

**Efeitos Nefrotóxicos do Veneno de *Bothrops jararaca* e Estudo da  
Ação de Antagonistas do PAF e da Cicloxigenase no Rim  
Perfundido de Rato.**

**Helena Serra Azul Monteiro**

Tese Apresentada à Faculdade de Ciências Médicas para Obtenção do  
Título de Doutor em Medicina.

Orientador de tese:

**Dr. Manassés Claudino Fonteles**  
Professor Titular e Livre Docente da Universidade Federal  
do Ceará.

Co-orientadora de tese:

**Dra. Júlia Prado Franceschi**  
Professora Adjunta e chefe do Departamento de  
Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas.

Universidade Estadual de Campinas

Campinas-SãoPaulo-1990.

**Efeitos Nefrotóxicos do Veneno de Bothrops jararaca e Estudo da  
Ação de Antagonistas do PAF e da Cicloxigenase no Rim  
Perfundido de Rato.**

*Este exemplar corresponde à versão  
final da Tese de Doutorado apresentada  
à Faculdade de Ciências Médicas da  
UNICAMP pela médica Helena Serra  
Avel Kenteiro.*

*Campinas, 04 de dezembro de 1990.*

*Júlia Prado Franceschi*  
Profa. Dra. Júlia Prado Franceschi

**Tese Apresentada à Faculdade de Ciências Médicas para  
Obtenção do Título de Doutor em Medicina.**

**Universidade Estadual de Campinas**

**Campinas-SãoPaulo-1990.**

**Orientador:**

**Prof. Manassés Claudino Fonteles**

**Co-orientadora:**

**Professora Dra. Júlia Prado Franceschi**

**Trabalho realizado na Unidade de Pesquisas Clínicas da  
Universidade Federal do Ceará, com recursos próprios, da FINEP  
e da CAPES.**

Ao Chico, companheiro de todas as horas. Aos meus filhos, Manuel Carlos e Janaina. Aos meus pais, por toda uma vida de apoio.

“Existem homens que lutam um só dia e são bons; outros lutam um ano inteiro e são melhores; existem aqueles que lutam muitos anos e são ótimos; mas ainda existem aqueles que lutam toda uma vida: estes são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht

### **Agradecimentos:**

A autora deste trabalho agradece ao Prof. Manassés Claudino Fonteles, pela orientação e análise crítica na execução e elaboração do mesmo.

À professora Júlia Prado Franceschi pela prestimosa ajuda e orientação.

Ao Prof. Odorico de Moraes Filho pela valiosa colaboração na parte estatística e elaboração final, de forma desinteressada, pelo simples prazer de ajudar.

Aos Professores Dalgimar Bezerra de Menezes e Margarida Maria de Lima Pompeu pela elaboração do estudo histopatológico.

A todos os professores, colegas de mestrado, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A estudante de medicina Maria do Socorro Aguiar Ribeiro pela grande ajuda na fase experimental deste trabalho.

A jovem Maria Luiza Braga do Amaral pela elaboração datilográfica deste trabalho

Aos técnicos Maria Sílvia Helena Freire de França, Valdir de Oliveira, Jociê Andrade da Silvia e Francisco José de Oliveira Queiroz pela eficiência e elevado padrão de trabalho.

Aos meus familiares, irmãs, cunhados e sogra pela solidariedade e amizade.

À bibliotecária Norma Carvalho Linhares pela paciente orientação nas referências bibliográficas.

A todos aqueles que colaboraram para a execução deste trabalho.

## Índice

Lista de Tabelas	i
Lista de figuras	iii
Resumo	vi
Abstract	viii
<b>Introdução</b>	
Generalidades sobre o envenenamento ofídico	01
Química e bioquímica dos venenos ofídicos	06
Tipos de toxinas presentes no veneno de serpentes	09
Constituintes inorgânicos e constituintes orgânicos não proteicos	11
Lesões presentes no envenenamento ofídico	13
Nefrotoxicidade	19
Objetivos	24
<b>Material e Métodos</b>	
Animais experimentais	25
Sistema de perfusão do rim isolado	25
Calibração de fluxo e resistência no sistema de perfusão	27
Solução Perfusora	27
Técnica cirúrgica	28
Protocolo experimental	30
Substâncias utilizadas	30
Cálculos de parâmetros funcionais renais	31
Determinação de água tissular e mineralização dos rins	32
Métodos analíticos	33
Técnica morfológica	34
Análise estatística	34
<b>Resultados</b>	
Estudo comparativo dos parâmetros funcionais de rins perfundidos na solução de Krebs-Henseleit em concentrações variáveis de albumina	35
Grupo controle com 6g% de albumina	36
Efeitos do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	36
Efeitos do BN 52021	38
Efeitos do WEB 2086	40
Efeitos da indometacina	41
Dinâmica de íons potássio	42
Composição hidroeletrólítica renal no rim perfundido e controle	43
Correlação entre alguns parâmetros	44
Estudo histopatológico	44

<b>Discussão dos Resultados</b>	<b>46</b>
<b>Conclusões</b>	<b>62</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>66</b>



## **Lista de Tabelas**

1. Acidentes ofídicos no Ceará (1986-1988)
2. Acidentes ofídicos no Ceará, segundo gênero de serpentes (1986-1988).
3. Comparação do fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG) e da fração de sódio reabsorvida ( $TNa^+$ ) dos grupos controles com concentrações variáveis de albumina.
4. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina.
5. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina (função distal e segmentar).
6. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina e veneno de *B. jararaca*.
7. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina e veneno de *B. jararaca* (função distal e segmentar).
8. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, BN 52021 e veneno de *B. jararaca*.
9. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, BN 52021 e veneno de *B. jararaca* (função distal e segmentar).
10. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, WEB 2086 e veneno de *B. jararaca*.
11. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, WEB 2086 e veneno de *B. jararaca* (função distal e segmentar).
12. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, indometacina e veneno de *B. jararaca*.

13. Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, indometacina e veneno de *B. jararaca* (função distal e segmentar).
14. Transporte de potássio (TK) em perfusão de rins isolados de ratos, perfundidos com solução Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, veneno de *B. jararaca* BN 52021, o WEB e indometacina.
15. Percentual de transporte de potássio (%TK) em perfusão de rins isolados de ratos, perfundidos com solução Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, veneno de *B. jararaca*, BN 52021, o WEB 2086 e indometacina.
16. Composição eletrolítica tecidual de sódio e potássio em rins controles (RC), comparados com rins tratados (RP) com veneno de *B. jararaca*, BN 52021, WEB 2086 e indometacina.
17. Alterações histopatológicas de rins controles perfundidos com albumina 6g% e de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca*.
18. Frequência relativa em percentual das alterações histopatológicas de rins controles perfundidos com albumina 6g% e de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca*.

## Lista de Figuras

1. Patogênese da lesão renal
2. Sistema de perfusão
3. Retas de calibração
4. Desenho esquemático das estruturas anatômicas renais e peri-renais.
5. Comparação entre os fluxos urinários de rins controles perfundidos com diversas concentrações de albumina.
6. Comparação entre os clearances de rins controles perfundidos em diversas concentrações de albumina.
7. Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* em diversas concentrações.
8. Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* em diversos concentrações.
9. Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de *B. jararaca*.
10. Comparação entre os clearances de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de *B. jararaca*.
11. Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de *B. jararaca*.
12. Comparação entre o percentual de sódio transportado de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de *B. jararaca*.
13. Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno.
14. Comparação entre o ritmo de filtração glomerular em rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno.
15. Comparação entre as pressões de perfusões de rins perfundidos com veneno de

- B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno.
16. Comparação entre o percentual de sódio transportado (%TNa<sup>+</sup>) de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno.
  17. Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.
  18. Comparação entre o ritmo de filtração glomerular (RFG) de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.
  19. Comparação entre as pressões de perfusões de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.
  20. Comparação entre o percentual de sódio transportado (%TNa<sup>+</sup>) de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.
  21. Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.
  22. Comparação entre o ritmo de filtração glomerular (RFG) de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.
  23. Comparação entre o percentual de sódio transportado (%TNa<sup>+</sup>) de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.
  24. Comparação entre as pressões de perfusões de rins perfundidos com veneno de *B. jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.
  25. Comparação entre o percentual de potássio transportado de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de *B. jararaca*.

26. Comparação entre o percentual de potássio transportado de rins perfundidos nos diversos grupos estudados.
27. Composição eletrolítica tecidual de sódio nos diversos grupos.
28. Percentual de sódio tecidual renal nos diversos grupos.
29. Composição eletrolítica tecidual renal de potássio nos diversos grupos.
30. Percentual de potássio tecidual renal nos diversos grupos.
31. Correlação linear do balanço glomérulo-tubular de rins controles perfundidos.
- 32, 33, 34 e 35 Correlação linear do balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos nos diversos grupos tratados.
- 36(a) Animal controle - Rim apresentando glomérulo sem alterações e túbulos com moderada tumefação celular. H.E. 800x. (b) Animal controle - Rim apresentando túbulos com moderada tumefação celular. H.E. 800x.
37. Animal tratado com veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando glomérulo com material proteico no espaço urinífero. Túbulos dilatados com moderada tumefação e borramento da borda em escova. H.E. 800x.
38. Animal tratado com veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando túbulos moderadamente dilatados, contendo material proteico em grande quantidade. H.E. 800x.
39. Animal tratado com veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando foco de necrose de células tubulares. H.E. 800x.

## **Efeitos Nefrotóxicos do Veneno de *Bothrops jararaca* e Estudo da Ação de Antagonistas do PAF e da Cicloxigenase no Rim Perfundido de Rato.**

Helena Serra Azul Monteiro, Tese de Mestrado, UNICAMP/UFC, 1990.

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* cuja importância se deve a alta frequência dos acidentes ofídicos, que constituem um sério problema de saúde pública em nosso país.

O modelo experimental utilizado foi o sistema de perfusão de rim isolado de rato para evitar a interferência de outros fatores sistêmicos.

A análise dos parâmetros funcionais renais foi realizada em perfusões com solução de Krebs-Henseleit modificada, sendo escolhida a concentração de 6g% de albumina, por apresentar melhores parâmetros quando comparados a outras preparações com 2 e 4g%. Os parâmetros estudados foram: pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG), transporte de sódio (TNa<sup>+</sup>), transporte de potássio (TK<sup>+</sup>), clearance de água livre (CH<sub>2</sub>O), transporte proximal de sódio (pTNa<sup>+</sup>), transporte distal de sódio (dTNa<sup>+</sup>).

Os grupos controle se mantiveram constantes durante todo o experimento e apresentaram os seguintes parâmetros: PP=149,17 ± 4,03 mmHg, RVR=6,38 ± 0,68 mmHg/ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; FU=0,26 ± 0,005 ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; RFG=1,13 ± 0,21 ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; TNa<sup>+</sup>= 136,13 ± 28,68 µEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; %TNa<sup>+</sup>=78,53 ± 1,91.

Nos grupos tratados pelo veneno (10µg/ml) observamos, aos 30 minutos de perfusão, a diminuição acentuada destes parâmetros em decorrência do efeito nefrotóxico, com os seguintes dados: PP=100,50 ± 10,81 mmHg.ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (45%); RVR=3,92 ± 0,47 mmHg/ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (31,10%); FU=0,02 ± 0,05 ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (85%), RFG=0,06 ± 0,02 ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (90%); TNa<sup>+</sup>=5,30 ± 2,73 µEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (90%). Os dados estatísticos expressam a média e o erro padrão da média.

Na tentativa de bloquear estes efeitos tóxicos, utilizamos o BN 52021 e WEB 2086, duas drogas antagonistas do PAF (fator ativador de plaquetas). O BN 52021 não apresentou proteção aos efeitos tóxicos do veneno, exceto o fato de evitar a diminuição de sódio e potássio tissulares, observada com o uso isolado da peçonha. O WEB 2086 além de impedir a diminuição do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular causados pelo veneno, elevou estes parâmetros em relação ao controle, embora a pressão de perfusão continuasse baixa. Os outros parâmetros CH<sub>2</sub>O, dTNa<sup>+</sup> e %dTNa<sup>+</sup> se apresentaram negativos quando comparados ao controle e ao uso isolado do veneno.

A outra substância utilizada foi a indometacina que promoveu antagonismo total aos efeitos tóxicos do veneno no fluxo urinário, ritmo de

filtração glomerular, resistência vascular renal e bloqueio parcial da pressão de perfusão.

A peçonha produziu diminuição de sódio e potássio teciduais, sendo estes efeitos bloqueados pelo BN 52021, WEB 2086 e Indometacina.

Com esta técnica empregada dispomos de um modelo para o estudo de efeitos tóxicos direto de drogas sobre o rim. Podemos concluir que o veneno de *Bothrops jararaca* produz alterações de FU, RFG, RVR, PP,  $TNa^+$ ,  $TK^+$  e  $\%TK^+$ , com diminuição de sódio e potássio no tecido renal, levando a um quadro compatível à insuficiência renal aguda.

No estudo histopatológico dos rins, observamos que os grupos controle e tratado com o veneno, apresentaram moderada dilatação e tumefação de túbulos provavelmente decorrente da técnica utilizada de perfusão com presença de albumina no líquido perfusor. Nos grupos tratados com o veneno detectamos maior intensidade de material proteico nos lúmens tubulares e nos espaços uriníferos dos glomérulos. Outro achado foi a necrose de células tubulares em dois dos rins perfundidos com o veneno.

## **Nephrotoxic Activity of *Bothrops jararaca* Venom and the Effects of PAF Antagonists and Cyclooxygenase Inhibitors in the Rat Perfused Kidneys.**

Helena Serra Azul Monteiro UNICAMP/UFC, 1990.

This work evaluates nephrotoxic effects of the venom of *Bothrops jararaca*, a snake responsible for many snake bite accidents in the Northeast of Brazil and thus is an important public health problem in our country.

The model used was the isolated perfused rat kidney.

We used a modified Krebs-Henseleit solution with added albumin at 6g% which produced more reliable than albumin concentrations of 2 and 4g%.

The parameters studied were: perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), sodium transport ( $\text{TNa}^+$ ), potassium transport ( $\text{TK}^+$ ), free water clearance ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), proximal transport of sodium ( $\text{pTNa}^+$ ) and distal transport of sodium ( $\text{dTNa}^+$ ).

The results for the control group were:  $\text{PP}=149,17 \pm 4,03$  mmHg,  $\text{RVR}=6,38 \pm 0,68$  mmHg/ $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\text{UF}=0,26 \pm 0,005$   $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\text{GFR}=1,13 \pm 0,21$   $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\text{TNa}^+=136,13 \pm 28,68$   $\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\% \text{TNa}^+=78,53 \pm 1,91$ .

In the kidneys treated by the venom (10mg/ml) we observed, at 30 min of perfusion, a marked decrease in these parameters:  $\text{PP}=100,50 \pm 10,81$  mmHg/ $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (45%);  $\text{RVR}=3,92 \pm 0,47$  mmHg/ $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (31,10%);  $\text{UF}=0,02 \pm 0,05$   $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (85%),  $\text{GFR}=0,06 \pm 0,02$   $\text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (90%);  $\text{TNa}^+=5,30 \pm 2,73$   $\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (90%).

In an attempt to block these toxic effects we have used BN 52021 and WEB 2086, two drugs which are platelet activating factor (PAF) antagonists. BN 52021 did not protect against the toxic effects of the venom, except in blocking the decrease in sodium and potassium in the tissues. WEB 2086 blocked the urinary flow and GFR changes by the venom and even elevated these parameters in relation to the controls. The perfusion pressure was not reversed.

$\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{dTNa}^+$  and  $\% \text{dTNa}^+$  all presented negative values when compared to controls.

We also found that indomethacin antagonized the toxic effects of the venom found in UF, GFR, RVR, and partially blocked PP.

The venom also produced a decrease in tissue  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , which in turn was blocked by BN 52021, WEB 2086 and indomethacin.

Histopathological study revealed that in both groups, treated and untreated by the venom, there was a tubular dilatation and tumefaction. These effects could be the result of the perfusion itself. However, in the groups treated



with the venom we found greater amounts of protein inside the tubules and in the glomerular spaces. We also found a tubular necrosis in two kidneys.

With this technique we now have a model to study nephrotoxic drugs. We conclude that the venom produces significant alterations of UF, GFR, RVR, PP,  $TNa^+$ ,  $\%TNa^+$  and  $\%TK^+$ , with a decrease in levels of tissue  $Na^+$  and  $K^+$ .

# **Introdução**

## **Generalidades Sobre o Envenenamento Ofídico:**

Em nosso país o estudo das peçonhas teve início no século passado com João Batista de Lacerda que realizou algumas pesquisas de importância sobre a farmacologia do veneno de serpentes brasileiras (Vital Brazil, 1982). No entanto, deve-se a Vital Brazil o grande desenvolvimento das investigações sobre peçonhas e animais peçonhentos bem como a profilaxia e tratamento dos acidentes causados por tanatofídios, escorpiões e aranhas.

Em 1901 Vital Brazil demonstrou a especificidade de soros pela imunização com veneno de diferentes espécies de serpentes e observou que o soro destes animais neutralizava exclusivamente ou com maior eficiência o veneno que foi utilizado para imunização. Ele foi o primeiro cientista a preparar soros mono e polivalentes (Vital Brazil, 1987).

No Ceará, os trabalhos sobre ofidismo são escassos. Entre os poucos existentes, destacamos as publicações de Lima Verde (1972, 1987) e Guimarães et al. (1989). Neste último trabalho os autores fizeram levantamento estatístico na divisão de Epidemiologia da Secretaria de Saúde deste Estado, entre os anos de 1986 a 1988, onde verificaram a ocorrência de 1079 casos, com 17 óbitos e letalidade de 1,6% (Tabela 1).

**Tabela1: Acidentes Ofídicos no Ceará (1986 - 1988)**

<b>Ano</b>	<b>Número de Casos</b>	<b>População</b>	<b>Incidência/ 100.000 hab.</b>	<b>Óbitos</b>	<b>Letalidade</b>
1986	285	5.917.929	4,81	3	1,05
1987	369	6.027.082	6,12	10	2,71
1988	386	6.138.248	6,28	4	1,03

Fonte: Suds / S.S.E. / DIEPI

\* Modificada de Guimarães et al., 1989.

Podemos observar pela tabela 2 que o acidente ofídico mais comum no nosso meio (serpentes identificadas) é por *B. jararaca*.

No Brasil os acidentes por *Micrurus* (cobra coral) são pouco frequentes, porém de grande gravidade.

Os acidentes por *Crotalus d. terrificus* ocorrem numa percentagem de 11 a 12% do total. Apesar de sua baixa frequência, apresentam elevada toxicidade, superior a causada pela picada de *Bothrops*, e causam paralisia flácida, nefrotoxicidade, hemólise (in vitro) e mioglobínúria (Raab et al., 1966; Rosenfeld, 1968).

