um pólo vascular pelo qual penetra a arteríola aferente e sai a arteríola eferente, e um pólo urinário, onde nasce o túbulo contorcido proximal. Ao penetrar no corpúsculo de Malpighi, a arteríola aferente divide-se em vários capilares, que vão constituir as alças. Além disso, há conexões diretas entre o vaso aferente e o eferente, pelas quais o sangue pode circular, mesmo sem passar pelo glomérulo. Nos capilares glomerulares circula sangue arterial, cuja pressão hidrostática é regulada pela arteríola eferente, que possui maior quantidade músculo liso do que a aferente (Comark, 1996)

1.6.3. Alterações renais causadas por venenos

Componentes tóxicos dos venenos podem agir de forma direta ou indireta sobre as células renais (Raab *et al.*, 1966). Os efeitos tóxicos sobre os rins podem causar:

a) Alterações de células renais (nefrite), células tubulares renais (nefrose); glóbulos vermelhos (hemoglobinúria), células musculares (nefrose mioglobinúrica), células nervosas (aumento da suscetibilidade renal);

b) Efeitos enzimáticos com lise celular e trombose causando infarto renal, formação de anafilotoxina e degranulação de mastócitos podendo ocorrer choque anafilactóide e nefrose;

c) Alterações glomerulares que podem ser degenerativas ou inflamatórias, tubulares, causando nefrose por efeito tóxico direto ou efeitos secundários pela degeneração celular (hemoglobina e mioglobinúria); hipóxia vascular e infarto renal.

A lesão glomerular pode ser resultado de glomerulonefrite proliferativa (Seedat *et al.*, 1974). Este tipo de lesão (glomerulonefrite, glomerulite e síndrome nefrótica) foi descrita nos acidentes ofídicos. As alterações glomerulares consistem de proliferação de células endoteliais e mesangiais, com deposição de fibrina. Ocasionalmente ocorre crescimento epitelial e geralmente a membrana basal não apresenta alteração significativa (Sitprija *et al.*, 1979).

A patogênese da lesão glomerular é decorrente da irritação direta causada pelo veneno sobre os vasos e algumas vezes sobre os capilares glomerulares (Jimenez-Porras, 1970), do efeito hemorrágico na membrana basal glomerular (Ohsaka, 1973), da deposição de fibrina e da reação imunológica. A C.I.V.D. (Coagulação IntraVascular Disseminada) pode causar danos glomerulares com proliferação de células mesangiais (Vassalli e McCluskey, 1965), fato freqüente nas picadas por crotalídeos, sendo estas alterações semelhantes às causadas pela toxemia gravídica. Há evidência de deposição de complexos imunes no glomérulo indicando a importância deste mecanismo na patogênese da lesão vascular (Sitprija, 1979).

Venenos botrópicos e crotálicos apresentam ações nefrotóxicas direta sobre túbulos renais, embora outros mecanismos possam contribuir para a patogênese dessas lesões (Sanchez *et al.*, 1992).

No envenenamento botrópico, a lesão renal ocorre na forma de insuficiência renal aguda (IRA) secundária a necrose tubular aguda (Kouyoumdjian e Kouyoumdjian, 1986), necrose cortical renal (Cupo *et al.*, 1991) e ocasionalmente glomerulonefrite (Rezende *et al.*, 1989). Afirma-se a importância das lesões sistêmicas causadas por distúrbios da coagulação após acidentes botrópicos, tendo sido relatados entre eles, casos de óbito. De qualquer forma, CIVD possivelmente não tem relevância em

experimentos com perfusão renal, uma vez que o perfusato é desprovido de fibrinogênio e de fatores de coagulação. (Havt *et al.*, 2001).

Utilizando o mesmo modelo de perfusão em rim isolado, Monteiro e Fonteles (1999) concluíram que o veneno da *Bothrops jararaca* causou nefrotoxicidade além de sugerir a participação de Fator de Agregação Plaquetária (FAP) em sua atividade.

Boer-Lima e colaboradores (1999) registraram diversas alterações histopatológicas na célula renal tais como: perda da borda em escova de células tubulares proximais, vacuolização citoplasmática, degeneração e descamação de células necróticas. Tais alterações fundamentam-se provavelmente nas ações proteolíticas do veneno e nas atividades PLA₂-dependentes.

A insuficiência renal aguda constitui a principal e mais séria complicação do envenenamento croálico (Cupo, 1988). Envenenamentos por *C. d. terrificus* induzem distúrbios na coagulação, miotoxicidade, neurotoxicidade e insuficiência renal aguda. (Barraviera, 1990; Martins *et al.*, 1998). As lesões renais são atribuíveis à ação miotóxica, bem como à liberação de mioglobina excretada pelos rins e à provável ação nefrotóxica direta do veneno (Azevedo-Marques *et al.*, 1985). O efeito miotóxico promovido pelo veneno da *C. d. cascavella* tem como consequência a rabdomiólise cujo efeito constitui um potencializador na nefrotoxicidade aguda do veneno (Martins *et al.*, 2002).

As complicações renais do acidente crotálico mais sérias revelam hemoglobínúria, oligúria, elevação dos níveis séricos de uréia e de creatinina cuja associação se faz com os sinais originados da ação neurotóxica do veneno. cujas mais freqüentes são: ptose unilateral palpebral (fácies neurotóxica), fraqueza muscular generalizada e diplopia secundária à oftalmoplegia. (Martins *et al.*, 1998).

Trabalhos realizados com a subespécie da *C .d. cascavella* relataram lesões diretas em túbulos e em células glomerulares e indiretamente causaram e estimularam liberação de mediadores endoteliais. (Martins *et al.*,1998).

A picada de *Vipera russel* promove obstrução tubular por hemoglobínúria e diminuição do lúmen arterial (Peiris *et al.*, 1969). A mioglobínúria pode ocorrer, sendo secundária a mionecrose, em picadas de serpentes marinhas. Quando ocorre insuficiência renal é devido à obstrução tubular pela mioglobina (Sitprija, 1979). Na insuficiência renal por peçonha de serpentes marinhas há hipercalemia secundária à mionecrose (Monteiro, 1990).

1.7. Importância e Justificativa

O estudo realizado visa contribuir para o esclarecimento dos efeitos biológicos avaliando as possíveis alterações renais causadas pelo veneno do *T.*

nattereri, para que formas de terapias mais eficientes sejam aplicadas nos casos de envenenamento.

A demonstração da atual epidemiologia no estado do Ceará contribui também na descrição da gravidade das lesões provocadas por esses acidentes, na precariedade de tratamento e no desinteresse pelo assunto de grande relevância sócio-econômica em nosso Estado.

O conhecimento mais detalhado acerca das ações biológicas do veneno se faz fundamental na elaboração de ferramentas farmacológicas além de fornecer embasamento científico para elaboração de novas linhas de pesquisa.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

2.1. Objetivos Gerais

- Investigar a epidemiologia dos acidentes humanos causados pelo peixe *Thalassophryne nattereri* no Estado do Ceará, bem como avaliar os efeitos renais induzidos pelo veneno;

- Avaliar os efeitos e as alterações histológicas provocadas pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* no sistema renal.

2.2. Objetivos específicos

a) Analisar aspectos epidemiológicos de acidentes causados pelo Niquim no Estado do Ceará de 1992 a 2002;

b) Avaliar as alterações renais causadas pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*;

c) Comparar os efeitos renais causados pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* em três doses logarítmicas 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL;

d) Correlacionar as alterações histológicas e funcionais dos rins perfundidos com o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de dados para o estudo epidemiológico

Os dados foram fornecidos pelo Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto Dr. José Frota (Hospital Municipal de Fortaleza), onde são atendidos casos da Capital e do Interior.

No presente estudo, foi realizada uma revisão das fichas de atendimento dos pacientes acometidos com o acidente causado pelo *T. nattereri* (Niquim) de 1992 a 2002, para análise das manifestações clínicas e da evolução dos mesmos.

3.2. Animais Experimentais para avaliar as alterações renais

Utilizamos ratos Wistar (Figura 07) adultos com peso entre 220 a 270g, sem distinção de sexo, fornecidos pelo biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em jejum alimentar de 24 horas antes dos experimentos com o fornecimento de água “*ad libitum*”. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).



Figura 07 – Animal experimental

3.3. Divisão dos grupos de animais

Objetivando analisar os efeitos do veneno do *Thalassophryne nattereri* (niquim), dividimos os animais experimentais em quatro grupos. Um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit modificada (MKHS), na presença de 6g% de albumina bovina. O grupo controle foi comparado aos outros três grupos nos quais utilizamos as concentrações de 3 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,3 μ g/mL do veneno liofilizado. Cada grupo era formado por seis animais.

3.4. O Veneno

O veneno utilizado em nossos experimentos foi fornecido pelo Instituto Butantan em São Paulo, pela Dra. Mônica Lopes Ferreira. Para a extração do veneno, os peixes foram coletados no encontro das águas da

Lagoa do Mundaú com a Praia de Barra Nova, no Estado de Alagoas. A extração era realizada comprimindo-se a base dos espinhos de modo a afastar a membrana que os envolve, forçando a expulsão do veneno, que foi coletado, sendo imediatamente centrifugado e estocado a -20°C ou liofilizado. A concentração de proteínas do veneno de *T.nattereri* foi determinada pelo método colorimétrico (Bradford, 1976) usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST.Louis, MO, USA). A quantidade de veneno foi expressa pelo seu conteúdo protéico. O veneno liofilizado, nas doses de 30, 100 e 300 μg foi diluído antes de cada experimento em 1ml de solução salina (0,9%) e adicionado ao sistema, que continha 100ml de solução perfusora, sempre após 30 minutos do início dos experimentos.

3.5. Substâncias utilizadas

Nos experimentos com perfusão renal utilizamos as seguintes substâncias:

→ NaHCO_3 (Synth)

→ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Synth)

→ NaCl (Synth)

→ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reagen)

→ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Reagen)

→ Manitol (Reagen)

- Ureia (Reagen)
- KCl (Merck)
- Glicose (Squibb)
- Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)
- Heparina (CEME)
- Albumina bovina (Sigma) - Fração V
- Inulina (Sigma)
- Pentobarbital sódico (Sigma)

3.6. Solução perfusora e seu preparo

A solução empregada nos experimentos foi a de Krebs-Henseleit modificada, associada com albumina bovina 6%.

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada a 20%, era composta por NaCl = 138g, KCl = 7g, NaH₂PO₄ . H₂O = 3,2g, MgSO₄ . 7H₂O = 5,8g, e Uréia = 10g. Separamos 100 ml desta solução 48 horas antes do experimento e adicionamos NaHCO₃ = 4,2 g, CaCl₂ . 2H₂O = 0,74 g, glicose = 2,0 g, e penicilina = 0,050 g. Em seguida, o volume foi completado para 2000ml com água bidestilada. Desta última solução, foi retirado 300ml e adicionado albumina bovina (6%). Após esse processo, foi realizada uma diálise com o auxílio de um homogeneizador. A diálise tem como função remover possíveis substâncias contaminantes como o citrato, lactato e piruvato (Hanson e Ballard,1968; Cohen *et al.*, 1977; Schurek et

al., 1970; Ross, 1978). Os 1700mL restantes foram usados como solução para a diálise, a qual foi trocada a cada 24 horas. Esta solução foi dialisada por 48 horas, e ao final deste período foi adicionado 0,15g de Inulina. O pH da solução perfusora foi ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

3.7. O Sistema de Perfusão Renal

As primeiras perfusões renais foram realizadas por Lobell em 1849, Bidder em 1862, Ludwig em 1868 e Schroder em 1882 (Araújo Filho, 1995) tendo sido um instrumento da pesquisa fisiológica por mais de um século. A técnica de perfusão renal sofreu grandes avanços, principalmente nas décadas de 70 e 80. Como descobertas importantes, podemos citar a adição da fração V de albumina bovina pura à solução perfusora (Bowman, 1970; Bowman e Mack, 1974; De Mello e Maack, 1976; Little e Cohen, 1974); a utilização de substâncias como glicose, aminoácido, oxaloacetato, piruvato e lactato (Bahlman *et al.*, 1967; Trimble e Bowman, 1973; De Melo e Mack, 1976); o uso da solução de Krebs-Henseleit (Schurek, 1980); e a adaptação do sistema para o emprego de um filtro miliporo no sistema de perfusão renal de ratos (Ross *et al.*, 1973; Cohen *et al.*, 1977; Fonteles, 1980).

Atualmente existem dois tipos de sistemas de perfusão de rim isolado, o aberto e o fechado. No sistema aberto, o perfusato não recircula pelo rim. Este sistema apresenta um alto gasto de albumina, inviabilizando

a elaboração de projetos. No sistema fechado, o perfusato recircula pelo rim e apresenta várias vantagens sobre o aberto, pois permite uma maior economia de albumina, as substâncias dialisadas se mantêm na solução e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dialisador (Monteiro, 1990; Monteiro *et al.*, 1999).

Os primeiros perfusatos foram constituídos para mimetizar o sangue e por este motivo tinham uma concentração de sódio de 140 Mm e uma concentração de potássio de 4 mM. Araújo Filho (1995), relatou que as hemácias foram excluídas do sistema de perfusão, porque uma alta capacidade de oxigênio seria desnecessária em níveis baixos de temperatura, usados na preservação de órgãos.

Segundo Marshall (1984), o perfusato ideal seria aquele que mimetiza a composição do fluido extracelular e osmolaridade, com substratos de glicose, ácidos graxos ligados a albumina e oxigênio.

No nosso trabalho foi utilizado o sistema fechado (Figuras 08 e 09), que inicialmente foi baseado nos estudos realizados por Bowman e Mack (1974) e Ross (1978). Fonteles e colaboradores (1982, 1983) modificaram o sistema, adicionando um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton *et al.*, (1974).

O sistema de perfusão fechado (Figuras 08 e 09) é composto de vários equipamentos, cada um com uma determinada função.

- * Condensador - mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
- * Coletor de urina - frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocado em intervalos de 10 minutos;
- * Seringa coletora de perfusato - coletor da solução de perfusão feita em intervalos de 10 minutos;
- * Bomba de perfusão (Watson) - bombeia a solução de perfusão no sistema, apresenta cinco velocidades;
- * Filtro de milipore (8 μ m) - filtra a solução perfusora;
- * Banho-maria - aquece o oxigenador ou pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre 36 e 37° C;
- * Fluxômetro - mede o fluxo da solução;
- * Manômetro de mercúrio - mede a pressão do perfusato;
- * Catabolhas - retira as bolhas formadas evitando embolia.
- * Oxigenador ou pulmão artificial - promove as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂)
- * Bomba aquecedora com termostato - mantém o sistema de perfusão na temperatura de 37° C.

A possibilidade de análise das funções renais sob condições bem definidas e sem a intervenção de fatores sistêmicos tem levado os pesquisadores a usar o rim isolado e perfundido de rato para estudar vários aspectos do transporte e do metabolismo renais (Araújo Filho, 1995; Monteiro *et al.*, 1999; Fonteles *et al.*, 2001).

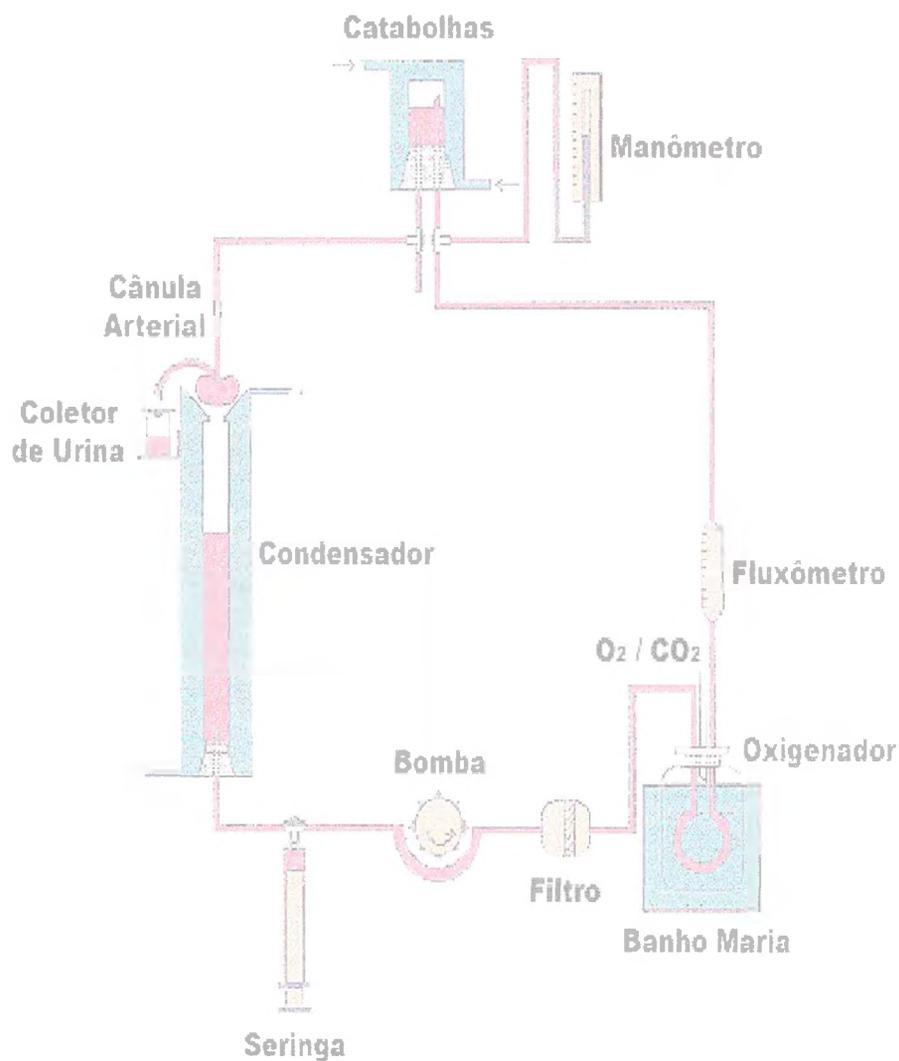


Figura 08 – Esquema do Sistema de Perfusão de Rim Isolado

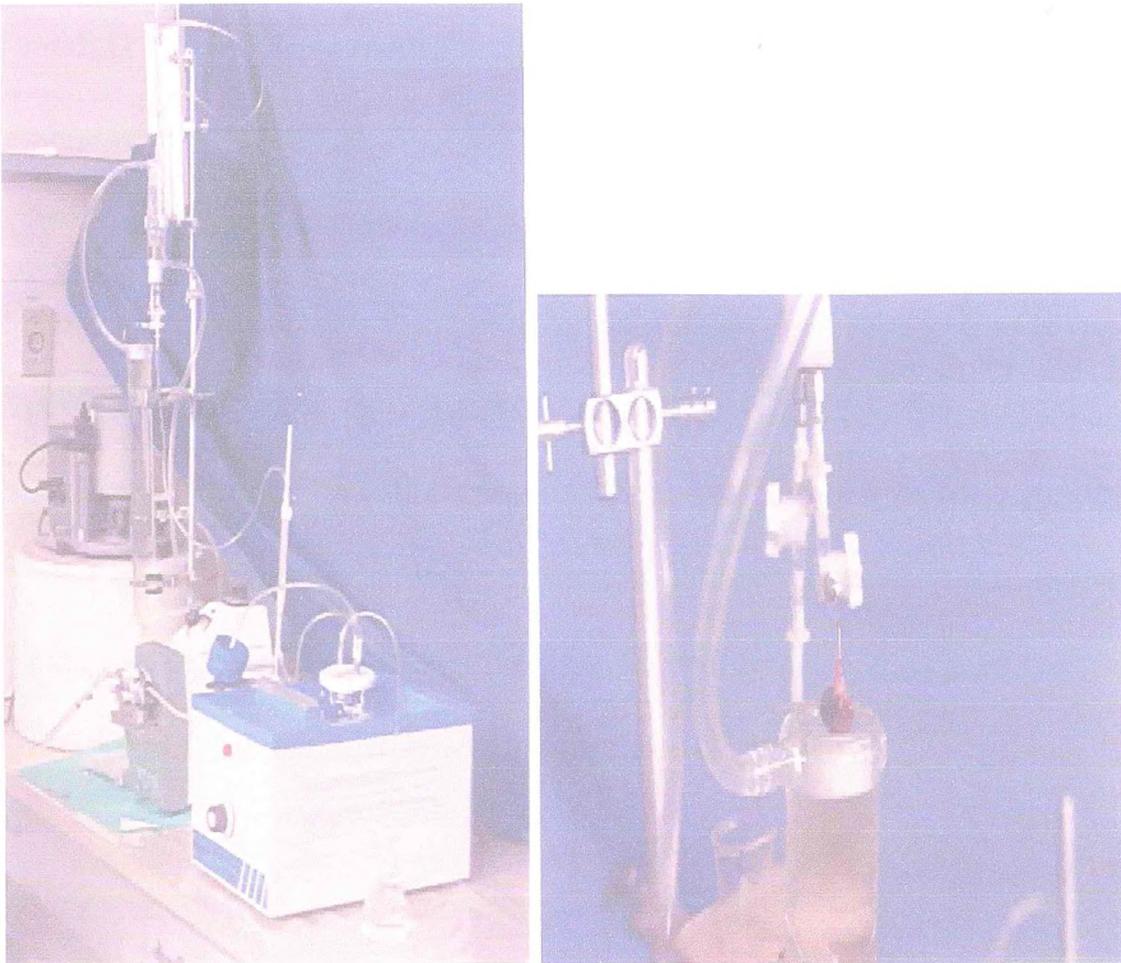


Figura 09 – Fotos do Sistema de perfusão de rim isolado

3.8. Preparo do Sistema

Antes do início de cada experimento, o sistema era calibrado após rigorosa limpeza com detergente e água destilada.

A calibração do sistema foi realizada com o sistema em funcionamento na presença de salina, aquecida entre as temperaturas de 36 a 37° C. A cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5), coletamos a salina por 1 minuto em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula), e anotamos a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão, a qual foi

medida através do manômetro de mercúrio ligado ao sistema. Para melhor adaptação do sistema às unidades da bomba, deixamos 3 minutos de intervalo entre cada coleta.

A calibração foi realizada com o intuito de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Em seguida, os resultados obtidos na calibração dos três grupos tratados foram compilados em curvas, onde plotamos a velocidade da bomba no eixo das abscissas contra a pressão de perfusão, volume de salina coletado (fluxo) e o valor obtido no fluxômetro no eixo das ordenadas (Figuras 10, 11 e 12).