A grande toxicidade da peçonha se deve principalmente à crotoxina (Vital Brazil et al., 1966). A peçonha da cascavel possui outros componentes farmacologicamente ativos tais como crotamina, convulxina, giroxina, deltatoxina, componente liberador de histamina e fator coagulante (Vital Brazil

**Tabela 2**  
**Acidentes Ofídicos no Ceará Segundo o Gênero de Serpente (1986-1988)\***

<b>Animal</b>	<b>1986</b>	<b>%</b>	<b>1987</b>	<b>%</b>	<b>1988</b>	<b>%</b>
Jararaca (B. jararaca)	146	51.23	81	21.95	113	29.27
Cascável (Crotalus)	7	2.46	28	7.59	29	7.51
Coral (Micrurus)	7	2.46	4	1.08	11	2.85
Surucucu (Lachesis)	1	0.35	2	0.54	2	0.52
Serpentes não Venenosas	1	0.35	3	0.81	62	16.06
Serpentes não Identificadas	106	37.19	72	19.51	164	42.49
Animais não Identificados	17	5.96	179	48.51	5	1.30
<b>Total</b>	<b>285</b>	<b>100.00</b>	<b>369</b>	<b>100.00</b>	<b>366</b>	<b>100.00</b>

\* Modificada de Guimarães et al., 1989.

et al., 1972)

No Brasil o gênero *Bothrops* é responsável por cerca de 90% do total dos acidentes ofídicos (Hoge e Romano, 1972). Estes venenos causam intensa dor local, sempre com hemorragia e necrose de tecidos que podem ser severas, necessitando amputação (Vital Brazil, 1911; Iwanaga e Suzuki, 1979; Haad, 1980, 1981). Os efeitos sistêmicos incluem coagulação sanguínea (Klobusitzki, 1961), hemorragia (Mandelbaum et al., 1976; Vargatftig, 1974, Ohsaka, 1979; Soto et al., 1978), choque cardiovascular (causa mais frequente de morte) (Vital Brazil, 1982), mioglobínúria e liberação de compostos farmacologicamente ativos como histamina e bradicinina (Rothschild et al., 1979). As principais espécies são: *B. jararaca*, *B. erythromelas*, *B. cotiara* e *B. neuwiedi*.

A mortalidade diminui de 20 para 2% quando os pacientes são tratados com o soro antiofídico ou antibotrópico. A toxicidade dos venenos botrópicos é menor do que dos crotálicos (Vital Brazil, 1911; Vital Brazil, et al 1966). A quantidade média de veneno inoculado em cada picada é de aproximadamente 65mg (Belluomini, 1967).

Os venenos animais são também denominados zootoxinas e podem ser classificados em peçonhas e substâncias tóxicas (Vital Brazil, 1982). As peçonhas são substâncias elaboradas por glândulas especializadas (veneníferas) que desempenham papel relevante na sobrevivência do indivíduo, da colônia e da espécie. As substâncias tóxicas estão localizadas nas vísceras, pele, músculo e humores de várias espécies animais podendo ser elaboradas nos próprios tecidos ou incorporadas pela ingestão de dinoflagelados e/ou outros organismos do fitoplankton. Além de desempenharem papel na defesa do indivíduo contribuem para diminuir a população de eventuais predadores, mantendo o equilíbrio do ecossistema.

Segundo Vital Brasil (1982), os animais peçonhentos podem ser classificados em:

- a) Animais peçonhentos vulnerantes (ofídios e escorpiões): inoculam secreção venenosa em suas vítimas através de cerdas, acúleos ou dentes;
- b) Animais peçonhentos por contato: elaboram substâncias tóxicas que ao atingirem o agressor promovem efeitos colaterais ou gerais (batráquios);
- c) Animais peçonhentos por projeção: projetam a secreção de glândulas veneníferas (serpentes africanas da família *Elapidae* e coleópteros vesicantes-potós). Somente devem ser consideradas como “verdadeiramente peçonhentas” as serpentes capazes de inocular o veneno de suas presas naturais no homem ou em outros animais.

Quanto à dentição os ofídios podem ser divididos em 4 grupos (Underwood, 1979 e Vital Brazil, 1982): Aglifas, Opistóglifas, Proteróglifas e Solenóglifas, sendo as duas últimas peçonhentas.

De grande importância no Brasil temos as seguintes serpentes: *Crotalus* (cascavel sul-americana), *Bothrops* (serpentes do gênero *Bothrops*) e *Elapídicas* (cobras corais). Estas serpentes pertencem a família *Viperidae* com duas sub-famílias, *Viperinae*, sem representantes no Brasil, e *Crotalinae* com os gêneros *Crotalus*, *Bothrops*, *Sistrurus*, *Lachesis* e *Agkistrodon*. Possuem um aparelho inoculador especializado que é constituído por dois dentes maxilares modificados (presas) ligados através de dois ductos às glândulas veneníferas. Durante o ataque eles formam um sistema tipo seringa que permite a inoculação

do veneno (Kochva e Gans, 1970).

Nas serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* a inervação dos músculos é diferente, permitindo que elas controlem a quantidade de veneno a ser injetada, podendo variar de 0 a 90%. O veneno é acumulado no lúmen da glândula e é expelido durante a picada. Trabalhos sobre estrutura e função das glândulas veneníferas são extensivamente revistos por Gans e Elliott (1968), Kochva e Gans (1970) e Bdolah (1979). O líquido amarelo produzido pelas glândulas veneníferas contém uma expressiva quantidade de toxinas, enzimas e outros componentes.

Enzimas encontradas no veneno têm sido usadas como marcadores no estudo do processo secretório. Na *B. jararaca* repetidas marcações a cada 3 - 4 dias de intervalo acusaram um decréscimo no veneno e uma regeneração de algumas enzimas do próprio veneno (Schenberg et al., 1970).



## **Química e Bioquímica dos Venenos Ofídicos:**

Os venenos presentes em diversos tipos de animais (serpentes, escorpiões e aranhas) contêm várias enzimas. As atividades dessas enzimas não podem ser ignoradas quando se considera a ação fisiopatológica do veneno como um todo (Meldrum, 1965). Encontram-se descritos a seguir os prováveis mecanismos fisiopatológicos:

- a) Efeito local com dano capilar e necrose de tecidos por proteinases, fosfolipases, arginina éster hidrolase e hialuronidase (Slotta, 1955; Iwanaga e Suzuki, 1979; Harris, 1985);
- b) Ação coagulante e anticoagulante pelo efeito de várias proteinases e fosfolipase A (Vital Brazil, 1982);
- c) Hipotensão aguda e dor devido a peptídeos vasoativos do sistema cinina (cininogenase) Iwanaga e Suzuki (1979).

Algumas enzimas são encontradas em todos os venenos, outras ocorrem em certos grupos taxonômicos e são características somente de algumas espécies (Iwanaga e Suzuki, 1979). Segundo os mesmos autores (1979), as principais enzimas encontradas nos diversos venenos ofídicos são: Fosfolipase A<sub>2</sub> (3.1.1.4), L-Aminoácido Oxidase (1.4.3.2), Fosfodiesterase (3.1.4.1), 5-Nucleotidase (3.1.3.5), Fosfomonodiesterase (3.1.3.2), Desoxirribonuclease (3.1.4.6), Ribonuclease (2.7.7.16), Adenosina Trifosfatase (3.6.1.8), Hialuronidase (4.2.99.1), NAD-Nucleotidase (3.2.25), Arilamidase e Peptidase, presentes em todos venenos; Endopeptidase, arginina-éster-hidrolase, cininogenase (3.4.4.21), 'trombin like enzima' (enzima semelhante a trombina), ativador do fator X e ativador da protombina presentes em venenos *Crotalídeos e Viperídeos*; Acetilcolinesterase (3.1.1.7), FosfolipaseB (3.1.1.5) e glicerofosfatase, presentes somente em venenos

elapídicos; Transaminase glutâmica pirúvica (2.6.1.2), catalase (1.11.1.6), amilase (3.2.1.1.), b-glucosaminidase, lactato desidrogenase (1.1.1.27) e 'heparinase like enzima' (enzima semelhante à heparina), encontradas em outros venenos não especificados.

O estudo comparativo das atividades enzimáticas dos venenos confirma a grande heterogeneidade destes produtos naturais. Certas enzimas são típicas de certas famílias de veneno. O veneno elapídico por exemplo é caracterizado pela acetilcolinesterase, que nunca é encontrada nos viperídeos e crotalídeos (Iwanaga e Suzuki, 1979).

Por outro lado endopeptidase, arginina-éster-hidrolase, 'trombin like enzima', cininogenase e fator procoagulante que são distribuídos nos venenos viperídeos e crotalídeos não são encontrados nos venenos elapídicos (Deutsch e Diniz, 1955; Iwanaga e Suzuki, 1979). Com raras exceções (*Ophiophagus hannah* e *Pseudechis collettii*), o veneno elapídico possui baixa atividade proteolítica e de arginina-éster-hidrolase.

As enzimas podem estar sujeitas a grandes variações dependendo da condição da serpente (idade, nutrição, sexo, espaço físico ou habitat). Bonilla et al (1973) compararam várias atividades enzimáticas de venenos estudando 4 grupos de serpentes *C. horridus horridus* (3-6, 7-12, 13-18 meses e adultos). O resultado sugeria um aumento contínuo no conteúdo total de proteínas desde o nascimento até a vida adulta. A atividade L-amino ácido oxidase aumentava com a idade, contudo a atividade de fosfodiesterase e 'trombin like enzima' aparentemente diminuía no animal adulto.

Outra dificuldade a ser considerada no estudo comparativo de atividade

enzimática é que o valor obtido não representa o valor absoluto. Alguns destes venenos (*V. ammodytes*) contêm um inibidor que reduz sua atividade proteolítica (Raudonat e Rocha e Silva, 1962) e uma enzima que destrói a cinina, principalmente endopeptidase interferindo com a atividade cininogenase (Iwanaga e Suzuki, 1979).

As diferenças na composição dos venenos não são somente restritas às suas enzimas, mas também para polipeptídeos tóxicos e substâncias biologicamente ativas. É bem conhecido que o veneno elapídico contém toxinas de baixo peso molecular (10.000) que passam através de membrana de diálise (30 a 70%), enquanto nos venenos viperídeos e crotalídeos são de alto peso molecular e pouco dialisáveis - 5 a 17% - (Mebs, 1969).

Estes resultados sugerem as características peculiares para os venenos. No veneno elapídico a substância molecular é pequena e pobre em enzimas e nos venenos viperídeo e crotalídeo a proteína apresenta alto peso molecular, sendo ricos em enzimas (Mebs, 1973).

## **Tipos de Toxinas Presentes no Veneno de Serpente**

As proteínas dos venenos ofídicos podem ser apresentadas em mais de 10 categorias com base em sua estrutura química e propriedades farmacológicas. Para maior simplificação, as toxinas protéicas podem ser agrupadas em 4 grupos (Karlsson, 1979):

- a) Neurotoxinas pós-sinápticas (cadeias curtas e longas);
- b) Toxinas de membrana (cardiotoxina, citoxina, fator lítico, citotoxina e outros);
- c) Toxinas com estrutura fosfolipásica (toxinas pré-sinápticas, mionecróticas) e
- d) Outras toxinas (crotamina, convulxina, giroxina, toxina mojave).

As neurotoxinas são as frações mais tóxicas dos venenos e estão divididas em classes farmacológicas de acordo com seu sítio de ação: muitas revisões sobre neurotoxinas foram realizadas desde 1970 (Jimenez Porras, 1970; Lee, 1972; Cheymol et al., 1972; TU, 1973; Mebs, 1973; Zlotkin, 1973; Yang e Chang, 1974; Karlsson, 1979).

As neurotoxinas pós-sinápticas se ligam ao receptor nicotínico da acetilcolina e impedem a sua ação despolarizante. Estas toxinas são comumente referidas como curariméticos, curariformes ou 'curare like'.

As neurotoxinas pré-sinápticas inibem a liberação de acetilcolina tendo letalidade maior do que a das toxinas pós-sinápticas. As neurotoxinas pré-sinápticas são extremamente letais e estruturalmente relacionadas com fosfatase A. Algumas neurotoxinas pré-sinápticas podem ter efeito mionecrótico

produzindo necrose de fibras musculares (Karlsson, 1979).

Toxinas de membrana formam outro grande grupo. Elas alteram a permeabilidade de membranas em uma grande variedade de células e tecidos, podendo ser referidas também como cardiotoxinas, fator lítico ou toxina citotóxica (Harris, 1984; Meldrum, 1965).

Ao lado de uma grande variedade de substâncias presentes no veneno ofídico, o 'nerve growth factor' (NGF) é uma das substâncias que mais desperta curiosidade, sendo um agente que regula o crescimento e diferenciação de neurônios simpáticos e em alguns casos do tecido neural (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968). O NGF representa um grupo de proteínas relacionadas pela evolução de um gen ancestral comum. O NGF pode ser encontrado em baixas concentrações, numa variedade de tecidos em todos os vertebrados examinados (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968). Esta substância está presente em maior concentração em três famílias de serpentes venenosas: *Elapidae*, *Crotalidae* e *Viperidae*. Todas as espécies da família *Crotalidae* examinadas possuem NGF (Hogue-Angeletti e Bradshaw, 1979). O NGF da *Bothrops jararaca* apresenta um componente principal com peso molecular de cerca de 30.000.

## **Constituintes Inorgânicos e Constituintes Orgânicos Não Proteicos**

Aproximadamente 90% do conteúdo do veneno é de material proteico. A maioria dos componentes tóxicos e biologicamente ativos consiste de material protéico. A porção não protéica do veneno é muito menor e em geral biologicamente menos ativa. A fração não proteica contém íons metálicos, ânions inorgânicos e algumas moléculas orgânicas pequenas incluindo peptídeos, lipídios, nucleosídeos, carboidratos e aminas (Bieber, 1979).

Os constituintes inorgânicos incluem metais e não metais. No grupo dos metais podemos citar o  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$  e  $Co^{++}$  (Devi, 1968; Friedrich e TU, 1971; Bieber, 1979). Um estudo sistemático destes metais existentes no veneno de 17 tipos de serpentes (Friedrich e TU, 1971) incluindo *Crotalidae*, *Viperidae* e *Elapidae* demonstrou que a atividade proteolítica e hemorrágica decrescia marcadamente após diálise, sugerindo que os metais iônicos podem ser responsáveis por estas atividades. Observou-se o reaparecimento de atividade hemorrágica quando à fração dialisada era adicionado o íon magnésio após 48 horas de diálise com água destilada (Bieber, 1979). Dentre os não metais inorgânicos presentes destacam-se o fósforo e o cloro (Devi, 1968; El-Hawary e Hassan, 1974a; Bieber, 1979). Até agora não há demonstração de função fisiológica para os mesmos.

O fósforo contido no veneno pode ser resultante de degradação dos tecidos da glândula venenífera porque muitos venenos contêm enzimas capazes de hidrolisar ácidos nucleicos, fosfolipídeos e ésteres de fosfato orgânico.

Os principais constituintes orgânicos não protéicos são os lipídios,

carboidratos, riboflavina, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos. Devi (1968) demonstrou a presença de lipídios e ribose nos venenos de *N. naja*, *V. russell*, e *C. durissus terrificus*, e descreveu também a presença de galactose e glicose em *V. russell*. Em geral a cor amarela do veneno é devido à presença de riboflavina. Uma extensa literatura indica a sua presença como coenzima L-amido-ácido-oxidase. (Sarkar e Devi, 1968). Foi demonstrada a presença de açúcar no veneno de *B. jararaca* (Fischer e Dorfel, 1954), purina (Doery, 1954) e de hipoxantina (Doery, 1957).

Aminoácidos e peptídeos são os constituintes não proteicos que apresentam maior atividade biológica. Um grupo de pequenos peptídeos apresenta potente efeito vasoativo nos sistemas biológicos. Os resultados de vários estudos sugerem que muitos ácidos que ocorrem em proteínas estão presentes na forma livre no veneno ofídico (Devi, 1968; El Hawary e Hasson, 1974b; Bieber, 1979). Serotonina, bufotenina e n-metiltriptofano estão presentes nos venenos de serpentes elapídicas, viperídicas e crotalídicas (Welsh, 1966). Rocha e Silva e colaboradores (1949) foram os primeiros a demonstrarem a liberação de bradicinina no plasma sob a ação do veneno de *B. jararaca*. Uma fração peptídica farmacologicamente ativa é o fator potenciador da bradicinina (BPF). Este fator inibe as enzimas proteolíticas que inativam a bradicinina e catalisam a conversão de angiotensina I em angiotensina II. Através de métodos de fracionamento do veneno de *B. jararaca* foram isolados nove peptídeos biologicamente ativos (Ferreira et al., 1970)

## **Lesões Presentes no Envenenamento Ofídico**

Mitchell(1860-1868) em estudo experimental sobre lesões causadas pelo veneno de cascavel, verificou que o efeito do mesmo sobre mesentério era a hemorragia. Concluiu da mesma observação que o sangramento era provocado pela ação direta do veneno. Posteriormente Mitchell e Reichert (1886) observaram que a hemorragia não ocorria nas artérias e nas veias, mas somente nos capilares. Como não encontraram lesões ou rupturas da parede capilar, deduziram que o sangue escapava por filtração através da parede vascular.

Noguchi (1909) demonstrou ação tóxica do veneno de *Crotalus adamanteus* sobre endotélio. Pearce (1909) em um trabalho considerado clássico, descreveu as lesões glomerulares produzidas experimentalmente pelo veneno de *Crotalus adamanteus* . Pearce demonstrou a presença de uma lesão glomerular "exudativa" isolada ou associada à hemorragia. Mallory (1926) realizou estudos histológicos de três casos de necrópsia nos quais descreveu numerosos trombos hialinos nos capilares do pulmão e no fígado, fragmentação da íntima dos vasos enquanto a média e a adventícia não mostraram alterações.

Mac-Clure (1935) publicou um caso clínico de *B. jararacussu* onde relatou lesões que consistiram em uma glomerulonefrite difusa aguda.

Taube e Essex (1937) após injeção intravenosa de veneno de *Crotalus adamanteus* em cães encontraram hemorragias petequiais maciças em todas as serosas e mucosas e em várias parênquimas.

Rotter(1937), na Costa Rica, descreveu alterações histológicas por *B. atrox* em coelho, concluindo que a sua ação proteolítica era menor do que a de



*B. jararaca*. Rotter também descreveu lesões do sistema nervoso central e do sistema vascular em três pacientes picados por *Bothrops*, com as seguintes características: forte edema e hemorragia nas vizinhanças da picada, grandes artérias e veias sem anormalidades, pequenas artérias com alterações graves, hemorragia do cerebelo, danos arteriais nos gânglios de base, causando uma perturbação funcional do sistema vascular cerebral, bem como diminuição de consistência das meninges. Edema pulmonar e hiperemia de órgãos parenquimatosos também foram descritos.

Magalhães (1935) observou hemiplegia, em um paciente, oito dias após picada de *Crotalus terrificus terrificus*.

Fidler et al. (1940) estudaram alterações patológicas experimentais provocadas pela injeção do veneno de *Crotalus adamanteus* (Rattlesnake) na *Macaca mulatta* que apresentou edema hemorrágico na pele no local da inoculação, com lesões necróticas na parede dos pequenos vasos e capilares que continham trombos. Em três animais houve degeneração gordurosa dos túbulos renais, cuja provável causa mortis foi o choque. Contudo, não encontraram lesões hemorrágicas ou exsudativas das alças glomerulares descritas por Pearce (1909). No SNC encontraram leve congestão no cerebelo e medula, nos pequenos vasos, meninges e substâncias cinzenta e branca.

Amorim e colaboradores (1951) após minucioso estudo histopatológico relataram os resultados experimentais de pesquisas feitas com veneno de *Bothrops jararaca* em coelhos e ratos, e com veneno crotálico em coelhos, ratos e cães. Os autores chegaram as seguintes conclusões:

- a) As hemorragias eram frequentes em vários órgãos internos e vasos no sistema nervoso;

- b) Era frequente a trombose hialiana dos capilares do pulmão;
- c) A necrose hialina da parede capilar, anteriormente descrita por Rotter, só foi encontrada em 1 caso de envenenamento, na pele no local da injeção;
- d) Não houve lesões de glomerulonefrite focal ou difusa no coelho e no rato;
- e) No envenenamento botrópico encontraram lesões hemorrágicas glomerulares no rim, idênticas àquelas descritas por Pearce no envenenamento pela cascavel Norte Americana, *Crotalus adamanteus*.

“As lesões produzidas nos órgãos no ofidismo experimental variam segundo a espécie zoológica dos animais empregados e conforme a qualidade do veneno, que depende do fenômeno e da espécie zoológica da serpente doadora do mesmo” (Amorim et al., 1951).

Após minucioso estudo histopatológico, Azevedo e Teixeira (1938) descreveram um caso onde o paciente picado por *B. jararaca* apresentou necrose simétrica da córtex renal, hemorragia da cápsula renal, da mucosa intestinal e das pleuras, necrose das células hepáticas, hiperemia das glândulas supra-renais, broncopneumonia hemorrágica e hidroperitônio. Edema e hiperemia dos pulmões, edema da vesícula biliar e edema sub-cutâneo também foram evidenciados. Os principais achados clínicos foram a anemia com endoarterite e a glomerulonefrite difusa levando à necrose simétrica da córtex renal, ocasionada por lesões obliterantes dos vasos renais. As causas mais comuns de necrose bilateral aguda da córtex renal em adultos são os acidentes no último semestre da gravidez (Matlin e Gary, 1974), septicemias, toxinas, traumas, queimaduras, pancreatite hemorrágica aguda e acidentes ófidicos.

Segundo Houssay (1930) as ações tóxicas das peçonhas ofídicas podem ser divididas em curarizantes (peçonha da *Naja-naja*), neurotóxicas (peçonha do gênero *Crotalus*), chocantes ou hipotensoras (peçonha do gênero *Bothrops*) e coagulantes maciças do sangue (peçonha *Vipera russell* ou injeções venenosas de doses elevadas de peçonha de *Bothrops*).

Segundo Vital Brazil (1982) as peçonhas viperídicas se caracterizam na sua grande maioria por induzirem estado de choque (causa mais frequente de morte), exercerem intensa atividade proteolítica, coagularem o plasma sanguíneo, produzirem hemorragia, produzirem acentuado efeito local com hemorragia e necrose dos tecidos, liberarem substâncias farmacologicamente ativas como bradicinina e histamina e não produzirem efeitos neurotóxicos com exceção do gênero *Crotalus*.

Especialmente com relação à peçonha de *Bothrops*, Vital Brazil (1982) ressaltou como principais características a indução do estado de choque, atividade proteolítica, hemorragia, liberação de bradicinina, edema hemorrágico e necrose de tecidos.

O choque é portanto a causa mais frequente de morte no envenenamento botrópico. O mecanismo fisiopatológico envolve a liberação de bradicinina, perdas sanguíneas por hemorragias de vários órgãos, desvio de plasma para o edema, liberação de várias substâncias em consequência da ação citotóxica de enzimas proteolíticas e de fosfolipases mionecrosantes, alterações renais, e presença de trombo serpentina e ativador do fator X podendo levar à coagulação intravascular disseminada.

Os principais componentes dos venenos que têm sido relacionados com os

efeitos locais são as proteases, as fosfolipases e as hemorraginas.

A hemólise é mais frequente nos acidentes com elapídeos do que com viperídeos ou crotalídeos. A fosfolipase A e o DLF (fator lítico direto) são os mais ativos componentes na hemólise (Condrea, 1979). Os efeitos hemorrágicos e necróticos durante muito tempo estiveram relacionados com a ação de enzimas proteolíticas (Houssay 1930). Posteriormente estudos comprovaram a dissociação destas atividades (Ohsaka 1979). Mandelbaum et al. (1988) estudaram a relação de fatores hemorrágicos e proteases isolados de três espécies de *Bothrops* (*jararaca*, *newiedi* e *moojeni*). O veneno de *B. Jararaca* possui os fatores hemorrágicos HF1, HF2 e HF3 e a toxina bothropasina, que é capaz de provocar hemorragia quando usada em doses maiores do que o fator hemorrágico (HF2) que possui peso molecular de 50.000 (Queiroz et al., 1985). Atualmente cerca de 40 toxinas hemorrágicas já foram isoladas em veneno de viperídeos (Mandelbaum, 1988).

O efeito do edema parece ser devido à liberação de mediadores como: aminas biológicas, histamina, serotonina e prostaglandinas (Rothschild, 1979). A liberação destes compostos parece estar relacionada ao aumento da permeabilidade capilar, hipotensão e choque. As enzimas implicadas nestas atividades são as cininogenases, fosfolipases e hidrolases de éster da arginina.

A liberação de histamina de tecidos parece estar relacionada com as fosfolipases (Rothschild et al.; 1979), porém outros componentes do veneno como o fator liberador de histamina (do veneno de *Vipera palestinae*), crotamina e DLF (do veneno de *Naja naja*) são capazes de liberar histamina (Damerou et al., 1975).

Trabalho recente de Kaouyoumdjian & Polizelli (1989) relaciona o tamanho da serpente *B. moojeni* com seus efeitos tóxicos, concluindo que as maiores serpentes apresentam aumento nas suas ações locais como edema, necrose e infecção secundária com leve perda em sua ação coagulante.

Vargaftig (1970) observou a liberação de um fator hipotensor após incubar gema de ovo ou lecitina com veneno de *B. jararaca*, *B. atrox* e *B. adamanteus*. Esses venenos contêm fosfolipases e poderiam estar gerando SRS (slow reacting substance). Essa substância de reação lenta é resultante da ação de enzimas intracelulares sobre ácidos graxos liberados pelas fosfolipases que agiriam sobre os fosfolípidos da membrana liberando ácidos graxos (ácido araquidônico), que sob a ação da cicloxigenase e lipoxigenases formam compostos ativos como as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (Damerou et al., 1975; Harris, 1985). Estes compostos ao produzirem seus efeitos biológicos causariam aumento da permeabilidade vascular, edema e hipotensão. O mecanismo produtor de hipotensão ainda não se encontra totalmente elucidado, mas parece resultar dos efeitos causados pelos componentes do veneno e das substâncias liberadas.

Os venenos botrópicos possuem atividade anticomplementar (Calich et al., 1978) que pode induzir a formação de anafilatoxinas do tipo C3a e C5a semelhante ao que ocorre com o veneno de *Naja naja* (Vogt, 1974). Apesar da capacidade de liberar histamina, a maior importância parece estar relacionada à indução de quimiotaxia no local da picada (Rothschild et al., 1979), não sendo provavelmente responsável pelos acentuados efeitos locais.

## Nefrotoxicidade

As alterações renais causadas por picada de serpentes incluem glomerulite (Sant et al., 1972), glomerulonefrite (Seedat et al., 1974), arterite (Sitprija et al., 1979), nefrite intersticial (Sant et al., 1972), necrose tubular (Sitprija et al., 1973 e 1979; Chugh et al. 1975; Amaral et al., 1985 e 1986), necrose cortical (Oram et al., 1963; Varagunam et al., 1970; Amaral et al., 1985) e infarto renal (Raab et al., 1966). A insuficiência renal é portanto a manifestação mais comum. Outras alterações são a hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria, proteinúria e síndrome nefrótica (Steinbeck, 1960).

Amaral et al., (1985) descreveram necrose cortical após acidente por *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Neste trabalho demonstraram ação nefrotóxica direta e indireta, com alterações glomerulares (nefrite), tubulares, hemólise (hemoglobínúria) e alterações musculares (mioglobínúria).

Recentemente Rezende et al. (1989), descreveram alterações histopatológicas renais em ratos injetados com o veneno de *B. jararaca*, utilizando dose letal 50% (DL50) de 14 µg/g de peso corporal. Doses menores não apresentaram alterações renais evidentes. Os animais tratados com o veneno desenvolveram insuficiência renal caracterizada pelo decréscimo na filtração glomerular, no clearance osmolar, na fração de sódio urinário excretado, bem como o aumento da creatinina plasmática. O histopatológico indicou proliferação da matriz mesangial, alteração degenerativa dos túbulos, caracterizada pela redução das bordas em escova e vacuolização citoplasmática; estas alterações ocorriam 5 horas após exposição ao veneno.

O envolvimento renal ocorre na forma de insuficiência renal aguda,

secundária a necrose tubular (Lopez et al., 1972; Amaral et al., 1986; Kouyoumdjian, 1986), necrose cortical renal (Azevedo et al., 1938; Amaral et al., 1985) e ocasionalmente, glomerulonefrite (Mac Clure, 1935).

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 anafilatoxina 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 (hemoglobinúria e mioglobinúria); hipóxia vascular e infarto renal.

A lesão glomerular pode ser resultado de glomerulonefrite proliferativa (Seedat et al., 1974). Este tipo de lesão (glomerulite, glomerulonefrite 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)

Os achados imunológicos mais comuns consistem na deposição de IgM e

de C3 nas áreas mesangiais se estendendo por toda a parede capilar. A intensidade de deposição varia conforme o veneno, sendo mais acentuado com *Vipera russell* (Sitprija et al., 1979). Amorim et al. (1951) descreveram lesões glomerulares hemorrágicas.

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.D. (coagulação intravascular disseminada) pode causar danos glomerulares com proliferação de células mesangiais (Vassalli e Mc Cluskey, 1965), fato frequente 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).

A lesão arterial foi demonstrada pela ação do veneno de *V. russell*, sendo a alteração mais comum a arterite necrosante da artéria interlobular (Sitprija et al., 1979). Também foi observado tromboflebite com depósito de C3 nas paredes das arteríolas aferentes e eferentes. Os dados sugerem que o efeito pode ser mediado pela ativação do complemento (Sitprija, 1979) não sendo detectadas imunoglobulinas (Bruninga, 1971; Ruddy et al., 1972).

Estudos em pacientes picados por *V. russel* demonstraram degeneração, necrose e regeneração de células epiteliais no túbulo distal e túbulos coletores, com ruptura de membrana basal. Os túbulos proximais foram menos atingidos.



Na insuficiência renal foram observados alterações intersticiais, sendo o edema mais constante e pronunciado na porção cortical. As células inflamatórias (linfócitos, células plasmáticas, mononucleares) estavam presentes no tecido intersticial da junção corticomedular localizadas em torno dos túbulos coletores necrosados, podendo penetrar dentro dos túbulos. As lesões intersticiais são secundárias à necrose tubular. Nefrite intersticial não foi observada. Os túbulos e interstício não apresentaram depósitos imunológicos (Sitprija, 1979).

Segundo Hadler e Vital Brazil (1966) uma das causas de lesão tubular renal seria o efeito da lisolecitina formada pela atividade de fosfolipase A.

A necrose do córtex renal foi observada em acidentes por *B. jararaca* (Azevedo et al., 1938; Sitprija e Boonpucknavig 1979; Amaral 1985); *Echis carinatus* (Oram et al., 1963); *Agkistrodon hypnale* (Varagunam et al., 1970) e *Vipera russel* (Chugh et al., 1975). A lesão é geralmente associada à CID com depósitos de fibrina no leito dos vasos, podendo ocorrer calcificação do córtex (Oram et al., 1963). A lesão renal mais comum nos acidentes por *B. jararaca* é a necrose cortical (Azevedo et al., 1938; Amaral 1985; Sitprija e Boonpucknavig 1979).

O estudo hemodinâmico renal demonstrou uma diminuição da circulação cortical onde encontram-se envolvidos fatores tais como a hipotensão arterial observada no envenenamento crotalídeo (Vital Brazil et al., 1966), CID, hemólise e arterite . A associação entre necrose tubular e CID também foi observada (Clarkson et al., 1970; Sitprija 1979). Algumas vezes a CID pode causar danos glomerulares com proliferação de células mesangiais (Vassalli e McCluskey, 1965), fato frequente nas picadas por crotalídeos.

Observou-se também obstrução tubular causada por hemoglobinúria (Peiris et al., 1969) e diminuição do lúmen arterial em picada por *V. russel*. A mioglobinúria pode ocorrer, sendo secundária a mionecrose, em picadas de serpentes marinhas. Quando ocorre insuficiência renal é devido à obstrução tubular pela mioglobina (Sitprija et al., 1979).

Na figura 1 podemos observar um diagrama da patogênese da lesão renal.

As manifestações clínicas renais mais comuns são a proteinúria, síndrome nefrótica, hematúria microscópica e macroscópica. Hemoglobinúria e mioglobinúria são pouco comuns.

Na insuficiência renal por peçonha de serpentes marinhas há hipercalemia secundária à mionecrose.

# Patogênese da Lesão Renal

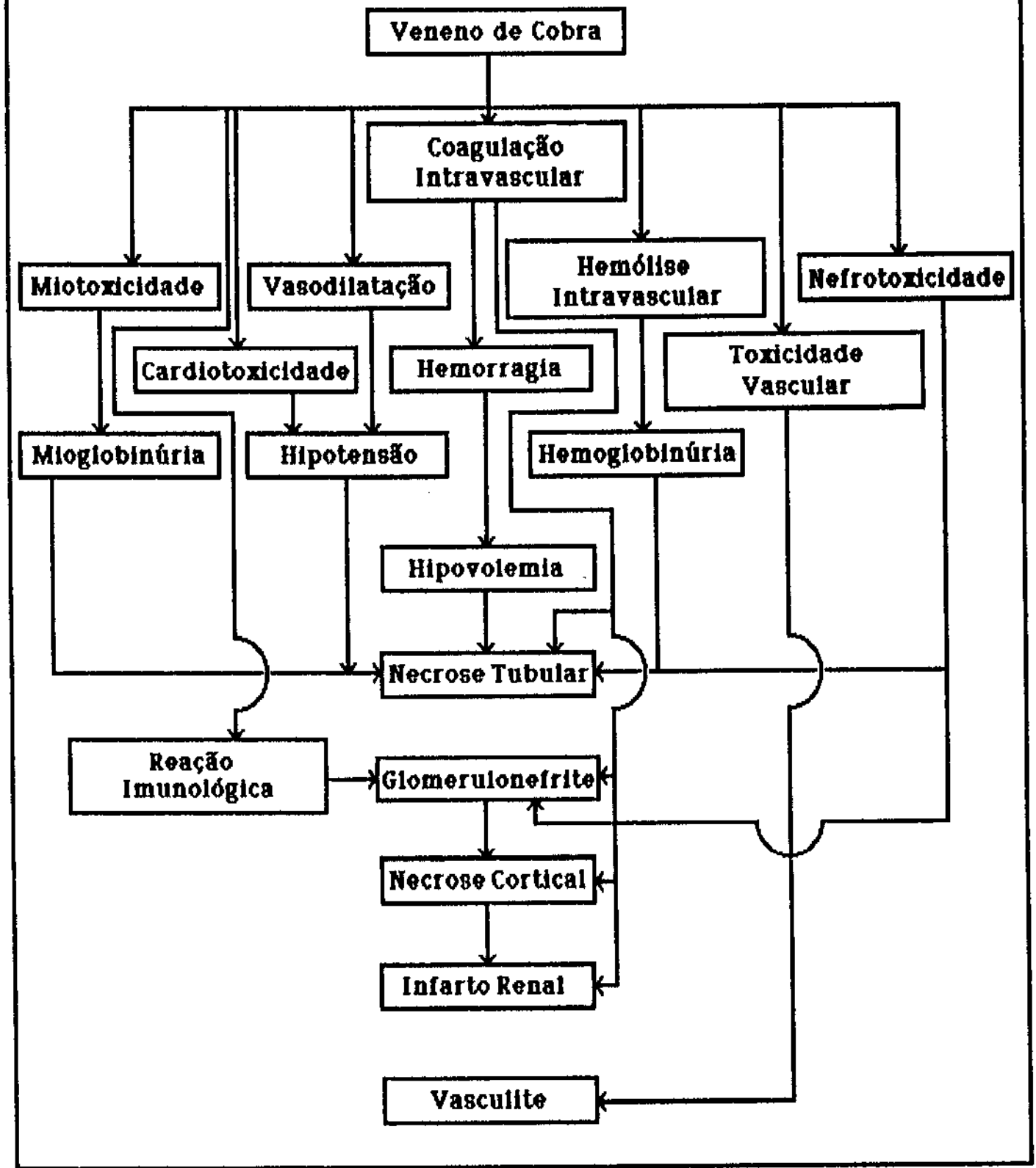


Figura 1

## **Objetivos:**

Os acidentes ofídicos no Brasil têm grande importância na prevalência da insuficiência renal aguda. Em nosso meio é elevada a frequência de acidentes ofídicos por *B. jararaca*, especialmente no meio rural. O presente trabalho tem o objetivo de aprofundar e caracterizar a nefrotoxicidade induzida pelo veneno de *B. jararaca*.

As alterações renais induzidas pelo veneno, bem como a relação dose - efeito sobre o rim são pouco conhecidas e somente estudadas *in vivo* onde fatores neurais e humorais interferem no processo. Utilizando um modelo de perfusão de rim isolado de rato *in vitro* desenvolvido por Bowman e Maack (1970) e Ross (1972), e posteriormente modificado por Fonteles (1980, 1982), podemos avaliar o efeito direto do veneno na preparação.

Os objetivos do presente trabalho são:

- 1) Identificar alterações agudas específicas de função renal induzidas pelo veneno.
- 2) Avaliar alterações histológicas nos rins tratados com o veneno *in vitro*, sem a interferência de outros efeitos fisiológicos de natureza sistêmica.
- 3) Estabelecer relação dose efeito na produção de nefrotoxicidade.
- 4) Avaliar o papel de possíveis fatores determinantes da evolução da insuficiência renal por acidente ofídico bem como da perspectiva de bloqueio farmacológico, mediante o uso de modernos agentes da terapêutica experimental.

## **Material e Métodos**

## **Animais Experimentais**

Ratos albinos, adultos, pesando entre 250 e 320g, de ambos os sexos. Os animais antes de serem utilizados foram mantidos em jejum por 24 horas e água *ad libitum*.

## **Sistema de Perfusão do Rim Isolado**

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado.

Nas últimas duas décadas, algumas descobertas propiciaram uma melhora considerável da perfusão do rim isolado:

- a) O uso de albumina bovina (fração V) pura na solução perfusora (Bowman, 1970; Schurek et al, 1978; Shurek e Alt, 1981; Ross et al., 1978; Bowman e Maack, 1974; Little e Cohen, 1974; De Mello e Maack, 1976);
- b) Uso de solução de Krebs-Henseleit (Shurek, 1980);
- c) Adição de substratos na solução perfusora tais como glicose, aminoácido, lactato, oxalacetato, piruvato (Bahlman et al, 1967; Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967; De Melo e Maack, 1976);
- d) Utilização de um filtro do tipo miliporo no sistema de perfusão para rins de coelho (Pegg, 1971) e rato (Ross et al., 1973; Cohen et al., 1977; Fonteles, 1980 e 1982)
- e) Adaptação de um pulmão artificial (Fonteles, 1980) baseado no modelo de Hamilton et al. (1974), utilizado originalmente

para perfusão de fígado isolado.