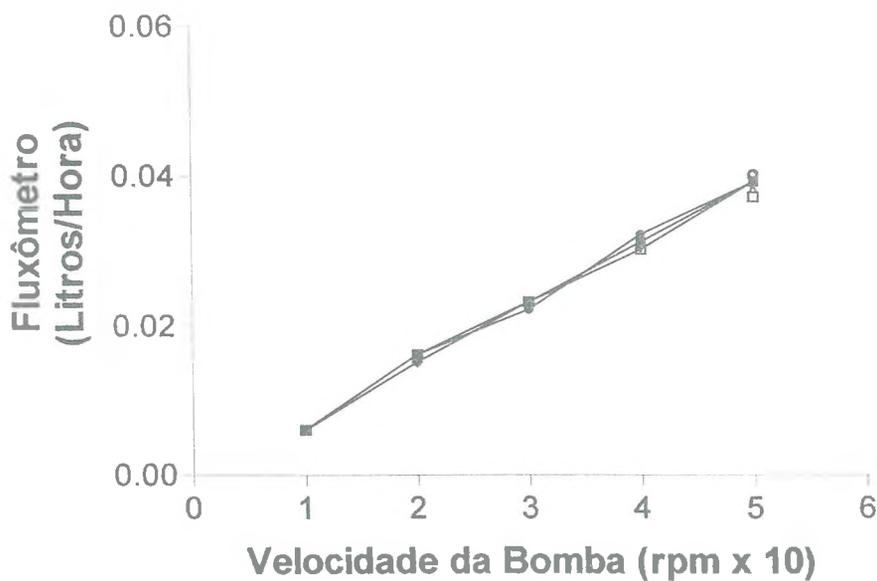


Figura 10 - Gráfico de calibração Fluxômetro x Velocidade da Bomba

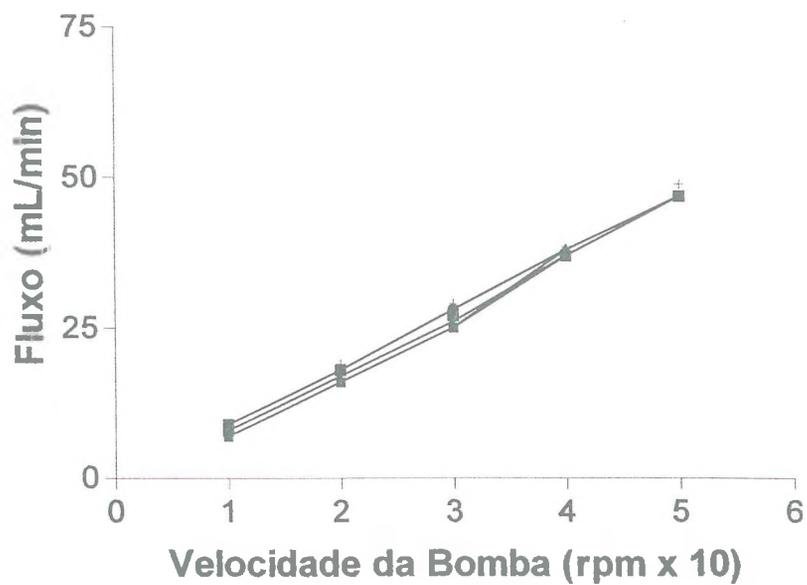


Figura 11 – Gráfico de calibração Fluxo x Velocidade da Bomba

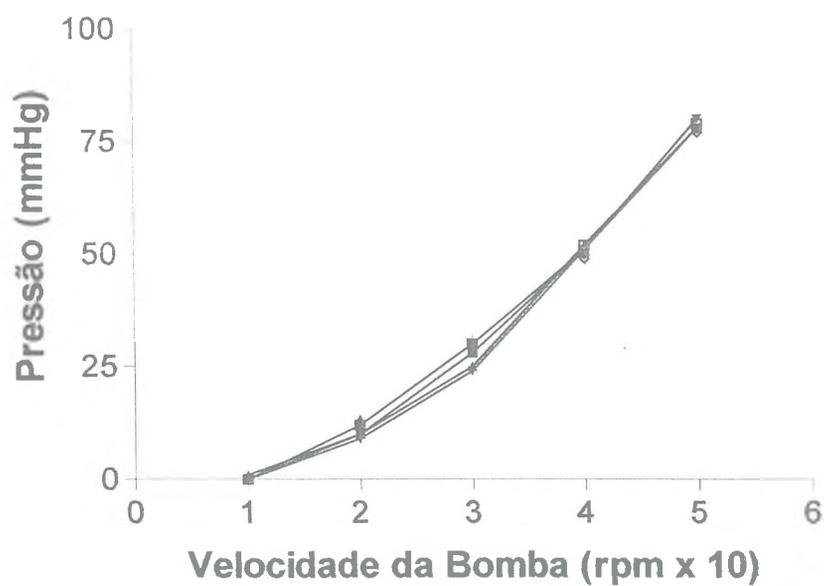


Figura 12 – Gráfico de calibração Pressão de Perfusão x Velocidade da Bomba

3.9. Técnica Cirúrgica

Após a anestesia do animal com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso vivo, com aplicação intraperitoneal (IP), injetamos na veia femural, devidamente identificada, 3 ml de manitol 20%, com objetivo de melhorar a diurese do animal. Após assepsia, fizemos uma incisão da parede abdominal com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para aumentar o campo cirúrgico. Rebatemos as vísceras para o lado esquerdo para visualização do rim direito e procedemos a limpeza do excesso de tecido gorduroso presente na área. Em seguida, isolamos o ureter, o qual foi canulado através de tubo de polietileno (PE50). Com o objetivo de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para com isso procedermos a descapsulação do rim. Realizados estes procedimentos, canulamos a artéria renal, a partir da artéria mesentérica superior. Após sua identificação, a artéria mesentérica superior foi ocluída em seu lado direito e pinçada no seu lado esquerdo. Com um pequeno corte em seu tecido introduzimos a cânula por 3 a 5 mm e fixamos cânula e artéria. Em seguida, os órgãos foram isolados com pinças e seccionados, promovendo a retirada do rim e ureter, devidamente liberados. Com o rim já acoplado ao sistema, esperamos um período de aproximadamente 20 minutos para sua adaptação ao sistema *in vitro* (Figura 13).

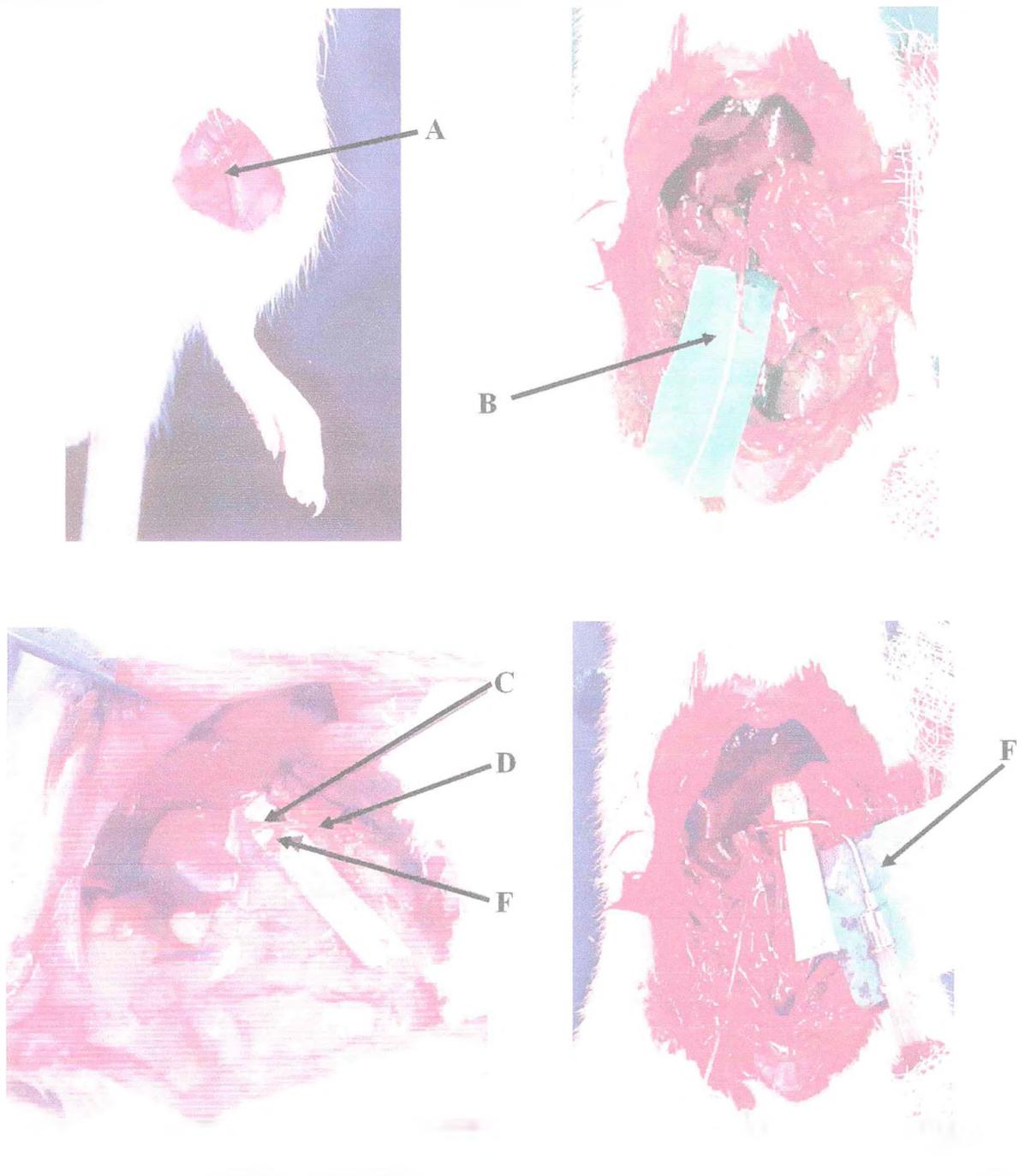


Figura 13 – Técnica cirúrgica. A – veia femoral; B – ureter direito canulado; C – artéria renal; D – artéria mesentérica; - E – aorta; F – cânula arterial.

3.10. Protocolo Experimental

Os experimentos foram iniciados após a adaptação do órgão ao sistema em aproximadamente 20 minutos. O tempo total de perfusão do órgão foi sempre de 120 minutos. Durante esse período, coletamos a cada 5 minutos a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, coletamos a urina e o perfusato. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os frascos de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e medida de osmolaridade. O veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* era administrado sempre 30 minutos após o início dos experimentos.

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

3.11. Avaliação bioquímica

O perfusato e a urina foram coletados em intervalos de 10 minutos, de forma intercalada, conforme o protocolo experimental já descrito. Com este material realizamos testes bioquímicos de dosagem de sódio, potássio, pelo método de fotometria de chama (Flame photometer –

modelo 443 IL). As dosagens de cloro foram realizadas através de método colorimétrico. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta descrita por Fonteles e Leibach (1982). Por fim, medimos a osmolaridade das amostras com um osmômetro (Vapor pressure osmometer – modelo 5100c ESCOR). Todas as análises bioquímicas foram realizadas na unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

3.12. Histologia

Após cada experimento, retiramos fragmentos dos dois rins, que foram acondicionados em frascos com formol 10%. Para proceder a análise histológica, estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5 μ m. Em seguida, procedemos a coloração do material pela hematoxilina-eosina e as lâminas foram analisadas por microscópio óptico (Nikon).

Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse, e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará com a orientação e colaboração do Dr. Dalgimar Beserra de Menezes

3.13. Cálculo dos parâmetros renais

Foram utilizadas as seguintes fórmulas para determinação dos parâmetros funcionais renais (Martinez-Maldonado *et al.*, 1978; Fonteles, 1980):

→ PP – pressão de perfusão (mmHg) – obtido do manômetro de mercúrio

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

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

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

FPR = Fluxo registrado a cada 10 min./ intervalo de tempo x peso do rim

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

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

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

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

DOUin = densidade ótica da inulina na urina

DOPin = densidade ótica da inulina no perfusato

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

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

PNa^+ = concentração de sódio no perfusato

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

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

UNa^+ = concentração de sódio na urina

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

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

$$\rightarrow \%TNa^+ - \text{percentual de sódio transportado} =$$

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

$$\rightarrow \text{Cosm} - \text{clearance osmótico } (\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) =$$

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

U_{osm} = osmolaridade urinária

P_{osm} = osmolaridade do perfusato

$$\rightarrow C_{\text{H}_2\text{O}} - \text{clearance de água livre } (\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) =$$

$$C_{\text{H}_2\text{O}} = FU - \text{Cosm}$$

$$\rightarrow d TNa^+ - \text{transporte distal de sódio } (\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) =$$

$$d TNa^+ = C_{\text{H}_2\text{O}} \times PNa^+$$

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

$$AdNa^+ = d TNa^+ + ENa^+$$

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

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

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

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

3.14. Estatística

Utilizamos um computador PC – Pentium (133Hz) e programa Sigmastat para análise estatística dos dados, expressos por média \pm EPM. Os valores dos parâmetros renais dos quatro grupos aqui avaliados foram comparados por ANOVA e teste comparativo entre grupos, feito por “teste t de Bonferroni”, com significância de * $p < 0,05$.

Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos.

A análise estatística do estudo epidemiológico foi realizada através do Epi Info versão 6.04b.

RESULTADOS

4.1. Resultados epidemiológicos

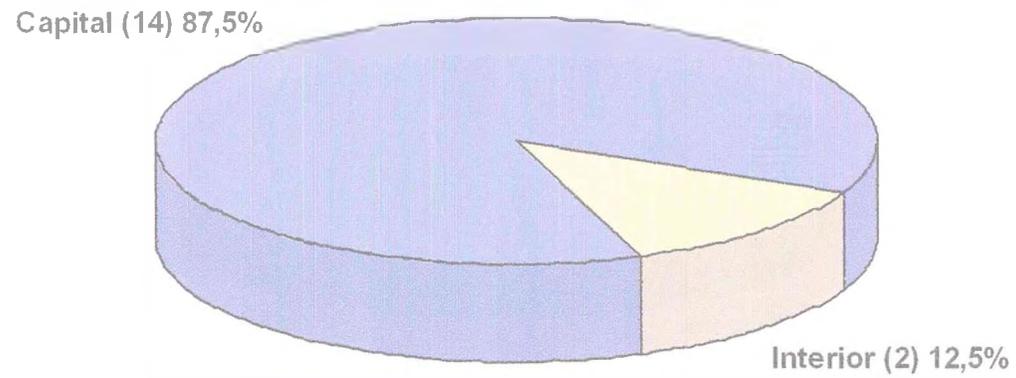
Foram registrados 16 casos de envenenamento pelo *T. nattereri* no litoral do Ceará. A maioria dos acidentes (87,5%) ocorreu em praias da região metropolitana de Fortaleza, com apenas 12,5% dos casos tendo ocorrido em praias do interior (Figura 14).

Com relação ao sexo, 15 (94%) eram do sexo masculino e 1(6%) do sexo feminino. Com relação a idade, 12 pacientes (75%) estavam na faixa etária de 21 a 40 anos, 3 (19%) tinham entre 41 e 60 anos e 1 (6%) estava na faixa de 1 a 10 anos (Figura 15).

O tempo de exposição foi de 1 a 5 horas (4 pacientes), 6 a 12 (3 pacientes) e mais de 12 horas (4 pacientes) e 5 pacientes não conseguiram informar o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento (Figura 16).

As manifestações clínicas mais comuns foram dor e edema local. Observou-se também isquemia, paralisia local, equimose e sensação de queimação na pele (Figura 17).

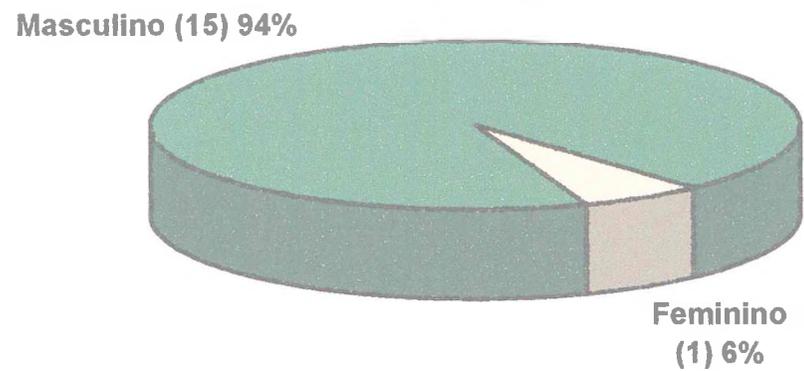
O tratamento consistiu de antiinflamatórios e analgésicos na maioria dos casos. Em alguns casos, foram utilizados anestésicos, água morna, lavagem cirúrgica e anti-histamínicos. Em 12 casos (75%) observou-se cura confirmada e em 2 (12%) cura não confirmada. Em dois casos a evolução foi ignorada (Bezerra, 2003).



FONTE: Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX/IJF

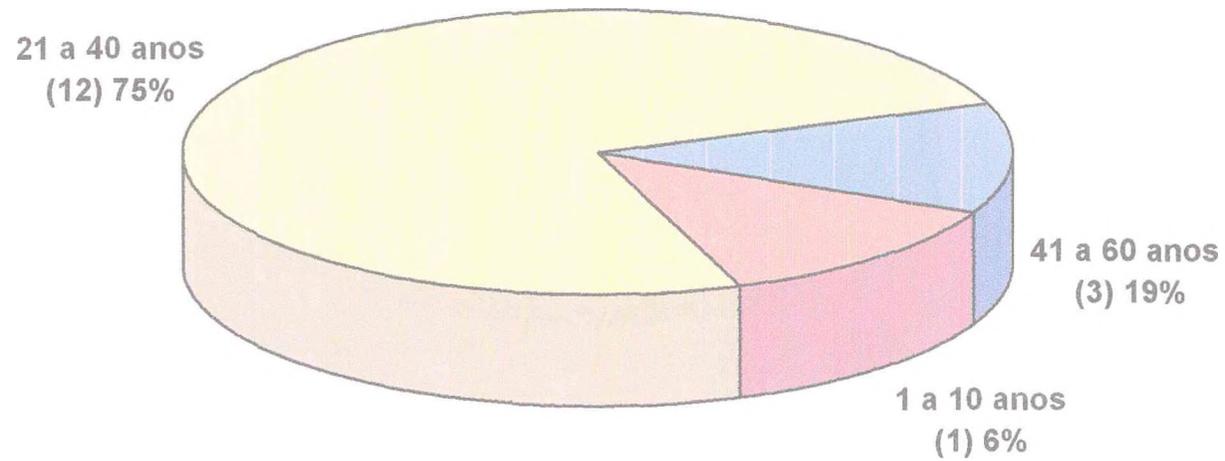
Figura 14 - Procedência dos casos de envenenamento por *T. nattereri*. Ceará, de 1992 a 2002.

R13845092/05



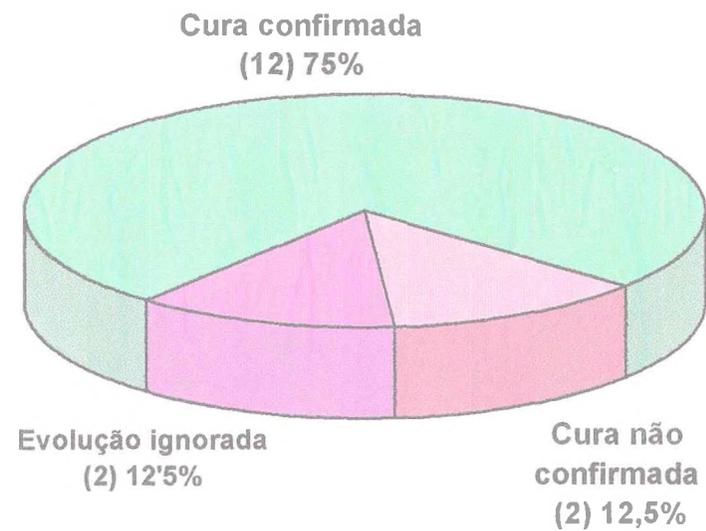
FONTE: Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX/IJF

Figura 15 - Sexo do Acidentado no Envenenamento por *T. nattereri*. Ceará, de 1992 a 2002



FONTE: Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX/IJF

**Figura 16 - Faixa Etária do Acidentado no Envenenamento por *T. nattereri*.
Ceará, de 1992 a 2002**



FONTE: Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX/IJF

**Figura 17 - Evolução Clínica do Acidentado no Envenenamento por *T. nattereri*.
Ceará, de 1992 a 2002**

Intervalo de Tempo	1992 a 2002	
	Nº.	%
<i>1 a 5 horas</i>	4	25
<i>6 a 12 horas</i>	3	18,75
<i>Mais de 12 horas</i>	4	25
<i>Não informado</i>	5	31,25
<i>Total</i>	16	

Fonte: Centro de Assistência Toxicológica –CEATOX

Tabela 2 - Números e percentuais de casos de acidentes por *T. nattereri* segundo o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, no Ceará de 1992 a 2002.

4.2. Estudo dos parâmetros funcionais renais

4.2.1. Avaliação do grupo controle em rim isolado de rato

Os parâmetros funcionais avaliados no grupo controle em que os rins foram perfundidos apenas com solução de Krebs-Henseleit modificada permaneceram estáveis durante os 120 min de perfusão (Figuras 18 a 31 e Tabelas 3 a 16).

4.2.2. Avaliação do Efeito do veneno do Niquim (*Thalassophryne nattereri*) em rim isolado nas concentrações 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3µg/mL.

A infusão do veneno ocorreu aos 30 min de perfusão, portanto os 30 min. iniciais funcionaram como controle interno do próprio experimento. Após o tratamento com as três doses (0,3µg/mL, 1µg/mL e 3 µg/mL) do veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*, foi observado que todas as três concentrações do veneno causaram um aumento na pressão de perfusão (PP) no tempo de 60 min., sendo também observado nos tempos de 90 e 120 min. (Figura 21 e Tabela 3).

A Resistência Vascular Renal (RVR) começou a se elevar no tempo de 60 min somente na concentração de 0,3 µg/mL, e se intensificou

nos tempos de 90 e 120 min em todas as três concentrações do veneno (Figura 19 e Tabela 4).

O Fluxo Urinário (FU) e o Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) começaram a aumentar no tempo de 90 min, e se intensificaram no tempo de 120 min nas concentrações de 0,3 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$, os dois parâmetros diminuíram nos tempos de 90 e 120 min (Figuras 20 e 21; Tabelas 5 e 6).

O percentual de Transporte Tubular de Sódio ($\%T\text{Na}^+$) na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ começou a reduzir no tempo de 90 min e este efeito se intensificou no tempo de 120min de cada experimento (Figura 22 e Tabela 7).

O percentual de Transporte Tubular de Potássio ($\%TK^+$) e de cloro ($\%T\text{Cl}^-$) na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ começaram a reduzir no tempo de 60 min, e este efeito foi observado também nos tempos de 90 e 120 min. (Figuras 24 e 26; Tabelas 9 e 11).

O percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio ($\%pT\text{Na}^+$) na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu no tempo de 90 min, sendo observado o mesmo efeito no tempo de 120 min. (Figura 23 e Tabela 8).

O percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio ($\%pTK^+$) aumentou na dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 120 min. e na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ esse parâmetro diminuiu no tempo de 90 min. (Figura 25 e Tabela 10).

O percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloro ($\%pTCl^-$) começou a reduzir no tempo de 60 min. nas doses de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$, sendo observado o mesmo efeito nos tempos de 90 e 120 min apenas na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27 e Tabela 12).

A Excreção de Sódio (ENa^+) começou a aumentar no tempo de 90 min. na dose de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e se intensificou no tempo de 120 min. O mesmo efeito foi observado na dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ apenas no tempo de 120 min. (Figura 28 e Tabela 13).

A Excreção de Potássio (EK^+) aumentou progressivamente nas doses de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 90 min, com efeito máximo aos 120 min de perfusão. Na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ esse parâmetro apresentou uma queda significativa após 90 minutos de perfusão, se mantendo reduzido aos 120 min. (Figura 29 e Tabela 14).

A Excreção de Cloro (ECl^-) começou a aumentar de forma significativa nas doses de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 90 min. sendo observado o mesmo efeito aos 120 min. Na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ esse parâmetro diminuiu no tempo de 90 min., se mantendo reduzido aos 120min. (Figura 30 e Tabela 15).

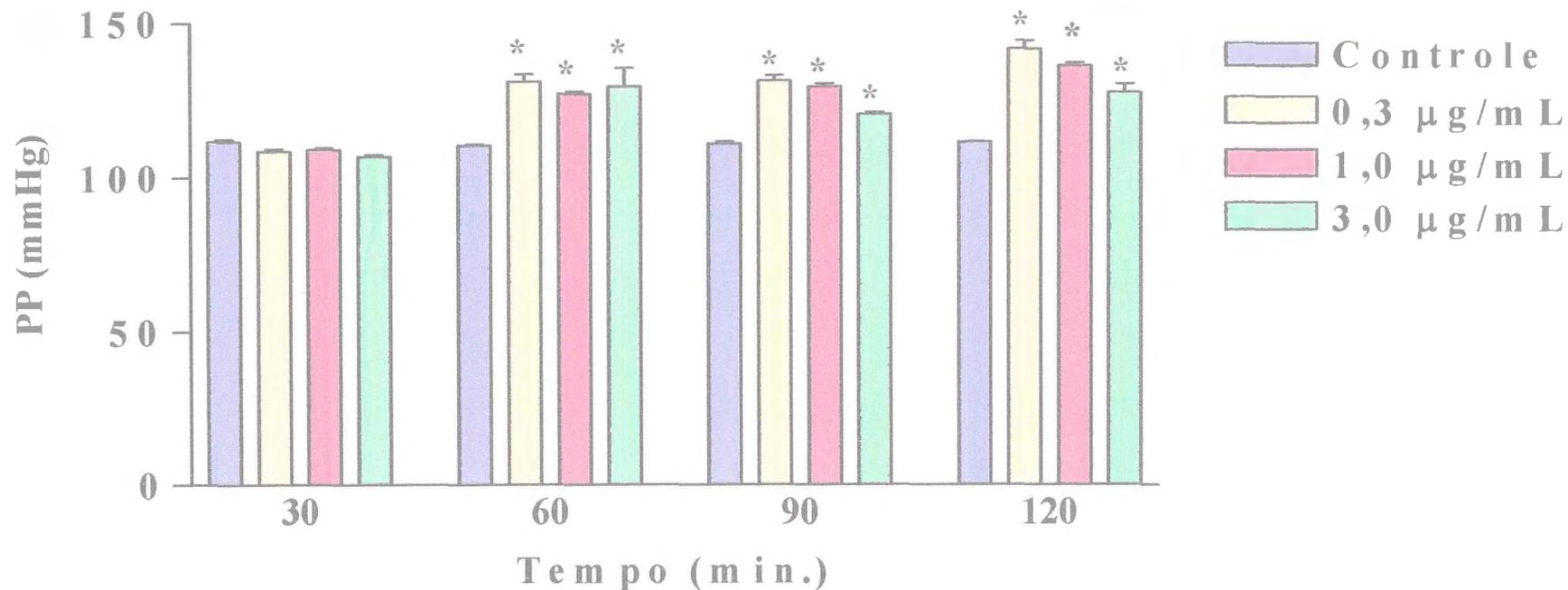
O Clearance osmótico (C_{osm}) começou a aumentar na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 60 min, também sendo observado nos tempos de 90 e 120 min. O mesmo efeito ocorreu na concentração de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ nos

últimos dois tempos. Uma redução significativa foi observada na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 90 min. (Figura 31 e Tabela 16).

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	111,68 ± 0,67	110,45 ± 0,35	111,00 ± 0,69	111,47 ± 0,34
0,3	108,57 ± 0,77	131,17 ± 2,38 *	131,37 ± 1,80 *	141,83 ± 2,67*
1	109,06 ± 0,64	127,20 ± 0,76 *	129,67 ± 0,87 *	136,33 ± 0,94*
3	106,90 ± 0,50	129,50 ± 6,03 *	120,57 ± 0,59 *	127,77 ± 2,68*

Os dados representam a média ± E.P.M. (* p<0,05).

Tabela 3: Pressão de Perfusão Renal (mmHg) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL , 1 µg/mL e 3 µg/mL.



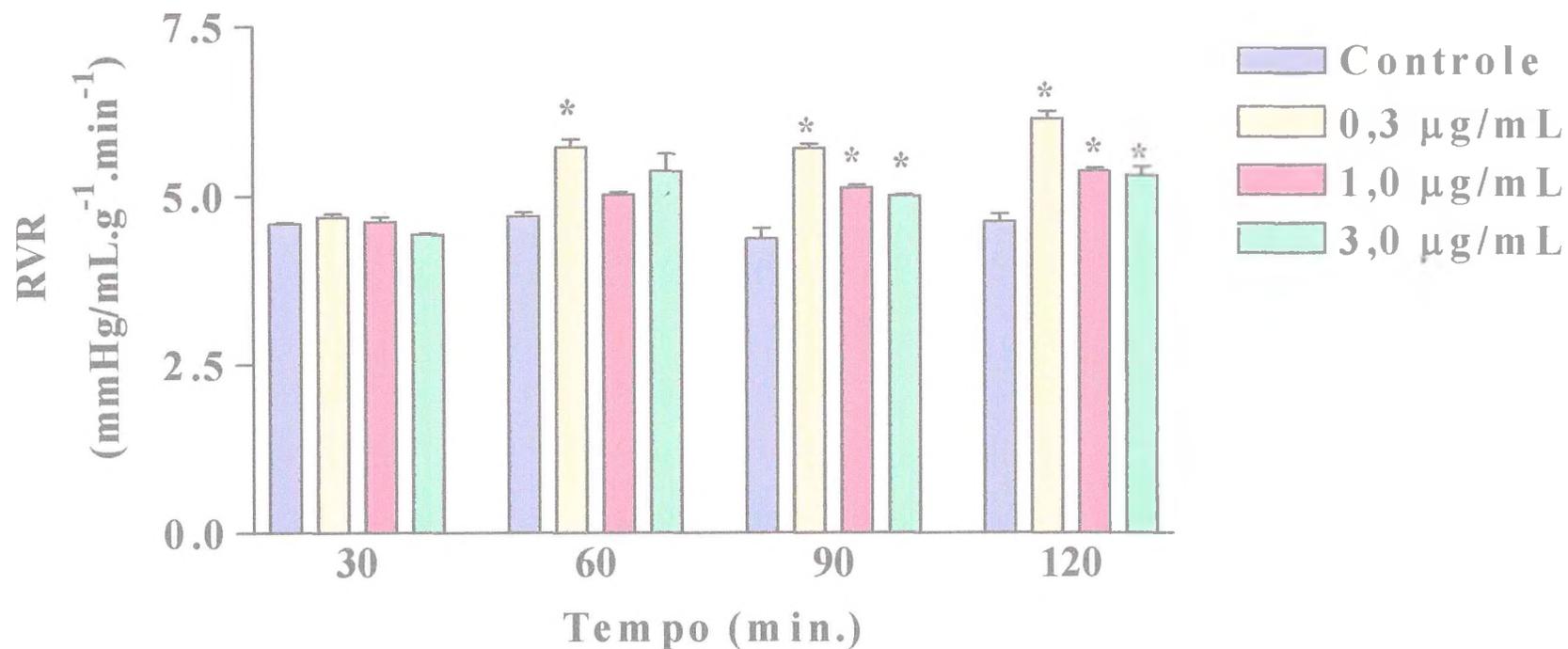
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). PP = pressão de perfusão. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 18 - Pressão de Perfusão (mmHg) na ausência ($n=6$) e presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	4,59 ± 0,02	4,70 ± 0,06	4,36 ± 0,16	4,62 ± 0,11
0,3	4,69 ± 0,05	5,72 ± 0,12 *	5,70 ± 0,07 *	6,14 ± 0,11 *
1	4,62 ± 0,07	5,02 ± 0,04	5,12 ± 0,04 *	5,37 ± 0,04 *
3	4,43 ± 0,02	5,37 ± 0,25	5,00 ± 0,02 *	5,31 ± 0,12 *

Os dados representam a média ± E.P.M.(*p<0,05).

Tabela 4: Resistência Vascular Renal ($\text{mmHg/ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.



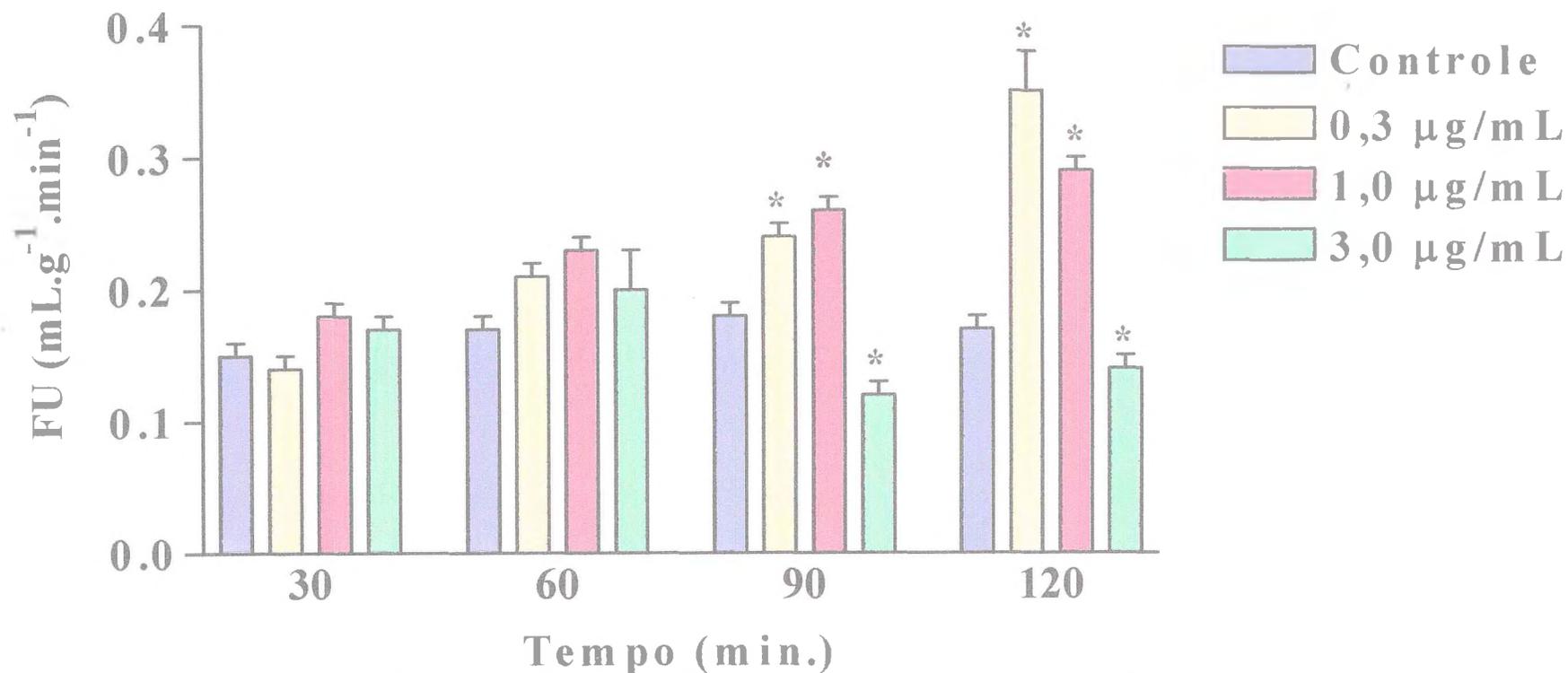
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). RVR = resistência vascular renal. * = diferença estatística em relação ao grupo controle

Figura 19 - Resistência Vascular Renal ($\text{mmHg}/\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de $0,3\mu\text{g}/\text{mL}$, $1\mu\text{g}/\text{mL}$ e $3\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01
0,3	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01 *	0,35 ± 0,03 *
1	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01 *	0,29 ± 0,01 *
3	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,12 ± 0,01 *	0,14 ± 0,01 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (* p<0,05).

Tabela 5: Fluxo Urinário ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.



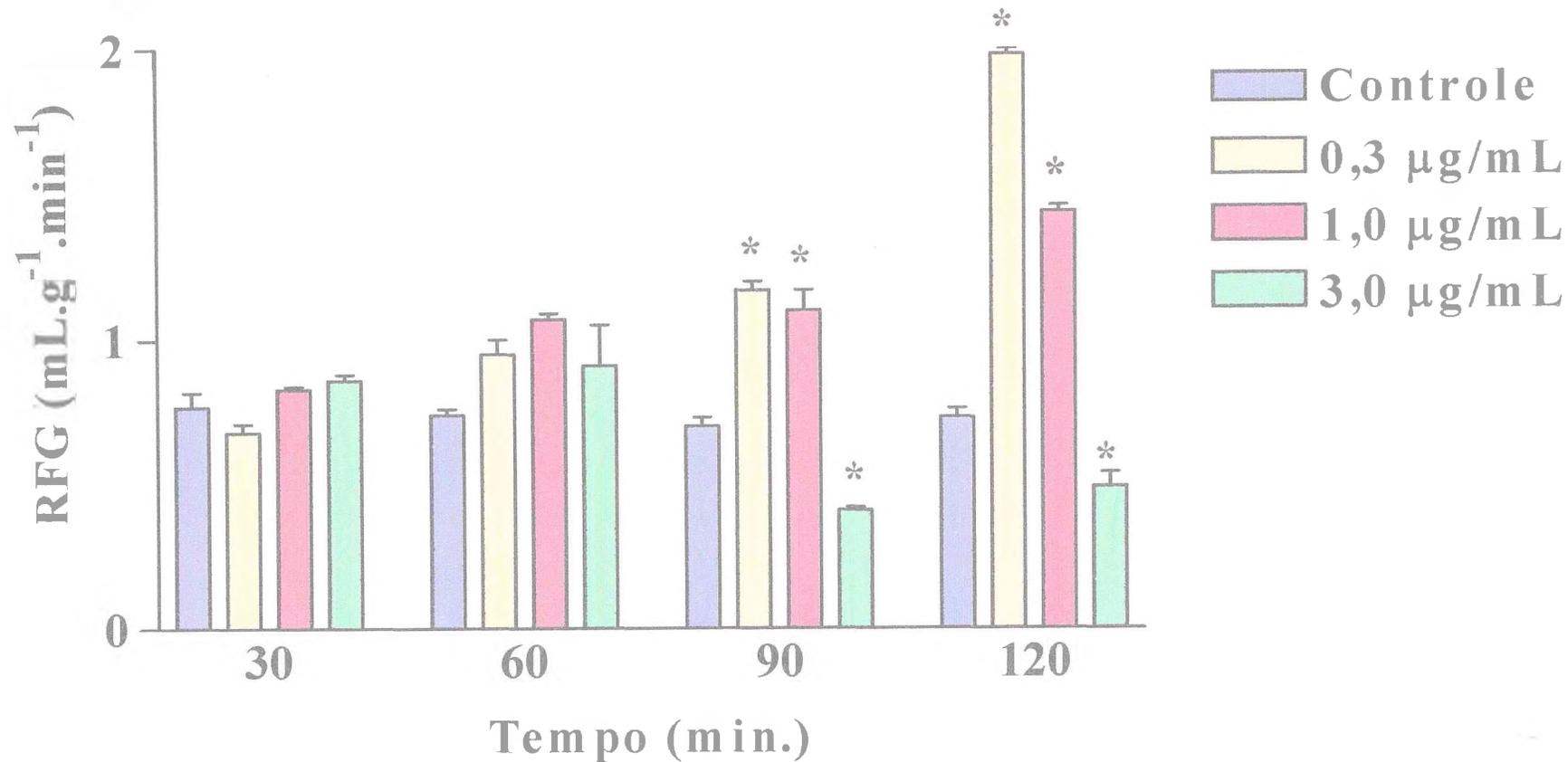
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). FU = Fluxo urinário. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 20 - Fluxo Urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de $0,3\mu\text{g/mL}$, $1\mu\text{g/mL}$ e $3\mu\text{g/mL}$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	0,77 ± 0,05	0,74 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,73 ± 0,03
0,3	0,68 ± 0,03	0,95 ± 0,05	1,17 ± 0,03 *	1,98 ± 0,20 *
1	0,83 ± 0,01	1,07 ± 0,02	1,10 ± 0,07 *	1,44 ± 0,02 *
3	0,86 ± 0,02	0,91 ± 0,14	0,41 ± 0,01 *	0,49 ± 0,05 *

Os dados representam a média ± E.P.M.(*p<0,05).

Tabela 6: Ritmo de Filtração Glomerular ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.



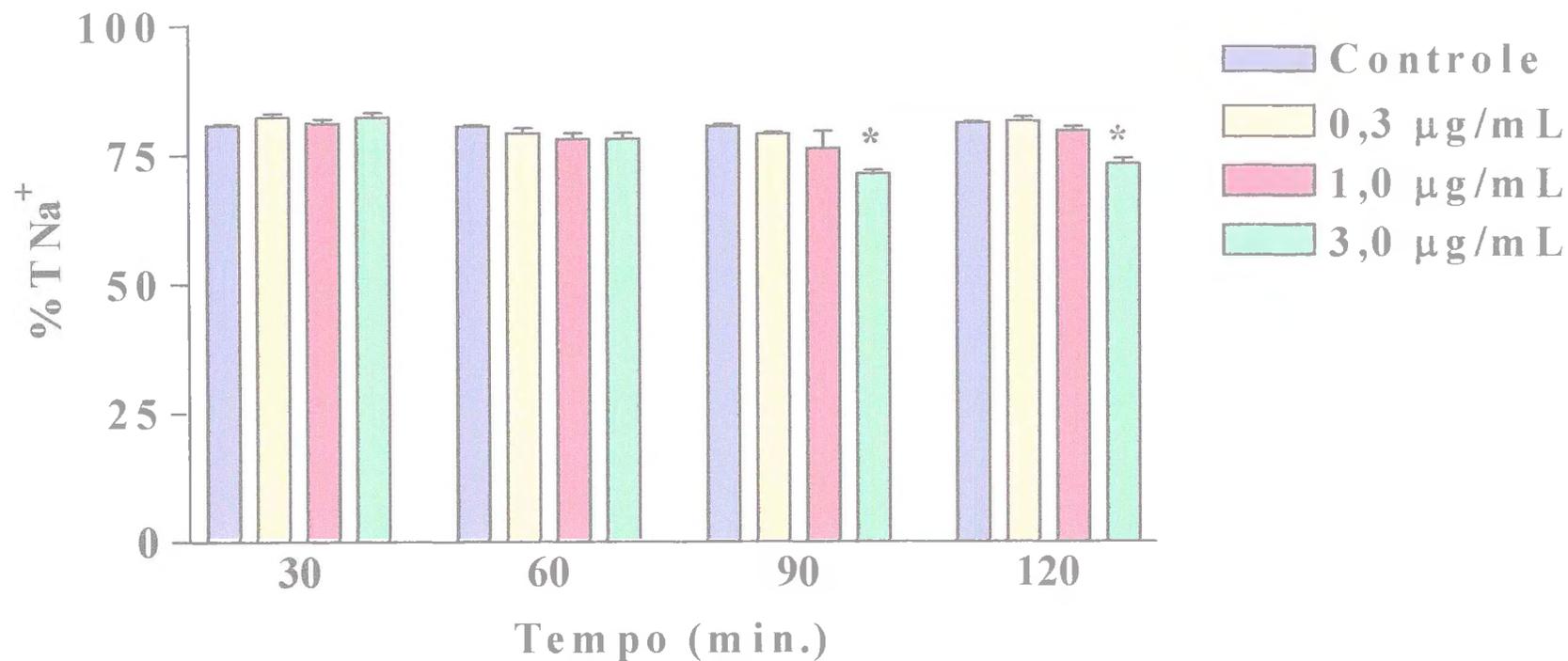
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). RFG= ritmo de filtração glomerular. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 21 - Ritmo de Filtração Glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	80,66 ± 0,25	80,52 ± 0,26	80,52 ± 0,32	81,15 ± 0,20
0,3	82,23 ± 0,72	79,09 ± 1,05	78,92 ± 0,37	81,47 ± 0,72
1,0	81,11 ± 0,86	78,04 ± 1,18	76,16 ± 3,34	79,49 ± 0,87
3,0	82,22 ± 0,90	78,04 ± 1,18	71,29 ± 0,64 *	73,10 ± 1,07 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (* p<0,05).