Atualmente existem dois modelos para perfusão do rim isolado. O sistema aberto, onde o perfusato não recircula através do rim, cuja principal vantagem é a manutenção constante de parâmetros funcionais renais. Porém, apresenta um elevado gasto de albumina, o que leva a custos operacionais altíssimos. Um outro, o sistema de perfusão com recirculação e diálise, apresenta algumas vantagens como a manutenção constante de parâmetros funcionais renais, utilização de albumina ou outras substâncias na solução perfusora em volume menor, manutenção constante de substâncias dialisáveis na solução de perfusão e a oxigenação adaptada no próprio dialisador. O desenvolvimento deste sistema permitiu uma preparação adequada para muitos estudos de fisiologia, bioquímica, farmacologia, imunologia e endocrinologia (Schurek et al., 1970; Pitts, 1971; Trimble e Bowman, 1973; Ross et al., 1973; Nizet, 1975; Cohen et al., 1977; Hierholzer e Wiederhold, 1976; Maack, 1980, Schurek, 1980; Fonteles, 1980 e 1982).

O sistema de perfusão utilizado neste trabalho baseia-se nas idéias pioneiras de Weiss e colaboradores (1959) e no sistema inicialmente descrito por Bowman e Maack (1972) e Ross (1978). As posteriores modificações introduzidas por Fonteles (1980) e Moreira Lima (1983) culminaram com o desenvolvimento de um sistema de perfusão com recirculação onde foi adicionado um pulmão artificial do tipo silástico. Para a realização satisfatória dos experimentos aqui descritos, fez-se necessária a troca do cilindro contendo a solução perfusora por outro de menor volume (50ml) e de paredes retas o que proporcionou uma maior economia de solução e facilidade na limpeza do sistema (figura 2).

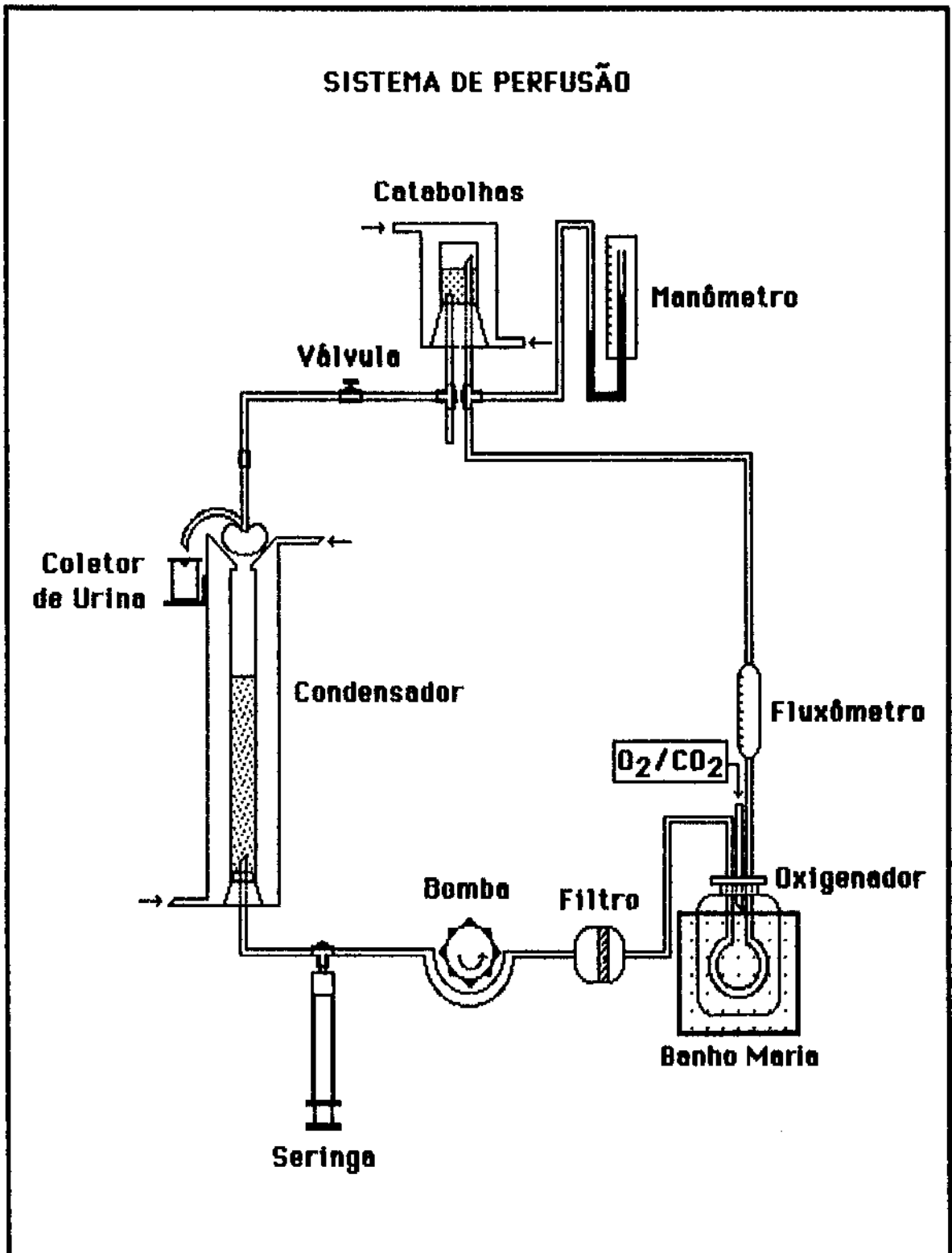


Figura 2



### **Calibração de Fluxo e resistência no sistema de Perfusão**

Após limpeza com detergente e água bidestilada aquecida, o sistema foi montado e calibrado utilizando-se duas curvas. Uma curva relacionando leitura do fluxômetro e fluxo em ml/min (fig 3A). O fluxo foi então calibrado para cada velocidade da bomba de perfusão, registrando-se a pressão de perfusão e o fluxômetro para cada unidade de bomba (1, 2, 3, 4 e 5) plotando-se no gráfico a leitura registrada no fluxômetro. Este procedimento foi realizado antes de cada experimento, com a cânula arterial, para se conhecer o fluxo de perfusão renal em face da resistência da própria cânula. A outra curva relacionava fluxômetro e pressão de perfusão, determinada pela resistência ao fluxo no sistema (figura 3B).

### **Solução Perfusora**

A solução utilizada foi a de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes contendo os seguintes sais:

NaCl	33,50g
KCl	1,85g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,38g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,473g
Uréia	2,5g

48 horas antes do experimento foram preparados 2000 ml de solução retirando-se 100ml da sol. concentrada de Krebs-Henseleit, previamente preparada e acrescida de:

NaHCO <sub>3</sub>	4,2g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,74g

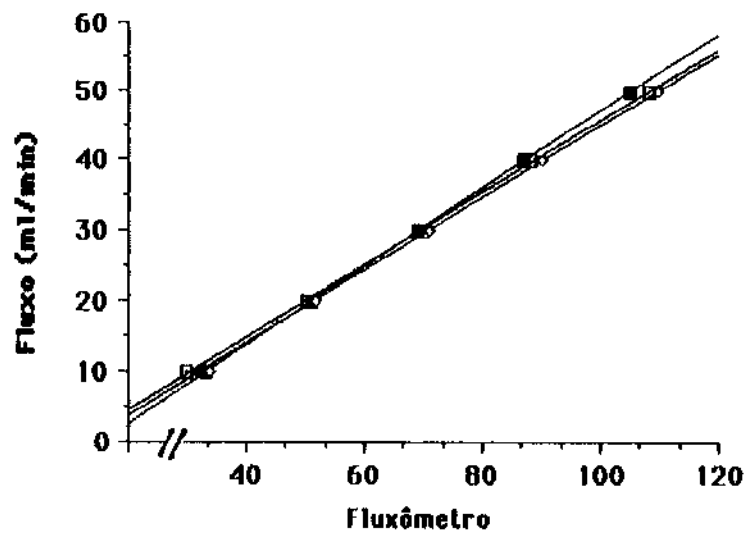


Figura 3a: Retas de Calibração Fluxômetro x Fluxo

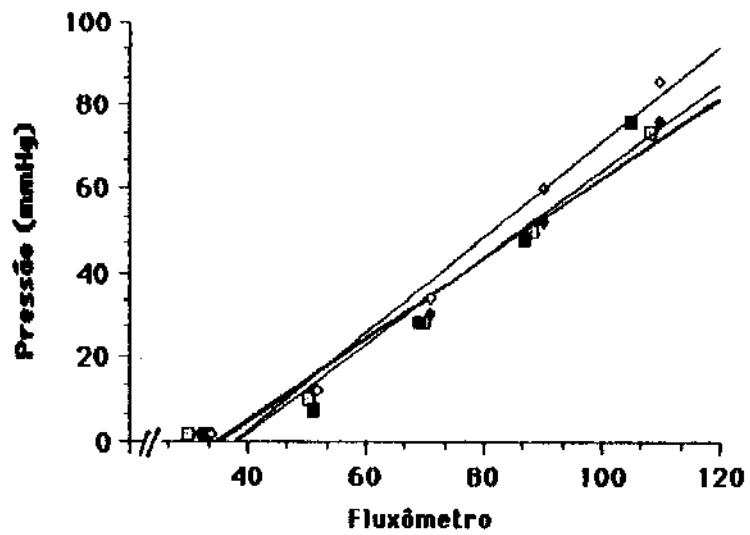


Figura 3b: Retas de Calibração do Fluxômetro x Pressão

Glicose	2,0g
Penicilina	0,050g

Após a diálise adicionou-se:

Inulina	0,075g
Glutation	0,046g

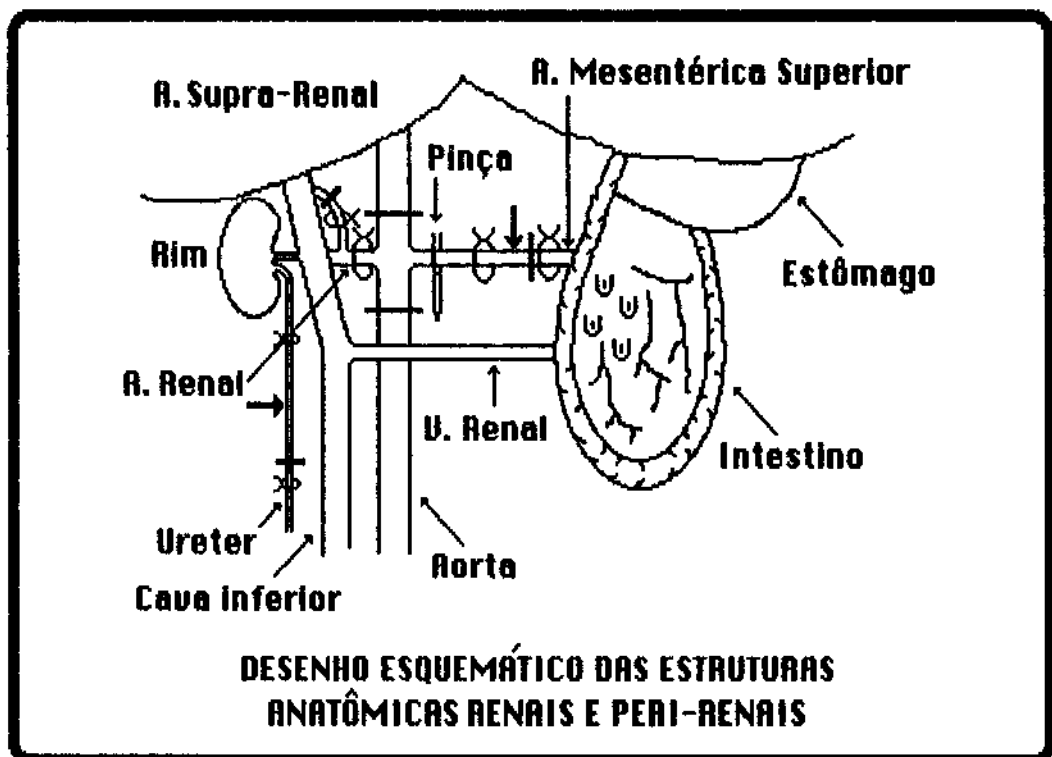
O volume foi completado para 2000ml de água bidestilada. Desta solução foram retirados 120ml e acrescentados 30ml de albumina bovina a 30% (Biobrás) para constituir a solução de perfusão, que foi em seguida colocada em sacos de diálise (Dyalisis "sacks" 250 - 7 U - Sigma). O restante da solução foi colocado dentro de um frasco com capacidade para 2000ml, que banhava a solução de perfusão, já colocada nos sacos de diálise.

A diálise da solução perfusora contendo albumina foi realizada para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (Hanson & Ballard, 1968; Cohen et al., 1977; Schurek et al., 1970; Ross, 1978) por 48 horas. O pH da solução de perfusão foi ajustado para 7,3 - 7,4. A solução de Krebs-Henseleit foi trocada com 24 horas e mantida sobre um homogeneizador em câmara fria a 4°C.

### **Técnica Cirúrgica**

Inicialmente, a técnica descrita neste trabalho era realizada com canulação da artéria renal através da artéria aorta abdominal o que permitia a perfusão do rim isolado sem a interrupção do fluxo sanguíneo a este órgão (Weiss et al., 1959). Esta técnica foi modificada com aprimoramento da canulação da artéria renal através da artéria mesentérica superior (Bahlman et al., 1967; Nishitsutsujuwo et al, 1967).

Os animais foram anestesiados com injeções intra-peritoneais de pentobarbital sódico na dose de 5mg/100g de peso corporal. Inicialmente, a veia femural foi isolada e manitol (100mg) diluído em 1,5 ml de água bidestilada foi administrado. Após realização de assepsia da parede abdominal, procedeu-se a uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba, com cuidado para não lesar os órgãos adjacentes, facilitando a abertura do campo cirúrgico e uma melhor visualização das estruturas anatômicas. Após esta etapa, rebateu-se as vísceras abdominais para o lado esquerdo e com uma gaze umedecida em soro fisiológico a 38°C, manteve-se a umidade dos tecidos. Com este procedimento foi possível a visualização do rim direito e das estruturas circunvizinhas. Com uma lupa (7x) foi identificada e dissecada a artéria mesentérica superior e observado se havia coincidência no mesmo plano com a origem da artéria renal direita na aorta abdominal. Após este procedimento o ureter direito foi dissecado e obstruído distalmente, seguindo-se sua canulação com um tubo de polietileno (PE 50). Posteriormente a artéria renal direita foi identificada e dissecada. A artéria supra-renal direita foi identificada justamente com a glândula supra-renal direita, sendo isoladas, suturadas e seccionadas. O rim direito foi descapsulado e limpo da maioria dos tecidos peri-renais. Injetou-se então mais 100mg de manitol e 50 unidades de heparina na veia femural. Após o início do procedimento cirúrgico uma parte da solução (40ml) já oxigenada foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para canulação da artéria renal; a via de acesso foi a artéria mesentérica superior, introduzindo-se a cânula arterial renal na direção da artéria renal direita penetrando cerca de 3 a 5mm, sendo feita a fixação da cânula. Logo após, os órgãos foram isolados com pinças hemostáticas e seccionados, sendo retirado o rim com o ureter livre dos outros órgãos e fixado à cânula perfusora. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro* sem interrupção do fluxo (Figura 4).



**Figura 4**

## **Protocolo Experimental**

Após a colocação do rim no sistema aguardou-se um período de tempo de 15 a 20 minutos para que o órgão se adaptasse as novas condições experimentais. O tempo de perfusão foi de 90 minutos, sendo que a cada 5 minutos procedia-se as leituras no fluxômetro e manômetro de mercúrio (que media a pressão de perfusão). A cada 10 minutos foram colhidas amostras de urina e perfusato para análise e verificação de volume urinário, que foram guardados em um freezer a temperatura de -20°C. Posteriormente dosou-se inulina, sódio e potássio, e mediu-se a osmolalidade de cada amostra.

A administração de veneno *B. jararaca* ao líquido perfusor foi feita sempre no 30º minuto de perfusão. As outras substâncias (Web 2086, BN52021, Indometacina) foram colocados no tempo zero, no início da experiência, e após 30 minutos colocou-se o veneno de *B. jararaca*. A quantidade de líquido perfusor no sistema foi 100ml.

### **Substâncias utilizadas**

Foram utilizadas os seguintes sais na solução perfusora: KCl, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaHSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> (MERCK)

Outras substâncias:

Penicilina G Potássio cristalina (Squibb)

Sulfato de Estreptomicina (Fontoura-Wyeth)

Uréia (Carlo Erba)

Inulina (Sigma)

Manitol (Darrow)

Heparina (Roche)

Albumina bovina a 30% (Biobrás)

Glutation (Sigma)

Veneno de *Bothrops jararaca* (Sigma)

BN 52021 (IPSEN e Institut Henri Beaufour)

WEB 2086 (Boehringer Ingelheim)

Indometacina (Sigma)

### **Cálculo dos Parâmetros Funcionais Renais**

As seguintes fórmulas foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (Pitts, 1975; Martinez-Maldonado et al., 1978; Fonteles, 1980):

1.  $FU$  ( $\text{ml. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) = fluxo urinário
2.  $RFG$  ( $\text{ml. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) = ritmo de filtração glomerular
3.  $RFG = (DOU_{in} / DOP_{in} \cdot FU)$   
 $DOU_{in}$  = densidade óptica da inulina na urina  
 $DOP_{in}$  = densidade óptica da inulina no perfusato
4.  $PNa^{+}$  = concentração de sódio no perfusato
5.  $UNa^{+}$  = concentração de sódio na urina
6.  $FNa^{+} = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{sódio filtrado} = RFG \cdot PNa^{+}$
7.  $ENa^{+} = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{sódio excretado} = FU \cdot UNa^{+}$
8.  $TNa^{+} = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{sódio transportado} = FNa^{+} - ENa^{+}$
9.  $\%TNa^{+} = \text{percentual de sódio transportado} = TNa^{+} \cdot 100 / FNa^{+}$
10.  $FK^{+} = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{potássio filtrado} = RFG \cdot PK^{+}$   
 $PK^{+}$  = concentração de potássio no plasma
11.  $EK^{+} = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{potássio excretado} = FU \cdot UK^{+}$   
 $UK^{+}$  = Concentração de potássio na urina
12.  $TK = (\mu \text{Eq. g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{potássio transportado} = FK^{+} - EK^{+}$

13. % TK = percentual de potássio transportado =  $TK.100/FK^+$
14.  $C_{osm}$  ( $ml. g^{-1}. min^{-1}$ ) = clearance osmótico =  $(U_{osm}/P_{osm}).FU$   
 $U_{osm}$  = Osmolalidade urinária  
 $P_{osm}$  = Osmolalidade do perfusato
15.  $C_{H_2O}$  ( $ml. g^{-1}. min^{-1}$ ) = clearance de água livre =  $FU - C_{osm}$
16.  $dTNa^+$  ( $\mu Eq. g^{-1}. min^{-1}$ ) = transporte distal de sódio =  $C_{H_2O}.PNa^+$
17.  $Ed$  ( $\mu Eq. g^{-1}. min^{-1}$ ) = Aporte distal de sódio =  $dTNa^+ + ENa$
18. %  $dTNa^+$  da  $ED$  =  $dTNa^+.100/Ed$  = percentual de transporte distal de sódio
19.  $pTNa^+$  ( $\mu Eq. g^{-1}. min^{-1}$ ) = transporte proximal de sódio =  $FNa^+ - Ed$
20. %  $pTNa^+$  = percentual de transporte proximal de sódio =  $pTNa^+.100/FNa^+$
21.  $RVR$  ( $mmHg/ml^{-1}.g^{-1}.min^{-1}$ ) = Resistência vascular renal =  $(PA - PV)/FPR$   
 $PA$  = Pressão arterial  
 $PV$  = Pressão venosa  
 $FPR$  = Fluxo de perfusão renal

### **Determinação de água tissular e mineralização dos rins para dosagem de eletrólitos ( $Na^+$ e $K^+$ )**

Os dois rins (direito e esquerdo) após cada experimento foram colocados em dois beakers numa estufa a  $90^\circ C$  por 48 horas. O cálculo da água renal foi dado pela diferença do peso úmido (antes de colocar na estufa) e do peso seco dos rins. Posteriormente eles foram colocados em cadinhos e incinerados a  $550^\circ C$  por 12 horas. Em seguida colocou-se 0,2ml de ácido nítrico mais 2ml de água bidestilada sobre as cinzas tendo sido estas aquecidas a  $100^\circ C$  por 2 a 3 minutos.