Tabela 7: Percentual do Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



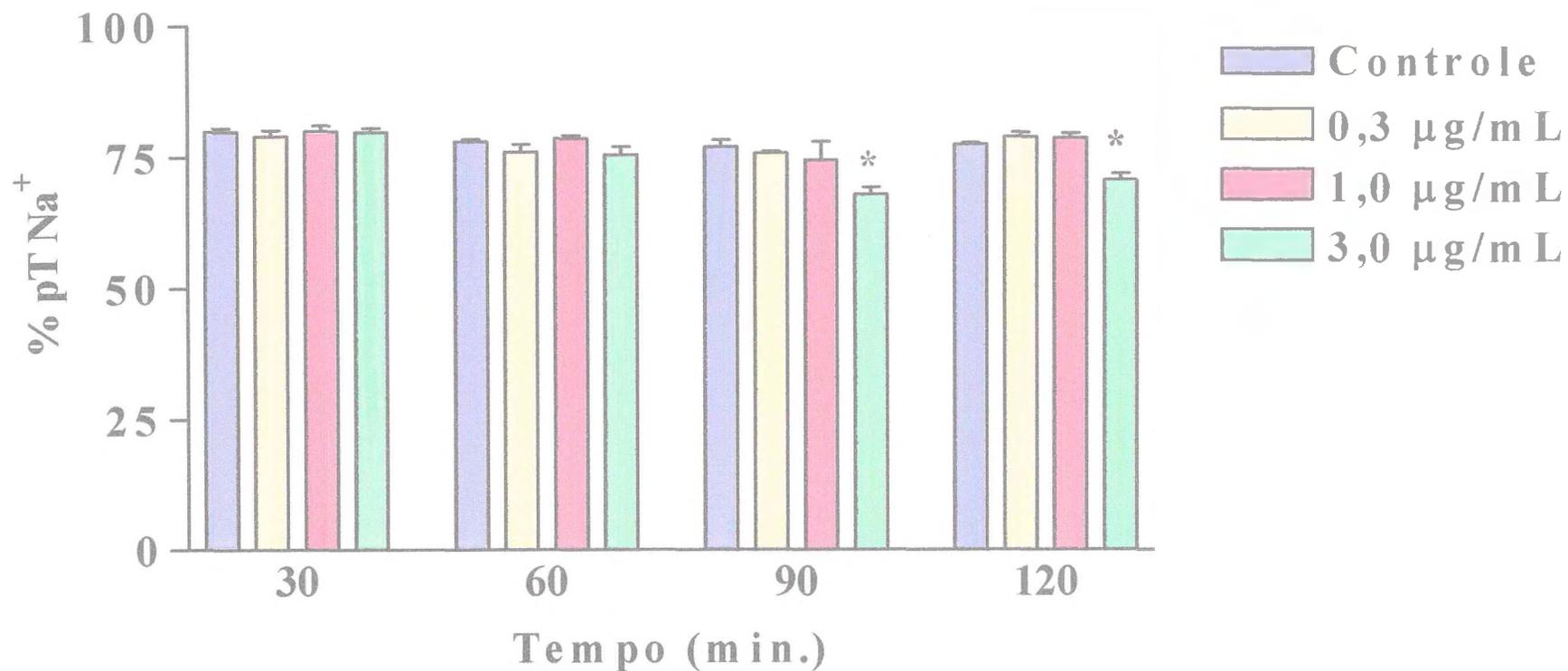
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%TNa⁺) = percentual de transporte tubular de sódio . * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 22 - Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL , 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	79,82 ± 0,74	77,97 ± 0,46	76,90 ± 1,38	77,41 ± 0,25
0,3	78,96 ± 1,19	76,00 ± 1,47	75,73 ± 0,39	78,83 ± 0,86
1	79,96 ± 1,03	78,55 ± 0,54	74,44 ± 3,46	78,64 ± 0,88
3	79,77 ± 0,75	75,47 ± 1,43	67,91 ± 1,36 *	70,66 ± 1,17 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

Tabela 8: Percentual do Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



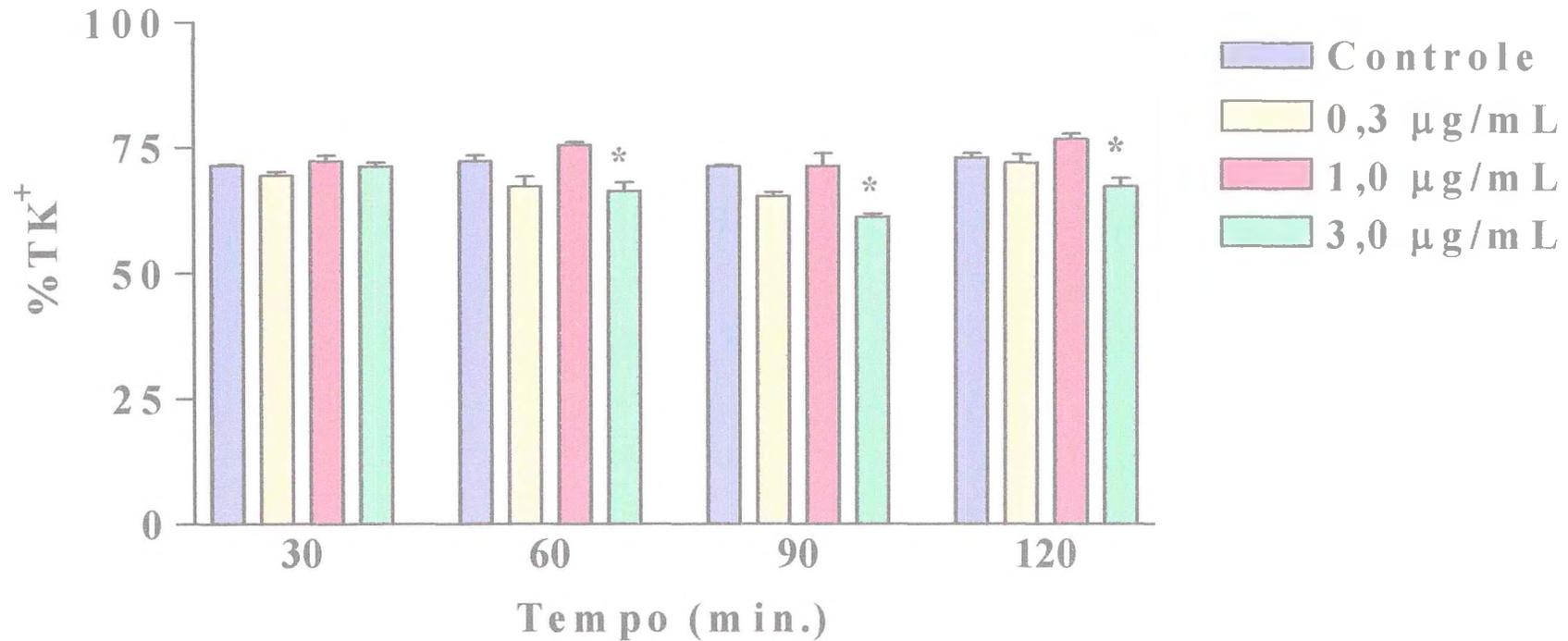
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%pTNa⁺) = percentual de transporte tubular de sódio . * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 23- Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	71,44 ± 0,21	72,23 ± 1,23	71,22 ± 0,27	72,90 ± 0,84
0,3	69,47 ± 0,75	67,23 ± 1,94	65,26 ± 0,84	71,90 ± 1,69
1	72,29 ± 1,12	75,41 ± 0,65	71,23 ± 2,55	76,62 ± 1,04
3	71,29 ± 0,74	66,32 ± 1,69 *	61,14 ± 0,64 *	67,22 ± 1,63 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 9: Percentual do Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



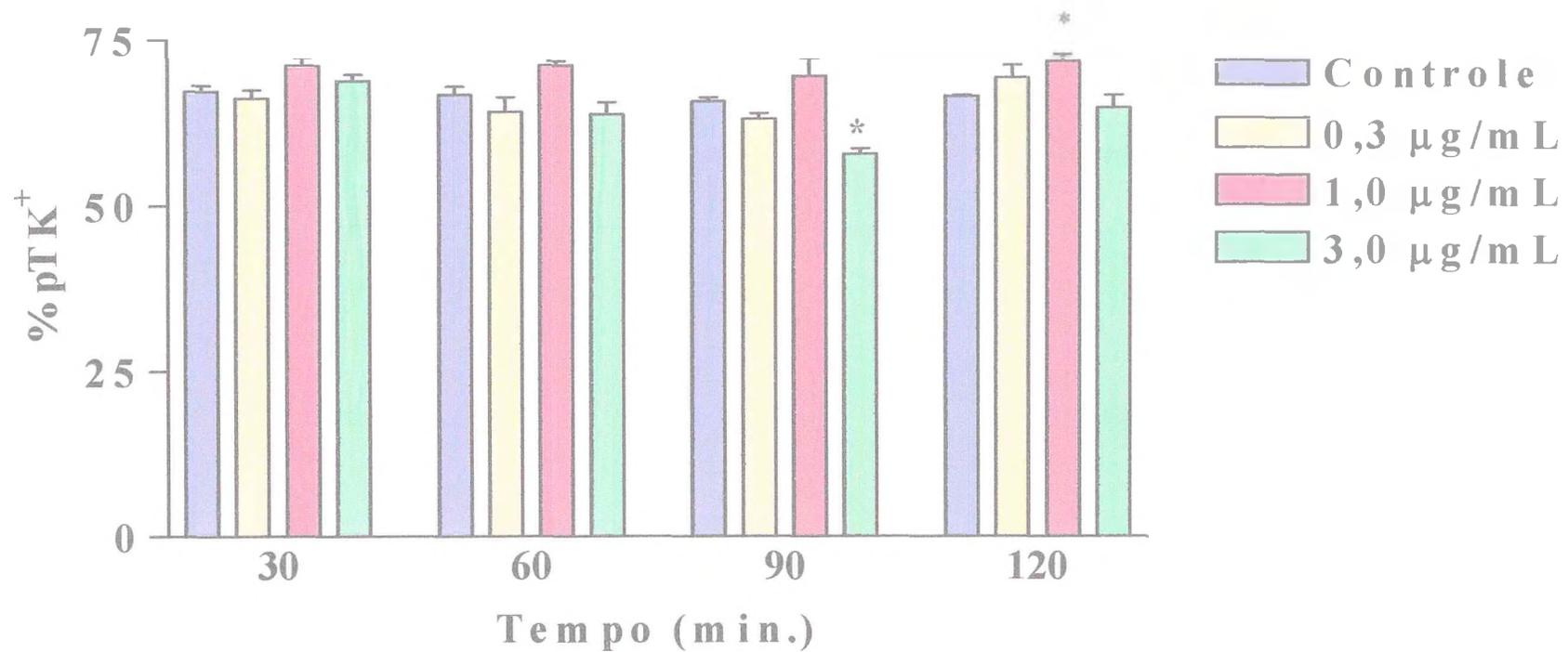
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%TK⁺) = percentual de transporte tubular de potássio * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 24 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL , 1µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	67,28 ± 0,86	66,71 ± 1,23	65,70 ± 0,61	66,44 ± 0,21
0,3	66,20 ± 1,24	64,13 ± 2,20	63,11 ± 0,80	69,27 ± 1,87
1	71,14 ± 1,23	74,14 ± 0,63	69,51 ± 2,68	75,77 ± 1,03 *
3	68,84 ± 0,92	63,75 ± 1,86	57,76 ± 0,83 *	64,79 ± 1,83

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 10: Percentual do Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



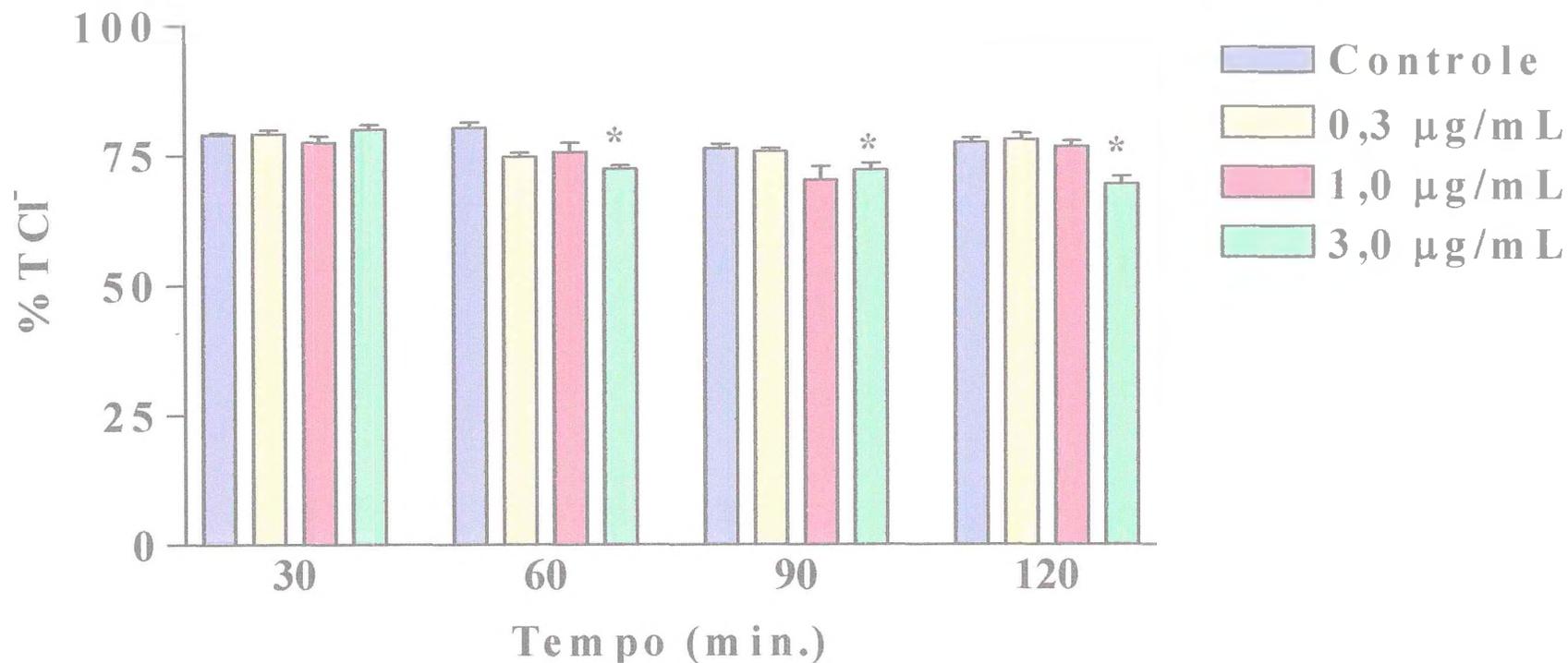
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%pTK⁺) = percentual de transporte tubular proximal de potássio * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 25 - Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK⁺) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	78,90 ± 0,34	80,25 ± 1,08	76,32 ± 0,90	77,53 ± 0,81
0,3	79,13 ± 0,72	74,76 ± 0,79	75,76 ± 0,57	78,11 ± 1,14
1	77,40 ± 1,26	75,66 ± 1,80	70,25 ± 2,65	76,72 ± 1,02
3	79,95 ± 0,93	72,45 ± 0,65 *	72,22 ± 1,26 *	69,49 ± 1,53 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 11: Percentual do Transporte Tubular Cloro (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



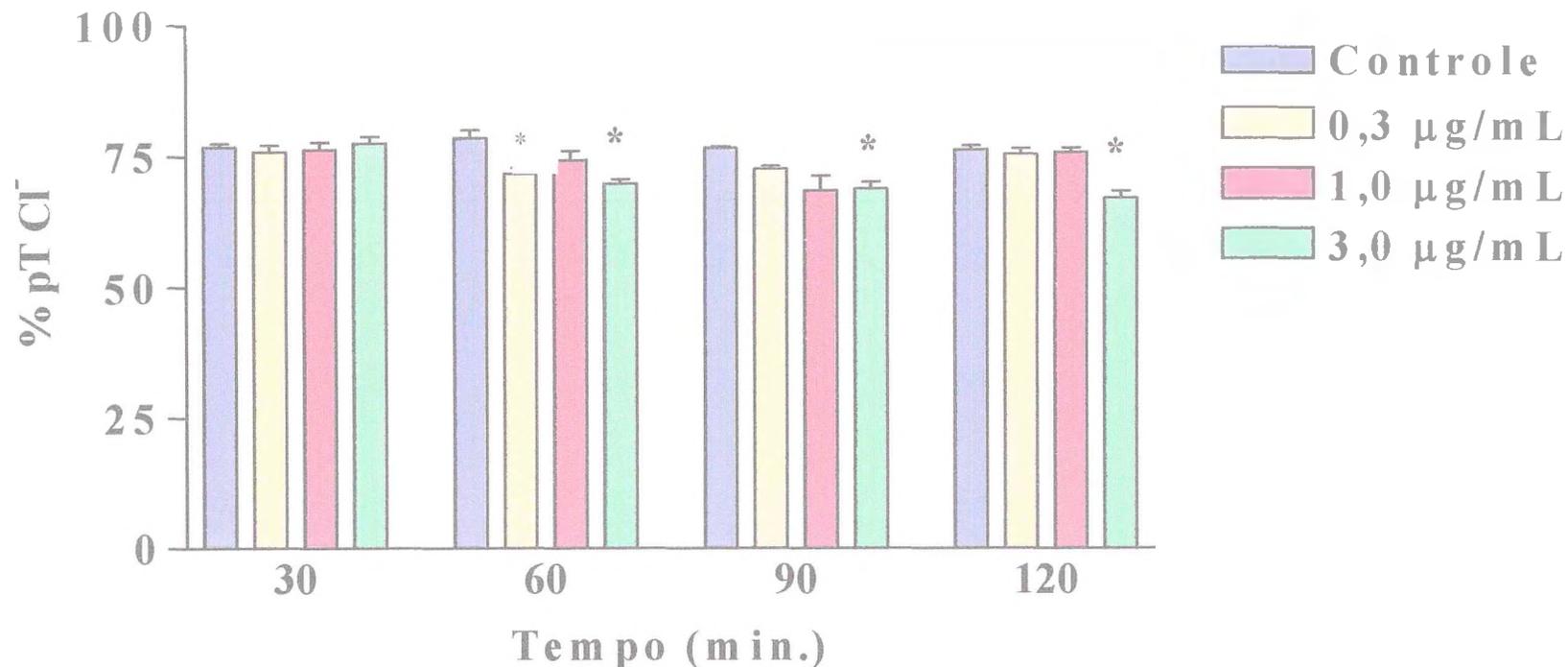
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%TCl⁻) = percentual de transporte tubular de cloro * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 26 - Percentual de Transporte Tubular de Cloro (%TCl⁻) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3µg/mL , 1 µg/ml e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	76,81 ± 0,65	78,50 ± 1,54	76,58 ± 0,35	76,36 ± 0,78
0,3	75,86 ± 1,23	71,66 ± 1,16 *	72,57 ± 0,60	75,47 ± 1,08
1	76,25 ± 1,40	74,39 ± 1,69	68,53 ± 2,78	75,87 ± 0,84
3	77,50 ± 1,26	69,88 ± 0,81 *	68,81 ± 1,34 *	67,06 ± 1,39 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 12: Percentual do Transporte Tubular Proximal de Cloro (%pTCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



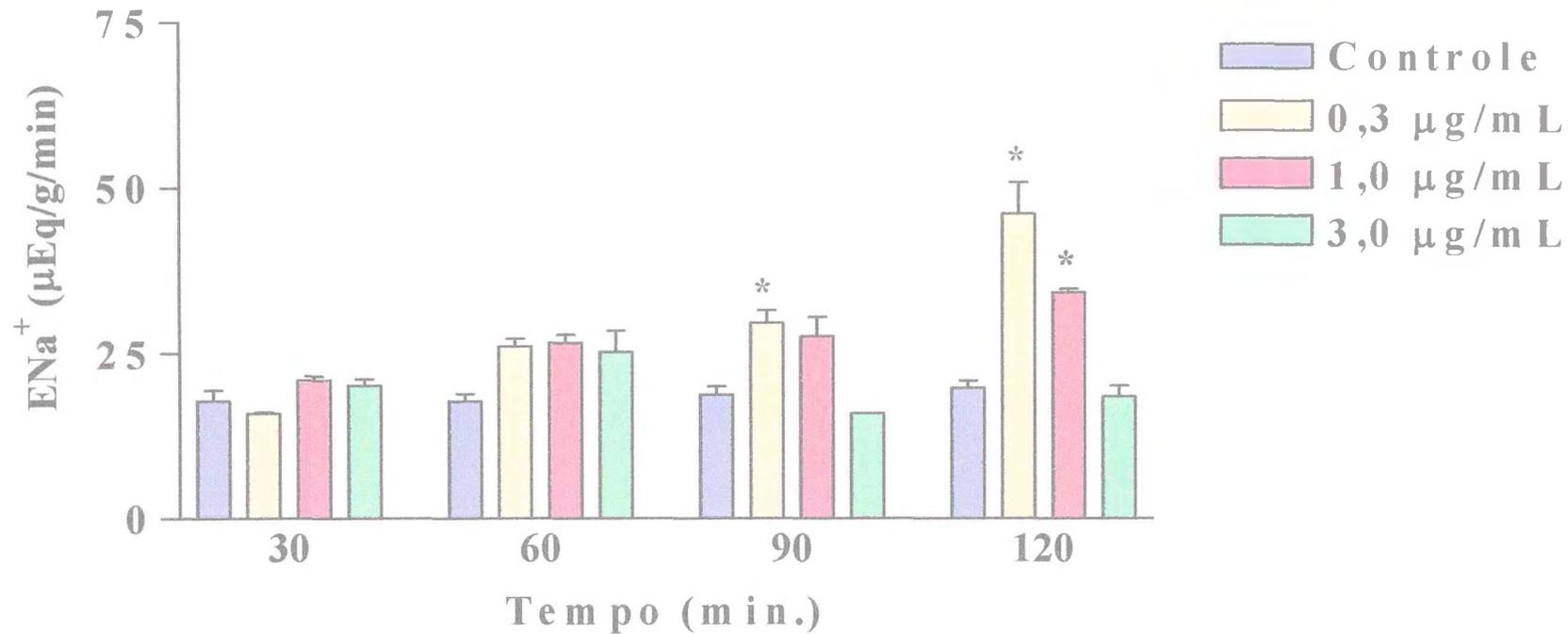
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). (%pTCl⁻) = percentual de transporte tubular proximal de cloro. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 27- Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloro (%pTCl⁻) na ausência (n=6) e na presença (n=6) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	17,81 ± 1,59	17,74 ± 1,12	18,76 ± 1,21	19,74 ± 1,09
0,3	15,87 ± 0,23	26,04 ± 1,12	29,54 ± 1,93 *	46,09 ± 4,74 *
1	20,93 ± 0,60	26,54 ± 1,24	27,58 ± 2,93	34,18 ± 0,57 *
3	20,10 ± 0,99	25,23 ± 3,19	15,83 ± 0,06	18,44 ± 1,60

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 13: Excreção de Sódio ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



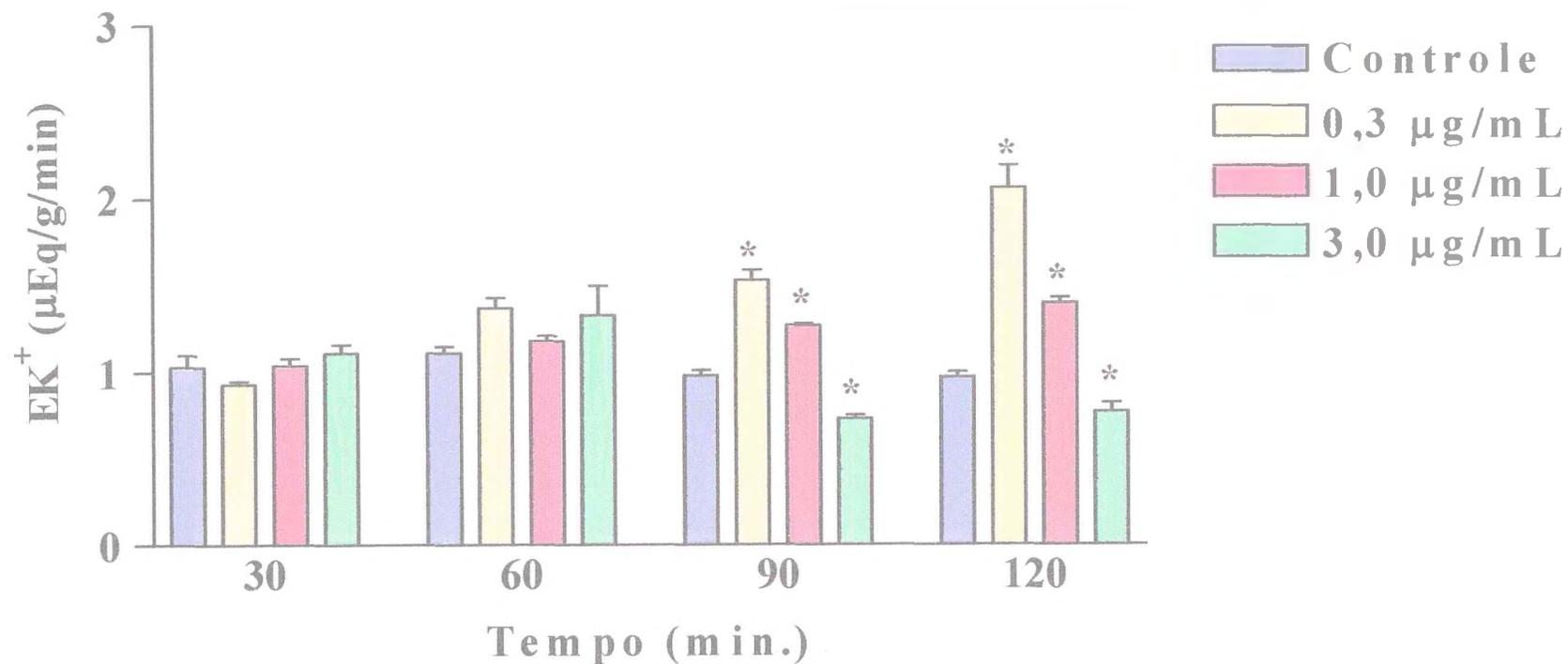
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). ENa^+ = Sódio excretado. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 28 - Sódio Excretado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	1,03 ± 0,07	1,11 ± 0,04	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,03
0.3	0,93 ± 0,02	1,37 ± 0,06	1,53 ± 0,06 *	2,06 ± 0,13 *
1	1,04 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,27 ± 0,01 *	1,40 ± 0,03 *
3	1,11 ± 0,05	1,33 ± 0,17	0,73 ± 0,02 *	0,77 ± 0,05 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 14: Excreção de Potássio ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