Após esta etapa o conteúdo dos cadinhos foi diluído em 10 ml de água bidestilada; nesta fase foi realizada a leitura de sódio e potássio no fotômetro de chama. A composição tecidual de potássio foi calculada através da seguinte fórmula:

$$K_t (\text{uEq/g peso seco rim}) = D_k \cdot 10 / \text{peso seco do rim}$$

$K_t$  = potássio tissular

$D_k$  (uEq/ml) = concentração de potássio na amostra diluída

### **Métodos Analíticos**

1. Dosagem de eletrólitos: as dosagens de sódio e potássio em amostras de urina e perfusato foram realizadas por fotometria de chama (Flame Photometer - modelo 443)

2. Dosagem de inulina: as dosagens em amostras de urina e perfusato foram realizadas pelo método de hidrólise direta conforme Gronow (1979) e Fonteles et al. (1982) com modificações, reduzindo as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Em tubos de ensaios previamente marcados foi adicionado 1,0ml de NaOH 1N. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 30 $\mu$ l de urina, perfusato ou água bidestilada (para padrão zero) de acordo com a amostra contida no tubo de ensaio; misturou-se o conteúdo em um aparelho vótex-mixer (agitador). As amostras foram então aquecidas a 100°C por 20 minutos e em seguida transportadas para resfriamento a 4°C na geladeira durante 30 minutos. Na etapa seguinte, acrescentou-se nos mesmos tubos 3,0 ml de difenilamina, levando-os ao 'aparelho misturador'. as amostras foram novamente submetidas a um aquecimento a 100°C e a resfriamento a 4°C. Finalmente, fez-se a leitura das densidades ópticas das amostras em um espectrofotômetro (UNICAN) a 620 nanômetros (nm).

3. Medida da Osmolalidade: as medidas da osmolalidade nas amostras de

urina de perfusato foram realizadas em um osmômetro (Advance Instruments, INC).

### **Técnica Morfológica**

Terminado o experimento o rim perfundido (direito) e o rim controle (esquerdo), foram clivados, fixados em formol a 10% e posteriormente submetidos a um processo de desidratação e diafanização para posterior confecção de cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura. A seguir os cortes foram corados em hematóxilina e eosina. O estudo das lâminas foi realizado através de microscópio óptico (Aus Jena - modelo Ergoval).

### **Análise Estatística**

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho estão apresentados em média e erro padrão da média (E.P.M.). A comparação dos tempos a cada 10 minutos foi realizada entre os grupos controle x veneno, controle x BN 52021, controle x WEB 2086, controle x indometacina, e os grupos entre si. Para análise estatística utilizou-se a análise de variância múltipla com o teste de significância de Fisher (95% de significância), no computador Macintosh Plus usando o programa Statview 512. O teste "t" pareado de Student foi aplicado para análise estatística do potássio e sódio tissulares, dos rins controle e perfundidos, nos vários grupos experimentais, usando o mesmo programa e o computador descritos anteriormente.

A análise estatística utilizada permitiu avaliações da ocorrência de alterações funcionais renais durante o período de perfusão. Correlação linear e o grau de inclinação da reta foram realizados entre alguns parâmetros funcionais renais.

## **Resultados**

### **Estudo comparativo dos parâmetros funcionais renais**

Experimentos preliminares foram realizados na presença de 2, 4 e 6 g% de albumina bovina com a finalidade de avaliar parâmetros funcionais no rim isolado de rato, usando quatro animais para cada grupo. A coleta de amostras obedeceu aos critérios descritos anteriormente em material e método.

Na comparação entre os grupos controle com 2, 4 e 6 g% de albumina, verificou-se que os melhores parâmetros renais foram obtidos com 6 g% (tabela 3). Portanto, a significância estatística (ANOVA-Fisher) obtida após esta comparação justificou a escolha da concentração de 6 g% de albumina a ser adicionada às soluções dos demais experimentos (figuras 5 e 6). Estes resultados corroboram aqueles publicados anteriormente por Moreira Lima (1983) e Moraes (1984) para rim de rato e coelho respectivamente.

**Tabela 3: Comparação de fluxo urinário (FU), do ritmo de filtração glomerular (RFG) e da fração de sódio reabsorvido (TNa<sup>+</sup>) dos grupos controle com concentrações variáveis de Albumina.**

---

Grupo	Albumina (g%)	Fluxo Urinário (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	RFG (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	TNa <sup>+</sup> (%)
1	2	0,235 ± 0,010	0.86±0.08	72,62 ± 5,71
2	4	0,233 ± 0,014*	0.97±0.09	76,94 ± 3,07*
3	6	0,260 ± 0,008*	1.13±0.06*	78,30 ± 1,45*

---

\* Significância de 95%

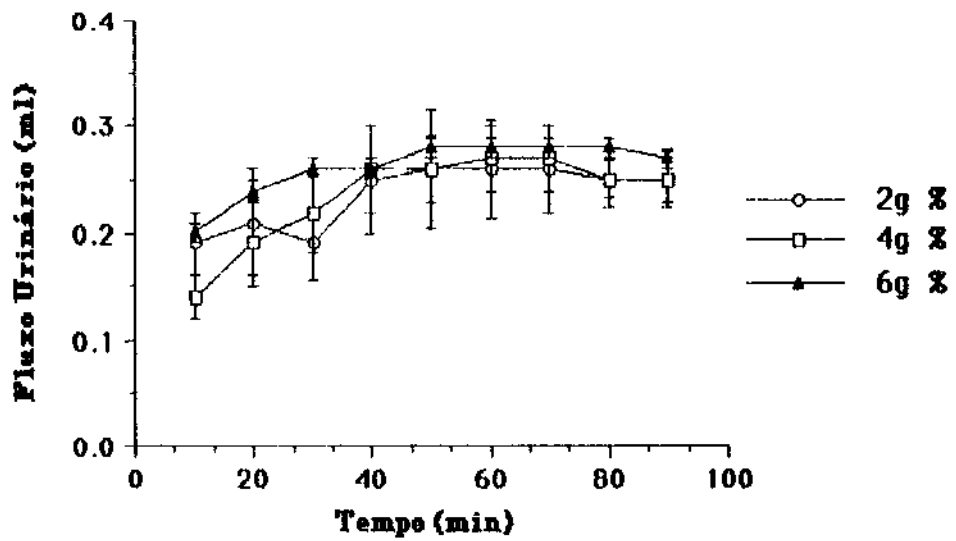


Figura 5: Comparação entre os fluxos urinários de rins controles perfundidos em diversas concentrações de albumina.

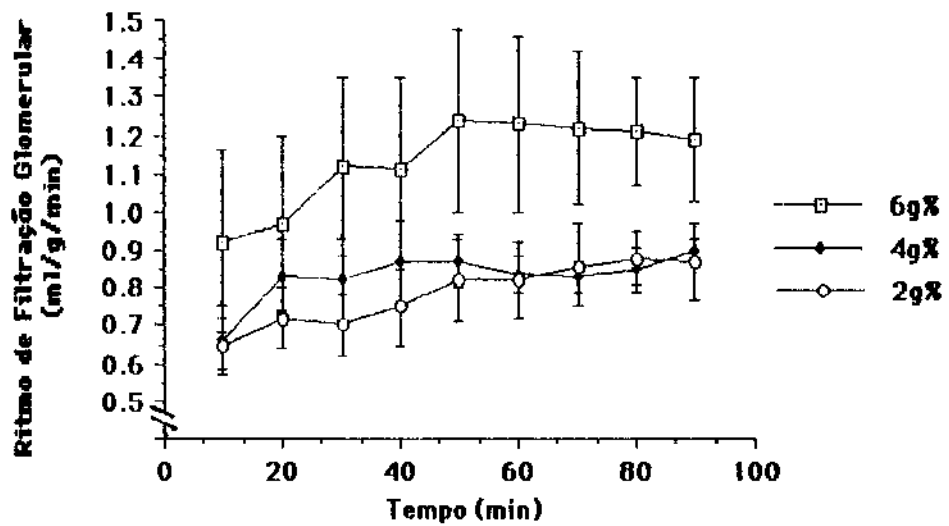


Figura 6: Comparação entre os clearances de rins controles perfundidos em diversas concentrações de albumina.

### **Grupo controle com 6 g% de albumina**

Os resultados deste grupo estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Na tabela 4 a preparação com 6 g% de albumina não apresentou alterações significativas durante o tempo de perfusão. A pressão de perfusão, a resistência vascular renal (RVR), o fluxo urinário, o transporte de sódio e a fração de sódio reabsorvido permaneceram estáveis durante todo o período de perfusão (90 minutos).

Apesar do ritmo de filtração glomerular (RFG) ter apresentado uma ligeira queda nos últimos 20 minutos, a comparação dos dados não revelou significância estatística (tabela 4). Para se encontrar os valores reais, os dados relativos a PP devem ser subtraídos dos valores encontrados na ponta da cânula. A reabsorção de sódio mostrou-se muito estável variando em torno de 80%.

A tabela 5 apresenta outros parâmetros funcionais de rins de rato na presença de 6 g% de albumina (n=4), que são o clearance de água livre o transporte proximal e distal, e o percentual de transporte de sódio reabsorvido nestas regiões. A análise estatística revela uma melhora funcional com a progressão da perfusão. Há um aumento do  $\text{CH}_2\text{O}$  do  $\text{pTNa}^+$  a partir dos 50 minutos. O percentual  $\text{pTNa}^+$  não apresentou alteração. O  $\text{dTNa}^+$  e percentual de  $\text{dTNa}^+$  apresentaram aumento a partir dos 40 minutos.

### **Efeitos do Veneno de *Bothrops jararaca***

Os resultados estão sumarizados nas tabelas 6 e 7. O estudo do efeito do veneno de *B. jararaca* foi realizado com várias concentrações do mesmo, com o propósito de avaliar uma relação dose efeito (0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg e 2 mg) afim de se avaliar a relação dose efeito (n=4 para cada dose).

**Tabela 4: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina (controle, n=4).**

<b>Tempo</b> (min)	<b>PP<sup>1</sup></b> (mmHg)	<b>RVR<sup>2</sup></b> (mmHg.ml <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>FU<sup>3</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>RFG<sup>4</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>TNa<sup>5</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%TNa<sup>6</sup></b>
10	148,75 ± 4,27	6,42 ± 0,65	0,20 ± 0,06	0,92 ± 0,24	105,83 ± 28,85*	78,20 ± 2,21
20	148,75 ± 4,27	6,42 ± 0,65	0,24 ± 0,06	0,97 ± 0,23	110,60 ± 29,92*	77,15 ± 2,27
30	148,75 ± 4,27	6,42 ± 0,65	0,26 ± 0,06	1,12 ± 0,23	133,93 ± 31,04	77,70 ± 1,93
40	148,75 ± 4,27	6,26 ± 0,72	0,26 ± 0,06	1,11 ± 0,24	132,40 ± 32,67	77,58 ± 2,21
50	148,75 ± 4,27	6,26 ± 0,72	0,28 ± 0,05	1,24 ± 0,24	149,85 ± 32,40	79,25 ± 2,20
60	148,75 ± 4,27	6,26 ± 0,72	0,28 ± 0,05	1,23 ± 0,23	149,40 ± 31,39	79,03 ± 2,37
70	147,50 ± 4,33	6,26 ± 0,72	0,28 ± 0,05	1,22 ± 0,20	149,70 ± 28,04	79,50 ± 1,31
80	151,25 ± 3,15	6,36 ± 0,67	0,28 ± 0,05	1,21 ± 0,14	147,50 ± 20,94	79,30 ± 1,31
90	151,25 ± 3,15	6,79 ± 0,74*	0,27 ± 0,05	1,19 ± 0,16	146,00 ± 22,94	79,58 ± 1,36

(1) Pressão de Perfusão: deverão ser subtraídos 28mmHg dos valores descritos para se encontrar os valores reais (2) Resistência Vascular Renal: deverão ser subtraídos 3mmHg.ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; (3) Fluxo Urinário; (4) Ritmo de Filtração Glomerular; (5) Transporte de sódio; (6) Percentual de sódio transportado.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

**Tabela 5: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina. Função distal e segmentar (controle, n=4).**

Tempo (min)	CH <sub>2</sub> O <sup>1</sup> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	pTNa <sup>2</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%pTNa <sup>3</sup>	dTNa <sup>4</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%dTNa <sup>5</sup>
10	0,003 ± 0,04	106,13 ± 29,06	77,13 ± 1,57	1,23 ± 0,61	2,85 ± 2,80
20	0,003 ± 0,08	110,28 ± 29,62	74,94 ± 1,39	2,14 ± 0,34	1,55 ± 3,88
30	0,012 ± 0,01	132,05 ± 31,13*	76,50 ± 1,12	1,73 ± 1,34	5,58 ± 4,37
40	0,022 ± 0,012	128,95 ± 32,26	74,23 ± 1,56	3,18 ± 1,63*	8,26 ± 5,62*
50	0,031 ± 0,011*	145,20 ± 32,10*	76,48 ± 1,43	4,56 ± 1,48*	11,24 ± 4,20*
60	0,025 ± 0,011*	145,33 ± 31,13*	78,23 ± 1,64	3,75 ± 1,61*	8,90 ± 4,38*
70	0,027 ± 0,006*	145,35 ± 27,44*	77,28 ± 1,27	4,18 ± 0,98*	9,90 ± 2,35*
80	0,025 ± 0,008*	146,00 ± 18,55*	71,30 ± 1,66	3,91 ± 1,44*	8,56 ± 2,23*
90	0,027 ± 0,010*	141,50 ± 22,22*	77,28 ± 1,60	4,33 ± 1,72*	9,90 ± 2,71*

(1) Clearance de água livre; (2) Transporte Proximal de Sódio; (3) Percentual de Transporte Proximal de Sódio; (4) Transporte Distal de Sódio; (5) Percentual de Transporte Distal de Sódio.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.



O veneno foi colocado aos 30 minutos da perfusão e observados fluxos urinários e pressão de perfusão. Posteriormente foram avaliados as funções renais *in vitro* após as dosagens dos parâmetros renais. Com esta metodologia, os 30 primeiros minutos funcionavam como controle interno do próprio experimento. Com os dados do fluxo urinário e pressão de perfusão estabelecemos uma curva dose-efeito com avaliação de significância entre os valores extremos.

A colocação do veneno na perfusão aos 30 minutos apresentou alterações nos principais parâmetros renais, conforme a concentração empregada, quando comparado ao grupo controle e ao controle interno do próprio experimento.

A comparação do veneno nas diversas doses apresentou significância estatística pelo teste de Fisher entre as doses de 0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg e 2 mg (figuras 7 e 8). Escolhemos a dose de 1 mg do veneno como padrão nos outros experimentos por apresentar significância estatística quando comparada ao controle interno do experimento nos 30 minutos iniciais (Tabela 6). Analisando estes resultados observamos uma queda na PP, RVR, no FU, RFG,  $\text{TNa}^+$  com discreta recuperação nos últimos 20 minutos da perfusão. O percentual de transporte de sódio apresentou diminuição a partir da colocação do veneno com significância estatística, quando comparado ao controle interno do experimento. A pressão de perfusão demonstrou queda acentuada. A resistência vascular renal diminuiu 20 minutos após a colocação do veneno, com recuperação nos últimos 20 minutos.

As figuras 7 e 8 demonstram que a diminuição de fluxo urinário e pressão de perfusão por unidade de tempo, nas diversas concentrações de veneno, são proporcionais ao aumento das doses, principalmente nas doses menores.

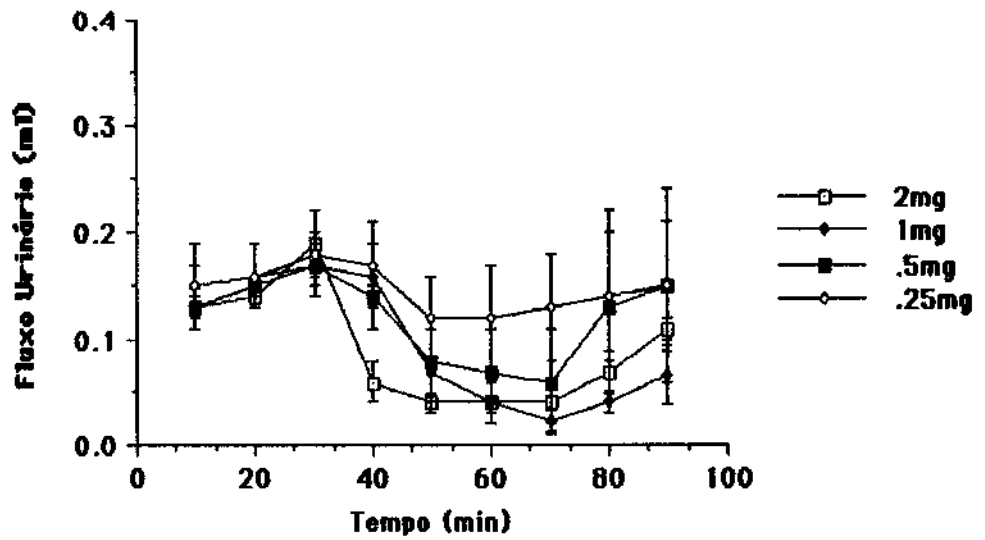


Figura 7: Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca em diversas concentrações.

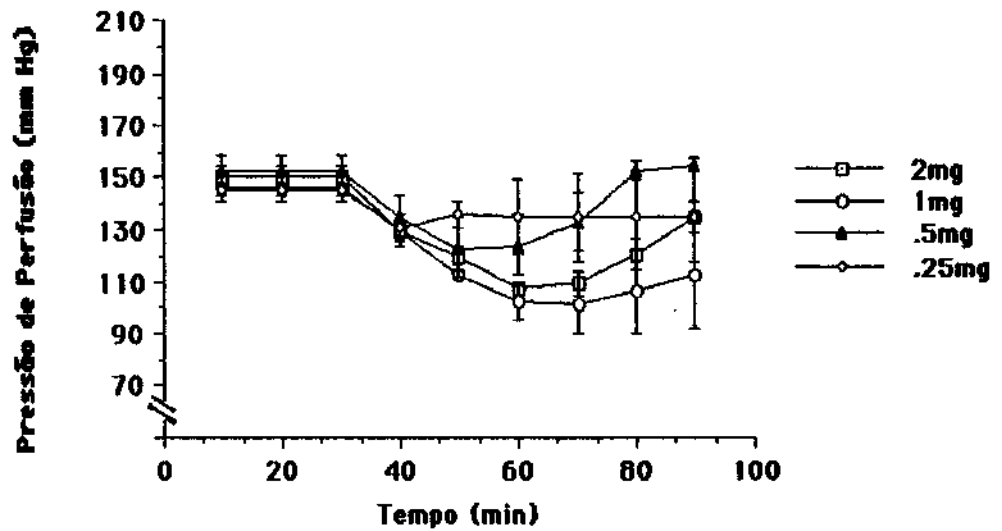


Figura 8: Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca em diversas concentrações.

**Tabela 6: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina e de 1mg de veneno de *B. jararaca* (n=4).**

Tempo (min)	PP1 (mmHg)	RVR2 (mmHg/ml <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	FU3 (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	RFG4 (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	TNa5 ( $\mu$ Eq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%TNa6
10	146,00 ± 4,24	5,69 ± 0,16	0,15 ± 0,02	0,61 ± 0,07	64,30 ± 9,08	74,10 ± 3,00
20	146,00 ± 4,24	5,61 ± 0,32	0,16 ± 0,02	0,62 ± 0,05	66,33 ± 7,24	75,80 ± 3,43
30	146,00 ± 4,24	5,61 ± 0,32	0,17 ± 0,02	0,70 ± 0,06	74,70 ± 8,41	77,03 ± 2,85
40	130,00 ± 5,77	4,97 ± 0,34	0,16 ± 0,03	0,53 ± 0,09	52,73 ± 8,80*	73,10 ± 1,02
50	113,00 ± 1,73*	4,32 ± 0,26*	0,07 ± 0,02*	0,18 ± 0,06*	16,20 ± 6,09*	69,03 ± 0,77*
60	101,50 ± 6,95*	3,92 ± 0,47*	0,04 ± 0,01*	0,07 ± 0,02*	5,30 ± 2,73*	69,69 ± 2,49*
70	100,50 ± 10,81*	3,90 ± 0,61*	0,02 ± 0,05*	0,06 ± 0,02*	5,99 ± 1,78*	67,30 ± 3,33*
80	102,80 ± 13,24*	4,12 ± 0,82*	0,04 ± 0,05*	0,16 ± 0,06*	9,34 ± 1,49*	62,03 ± 6,90*
90	105,50 ± 15,95*	4,41 ± 1,00*	0,07 ± 0,01*	0,25 ± 0,07*	12,29 ± 6,42*	65,90 ± 3,88*

(1) Pressão de Perфуsão: ; deverão ser subtraídos 26mmHg dos valores descritos para encontrar os valores reais (2) Resistência Vascular Renal: deverão ser subtraídos 2mmHg/ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; (3) Fluxo Urinário; (4) Ritmo de Filtração Glomerular; (5) Transporte de sódio; (6) Percentual de sódio transportado.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

**Tabela 7: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 5g% de albumina e de 1mg de veneno de *B. jararaca*. Função distal e segmentar (n=4).**

<b>Tempo</b>	<b>CH<sub>2</sub>O<sup>1</sup></b> (min)	<b>pTNa<sup>2</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%pTNa<sup>3</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>dTNa<sup>4</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%dTNa<sup>5</sup></b>
10	0,009 ± 0,010	62,08 ± 8,39	75,15 ± 2,69	1,22 ± 0,73	5,63 ± 2,77
20	0,013 ± 0,005	64,50 ± 8,39	74,50 ± 2,51	1,82 ± 0,35	9,44 ± 0,61
30	0,012 ± 0,005	72,48 ± 6,93	74,75 ± 2,40	2,17 ± 0,43	9,03 ± 1,05
40	0,017 ± 0,004	50,45 ± 8,33	68,80 ± 1,42	2,25 ± 0,25	10,20 ± 0,74*
50	0,021 ± 0,033	15,45 ± 8,60*	50,74 ± 15,18	0,75 ± 0,34*	6,82 ± 2,56
60	0,001 ± 0,001*	5,08 ± 5,78*	41,70 ± 25,33*	0,24 ± 0,04*	6,42 ± 1,88
70	0,002 ± 0,002*	5,65 ± 1,82*	52,55 ± 12,57*	0,34 ± 0,16*	6,09 ± 1,49
80	0,005 ± 0,004	8,64 ± 1,44*	49,20 ± 11,09*	0,72 ± 0,30*	6,77 ± 1,27
90	0,008 ± 0,005	11,18 ± 6,65*	44,58 ± 18,47*	1,11 ± 0,37*	6,94 ± 1,55

(1) Clearance de água livre; (2) Transporte Proximal de Sódio; (3) Percentual de Transporte Proximal de Sódio; (4) Transporte Distal de Sódio; (5) Percentual de Transporte Distal de Sódio.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

As figuras 9 a 12 comparam o fluxo urinário, o RFG, a pressão de perfusão e o percentual de sódio transportado nos rins controle e naqueles que receberam 1 mg de veneno aos 30 minutos de perfusão. Conforme pode-se observar todos os parâmetros sofrem uma queda acentuada nos rins tratados.

A tabela 7 ilustra as alterações renais de clearance de água livre, transporte proximal de sódio, percentual de transporte proximal de sódio, transporte distal de sódio e de transporte percentual distal de sódio. O  $pTNa^+$  e a fração proximal de sódio reabsorvida ( $pTNa^+$ ) apresentaram queda acentuada após a colocação do veneno com significância a partir dos 50 e 60 minutos respectivamente. O  $dTNa^+$  apresentou queda aos 50 minutos com discreta recuperação nos últimos 10 minutos e alteração significativa no percentual de  $dTNa^+$  apenas aos 40 minutos. A diferença nos valores do clearance de água livre apresentou significância somente aos 60 e 70 minutos quando comparado aos primeiros 30 minutos de perfusão.

### **Efeitos do BN 52021**

Os resultados deste grupo estão apresentados nas tabelas 8 e 9. Após observarmos as alterações causadas pelo veneno de *B. jararaca* (1 mg), tentamos bloquear os efeitos descritos acima. Inicialmente usamos BN 52021, um antagonista do PAF, na concentração de 0,1mg/ml colocado no início do experimento (tempo zero). Aos 30 minutos colocamos o veneno na dose descrita anteriormente. Observamos que não houve bloqueio dos efeitos do veneno em vários parâmetros como demonstra a tabela 8. Desta tabela notamos também que a PP, RVR, RFG, FU,  $TNa^+$ , percentual de  $TNa^+$ , continuaram caindo mesmo com o uso do BN 52021, após a colocação do veneno. A comparação dentro do próprio experimento considerando os 30 minutos iniciais como controle mostrou

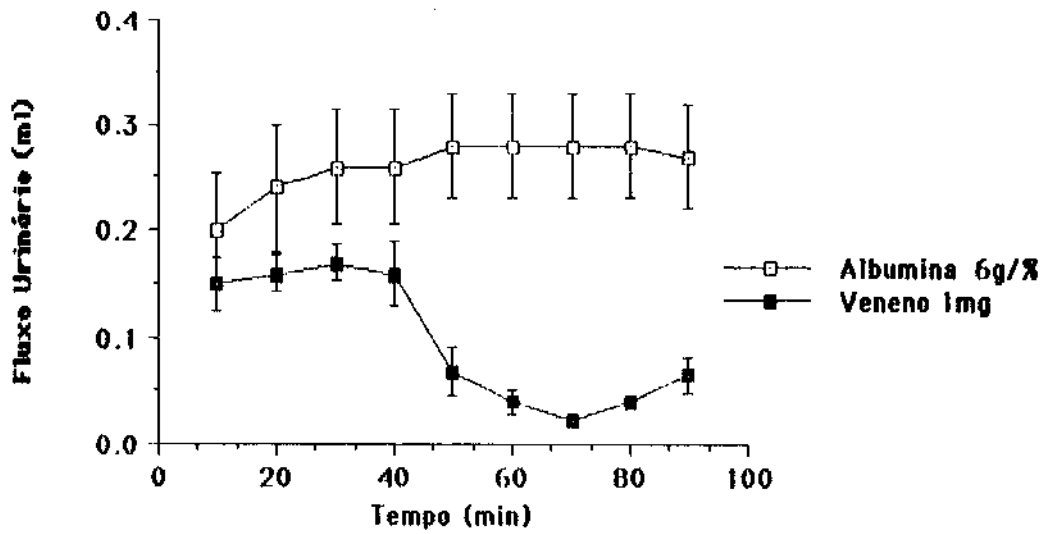


Figura 9: Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de B. Jararaca.

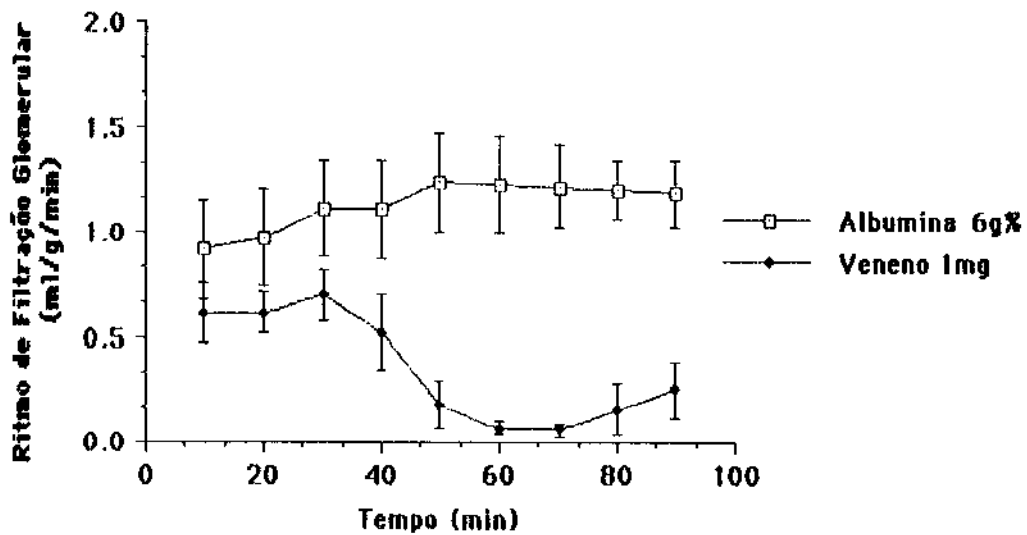


Figura 10: Comparação entre os clearances de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de B. Jararaca.

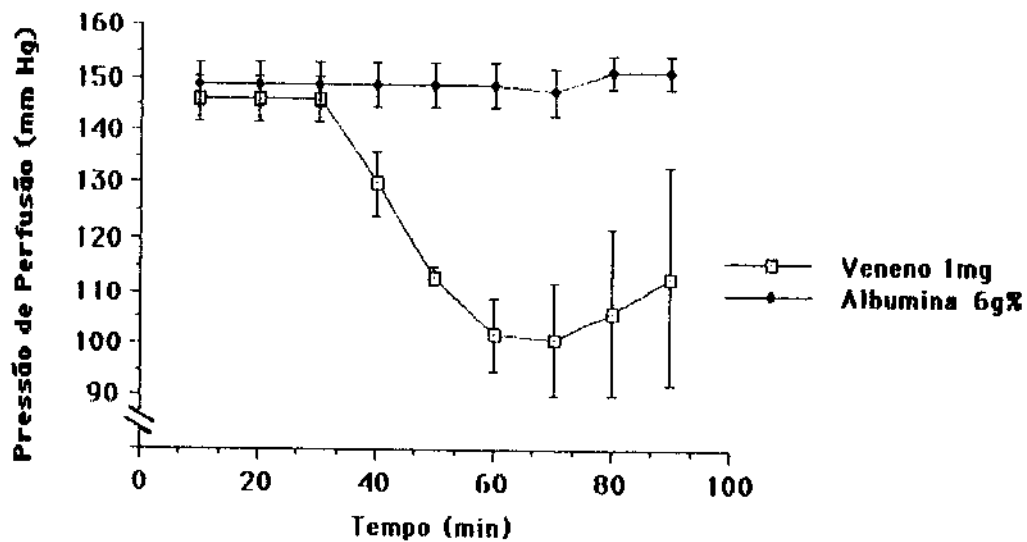


Figura 11: Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de B. Jararaca.

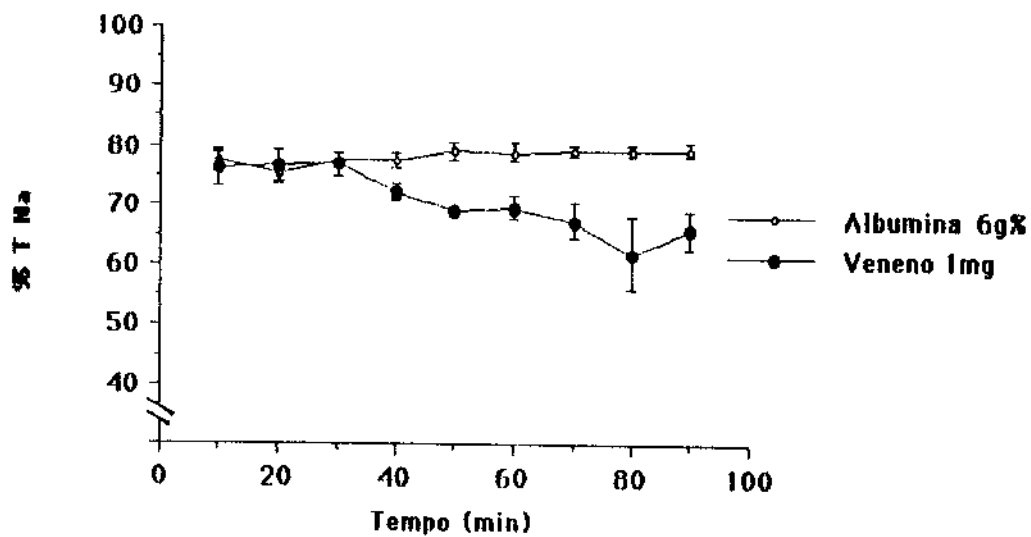


Figura 12: Comparação entre o percentual de sódio transportado de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de B. Jararaca.

**Tabela 8: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 10mg de BN 52021 e 1mg de veneno de *B. jararaca* (n=4).**

<b>Tempo</b> (min)	<b>PP<sup>1</sup></b> (mmHg)	<b>RVR<sup>2</sup></b> (mmHg.ml <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>FU<sup>3</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>RFG<sup>4</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>TNa<sup>5</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%TNa<sup>6</sup></b>
10	137,50 ± 5,06	4,39 ± 0,39	0,24 ± 0,05	1,01 ± 0,16	106,40 ± 17,49	79,67 ± 1,63
20	137,50 ± 5,06	4,23 ± 0,26	0,25 ± 0,05	1,16 ± 0,17	128,88 ± 17,13	80,90 ± 1,56
30	137,50 ± 5,07	4,23 ± 0,26	0,30 ± 0,07	1,26 ± 0,27	131,85 ± 24,45	79,73 ± 1,51
40	121,50 ± 4,34*	3,73 ± 0,21*	0,24 ± 0,08	0,98 ± 0,30	102,63 ± 27,22*	79,67 ± 2,91
50	105,50 ± 4,86*	3,23 ± 0,15*	0,16 ± 0,09*	0,51 ± 0,34*	47,96 ± 33,24*	64,77 ± 5,92*
60	100,50 ± 3,69*	3,08 ± 0,13*	0,11 ± 0,05*	0,35 ± 0,18*	33,70 ± 18,70*	63,10 ± 7,90*
70	101,50 ± 4,57*	3,11 ± 0,15*	0,11 ± 0,06*	0,29 ± 0,14*	24,55 ± 12,63*	63,73 ± 1,82*
80	104,00 ± 5,03*	3,19 ± 0,16*	0,13 ± 0,07*	0,30 ± 0,16*	21,87 ± 13,84*	52,30 ± 3,61*
90	106,00 ± 5,03*	3,25 ± 0,16*	0,16 ± 0,08*	0,36 ± 0,19*	27,88 ± 16,64*	55,20 ± 1,19*

(1) Pressão de Perfusão; deverão ser subtraídos 17mmHg dos valores descritos para encontrar os valores reais (2) Resistência Vascular Renal; deverá ser subtraído 1mmHg.ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; (3) Fluxo Urinário; (4) Ritmo de Filtração Glomerular; (5) Transporte de sódio; (6) Percentual de sódio transportado.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.



significância a partir de 40 minutos para a PP, a RVR, o TNa<sup>+</sup>. Aos 50 minutos mostrou significância para o FU, RFG e percentual de TNa<sup>+</sup>. Portanto, estes efeitos foram semelhantes ao obtido pelo uso isolado do veneno.

Nas figuras de 13 a 16 os gráficos apresentam fluxo urinário RFG, PP e percentual TNa em função do tempo comparando os dados obtidos em rins que receberam 1 mg de veneno aos 30 minutos de perfusão em Krebs-Henseleit com àqueles previamente perfundidos com Krebs + BN 52021. Os 30 minutos que precederam a aplicação de veneno mostram o efeito do BN 52021 sobre a preparação na mesma dose. Podemos observar uma leve proteção (estatisticamente não significante) nos dois primeiros parâmetros. Quanto aos demais, os resultados obtidos mostram-se favoráveis a ausência de proteção do BN 52021 em relação aos efeitos da peçonha de *B. jararaca*.

Na tabela 9, os outros parâmetros se apresentaram da seguinte forma: CH<sub>2</sub>O, constante durante toda perfusão, com exceção apenas aos 80 minutos onde apresentou queda com significância estatística. O pTNa<sup>+</sup> e o percentual de pTNa<sup>+</sup> apresentaram queda aos 50 e 60 minutos respectivamente, comportando-se de forma semelhante ao veneno quando usado isoladamente. O dTNa<sup>+</sup> e o percentual de dTNa<sup>+</sup> apresentaram discreto aumento (sem significância estatística), após 10 minutos da colocação do veneno, retornando aos parâmetros iniciais o que também foi observado com o uso isolado do veneno. No entanto notou-se que o grupo tratado com BN 52021 (tabela 9) não apresenta queda dos parâmetros, exceto aos 80 minutos, o que difere do dTNa<sup>+</sup> no grupo tratado com o veneno (tabela 7), no qual observamos a queda deste parâmetro a partir de 50 minutos com discreta recuperação aos 90 minutos. O percentual de dTNa<sup>+</sup> também não apresentou queda no grupo tratado com BN 52021.