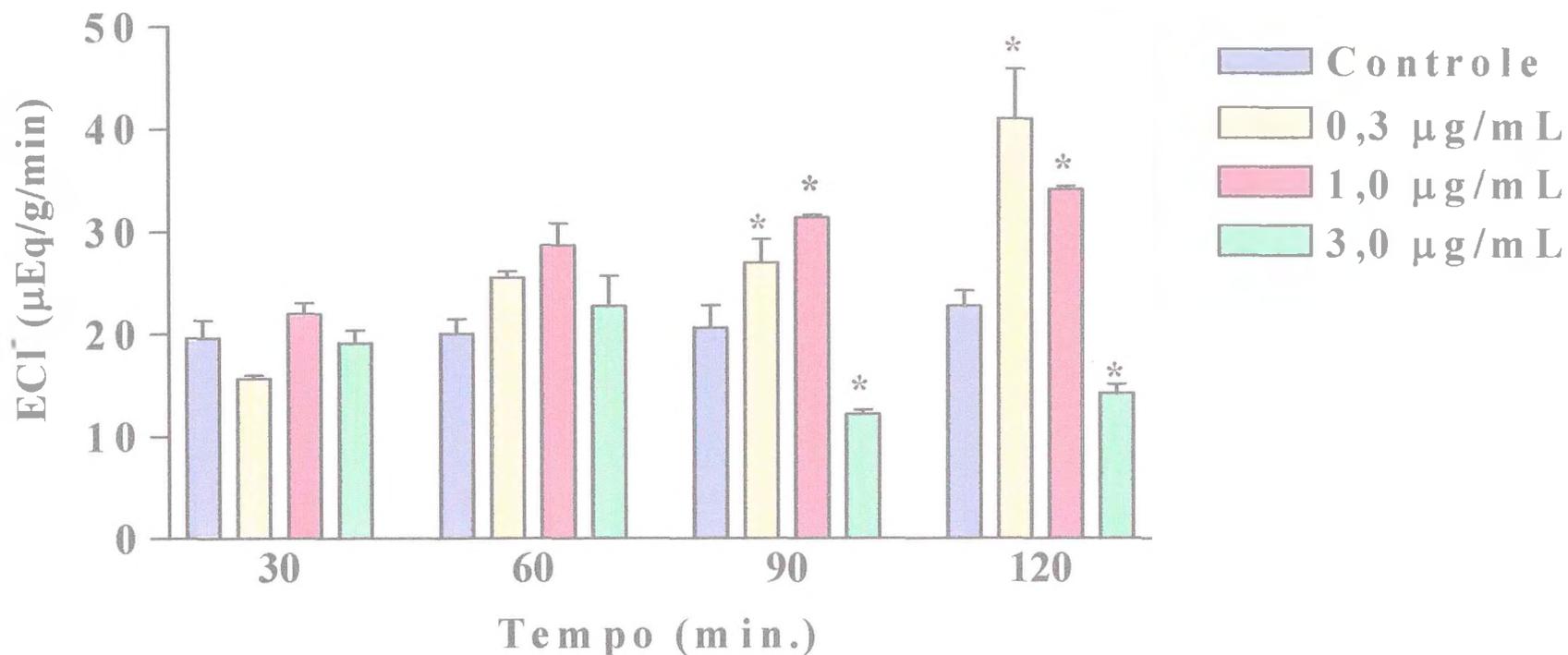
Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). EK^+ = potássio excretado. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 29 - Potássio Excretado ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu g/mL$, 1 $\mu g/mL$ e 3 $\mu g/mL$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	19,60 ± 1,73	20,05 ± 1,39	20,64 ± 2,15	22,70 ± 1,52
0,3	15,62 ± 0,32	25,48 ± 0,66	26,97 ± 2,30 *	41,02 ± 4,85 *
1	21,95 ± 1,07	28,69 ± 2,10	31,37 ± 0,24 *	34,12 ± 0,32 *
3	19,10 ± 1,27	22,72 ± 2,96	12,17 ± 0,41 *	14,19 ± 0,87 *

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 15: Excreção de Cloro ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



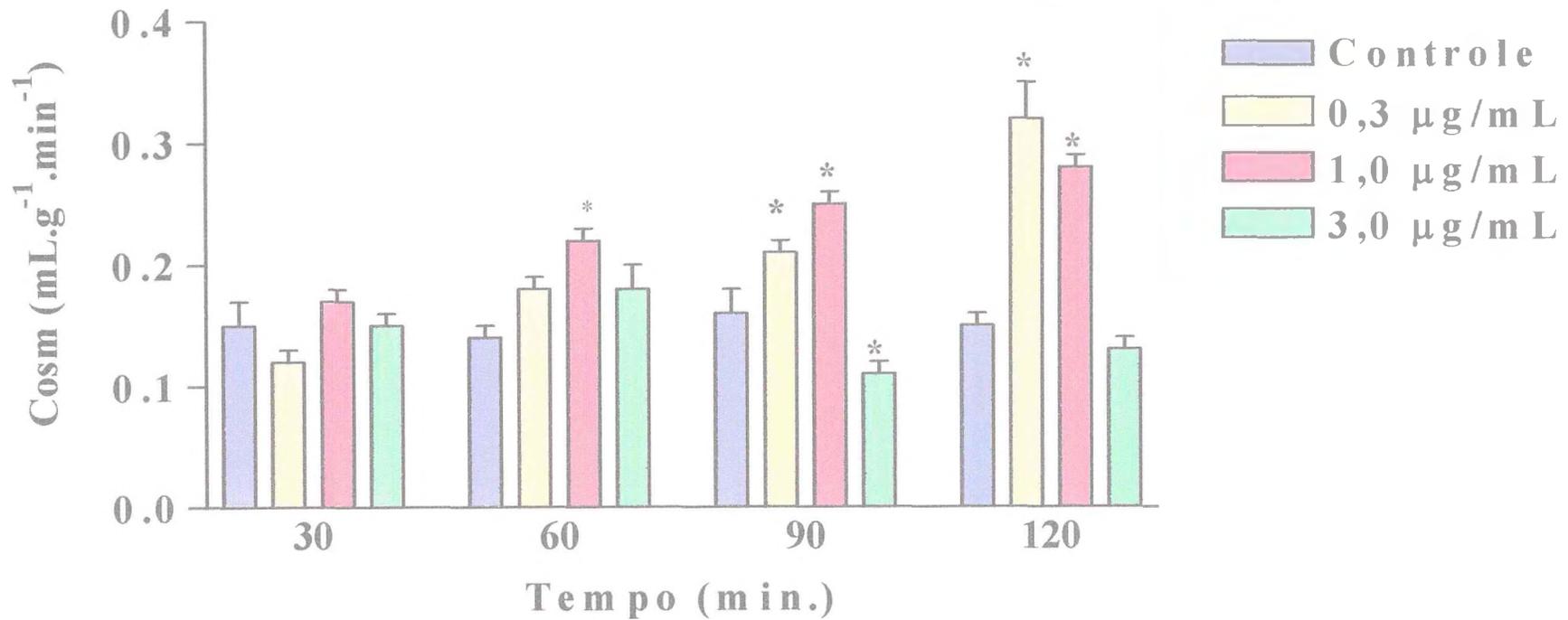
Dados apresentados por média ± EPM ($p < 0,05$). ECI^- = Cloro excretado. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 30- Cloro Excretado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de $0,3\mu\text{g/mL}$, $1\mu\text{g/mL}$ e $3\mu\text{g/mL}$.

Tempo	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01
0,3	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,01 *	0,32 ± 0,03 *
1	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,01 *	0,25 ± 0,01 *	0,28 ± 0,01 *
3	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,01 *	0,13 ± 0,01

Os dados representam a média ± E.P.M. (*p<0,05).

TABELA 16: Clearance Osmótico (ml.g⁻¹.min⁻¹) nos grupos controle (n=6) e tratados com o veneno (n=6) do peixe *T. nattereri* nas concentrações de 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL.



Dados apresentados por média \pm EPM ($p < 0,05$). Cosm = clearance osmótico. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

Figura 31 - Clearance Osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) na ausência ($n=6$) e na presença ($n=6$) do veneno do *Thalassophryne nattereri* nas concentrações de $0,3 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ e $3 \mu\text{g/mL}$.

4.3. Avaliação histológica

Na análise histológica dos rins de animais pertencentes ao grupo controle, foi observado uma pequena quantidade de material protéico nos túbulos renais. Não foi encontrada qualquer alteração no espaço urinário (Figura 33).

Após a perfusão com o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* os rins apresentaram uma quantidade moderada de material protéico nos túbulos renais e no espaço urinário. Nos túbulos renais foram encontrados cilindros eosinofílicos, mas não foi encontrado qualquer anormalidade a nível de vasos e interstício (Figuras 34 a 44).

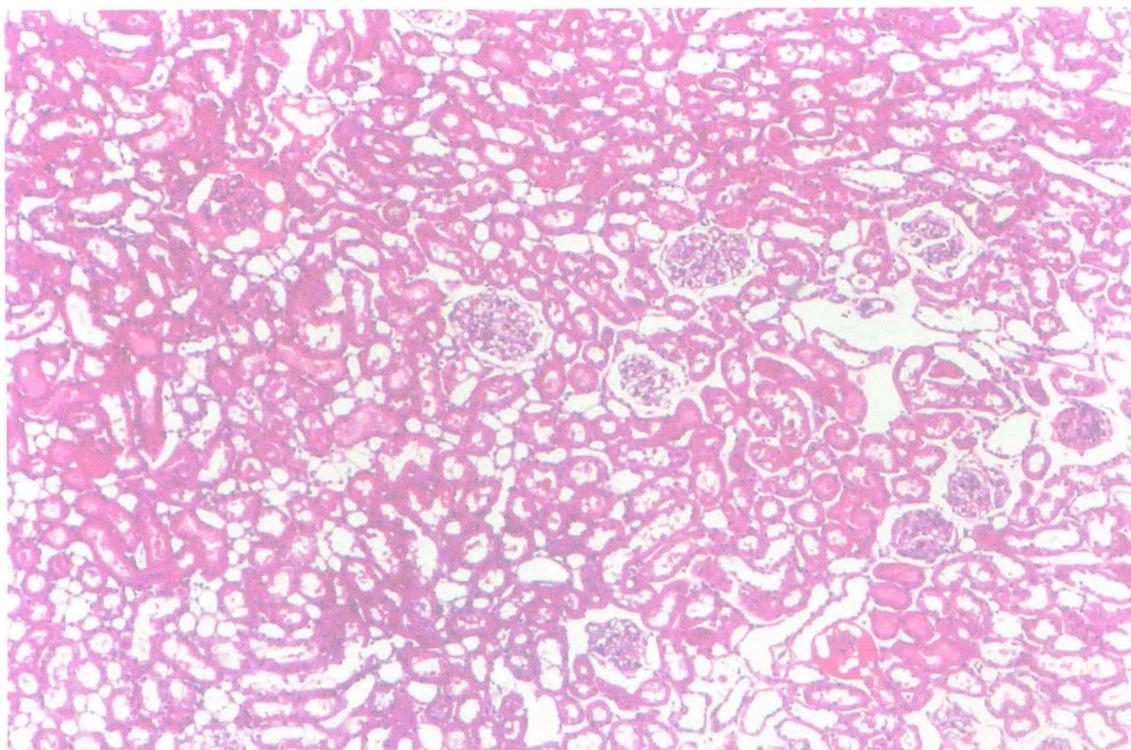


Figura 32 – Avaliação histológica de rins perfundidos somente com solução Krebs-Henseleit modificada (MKHS) - controle. Observar uma pequena quantidade de material protéico nos túbulos renais. H.E. (X 40)

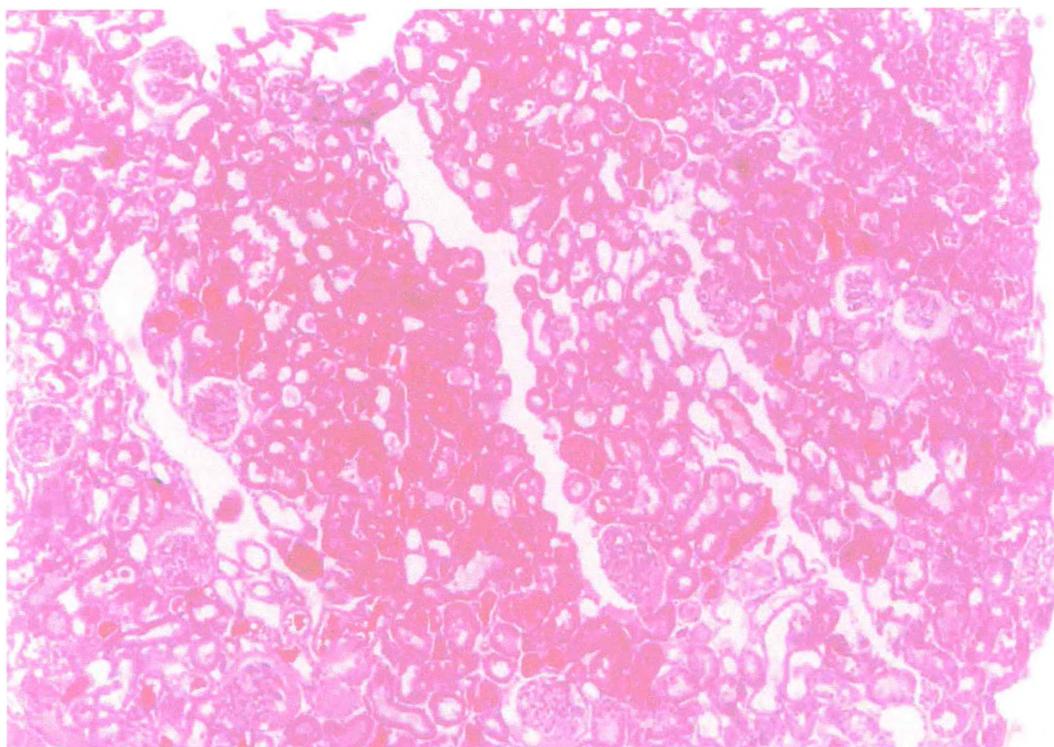


Figura 33– Avaliação histológica dos rins perfundidos com 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno do *T. nattereri* mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos glomérulos e túbulos renais. H.E. (X 40)

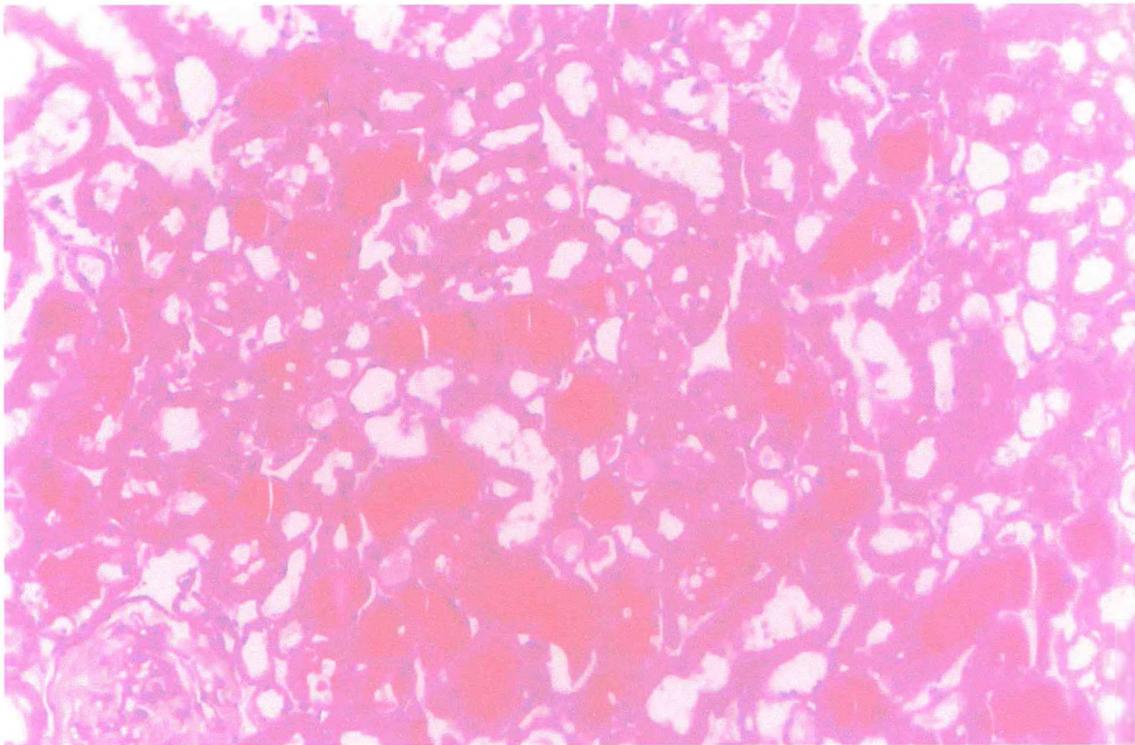


Figura 34 – Avaliação histológica dos rins perfundidos com 0,3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos túbulos renais (cilindros eosinofílicos). H.E. (X 100)

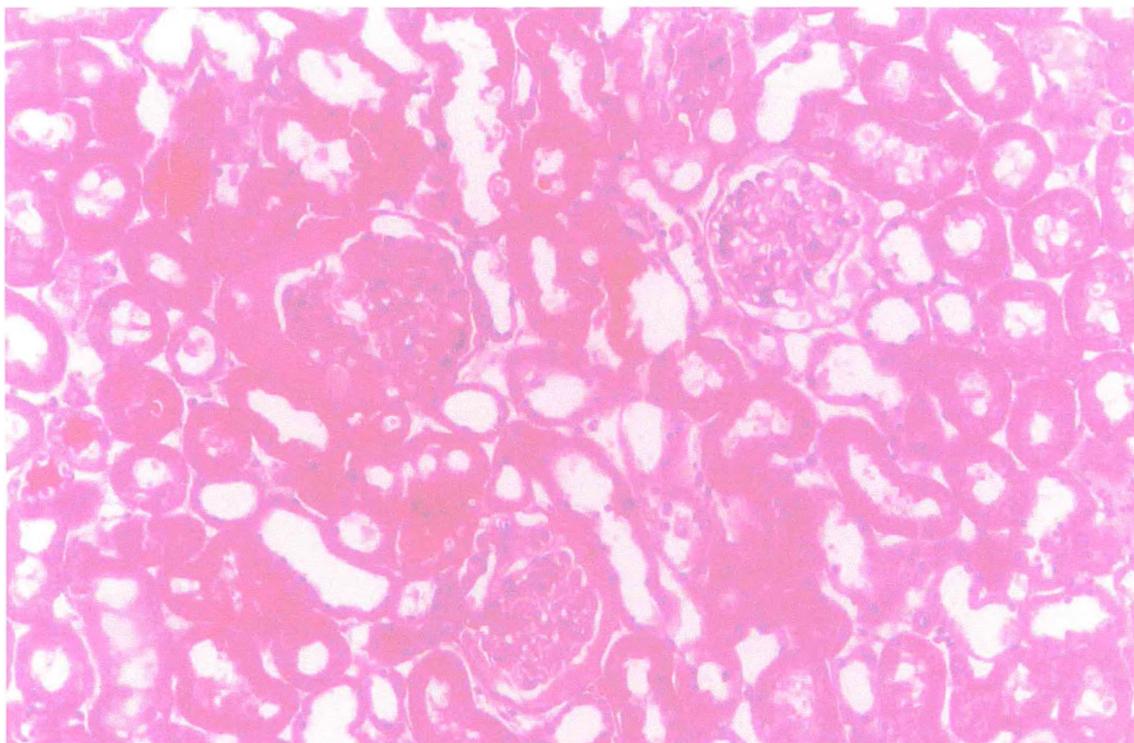


Figura 35 – Avaliação histológica dos rins perfundidos com 0,3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos glomérulos. H.E (X 100)

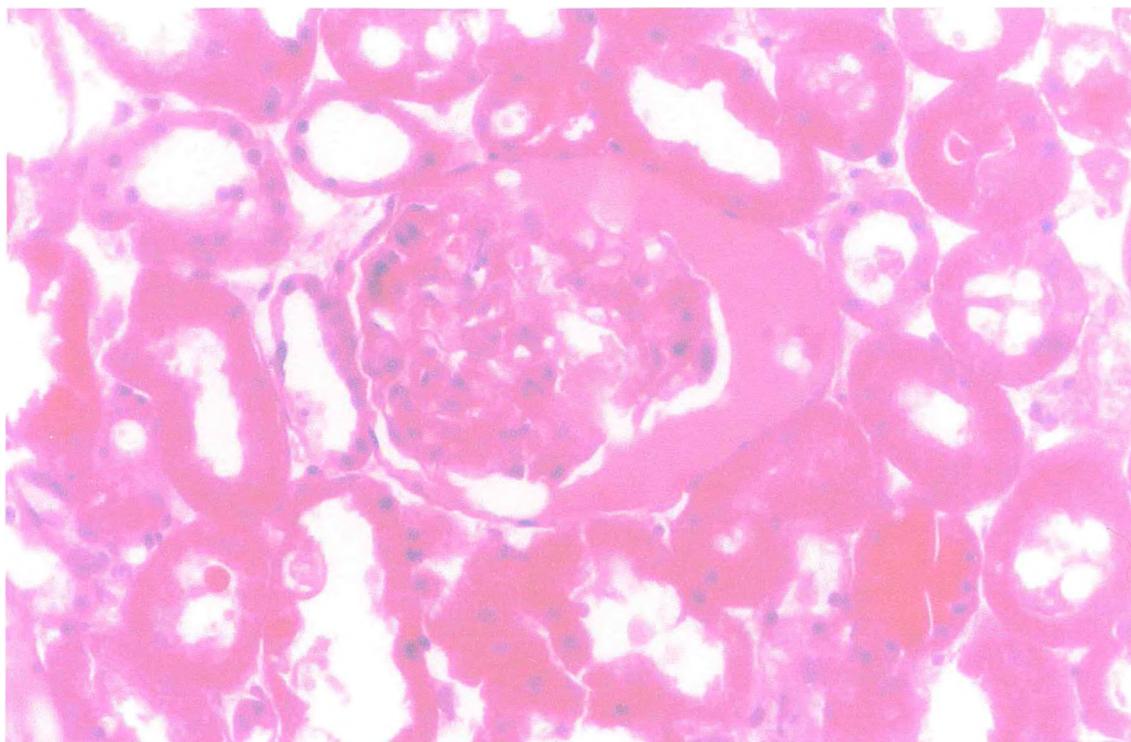


Figura 36– Avaliação histológica dos rins perfundidos com 0,3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando uma moderada quantidade de material protéico nos glomérulos. H.E. (X 200)