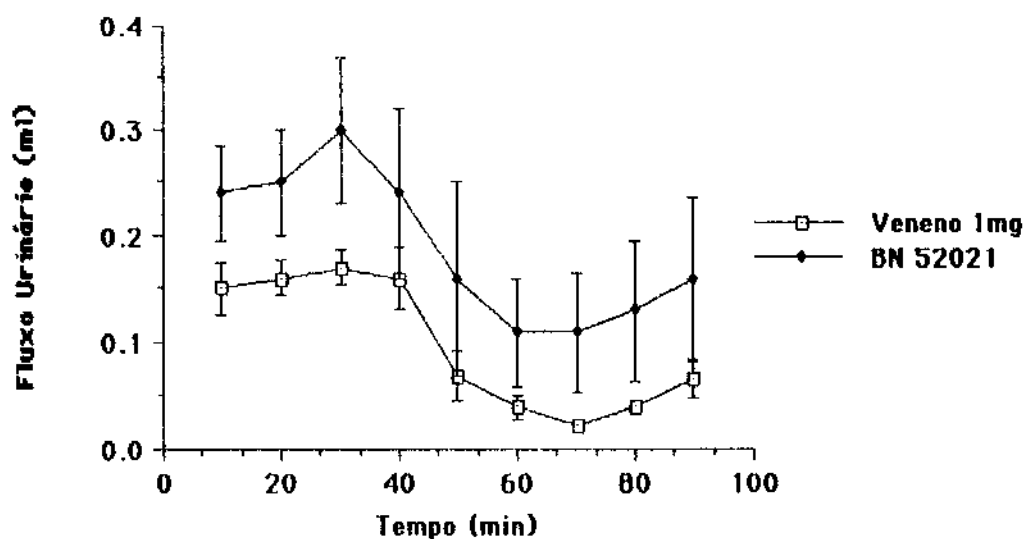


Figura 13: Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado BN52021 previamente ao veneno.

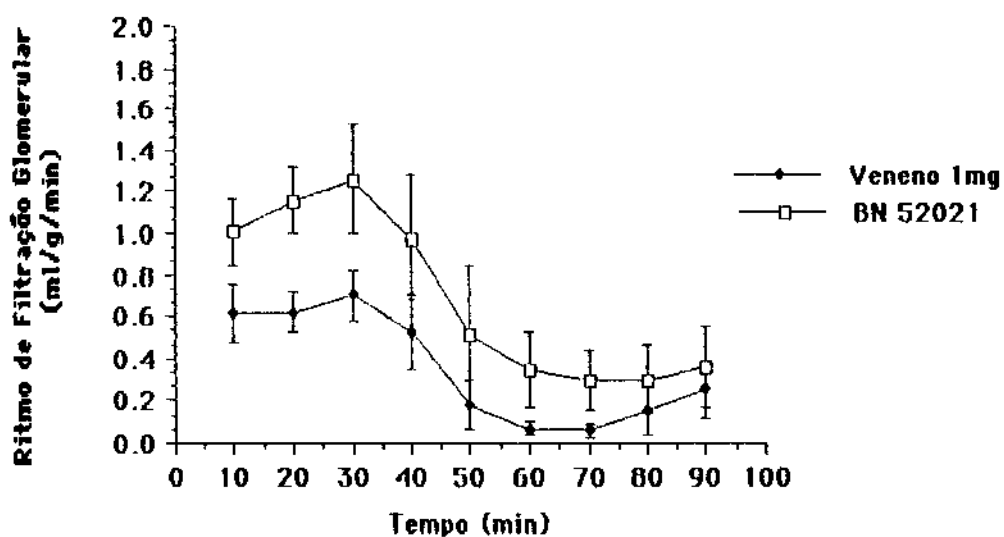


Figura 14: Comparação entre os clearances de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno.

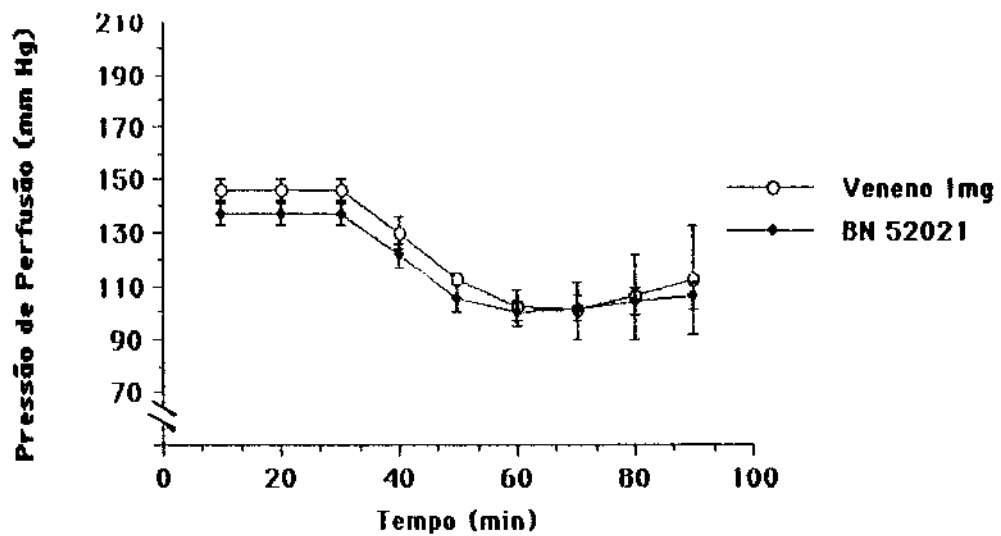


Figura 15: Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos com o veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado BN 52021 previamente ao veneno

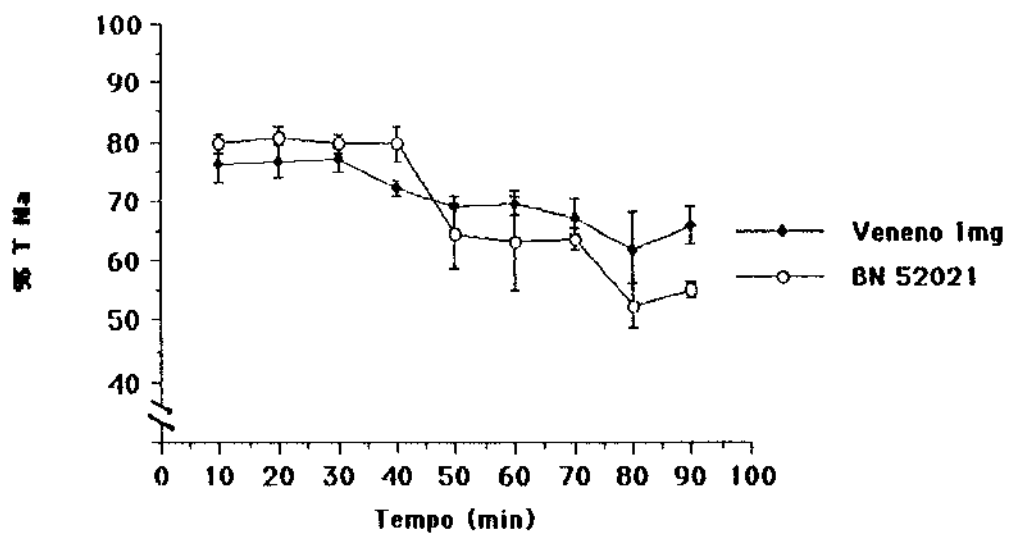


Figura 16: Comparação entre o percentual de sódio transportado de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado BN52021 previamente ao veneno.

**Tabela 9: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 1mg do veneno de *B. fararaca* e 10mg de BN 52021. Função distal e segmentar. (n=4)**

Tempo (min)	CH <sub>2</sub> O <sup>1</sup> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	pTNa <sup>2</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%pTNa <sup>3</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	dTNa <sup>4</sup>	%dTNa
10	0,010 ± 0,010	105,23 ± 17,09	77,90 ± 1,88	1,28 ± 0,67	3,45 ± 1,96
20	0,013 ± 0,014	122,50 ± 14,62	80,08 ± 1,83	1,71 ± 0,91	3,82 ± 2,76
30	0,022 ± 0,014	128,93 ± 23,80	78,03 ± 1,53	2,90 ± 0,85	7,23 ± 1,17
40	0,021 ± 0,013	99,33 ± 26,00	76,90 ± 2,43	3,25 ± 1,19	10,60 ± 1,34
50	0,018 ± 0,026	45,64 ± 31,76*	51,30 ± 11,06	2,40 ± 1,65	11,34 ± 3,35
60	0,007 ± 0,007	32,77 ± 18,95*	43,30 ± 17,55*	0,93 ± 0,47	11,14 ± 4,53
70	0,006 ± 0,014	23,74 ± 13,04*	40,33 ± 18,79*	0,81 ± 0,96	9,34 ± 9,03
80	0,002 ± 0,005*	21,58 ± 13,85*	32,85 ± 18,81*	0,28 ± 0,36*	3,30 ± 3,39
90	0,006 ± 0,010	27,08 ± 16,12*	29,65 ± 21,88*	0,78 ± 0,73	3,35 ± 3,10

(1) Clearance de água livre; (2) Transporte Proximal de Sódio; (3) Percentual de Transporte Proximal de Sódio; (4) Transporte Distal de Sódio; (5) Percentual de Transporte Distal de Sódio.

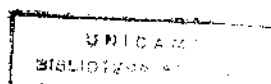
\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

## Efeitos do WEB 2086

Os resultados deste grupo estão apresentados nas tabelas 10 e 11. Como não obtivemos bloqueio com o uso de BN 52021, continuamos testando outras substâncias na tentativa de conseguir bloquear os efeitos deletérios do veneno. Utilizamos então WEB 2086 (0,1mg/ml) da forma descrita anteriormente. No início do experimento e aos 30 minutos colocamos a mesma dose do veneno. A tabela 10 demonstra os seguintes resultados: a PP e RVR continuaram caindo após a colocação do veneno não tendo havido portanto qualquer proteção pela análise desses parâmetros que se comportaram de forma semelhante ao grupo tratado apenas com o veneno. Na tabela 10 ainda, o fluxo urinário e o RFG apresentaram queda discreta, embora sem significância estatística, com recuperação seguida de aumento acentuado na diurese e no RFG. As outras variáveis (transporte de sódio e o percentual de  $TNa^+$ ) observadas mostram as mesmas quedas acentuadas causadas pelo veneno e portanto, ausência de efeito protetor do WEB.

Nas Figuras de 17 a 20, comparamos os valores obtidos para o fluxo urinário, RFG, PP e percentual de  $TNa^+$  em função do tempo de exposição ao veneno em rins perfundidos apenas em Krebs-Henseleit comparado aos mesmos parâmetros avaliados em rins perfundidos com Krebs-Henseleit mais WEB 2086. Os 30 minutos que precederam a aplicação do veneno mostram os efeitos isolados do WEB 2086 sobre esta preparação. O fluxo urinário e o RFG demonstraram que há um bloqueio estatisticamente significativo do efeito do veneno após colocação do WEB 2086 (figuras 17 e 18). O percentual de  $TNa^+$  não apresentou bloqueio ao efeito do veneno, demonstrando uma queda ainda mais acentuada (figura 20). Quanto à pressão de perfusão os efeitos do WEB 2086 que se iniciam apenas aos 60 minutos parecem demonstrar uma leve proteção, que não é estatisticamente significativa (figura 19).



**Tabela 10: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 10mg de WEB 2086 e 1mg de veneno de *B. jararaca* . (n=4)**

<b>Tempo</b> (min)	<b>PP1</b> (mmHg)	<b>RVR2</b> (mmHg/ml <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>FU3</b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>RFG4</b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>TNa5</b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%TNa6</b>
10	143,50 ± 5,85	4,39 ± 0,72	0,22 ± 0,09	0,75 ± 0,39	66,66 ± 7,86	76,28 ± 1,39
20	146,00 ± 7,17	4,14 ± 0,61	0,20 ± 0,07	0,81 ± 0,27	56,76 ± 1,91	74,65 ± 1,24
30	146,50 ± 7,23	4,15 ± 0,61	0,21 ± 0,07	0,81 ± 0,27	55,73 ± 0,97	72,95 ± 1,79
40	128,50 ± 6,95*	3,63 ± 0,51*	0,16 ± 0,07	0,57 ± 0,23	35,36 ± 2,62	72,15 ± 0,52
50	113,50 ± 5,85*	3,20 ± 0,44*	0,15 ± 0,08	0,44 ± 0,31	8,78 ± 4,64*	43,60 ± 13,08*
60	115,00 ± 5,80*	3,26 ± 0,49*	0,19 ± 0,10	0,59 ± 0,40	13,10 ± 7,12*	48,55 ± 10,46*
70	116,00 ± 6,38*	3,29 ± 0,48*	0,22 ± 0,09	0,60 ± 0,36	15,64 ± 9,13*	43,77 ± 12,49*
80	116,50 ± 6,60*	3,31 ± 0,48*	0,33 ± 0,12*	0,89 ± 0,53	21,82 ± 13,52*	42,27 ± 14,54*
90	118,50 ± 7,41*	3,31 ± 0,48*	0,43 ± 0,11*	1,18 ± 0,51*	54,56 ± 21,83*	53,30 ± 11,49*

(1) Pressão de Perfusão; deverão ser subtraídos 23mmHg dos valores descritos para encontrar os valores reais (2) Resistência Vascular Renal; deverá ser subtraído 1mmHg/ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; (3) Fluxo Urinário; (4) Ritmo de Filtração Glomerular; (5) Transporte de sódio; (6) Percentual de sódio transportado.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

**Tabela 11: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 1mg de veneno de *B. jararaca* e 10mg de WEB 2086. Função distal e segmentar. (n=4)**

Tempo (min)	CH <sub>2</sub> O <sup>1</sup> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	pTNa <sup>2</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%pTNa <sup>3</sup>	dTNa <sup>4</sup> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	%dTNa <sup>5</sup>
10	-0,012 ± 0,006	65,37 ± 9,71	77,09 ± 1,87	-1,74 ± 0,45	-7,88 ± 2,96
20	-0,013 ± 0,007	58,17 ± 2,32	76,38 ± 1,12	-1,83 ± 0,53	-7,30 ± 1,59
30	-0,015 ± 0,011	57,10 ± 0,64	74,80 ± 1,37	-2,13 ± 0,83	-7,03 ± 1,54
40	-0,007 ± 0,007	36,17 ± 2,58*	73,80 ± 1,21	-1,15 ± 0,50	-6,40 ± 2,85
50	-0,004 ± 0,006*	9,06 ± 5,38*	45,39 ± 12,49*	0,71 ± 0,44*	-3,10 ± 0,57
60	-0,002 ± 0,010*	12,89 ± 8,76*	46,75 ± 12,29*	-0,38 ± 0,74*	1,32 ± 3,27*
70	-0,003 ± 0,009*	15,49 ± 10,90*	43,07 ± 13,42*	-0,46 ± 0,68*	0,075 ± 1,77*
80	-0,008 ± 0,012	22,22 ± 15,62*	43,25 ± 14,44*	-1,30 ± 0,90	-1,95 ± 0,62
90	-0,004 ± 0,007*	54,73 ± 25,51	53,45 ± 11,70*	-0,66 ± 0,47*	-0,68 ± 0,70*

(1) Clearance de água livre; (2) Transporte Proximal de Sódio; (3) Percentual de Transporte Proximal de Sódio; (4) Transporte Distal de Sódio; (5) Percentual de Transporte Distal de Sódio.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão dos resultados obtidos em quatro experimentos.

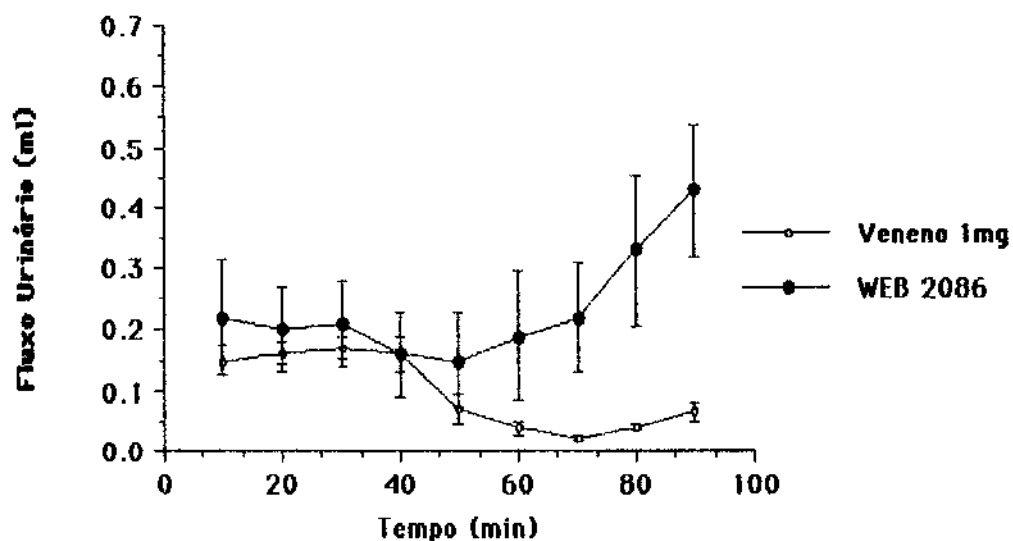


Figura 17: Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.

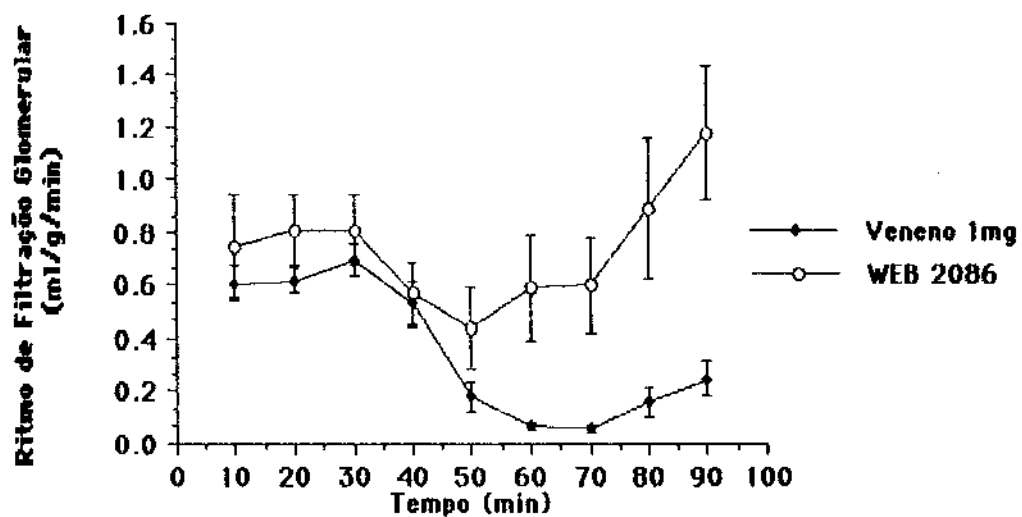


Figura 18: Comparação entre o clearance de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.



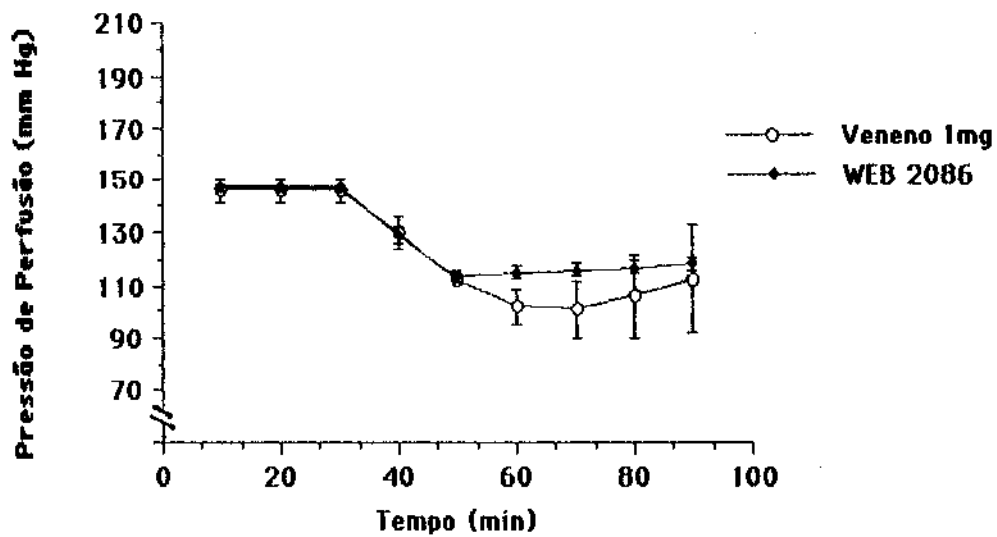


Figura 19: Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.