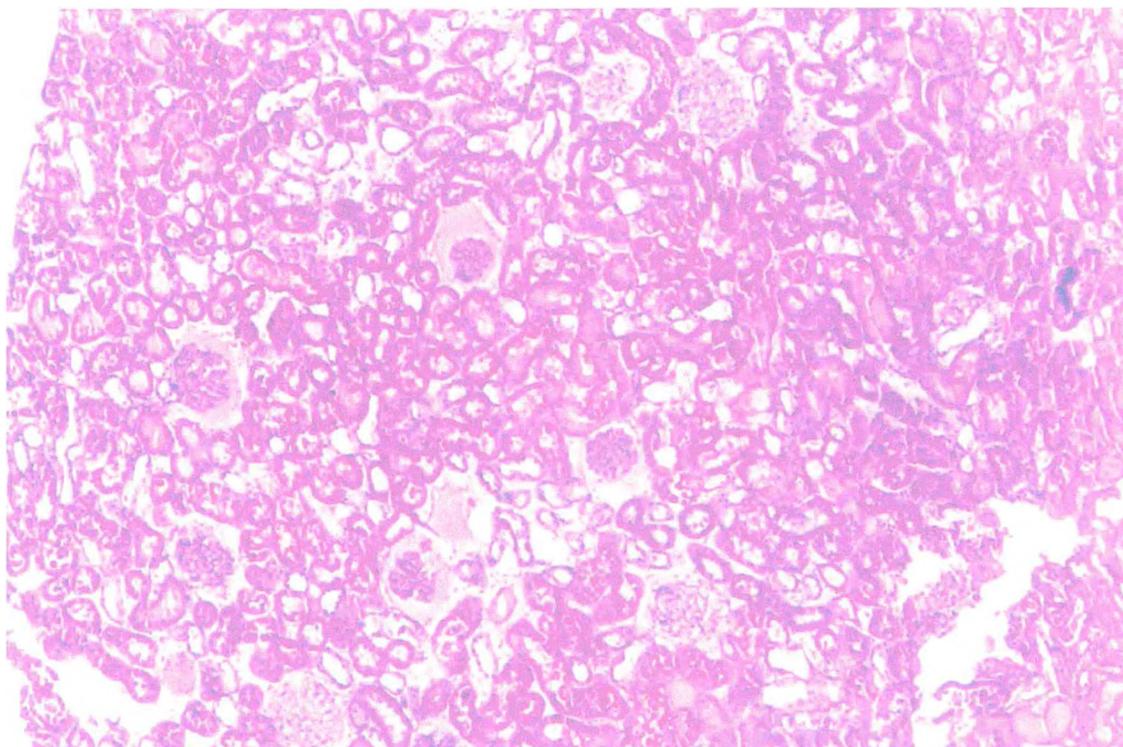


Figura 37 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno do *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico no espaço urinário e túbulos renais. H.E. (X 40)

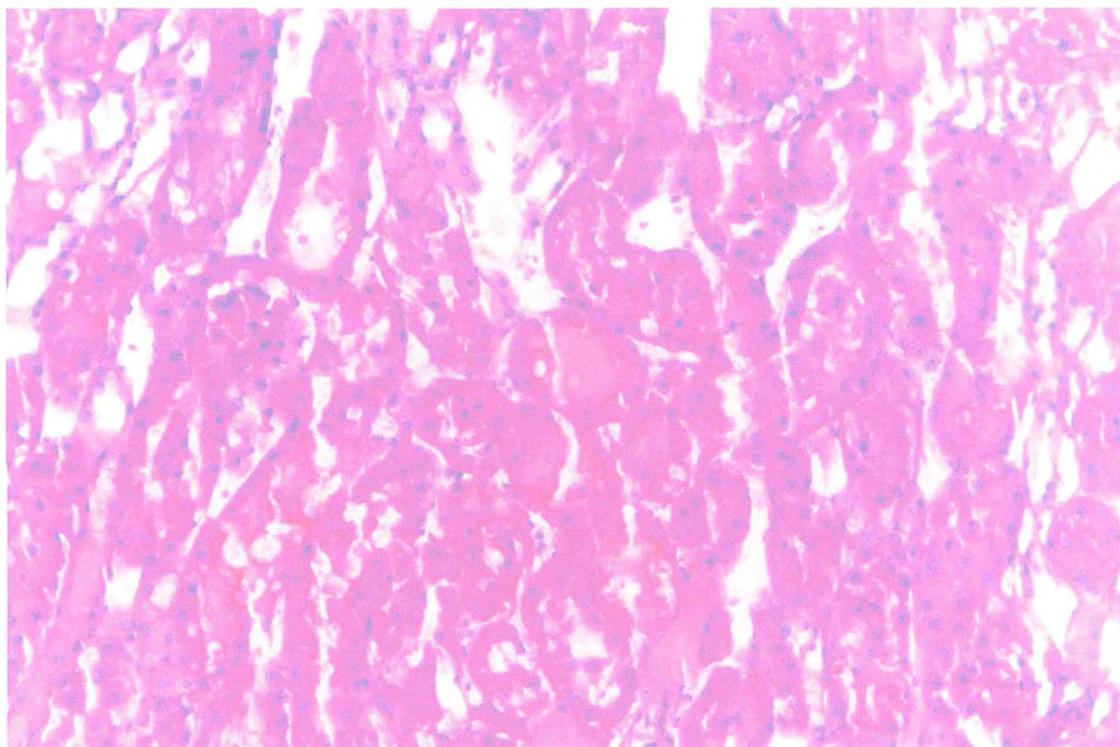


Figura 38 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos renais (cilindros eosinofílicos). H.E. (X 100)

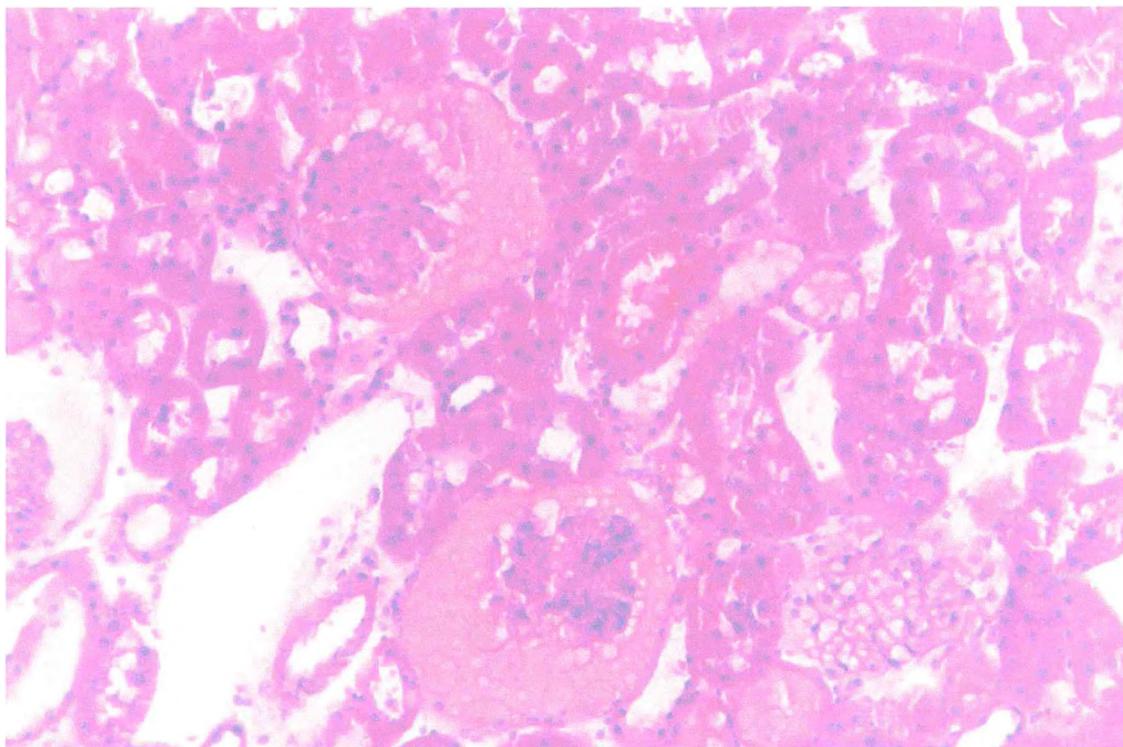


Figura 39 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos e glomérulos. H.E (X 100)

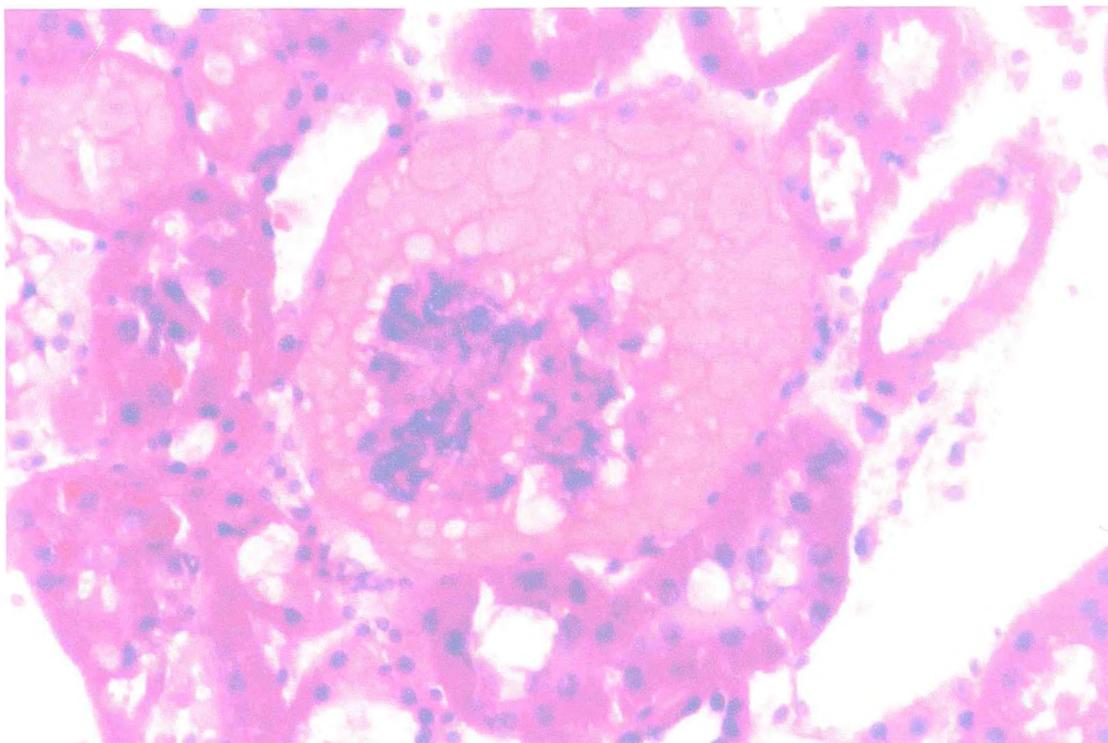


Figura 40 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de veneno do *T. nattereri* mostrando um glomérulo com depósito de material protéico. H.E. (x 200)

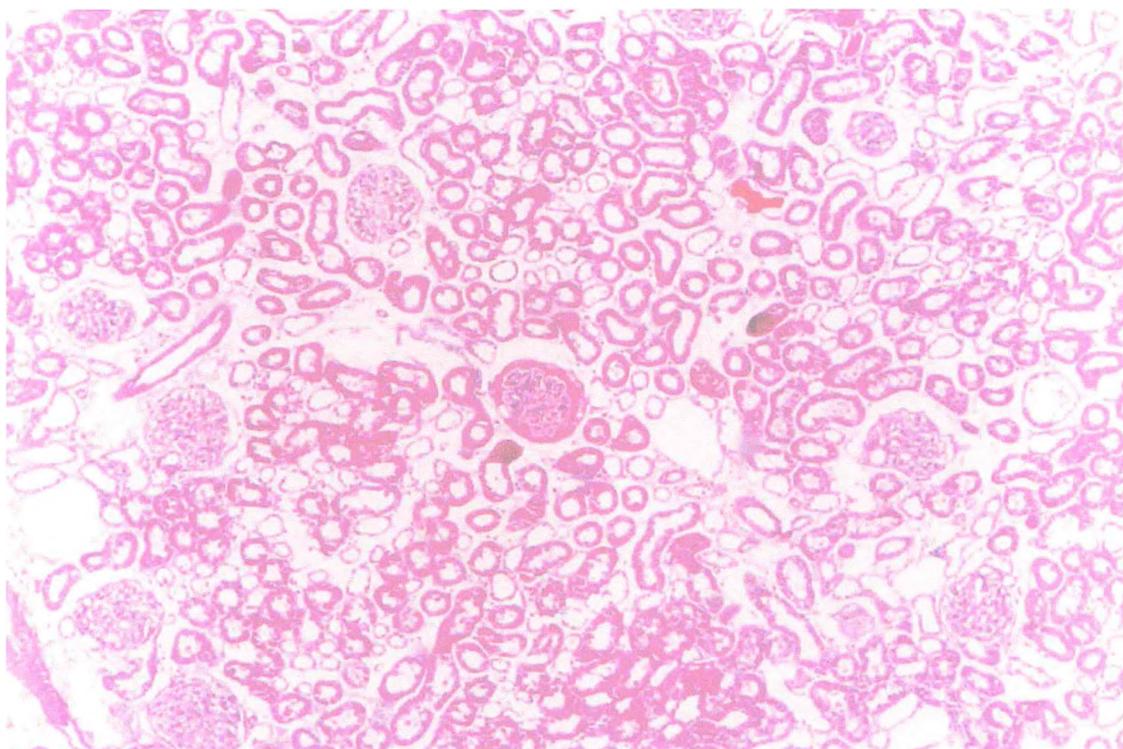


Figura 41 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando um depósito moderado de material protéico nos túbulos renais e espaço urinário. H.E. (X 40)

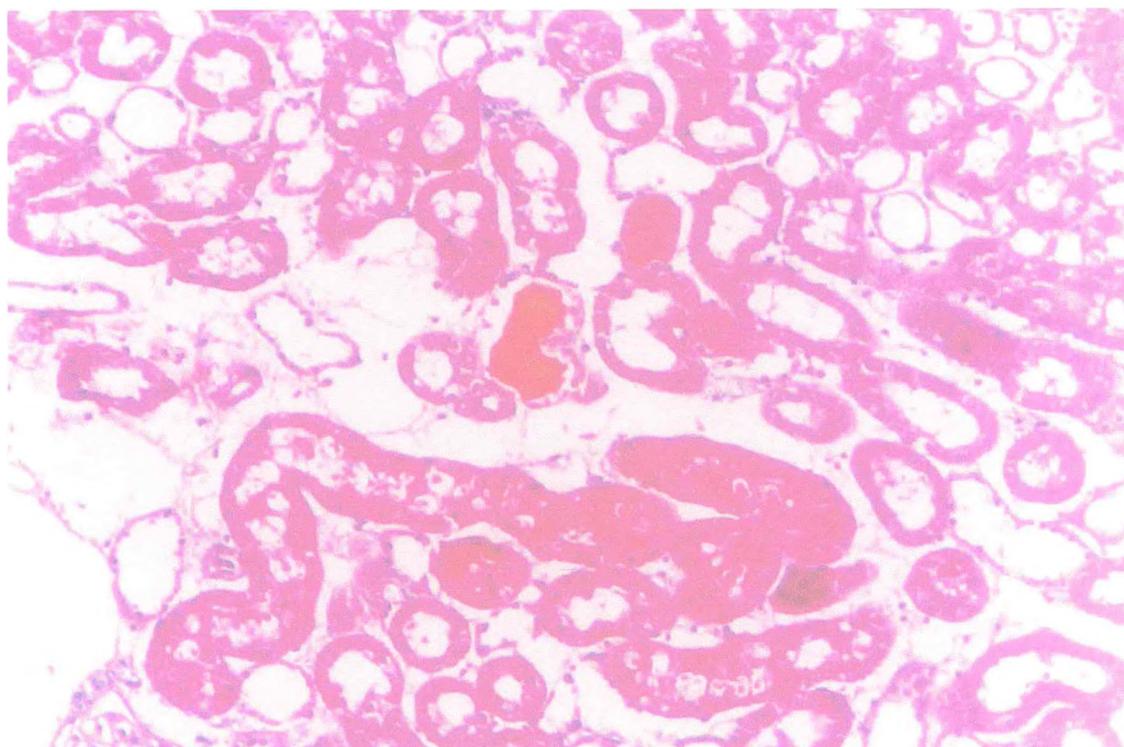


Figura 42 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando uma quantidade moderada de material protéico nos túbulos renais. H.E (X 100)

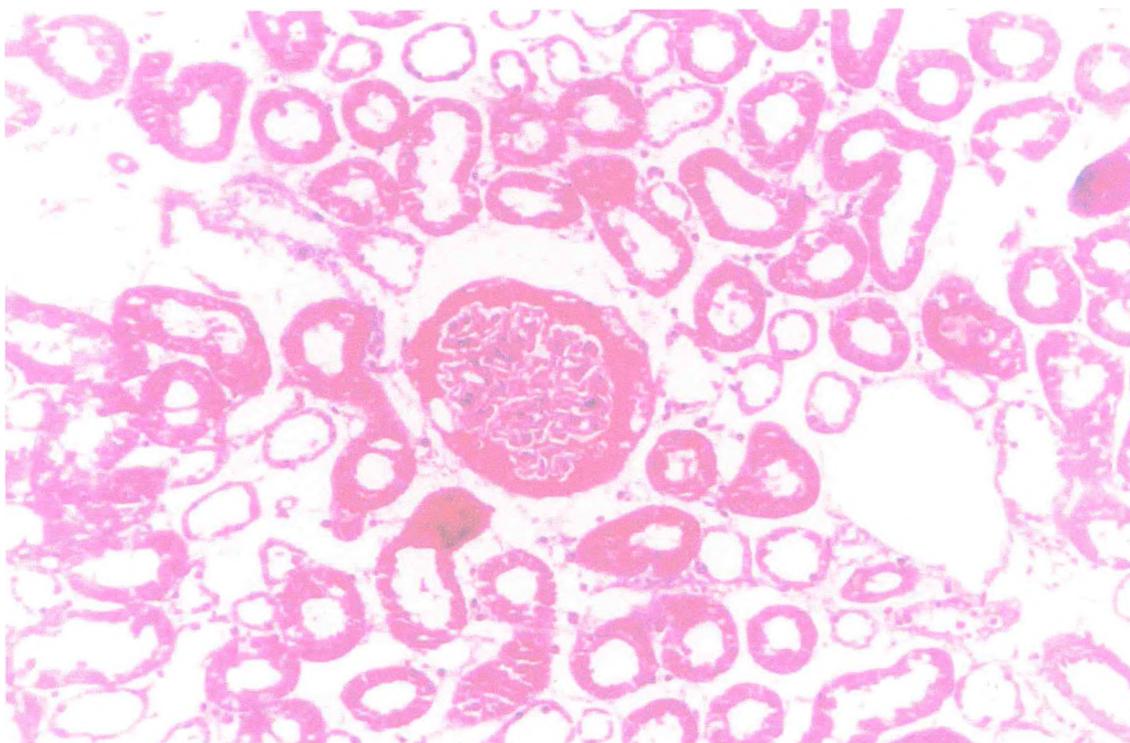


Figura 43 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno do *T. nattereri* mostrando uma quantidade moderada de material protéico nos glomérulos e túbulos renais. H.E (X 100)

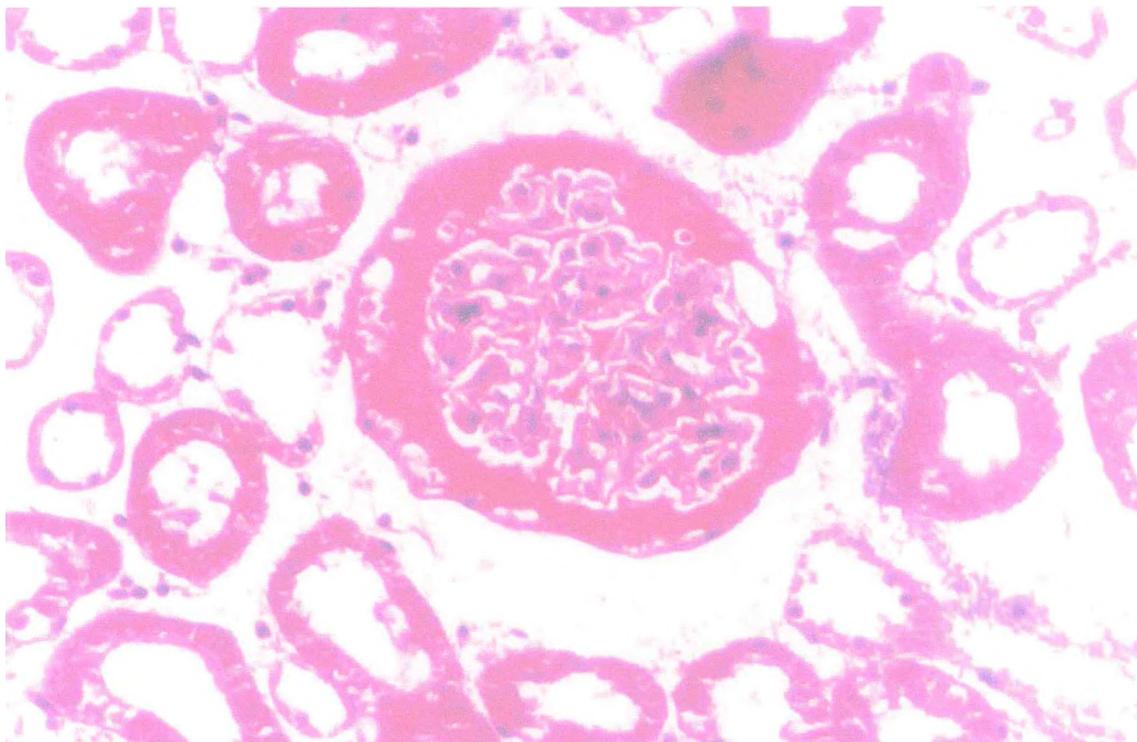


Figura 44 – Avaliação histológica de rins perfundidos com 3 µg/mL de veneno do *T. nattereri* mostrando uma quantidade moderada de material protéico no glomérulo e túbulos renais. H.E. (X 200)

DISCUSSÃO

O envenenamento pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (Niquim) representa um sério problema de saúde pública principalmente para pescadores, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. O veneno do *T. nattereri* ainda é pouco estudado, sendo escasso o número de trabalhos que contribuem para um melhor entendimento do mecanismo de ação do veneno e que propõem terapias para reverter o quadro de envenenamento.

A busca epidemiológica realizada no Centro de Assistência Toxicológica – CEATOX/IJF visando detectar a ocorrência do envenenamento causado pelo *T. nattereri* no estado do Ceará, registrou 16 casos entre o período de 1992 a 2002. Esse dado provavelmente deve ser mais elevado e pode estar ocorrendo subnotificação dos acidentes.

Infelizmente o problema da subnotificação nas unidades públicas de saúde do nosso Estado existe, como também em todo o país, pois apresentam na sua maioria um funcionamento precário, com servidores mal remunerados, geralmente em número insuficiente e mal treinados para o exercício de suas funções. Esse quadro ainda é mais grave no interior do Estado, favorecendo a falta de informação dos acidentes.

Um outro fator que pode estar interferindo é a não existência de um tratamento específico que reverta os efeitos do envenenamento, fazendo com que as pessoas acidentadas não procurem as unidades de saúde, como foi constatado em um município do interior do Estado, chamado Fortim onde existe o peixe e os pescadores da comunidade e marisqueiros sabem

que não adianta procurar o serviço de saúde em caso de acidente a não ser quando ocorre infecção secundária.

Com relação ao sexo, sabe-se que a participação dos homens no ramo da pesca ainda é muito forte, sendo observado que 94% dos casos de envenenamento eram do sexo masculino.

Quanto à avaliação da faixa etária, 75% dos pacientes apresentavam entre 21 e 40 anos de idade, sendo nessa faixa que ocorre uma maior concentração da força de trabalho pois, nas comunidades pesqueiras, os trabalhadores retiram do mar, rios e lagoas o sustento de suas famílias.

No que se refere ao tempo de exposição, onde é informado o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, 31,25% dos acidentados não conseguiram dar essa informação, provavelmente devido ao estresse agudo causado pelo trauma do acidente. Os demais acidentados ficaram distribuídos em três grupos: 25% levaram de 1 a 5 horas; 18,75% de 6 a 12 horas e 25% mais de 12 horas.

As manifestações clínicas mais observadas foram dor e edema local, estando presentes também isquemia, paralisia local, equimose e sensação de queimação na pele.

O tratamento dos casos consistiu na sua maioria de anti-inflamatórios e analgésicos, sendo utilizado em alguns casos anestésicos, água morna, lavagem cirúrgica e anti-histamínicos. Em 75% dos casos

observou-se cura confirmada, em 12,5% ocorreu cura não confirmada e em 12,5% dos casos a evolução foi ignorada.

O veneno causa um forte efeito local como dor intensa, edema e necrose. Experimentos realizados com modelos animais causaram letalidade, edema, nocicepção e necrose (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998), demonstrando que o veneno do Niquim produziu inflamação, semelhante a sintomatologia observada nos acidentes humanos. Contudo, letalidade não foi descrita nos envenenamentos humanos, provavelmente devido às baixas doses de veneno inoculadas em relação ao peso das vítimas.

A inflamação funciona como um fator protetor que atua na diluição, remoção ou destruição do agente tóxico (Gallin *et al.*, 1988). Em alguns acidentes com animais venenosos, os sinais inflamatórios podem evoluir rapidamente para necrose, que pode debilitar a vítima e causar importantes seqüelas (Lopes-Ferreira *et al.*, 2000).

Os rins são os principais responsáveis pela excreção e troca de eletrólitos do sangue. Eles são responsáveis pela hemodinâmica renal e pela função excretora (Harris *et al.*, 2001). Os efeitos do veneno do peixe *T. nattereri* na fisiologia renal não tinham sido testados até agora. Esta dissertação teve como objetivos pesquisar os acidentes humanos ocorridos no período de 1992 a 2002 no estado do Ceará e avaliar as alterações renais causadas pelo veneno do Niquim no método de rim isolado de rato, como

também correlacionar possíveis alterações histológicas e funcionais do rim após exposição ao veneno do *T. nattereri*.

Foram testadas três diferentes doses do veneno do Niquim (0,3 , 1 e 3 $\mu\text{g/ml}$) no método de rim isolado de rato e foi observado um aumento na Pressão de Perfusão (PP), na Resistência Vascular Renal (RVR), no Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) e no Fluxo Urinário (FU) nas duas primeiras doses. Contudo, o RFG, FU, o Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺), Potássio (%TK⁺), Cloro (%TCl⁻) diminuíram depois da aplicação da maior dose (3 $\mu\text{g/mL}$).

Estudos de microscopia intravital realizados com o veneno do Niquim mostraram alterações pronunciadas na hemodinâmica microvascular, representadas por depósitos de fibrina e formação de trombos seguidos por estase arteriolar parcial e venular completa (Lopes-Ferreira, *et al.*, 2002).

Kristensen e colaboradores (2000), descreveram que o endotélio intacto não é trombogênico. A injúria endotelial na linha dos microvasos pode promover eventos pró-coagulantes como ativação de plaquetas e da cascata de coagulação, resultando em trombose.

Sabe-se que o veneno do *T. nattereri* não induz hemorragia, mas causa trombose, o que, muito provavelmente, deve afetar o fluxo sangüíneo durante o processo de regeneração (Lopes-Ferreira *et al.*, 2001). Além disto, a escassez de macrófagos pode afetar o processo regenerativo, uma

vez que estas células secretam uma variedade de fatores de crescimento que modulam a replicação e diferenciação da regeneração celular (Auger & Ross, 1992).

Os aumentos na PP e na RVR, observados em nossos experimentos, não foram promovidos por eventos sistêmicos visto que trabalhamos com o método de rim isolado de rato. Lopes-Ferreira e colaboradores (2002) demonstraram que o veneno do Niquim poderia induzir lise em cultura de células endoteliais. Dessa forma, sugerimos que um efeito similar poderia ocorrer nas células endoteliais renais. A lise poderia induzir a liberação de agentes vasoativos os quais poderiam alterar os parâmetros vasculares aqui avaliados.

As células renais podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicininas, componentes do complemento e fatores de ativação plaquetária (Barraviera *et al.*, 1995; Whatly, 1989). Um importante componente do glomérulo é o mesângio. As células mesangiais exibem atividade fagocítica e secretam prostaglandinas, e a maioria delas também contém miofilamentos e podem se contrair em resposta a uma variedade de estímulos. Como as células mesangiais estão localizadas próximo dos capilares glomerulares, podem influenciar o RFG através da regulação do fluxo dos capilares sangüíneos (Koepper & Stanton, 1992). Como não foi observada qualquer alteração nas células endoteliais renais após a perfusão dos rins com o veneno do Niquim na análise microscópica, sugerimos que

as células mesangiais estão envolvidas indiretamente na liberação de alguns fatores que poderiam interferir na fisiologia renal.

Lopes-Ferreira e colaboradores (1998) descreveram que o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* é composto por toxinas de natureza protéica, as quais possuem propriedades proteolíticas e miotóxicas, mas aparentemente desprovidas de atividade fosfolipásica.

Tratamentos de pacientes com dexametazona e indometacina, antiinflamatórios esteroideal e não esteroideal, respectivamente, foram ineficientes como instrumento terapêutico. Talvez o sistema calicreína-cininogênio-cinina esteja envolvido no caso de ictismo estudado, pois a potenciação das respostas nociceptiva e edematogênica pelo captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina e a ineficiência dos antiinflamatórios clássicos em reverter o quadro de envenenamento foram descritos em estudos recentes e pode estar relacionado a uma série de processos fisiopatológicos (Lopes-Ferreira *et al.*, 2000).

Alguns tratamentos domésticos descritos na literatura consistem em colocar o membro afetado em água quente, a uma temperatura tão alta quanto o paciente possa suportar (Halstead, 1971). Lopes-Ferreira (2000) comprovou a termolabilidade do veneno do Niquim que, aquecido a 56°C por 60 min, sofria a destruição de suas atividades biológicas.

Kini e Iwanaga (1986) mostraram que a atividade da fosfolipase A₂ não é essencial para a ação farmacológica das miotoxinas. Eles

sugeriram que as miotoxinas que não apresentam atividade fosfolipásica poderiam causar algum dano através da desorganização da bicamada lipídica e conseqüentemente afetar o influxo de cálcio promovendo mionecrose.

Barbosa e colaboradores (2002) testaram a miotoxina I oriunda do veneno da *Bothrops moojeni*, a qual não apresenta atividade da PLA₂, no método de rim isolado de rato. Eles mostraram aumentos na PP, RVR, FU, RFG e reduções nos %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻. Talvez a presença da miotoxina sem atividade da PLA₂ no veneno do *Thalassophryne nattereri* poderia promover todas as alterações observadas neste trabalho.

Acreditamos que os resultados apresentados neste trabalho possam contribuir para alertar as autoridades da área de saúde em nosso Estado no sentido de tornar mais eficiente o sistema de informação dos acidentes de animais marinhos e propiciar um maior esclarecimento das alterações causadas pelo envenenamento por *T. nattereri*.

CONCLUSÕES

- A partir do levantamento de prontuários (CEATOX-IJF/CE) de pacientes acidentados pelo peixe *T. nattereri* descrevemos pela primeira vez a ocorrência destes acidentes no Estado do Ceará, com predominância nas praias da região metropolitana de Fortaleza.

- Os casos de ictismo estudados mostraram-se relativamente freqüentes em nossa região, atingindo principalmente a população economicamente ativa (pescadores, catadores de mariscos e banhistas). O tratamento, ainda que apenas sintomático, deve ser instituído rapidamente, afim de que se evitem as possíveis complicações.

- O veneno do *Thalassophryne nattereri* alterou a fisiologia renal interferindo principalmente nos parâmetros vasculares. Provavelmente, estes resultados foram promovidos por agentes miotóxicos ou por um efeito direto do veneno nas células renais causando a liberação de fatores vasoativos que poderiam aumentar a pressão de perfusão e a resistência vascular renal e causar uma diminuição no transporte de eletrólitos em altas concentrações de veneno.

REFERÊNCIAS

Almeida, V. G., Rocha, C. M., 1989. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e /ou venenosos. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* **2**, 49-51.

Auger, M. J. & Ross, J.A., 1992. The biology of the macrophage. In: Lewis C.E. & McGee, J.O.D. (eds) *The Macrophage*. Oxford: IRL Press.

Auto, H. F., 1992. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. *Rev. Esc. Ciênc. Méd. de Alagoas*, **5**: 35-6.

Araújo Filho, 1995. Efeitos comparativos do Glutation (GSH) em dois modelos de solução preservadora no rim perfundido de coelho. Tese de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.

Azevedo-Marques, M. M., Cupo, P., Coimbra, T. M., Hering S. E., Rossi, M. A., Laure, C. J., 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south-America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, v.**23**, p.631-636.

Bahlmann, J., Giebisch, G. and Ochwaldt, B., 1967. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* **212**, 77-82.

Barbosa, P .S .F., Havt, A., Facó, P. E. G., Sousa, T. M., Bezerra, Fonteles, M. C., Toyama, M. H., Maragoni, S., Novello, J. C. and Monteiro, H. S. A., 2002. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* **40**(10), 1427-1435.

Barraviera, B., 1990. Curso sobre acidentes por animais peçonhentos: Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.* **64**, 14-20.

Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowiki, A., Hanson, L. A. and Meira, D. A., 1995. Acute phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops ssp.* and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins.* **1**, 11-22.

Bezerra, G.P., 2003. Epidemiologia dos acidentes pelo niquim (*Thalassophryne nattereri*) no Estado do Ceará no período de 1992 a 2002. XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém – PA.

Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A.R., Cruz-Höfling, M.A., 1999. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**, 698-706.

Bowman, R. H., 1970. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol.Chem.* **245**, 1604-1612.

Bowman, R. H. & Mack, T., 1974. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte transport in perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, **226** (2): 426-30.

Bradford, M.M.,1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.

Brasil, 1998. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, p. 91-95.

- Bulger, R. E, Dobyan D. C.,1982. Recent advances in renal morphology: *Annu Rev Physiol*, 44:147
- Cohen, J. J.; Kook, Y. J.; Little, J. R., 1977. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. *Am. J. Physiol.*, **226**:103-21.
- Collette, B. B. A review of the venomous toadfishes, subfamily *Thalassophryninae*, *Copeia*, **4**: 846-64, 1966.
- Comark, D. H., 1996. *Fundamentos da Histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 15, p. 263-276.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M. M. and Hering, S. E., 1988. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**, 924-929.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M. M., Hering, S. E., 1991. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.24, supl. 2, p.87-96.
- DeMello, G. & Maack, T., 1976. Nephron function of the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, **231**: 1699-707.
- Douglas, C. R., 2001. Homeostase renal. *Patofisiologia de Sistemas Renal*. São Paulo, Robe editorial, p.39-86.

- Fonseca, L.A., Lopes-Ferreira, M., 2000. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). *An. Bras.Dermatol.* **75** (4), 435-443.
- Fonteles, M.C., 1980. Efeito do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. Tese (Docência) UFC. Centro de Ciências da Saúde.
- Fonteles, M.C., Leibach, F.H., 1982. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* **90**, 159-161
- Fonteles, M. C., Cohen, J. J., Black, and Wertheim, S. J., 1983. Support of renal Kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.***244**, 235-246.
- Fonteles, M.C., Carrithers, S.L., Monteiro, H.S.A., Carvalho, A.F., Coelho, G.R., Greenberg, R.N., Forte, L.R., 2001. Renal effects of serine-7 analog of lymphoguanylin in ex vivo rat kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol.***280**, 207-213.
- Frenette, C. & Maclean, J. D., 1988. A larga common-source outbreak of ciguatera fish poisoning. *J. Infeat. Dis.*, **158**: 1128-31
- Fróes, H. P., 1932. Sur un poisson toxiphore brésilien: "le niquim" *Thalassophryne maculosa*. *Rev. Sud-Am. Med. Chil.*, **3**: 871-78.
- Fróes, H. P., 1933. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (Thalassophrynidae). *Bahia Médica.* **4**, 225-227.

Ganong, W. F., 1989. Formation and excretion of urine. In: *Review of Medical Physiology*, 14th ed. Appleton & Lange.

Guyton, A. and Hall, J. E., 1996. Textbook of medical physiology, 9^a ed., Philadelphia W. B. Saunders, p.191-212.

Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R.S., Overview, 1988. In Gallin, J. L., Goldstein, I. M., Snyderman, R. S. (Eds) *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, New York, p.1-3.

Haddad Jr., V., Pardal, P. P. O., Cardoso, J. L. C. & Martins, I. A., 2003. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (Niquim or Miquim): report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **45**(4): 221-223.

Hamilton, R. L., Benny, N. M., Williams, M. C. and Severin-Ghaus, E. M. A., 1974. Simple and inexpensive membrane lung for small organ perfusion. *J. Lipid Res.* **15**, 182-186.

Halstead, B. W., 1971. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. Princeton: Darwin Press, 2v.

Hanson, R. W. and Ballard, F. S., 1968. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. *J. Lipid. Res.* **9**, 667-668.

Harris, R. C. and Breyer, M. D., 2001. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **281** (1), 1-11.

- Havt, A., Fonteles, M. C., Monteiro, H. S. A., 2001. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. *Toxicon*, **39**, 1841-1846.
- Jimenez-Porras, J. M., 1970. Biochemistry of snake venoms. (a review) *Clin. Toxicol.*, **3**: 389-431.
- Junqueira, L. C. e Carneiro, J., 1995. Aparelho urinário. *Histologia Básica* ed.8ª, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.313-330.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986. Structure-function relationship of phospholipase II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* **24**, 895-905.
- Koepper, B. M. and Stanton, B. A.,1992. Structure and function of the of the kidneys and the lower urinary tract. *In renal Physiology*, ed. Kimberly Kist, pp. 22-23.
- Kouyoumdjian, J.A., Kouyoumdjian, N.C.V.,1986. Acidentes ofídicos: Estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto. *Ars Curandi*, v.19, supl.8, p.55-92.
- Kristensen, S. D., Lassen, J. F., Ravn, H. B., 2000. Pathophysiology of coronary thrombosis. *Semin. Interventional Cardiol.* **5**, 109-115.
- Little, J. R. & Cohen, J. J., 1974. Effect of albumin concentration of function of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, **226**(3): 512-7.

- Lopes, P. F. A. & Argento, C. A., 1984. Acidentes por animais peçonhentos. *Ars. Cvrandi*, São Paulo, **17**: 101-7.
- Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K. C., Cardoso, D. F., Moura-da-Silva, A. M., Mota, I., 1998. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*.**36**, 405-410
- Lopes-Ferreira, 2000. *Thalassohryne nattereri* (niquim):Do Veneno à Terapia. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lopes-Ferreira, M.; Moura-da-Silva, A. M.; Mota, I.;Takehara, H. A.,2000. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*, **38**: 1149-56.
- Lopes-Ferreira, M.; Núñez, J., Rucavado, A.; Farsky, S. H. P., Lomonte, B., Angulo, Y., Moura-da-Silva, A. M., Gutiérrez, J. M., 2001. Muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *Int.J. Exp.Pathol.***82**, 55-64.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A. M., Piran-Soares, A. A., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Farsky, S. H. P., 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*. **40**(8), 1141-1147.
- Maretic, Z., 1988. Fish venoms, In TU, A. T. (Ed). Handbook of Natural Toxins: Marine toxins and venoms. Ney York: Marcel Dekker, p. 445-78.
- Marshall, V.C., 1984. Renal Preservation. *Kidney Transplantation*. 129-157.

Martinez-Maldonado, M.S., Tawroulaki-Tsapara, A., Tsapara, N., Suki, W.N. and Ek Noyan, G., 1978. Renal effects of lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. *J. Lab. Clin. Méd.*, v.80, n.3, p.445-461.

Martins, A. M. C., Monteiro, H. S. A., Guedes Júnior E. O., Menezes, D. B. & Fonteles M. C., 1998. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*, 36: 1441-1450.

Martins, A. M. C., Toyama, M. H., Havt, A., Novello, J. C., Marangoni, S., Fonteles, M. C. and Monteiro, H. S. A., 2002. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*, 40: 1165-1171.

Monteiro, H. S. A., 1990. Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina. Tese de Doutorado – Centro de Ciências da Saúde, UNICAMP, Campinas.

Monteiro, H.S.A. and Fonteles, M.C., 1999. The effect of *Bothrops Jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. *Pharmacology and Toxicology*. 85, 198-200.

Ohsaka, A., Just, M., Habermann, E., 1973. Action of the snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 323, 415-28.

- Peiris, O. A., Wimalaratne, K. D. and Nimalasuriya, 1969. Exchange transfusion in the treatment of *Russell's viper* bite. *Postgrad. Med. J.*, **45**: 627-629.
- Raab, W. & Kaiser, E., 1966. Nephrotoxic action of snake venom. *Mem. Inst. Butantan*, **33**, 1017-20.
- Rezende, N.A., Amaral, C.F.S., Banbirra, E.A., Lachatt, J.J., Coimbra, T.M., 1986. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. J. Res.*, v.22, p.407-416.
- Ross, B.D., Epstein, F.H. and Leaf, 1973. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v.225, 165-171.
- Ross, B. D., 1978. The isolated perfused rat kidney. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **55**, 13-21.
- Sanchez, E.F., Freitas, T.V., Ferreira-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R. , 1992. Biological activities of venoms from south american snake. *Toxicon*. V.30, supl.1, p.95-103.
- Schurek, H. J.; Lohfert, H.; Hierholzer, K., 1970. Na⁺ reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na⁺ - load) *Pflugers Arch. Ges. Physiol.*, 319:1285.
- Schurek, H. J., 1980. Application of the isolated rat kidney. *Contrib. Nephrol.*, **19**: 176-90.

Schvartsman, S., 1985. Intoxicações agudas: peixes. 3 ed., São Paulo, Sarier, p. 407-409.

Seedat, Y. K.; Reddy, J.; Edington, D. A., 1974. Acute renal failure due to proliferative nephrites from snake bite poisoning. *Nephron*, **13**: 455-63.

Sitprija, V., Boonpucknavig, V., 1979. Snake and nephrotoxicity. In: Lee, C.Y. (ed) *Snake Venoms*. New York: Springer Verlag, p. 997-1018.

Trimble, M. E. & Bowman, R. H., 1973. Renal Na^+ and K^+ transport: effects of glucose, palmitate and alfa-bromopalmitate. *Am. J. Physiol.*, **225**(5): 1057-62.

Vassali, P. & McCluskey, R.T., 1965. The coagulation process and glomerular disease. *Am. J. Med.*, **39**, 179-82

Whatly, R. E., 1989: The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6325-6333.

Williamson, J. A., 1990. Animais marinhos venenosos e peçonhentos. In: *Cecil.- Tratado de medicina interna*, 18. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 1684-85.

Williamson, J. A., 1992. Current challenges in marine envenomation: an overview. *J. Wilderness Med*, **3**, 422.

Produção científica desta Dissertação:

Bezerra, G. P., Facó, P. E. G., Monteiro, H.S.A., Havt, A., Meneses, D. B., Silva, J. G., 2003. Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno do peixe niquim (*Thalassophryne nattereri*) em rins de ratos wistar submetidos à perfusão isolada. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém-PA.

Facó, P. E. G., Havt, A., Bezerra, G. P., Monteiro, H. S. A., SILVA, J. G., 2003. Epidemiologia dos acidentes pelo peixe niquim (*Thalassophryne nattereri*) no estado do Ceará no período de 1992 a 2002. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém-PA, p. 11.

Facó, P. E. G., Bezerra, G. P., Havt, A., Martins, A. M.C., Fonteles, M.C., Lopes-Ferreira, M., Monteiro, H.S.A., 2003. Estudo das alterações histopatológicas renais promovidas pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. XIX Congresso Brasileiro de Investigação Clínica - XXVII Congresso Brasileiro de Neurociências e Comportamento. Curitiba-SC., v. 1.

Facó, P. E. G., Havt, A., Bezerra, G. P., Barbosa, P. S. F., Bezerra, I. S. A. M., Martins, Alice M.C., Fonteles, M. C., Lopes-Ferreira, M., Monteiro, H. S. A., 2002. Renal alterations promoted by *Thalassophryne nattereri* venom. In: VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Pirenópolis- GO.

Facó, P. E. G., Havt, A., Barbosa, P. S. F., Nobre, A. C. L., Bezerra, G. P., Meneses, D. B., Fonteles, M. C., Lopes-Ferreira, M., Monteiro, H. S. A., 2003. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon* (42), 509-514.

Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney

P.E.G. Facó^a, A. Havt^b, P.S.F. Barbosa^b, A.C.L. Nobre^b, G.P. Bezerra^b, D.B. Menezes^a,
M.C. Fonteles^c, M. Lopes-Ferreira^d, H.S.A. Monteiro^{b,*}

^aDepartment of Pathology and Forensic Medicine, Rua Monsenhor Furtado, S/N, 60441-750 Fortaleza, CE, Brazil

^bDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

^cCeara State University, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil

^dImmunopathology Laboratory, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 24 January 2003; accepted 23 July 2003

Abstract

Thalassophryne nattereri, popularly known as Niquim, is a venomous fish responsible for many accidents in fishermen in the Northeast of Brazil. The effects of *T. nattereri* venom on renal physiology has not been tested. Isolated kidneys from Wistar rats of 240–280 g weight were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6 g% of previously dialyzed bovine serum albumin. The effects of Niquim venom were studied on the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), percent of sodium tubular transport (%TNa⁺), percent of potassium tubular transport (%TK⁺) and percent of chloride tubular transport (%TCl⁻). The venom of *T. nattereri* (0.3, 1.0, and 3.0 µg/ml) was always added to the system 30 minutes after the beginning of each experiment ($n = 6$). All experiments were preceded by 30 minutes internal control period and an external control group, where kidneys were perfused with only Krebs-Henseleit solution. All three doses tested promoted increases in PP and RVR. The first two doses also increased GFR and UF. The higher dose promoted decreases in GFR, UF, %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻. In the treated groups we observed hyalin casts inside all tubules and proteinaceous material in the urinary space. We conclude that the effects resulted from niquim venom agents that promoted a direct effect in kidney cells causing the release of vasoactive factors.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Thalassophryne nattereri*; Niquim; Fish venom; Renal perfusion

1. Introduction

Thalassophryne nattereri, popularly known as Niquim, is a batrachoididae fish widely distributed on the coast of all continents but poles (Collette, 1966). It is a venomous fish responsible for many accidents in fishermen in the Northeast of Brazil (Almeida and Rocha, 1989), affecting hundreds of people every year (Lopes-Ferreira et al., 1998). It has a special apparatus for venom injection including spines located near to the opercular and dorsal fins. Accidents

occur through contact with the spines causing perforation of the tegument and injection of venom from the venom glands (Fróes, 1933).

The clinical picture caused by *T. nattereri* venom includes intense pain, mild local erythema, severe oedema and rapid progression to necrosis; in some cases, amputation or grafts may be required (Auto, 1992). An efficient treatment is not available, therefore these alterations last for long periods (Fonseca and Lopes-Ferreira, 2000). Anti-inflammatory drugs are inefficient to control the symptoms of the accidents and a great number of patients are treated with empirical procedures such as the immersion of the wounded area in hot water. The most efficient treatment is

* Corresponding author. Fax: +55-85-2815212.

E-mail address: serrazul@truenet-cc.com.br (H.S.A. Monteiro).

the administration of antivenoms, which are available only in Australia (Sutherland, 1992).

The *T. nattereri* venom is composed of protein toxins with proteolytic and myotoxic properties, but apparently devoid of phospholipase A₂ (Lopes-Ferreira et al., 1998). Analysis of skeletal muscles of mice injected with the venom showed a damage to muscle regeneration (Lopes-Ferreira et al., 2001). Some studies suggested that venom action on endothelium may contribute to hemostasis and to the formation of platelet and fibrin thrombi, with the consequent ischemia (Lopes-Ferreira et al., 2002).

The effects of *T. nattereri* venom upon the renal physiology had not been tested until now. The aim of the present work was to study the functional alterations produced by niquim in the isolated rat kidney model, as well as to verify the renal histological changes, in the absence of systemic interactions.

2. Materials and methods

Adult Wistar rats of both sexes, weighing 240–280 g were fasted 24 h before each experiment, with free access to water. The animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (50 mg Kg⁻¹ body weight ip). The right kidney was prepared for perfusion after careful dissection and the kidney was cannulated through the mesenteric artery without interruption of the flow (Bowman, 1970; Bahlmann et al., 1967; Nishiitsutji-Uwo et al., 1967). The perfusion method was a Modified Krebs Henseleit Solution (MKHS) with the following composition in mmol/l: Na⁺ 147, K⁺ 5, Ca⁺⁺ 2.5, Mg⁺⁺ 2, Cl⁻ 110, HCO₃⁻ 2.5, SO₄²⁻ 1, PO₄³⁻ 1. Six grams of bovine serum albumin (BSA fraction V) from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), urea 0.075 g, inulin 0.075 g and glucose 0.15 g were added to the solution for a final perfusate of 100 ml. BSA was previously dialyzed for 48 h at 4 °C in 1.5 l of Krebs. (Hanson and Ballard, 1968;

Greg et al., 1978; Fonteles et al., 1983; Lima et al., 1992). The pH was then adjusted to 7.4. The perfusion system was based on Bowman's technique (Bowman, 1970) which was modified in our laboratory by the addition of an artificial lung to improve oxygenation (Hamilton et al., 1974) and by the 1.2 µm millipore filter (Pegg, 1971). The flow calibration and the resistance of the system were determined before each experiment. The rate of perfusion flow was maintained of 25–35 ml min⁻¹ per kidney. The first 30 min. of perfusion were considered to be internal control. Each experiment was divided into four periods of 30 min.; these periods were further subdivided into equal intervals of 10 min. During each 10 min. period, samples of perfusate and urine were collected for determinations of sodium, potassium, inulin and osmolality. The right renal artery was cannulated through the upper mesenteric artery and the kidney was isolated (Bahlmann et al., 1967; Nishiitsutji-Uwo et al., 1967; Ross, 1978; Fonteles et al., 1998), allowing uninterrupted perfusion of the kidney. Sodium and potassium concentrations were determined by flame photometry (model 44 Instrumentation Lab, 443) and inulin was determined according to Walser et al., (1955), as modified by Fonteles et al., (1983). The osmolality of the samples was measured with an advanced instrument osmometer (WES-COR 5100c vapor pressure, USA). This work tested the renal effects of three different concentrations (0.3, 1.0 and 3.0 µg/ml) of *T. nattereri* fish venom that was kindly provided by Dr Mônica Lopes Ferreira from Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil. The venom was always added to the system after the first 30 min. of each experiment. The glomerular filtration rate (GFR), the fractional tubular transports of sodium (%TNa⁺), potassium (%TK⁺), and chloride (%TCl⁻), urinary flow (UF) and renal vascular resistance (RVR) were determined by conventional clearance measurements as described in detail elsewhere (Walser et al., 1955). Data of four periods of

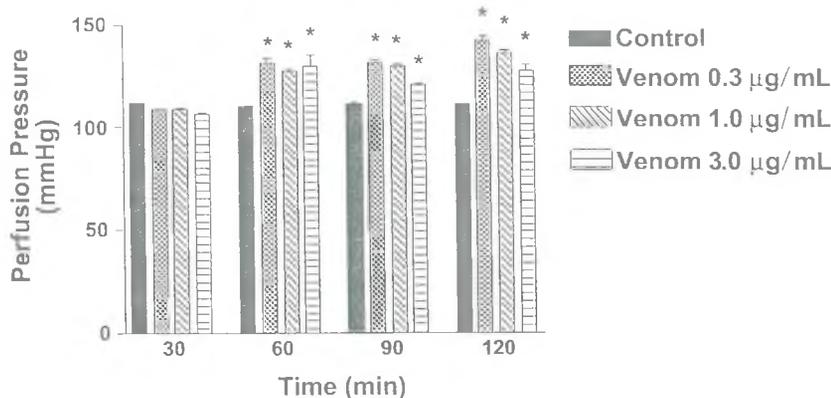


Fig. 1. The effects of the *Thalassophryne nattereri* fish venom on the perfusion pressure (PP). Control—perfusion with only modified Krebs Henseleit solution; Venom 0.3 µg/ml—perfusion with 0.3 µg/ml; Venom 1.0 µg/ml—perfusion with 1.0 µg/ml; Venom 3.0 µg/ml—perfusion with 3.0 µg/ml. The data are reported as mean ± SEM from 6 different experiments each group analyzed by ANOVA (Bonferroni test) with **p* < 0.05).

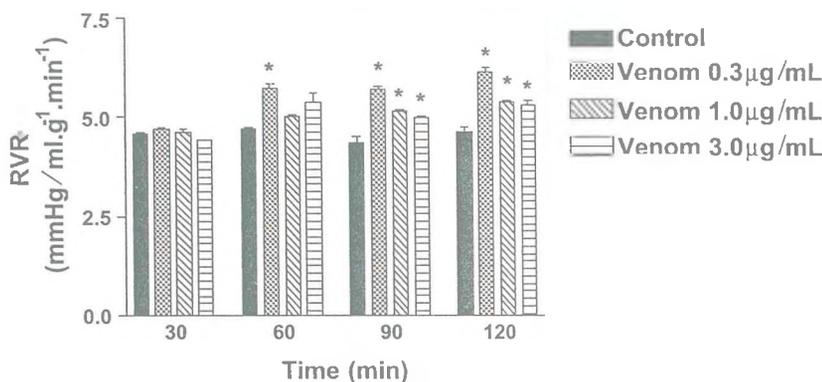


Fig. 2. The effects of the *Thalassophryne nattereri* fish venom on the renal vascular resistance (RVR). Control—perfusion with only modified Krebs Henseleit solution; Venom 0.3 µg/ml—perfusion with 0.3 µg/ml; Venom 1.0 µg/ml—perfusion with 1.0 µg/ml; Venom 3.0 µg/ml—perfusion with 3.0 µg/ml. The data are reported as mean \pm SEM from 6 different experiments each group analyzed by ANOVA (Bonferoni test) with $*p < 0.05$.

30 min. (30, 60, 90 and 120 min.) were averaged. All groups were compared with a control group, where kidneys were perfused with only a MKHS. Statistical analyses were carried out by one-way ANOVA and Bonferoni test with the level of significance set at $p < 0.05$. There were six perfused-kidney experiments for each group. After perfusion, the kidneys were conserved in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were taken, stained by Hematoxilin and Eosin, and submitted to histological analysis.

3. Results

The renal function was not altered after perfusion with only MKHS. After treating the kidneys with three different concentrations of the *T. nattereri* fish venom (0.3, 1.0 and 3.0 µg/ml) we observed that all three concentrations of

the venom caused an increase in the perfusion pressure (PP) in the 60 min. period, which was also observed in the periods of 90 and 120 min. (Fig. 1).

RVR started to increase in the 60 min. period only in the concentration of 0.3 µg/ml, and were intensified in the period of 90 and 120 min. with all three concentrations (Fig. 2). The GFR and the UF started to increase in the 90 min. period, and were intensified in the period of 120 min. in the concentrations of 0.3 and 1.0 µg/ml. In the dose of 3.0 µg/ml both of them decreased in the period of 90 and 120 min. (Figs. 3 and 4).

The percentage of sodium tubular transport ($\%TNa^+$) in the dose of 3.0 µg/ml started to reduce in the 90 min. period and this effect was intensified in the last period of each experiment. The percentage of potassium ($\%TK^+$) and chloride tubular transport ($\%TCl^-$) in the dose of 3.0 µg/ml started to decrease in the 60 min. period, and this effect was observed in the period of 90 and 120 min. (Table 1).

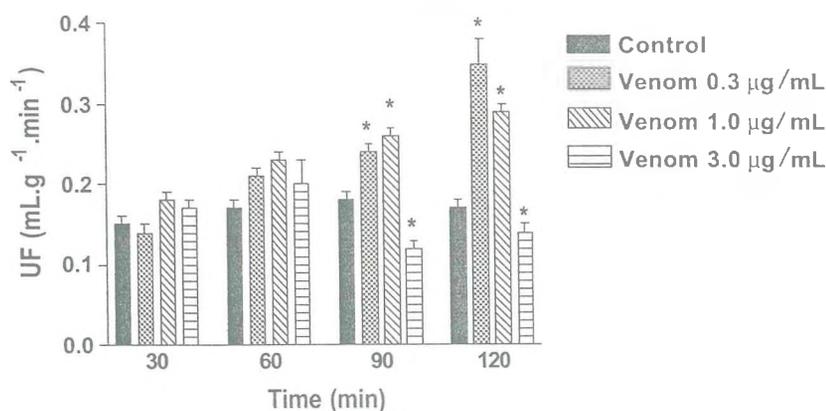


Fig. 3. The effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom on the (UF). Control—perfusion with only modified Krebs Henseleit solution; Venom 0.3 µg/ml—perfusion with 0.3 µg/ml; Venom 1.0 µg/ml—perfusion with 1.0 µg/ml; Venom 3.0 µg/ml—perfusion with 3.0 µg/ml. The data are reported as mean \pm SEM from 6 different experiments each group analyzed by ANOVA (Bonferoni test) with $*p < 0.05$.

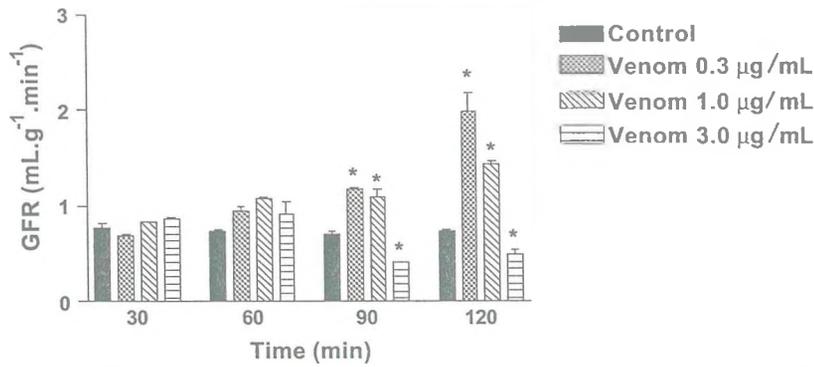


Fig. 4. The effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom on the GFR. Control—perfusion with only modified Krebs Henseleit solution; Venom 0.3 µg/ml—perfusion with 0.3 µg/ml; Venom 1.0 µg/ml—perfusion with 1.0 µg/ml; Venom 3.0 µg/ml—perfusion with 3.0 µg/ml. The data are reported as mean \pm SEM from 6 different experiments each group analyzed by ANOVA (Bonferroni test) with $*p < 0.05$.

The histological evaluation profiled by the control group, in which kidneys were perfused with only MKHS, showed a small amount of a proteinaceous material in the renal tubules, although no alteration in the urinary space was detected. After the perfusion treatment with *T. nattereri* fish venom, the kidneys exhibited a moderate deposit of proteinaceous material in the tubules and urinary space. Eosinophilic casts were seen in the renal tubules, but no abnormalities were seen in the renal vessels. (Fig. 5).

4. Discussion

The envenomation by *T. nattereri* fish (niquim) constitutes a serious health problem for fishermen, particularly in the North and Northeast of Brazil. The physiopathological

alterations induced by the venom have not been described by far. The number of studies on this issue is relatively scarce and the mechanistic of the envenomation by niquim is poorly understood. The venom causes strong local effect such as intense pain, edema and necrosis. Experiments carried out on animal models caused lethality, necrosis, nociception and edema (Lopes-Ferreira et al., 1998). However, in spite of severe local and systemic effects, lethality was not described in human accidents, probably because of the relationship between venom dose and victim weight.

The effects of *T. nattereri* fish venom upon renal physiology had never been tested until now. The present work characterizes the renal effects of niquim venom by isolated perfused rat kidney method. We tested three different doses and observed an increase in PP, RVR, GFR and UF in the first two doses. However, GFR, UF and

Table 1
The effects of the *Thalassophryne nattereri* fish venom on the tubular sodium, potassium and chloride transport

	30 min	60 min	90 min	120 min
	%TNa ⁺			
Control	80.66 \pm 0.25	80.52 \pm 0.26	80.52 \pm 0.32	81.15 \pm 0.20
0.3 µg/ml	82.23 \pm 0.72	79.09 \pm 1.05	78.92 \pm 0.37	81.47 \pm 0.72
1.0 µg/ml	81.11 \pm 0.86	78.04 \pm 1.18	76.16 \pm 3.34	79.49 \pm 0.87
3.0 µg/ml	82.22 \pm 0.90	78.04 \pm 1.18	71.29 \pm 0.64*	73.10 \pm 1.07*
	%TK ⁺			
Control	71.44 \pm 0.21	72.23 \pm 1.23	71.22 \pm 0.27	72.90 \pm 0.84
0.3 µg/ml	69.47 \pm 0.75	67.23 \pm 1.94	65.26 \pm 0.84	71.90 \pm 1.69
1.0 µg/ml	72.29 \pm 1.12	75.41 \pm 0.65	71.23 \pm 2.55	76.62 \pm 1.04
3.0 µg/ml	71.29 \pm 0.74	66.32 \pm 1.69*	61.14 \pm 0.64*	67.22 \pm 1.63*
	%TCl ⁻			
Control	78.90 \pm 0.34	80.25 \pm 1.08	76.32 \pm 0.90	77.53 \pm 0.81
0.3 µg/ml	79.13 \pm 0.72	74.76 \pm 0.79	75.76 \pm 0.57	78.11 \pm 1.14
1.0 µg/ml	77.40 \pm 1.26	75.66 \pm 1.80	70.25 \pm 2.65	76.72 \pm 1.02
3.0 µg/ml	79.95 \pm 0.93	72.45 \pm 0.65*	72.22 \pm 1.26*	69.49 \pm 1.53*

The data were reported as mean \pm SEM from six different experiments each group analyzed by ANOVA (Bonferroni test) with $*p < 0.05$. Control—perfusion with only MKHS solution; 0.3 µg/ml—perfusion with 0.3 µg/ml of *T. nattereri* fish venom; 1.0 µg/ml—perfusion with 1.0 µg/ml of *T. nattereri* fish venom; 3.0 µg/ml—perfusion with 3.0 µg/ml of *T. nattereri* fish venom. %TNa⁺—percentage of tubular sodium transport; %TK⁺—percentage of tubular potassium transport; %TCl⁻—percentage of tubular chloride transport.

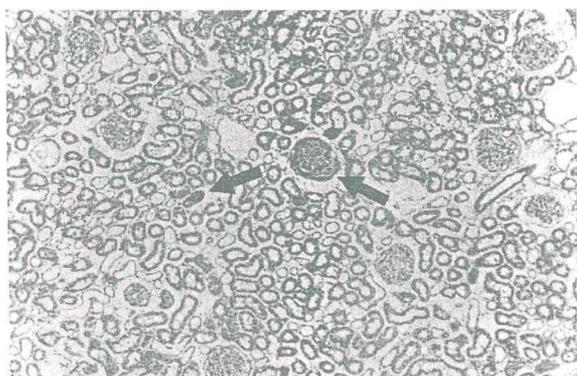


Fig. 5. Histological evaluation of kidneys perfused with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of niquim venom showing a moderate deposit of a proteinaceous material in the urinary space and renal tubules (H.E. 40 \times).

sodium potassium and chloride tubular transport decreased only after testing the highest dose.

Intravital microscopic studies with *T. nattereri* fish venom showed pronounced alterations on microvascular hemodynamics, represented by fibrin depots and thrombus formation followed by complete venular and transient arteriolar stasis (Lopes-Ferreira et al., 2002). Kristensen et al., 2000, described that intact endothelium is non-thrombogenic. Damage to the endothelial lining of microvessels promotes pro-coagulant events, activating platelets and coagulation cascade, resulting in thrombosis.

However, since our experiments are devoid of blood we can assure that increases in PP and RVR were not promoted by pro-coagulant events. Nevertheless, Lopes-Ferreira et al., 2002 demonstrated that *T. nattereri* venom could induce lysis of cultured endothelial cells. The lysis could be inducing the release of vasoconstrictor agents, which could be altering the vascular parameters herein evaluated.

Kidney cells can release prostaglandins, cytokines, bradykinin, complement fractions and platelet-activating factor (Barraviera et al., 1995; Whatly, 1989). The alterations described herein can be due to a direct action of the venom in renal glomeruli and tubules or indirect release of mediators.

Lopes-Ferreira et al., 1998 described that *T. nattereri* venom is composed of protein toxins, which possess proteolytic and myotoxic properties, but are apparently devoid of phospholipase A₂ activity. In addition, treatment of patients with dexametazone and indometacin were ineffective as therapeutic tool (Lopes-Ferreira et al., 2000).

Kini and Iwanaga (1986) showed that PLA₂ activity is not essential for the pharmacological action of myotoxins. They suggested that the myotoxins, which do not present PLA₂ activity, could cause its damage by disorganizing lipid bilayers and consequently affecting calcium influx and promoting myonecrosis. Maybe the presence of a myotoxin without PLA₂ activity in the *T. nattereri* venom could be promoting the renal alterations presented in this work.

We conclude that the *T. nattereri* venom altered renal physiology interfering especially in the vascular parameters. Probably, those results were promoted by myotoxic agents or a direct effect of the venom in kidney cells causing the release of vasoactive factors that could increase PP and RVR and decrease of electrolytes transport in higher doses.

Acknowledgements

Acknowledgements are made to Dr. Mônica Lopes-Ferreira from Butantan Institute that provided the venom, to Maria Silvia F. França and Domingos Barreto Oliveira for technical assistance. This research was supported by CNPq, FAPESP and FUNCAP (Brazil).

References

- Almeida, V.G., Rocha, C.M., 1989. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* 2, 49–51.
- Auto, H.F., 1992. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. *Rev. Esc. Ciênc. Méd. de Alagoas* 5, 35–36.
- Bahlmann, J., Giebisch, G., Ochwaldt, B., 1967. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 212, 77–82.
- Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowiki, A., Hanson, L.A., Meira, D.A., 1995. Acute phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* ssp. and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins.* 1, 11–22.
- Bowman, R.H., 1970. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* 245, 1604–1612.
- Collette, B.B. (1966). A review of the venomous toadfishes, subfamily *Thalassophryinae*, *Copeia*, 4, 846–864.
- Fonseca, L.A., Lopes-Ferreira, M., 2000. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). *An. Bras. Dermatol.* 75 (4), 435–443.
- Fonteles, M.C., Cohen, J.J., Black, J.J., Wertheim, S.J., 1983. Support of renal Kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244, 235–246.
- Fonteles, M.C., Greenberg, R.N., Monteiro, H.S.A., Currie, M.G., Forte, L.R., 1998. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 275 (Renal Physiol. 44) 275, 191–197.
- Fróes, H.P., 1933. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). *Bahia Médica.* 4, 225–227.
- Greg, G.M., Cohen, J.J., Black, A.Y., Espeland, M.A., Feldstain, M.C., 1978. Effects of glucose and insulin metabolism and function of perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 235, 52–61.
- Hamilton, R.L., Benny, N.M., Williams, M.C., Severin-Ghaus, E.M.A., 1974. Simple and inexpensive membrane lung for small organ perfusion. *J. Lipid Res.* 15, 182–186.
- Hanson, R.W., Ballard, F.S., 1968. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. *J. Lipid Res.* 9, 667–668.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986. Structure–function relationship of phospholipase II: Charge density distribution and the myotoxicity

- of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24, 895–905.
- Kristensen, S.D., Lassen, J.F., Ravn, H.B., 2000. Pathophysiology of coronary thrombosis. *Semin. Interventional Cardiol.* 5, 109–115.
- Lima, A.A.M., Monteiro, H.S.A., Fonteles, M.C., 1992. The effects of *Escherichia coli* heat-stable entero-toxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol. Toxicol.* 70, 163–167.
- Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K.C., Cardoso, D.F., Moura-da-Silva, A.M., Mota, I., 1998. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon* 36, 405–410.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Mota, I., Takehara, H.A., 2000. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon* 38, 1149–1156.
- Lopes-Ferreira, M., Núñez, J., Rucavado, A., Farsky, S.H.P., Lomonte, B., Angulo, Y., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., 2001. Muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 55–64.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Piran-Soares, A.A., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Farsky, S.H.P., 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon* 40 (8), 1141–1147.
- Nishiitsutji-Uwo, G.M., Ross, B.D., Krebs, H.A., 1967. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* 103, 852–862.
- Pegg, D.E., 1971. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. *Cryobiology* 8, 431–440.
- Ross, B.D., 1978. The isolated perfused rat kidney. *Clin. Sci. Mol. Med.* 55, 13–21.
- Sutherland, S.K., 1992. Antivenom use in Austrália. Premedication, adverse reactions and the use of venom detection kits. *Med. J. Aust.* 157, 734–739.
- Walser, M., Davidson, D.G., Orloff, 1955. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J. Clin. Invest.* 34, 1520–1523.
- Whatly, R.E., 1989. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264, 6325–6333.