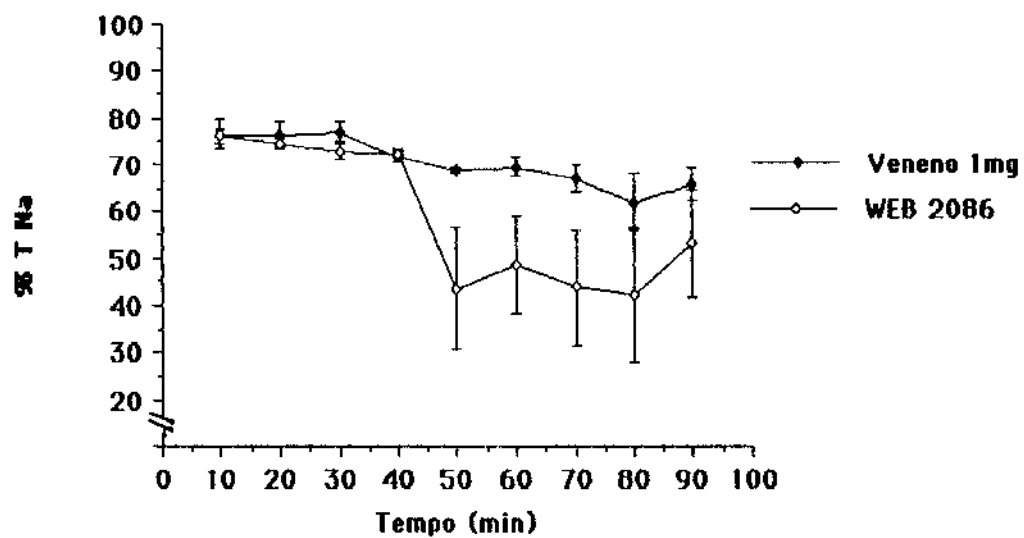


Figura 20: Comparação entre o percentual de sódio transportado de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado WEB 2086 previamente ao veneno.

Na tabela 11 os parâmetros dependentes do clearance osmolar se comportaram da seguinte forma: o  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{dTNa}^+$  e Percentual de  $\text{dTNa}^+$  se apresentaram negativos com exceção do percentual de  $\text{dTNa}^+$  aos 60 e 70 minutos da perfusão. O  $\text{pTNa}^+$  e o percentual de  $\text{pTNa}^+$  apresentaram queda com recuperação no fim do experimento com significância a partir de 50 e 40 minutos respectivamente.

### **Efeitos da Indometacina**

Os resultados destes grupos estão demonstrados nas tabelas 12 e 13. A indometacina (1 mg) foi testada mantendo-se o mesmo protocolo experimental.

Na tabela 12, observa-se que a RVR e PP apresentaram alterações quando comparados ao controle interno da experiência, tendo-se observado um efeito semelhante ao do veneno isolado. O fluxo urinário e RFG não apresentaram a queda característica observada no grupo tratado com veneno, sendo que nos últimos 20 minutos houve aumento da diurese, bem como do clearance de inulina. Demonstra-se assim, um bloqueio total ao efeito do veneno em relação a esses parâmetros, embora haja apenas um bloqueio parcial na pressão de perfusão. O  $\text{TNa}^+$  e o percentual de  $\text{TNa}^+$  apresentaram uma queda acentuada que se manteve até o final do experimento, a exemplo do que ocorre com o veneno. A PP continuou apresentando queda após colocação do veneno. Com esses dados pode-se observar que a indometacina bloqueou o efeito do veneno no FU (figura 21) e RFG (figura 22), não alterando entretanto o  $\text{TNa}^+$  e percentual de  $\text{TNa}^+$  que se comportaram de maneira semelhante àquela observada com o veneno (figura 23). Não houve bloqueio ao efeito de diminuição da PP como se pode observar na figura 24.

**Tabela 12: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 1mg de indometacina e 1mg de veneno de *B. jararaca* - (n=4)**

<b>Tempo</b> (min)	<b>PP1</b> (mmHg)	<b>RVR2</b> (mmHg/ml <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>FU3</b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>RFG4</b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>TNa5</b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%TNa6</b>
10	154,67 ± 2,91	6,36 ± 0,53	0,17 ± 0,0	0,53 ± 0,08	49,57 ± 17,05	61,50 ± 6,31
20	154,67 ± 2,91	6,80 ± 0,17	0,19 ± 0,03	0,57 ± 0,16	37,77 ± 5,67	61,10 ± 6,24
30	154,67 ± 2,91	6,80 ± 0,17	0,20 ± 0,03	0,62 ± 0,19	38,47 ± 3,74	61,83 ± 6,60
40	146,67 ± 7,69	6,42 ± 0,34	0,20 ± 0,05	0,49 ± 0,28	24,20 ± 4,73*	57,83 ± 7,23
50	138,00 ± 11,06*	6,07 ± 0,51	0,22 ± 0,06	0,50 ± 0,23	16,87 ± 5,29*	46,07 ± 11,55
60	126,67 ± 10,91*	5,57 ± 0,51*	0,22 ± 0,05	0,47 ± 0,24	10,33 ± 5,97*	44,07 ± 13,45*
70	116,00 ± 7,02*	5,10 ± 0,34*	0,27 ± 0,08	0,62 ± 0,37	8,76 ± 8,02*	42,47 ± 17,05*
80	114,67 ± 7,69*	5,04 ± 0,37*	0,31 ± 0,10*	0,72 ± 0,44	8,25 ± 8,37*	46,33 ± 5,38
90	120,00 ± 12,00*	4,72 ± 0,03*	0,38 ± 0,12*	0,81 ± 0,47	11,08 ± 12,12*	42,33 ± 14,99*

(1) Pressão de Perfusão; deverão ser subtraídos 34mmHg dos valores descritos para encontrar os valores reais (2) Resistência Vascular Renal; deverão ser subtraídos 3mmHg/ml<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; (3) Fluxo Urinário; (4) Ritmo de Filtração Glomerular; (5) Transporte de sódio; (6) Percentual de sódio transportado.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

**Tabela 13: Parâmetros funcionais de rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina, 1mg de veneno de *B. jararaca* e 1mg de Indometacina. Função distal e segmentar. (n=4)**

<b>Tempo</b> (min)	<b>CH<sub>2</sub>O<sup>1</sup></b> (ml.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>pTNa<sub>2</sub></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%pTNa<sub>3</sub></b>	<b>dTNa<sub>4</sub></b> (μEq.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	<b>%dTNa<sub>5</sub></b>
10	-0,020 ± 0,015	51,70 ± 16,27	68,93 ± 5,13	-3,06 ± 1,12	-15,30 ± 8,48
20	-0,003 ± 0,013	39,13 ± 5,32	63,10 ± 3,30	-0,44 ± 1,00*	-1,38 ± 4,01*
30	-0,080 ± 0,006	39,33 ± 3,58	63,20 ± 4,53	-1,12 ± 0,35*	-3,07 ± 1,03*
40	-0,011 ± 0,007	25,70 ± 5,31*	57,05 ± 5,92	-1,66 ± 0,48	-4,83 ± 2,36*
50	0,005 ± 0,006*	16,57 ± 5,40*	44,18 ± 8,36	0,75 ± 0,48*	2,04 ± 0,91*
60	-0,004 ± 0,004	11,06 ± 6,13*	36,84 ± 12,67*	-0,62 ± 0,27*	-1,84 ± 1,74*
70	-0,001 ± 0,006	8,72 ± 7,68*	30,60 ± 16,70*	-0,26 ± 0,44*	-0,89 ± 1,27*
80	-0,004 ± 0,007	8,24 ± 8,30*	28,10 ± 17,83*	-0,55 ± 1,13*	-0,93 ± 0,87*
90	-0,016 ± 0,036	10,82 ± 11,88*	21,70 ± 25,97*	0,17 ± 0,19*	-3,11 ± 3,48*

(1) Clearance de água livre; (2) Transporte Proximal de Sódio; (3) Percentual de Transporte Proximal de Sódio; (4) Transporte Distal de Sódio; (5) Percentual de Transporte Distal de Sódio.

\* Significância a 95%

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

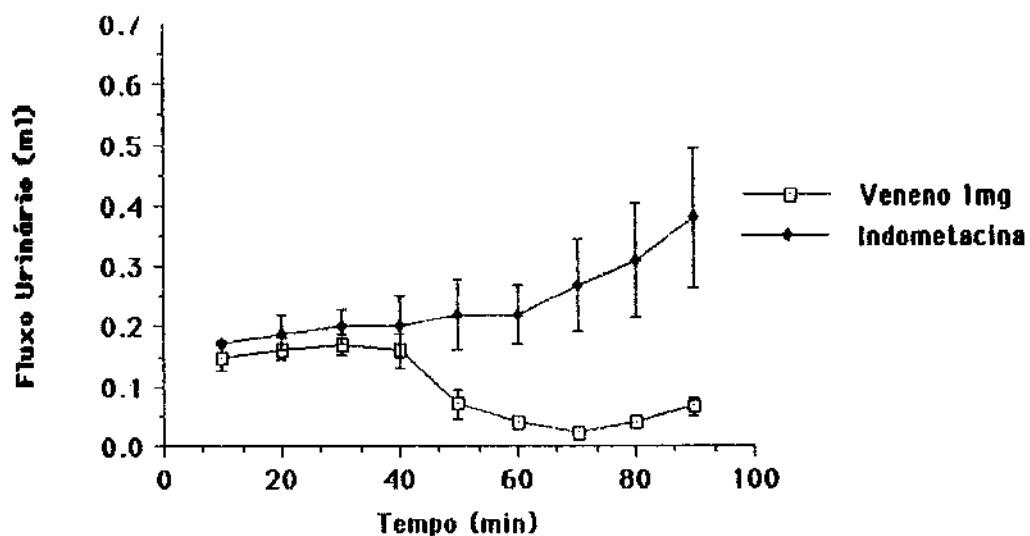


Figura 21: Comparação entre os fluxos urinários de rins perfundidos com veneno de *B. Jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.

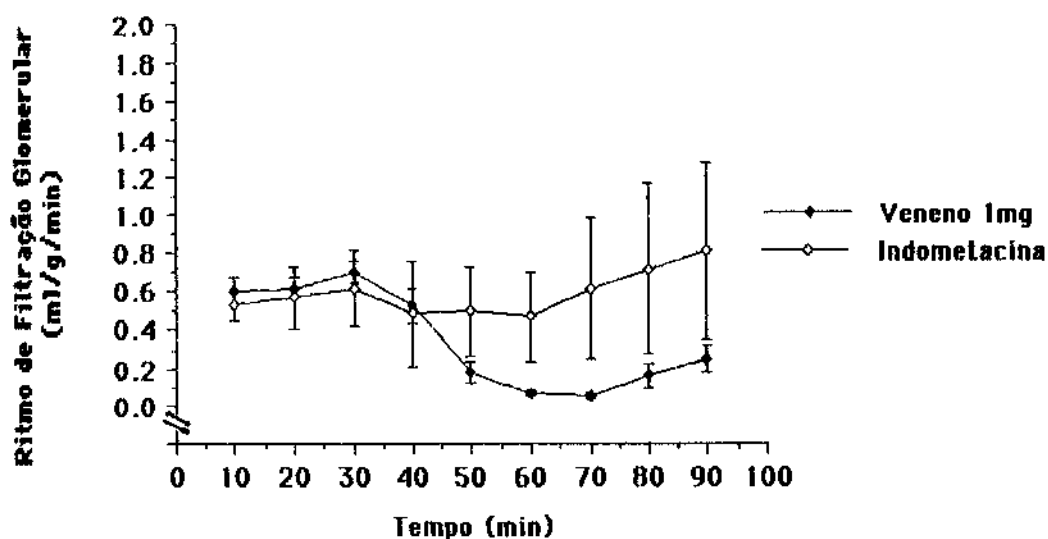


Figura 22: Comparação entre os clearances de rins perfundidos com veneno de *B. Jararaca* e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.

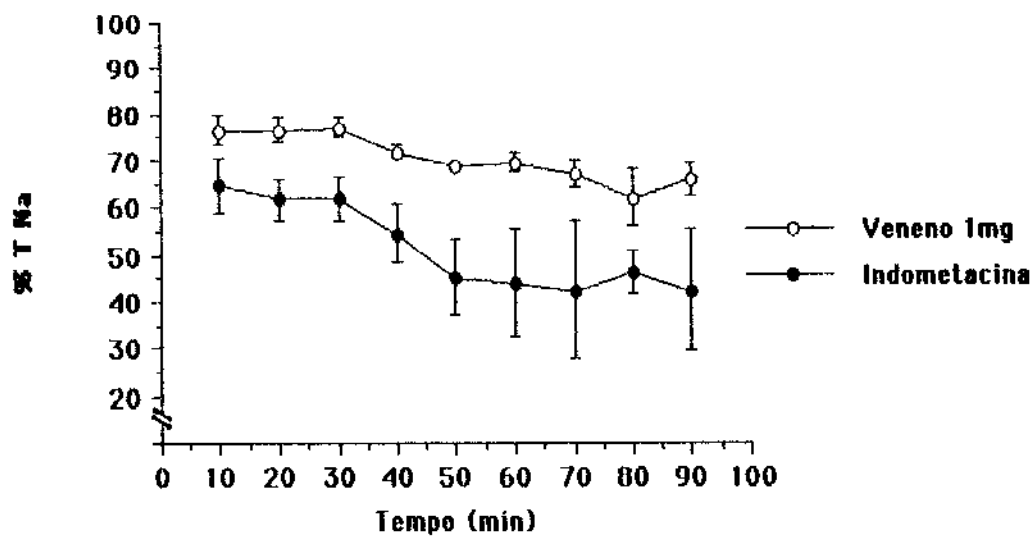


Figura 23: Comparação entre o percentual de sódio transportado de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.

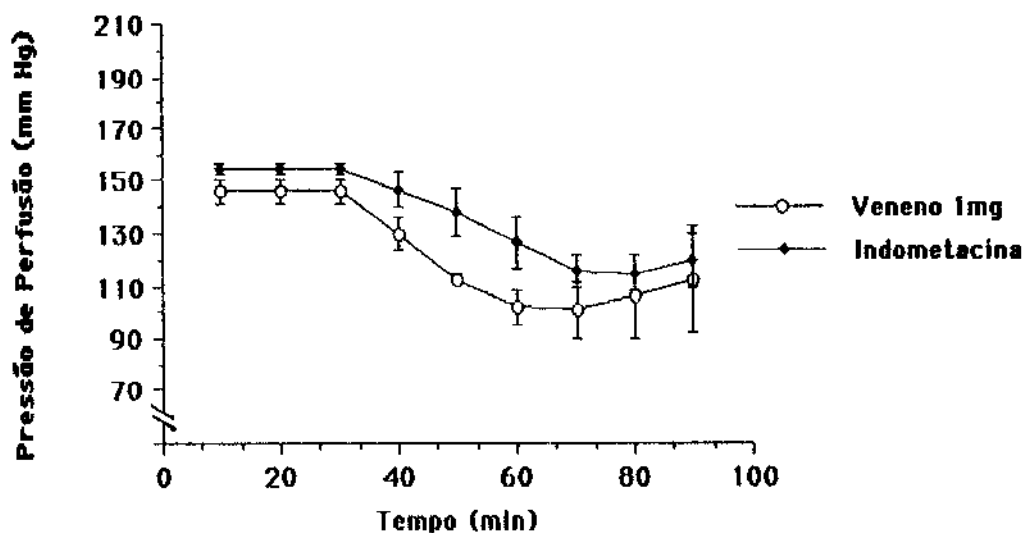


Figura 24: Comparação entre as pressões de perfusão de rins perfundidos com veneno de B. Jararaca e de rins nos quais foi adicionado indometacina previamente ao veneno.

Quanto aos outros parâmetros (tabela 13) observamos que o clearance de água livre ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), o  $\text{dTNa}^+$  e o percentual de  $\text{dTNa}^+$  se apresentaram negativos exceto os valores de  $\text{dTNa}^+$  aos 50 e 90 mins, diferentemente do que ocorreu com o uso isolado do veneno. O  $\text{pTNa}$  e o percentual  $\text{TNa}^+$  se apresentaram mais baixos já aos 30 minutos, pela presença da indometacina. Quando comparados ao grupo tratado apenas com o veneno, mostraram uma queda mais discreta.

### **Dinâmica de íons potássio**

Os dados experimentais da excreção de íons potássio estão apresentados nas tabelas 14 e 15. O potássio transportado ( $\text{TK}^+$ ) e o percentual de potássio transportado ( $\%\text{TK}^+$ ) permaneceram constantes nos experimentos controle.

Nos experimentos nos quais utilizamos o veneno (1 mg) houve queda acentuada destes parâmetros (figura 25).

Com o uso do BN 52021 no início do experimento, observamos que após colocação do veneno não houve bloqueio, apresentando uma queda menos acentuada do  $\text{TK}^+$  e percentual de  $\text{TK}^+$  semelhante a do uso isolado do veneno (figura 26).

O WEB 2086 demonstrou bloqueio total aos efeitos do veneno em relação ao TK, porém apresentou queda do percentual de TK (figura 26).

O uso da indometacina promoveu uma queda do transporte de potássio comparada ao controle no início do experimento, que se acentuou após a colocação

**Tabela 14: Transporte de potássio (TK)<sup>1</sup> em perfusão de rins isolados de ratos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina (controle), 1mg de veneno de *B. jararaca*, BN 52021, 10mg de WEB 2086 e 1mg de indometacina. (n=4)**

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>	<b>Veneno</b>	<b>BN 52021</b>	<b>WEB 2086</b>	<b>Indometacina</b>
10	2.79±0.9	2.15±0.3	3.54±1.01	3.75±1.71	1.86±0.68
20	3.0±1.01	2.21±0.24	4.28±0.81	3.23±1.37	1.46±0.28
30	3.53±1.01	2.52±0.26	4.44±0.86	3.17±1.39	1.49±0.20
40	3.56±1.04	1.75±0.30	3.45±1.0	2.32±1.17	0.90±0.16*
50	4.0±1.01	0.49±0.17*	1.75±1.17*	1.78±1.46*	0.61±0.16*
60	3.96±0.94	0.24±0.06*	1.32±0.78*	2.35±1.85	0.36±0.19*
70	3.99±0.89	0.20±0.07*	0.98±0.54	2.26±1.67	0.27±0.25*
80	3.94±0.63	0.32±0.08*	0.90±0.60*	3.32±2.50	0.25±0.27*
90	3.92±0.72	0.47±0.19*	1.14±0.71*	4.46±2.50	0.35±0.40*

(1) TK: potássio transportado.

\* Significância a 95%.

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.



**Tabela 15: Percentual de transporte de potássio (% TK)<sup>1</sup> em perfusão de rins isolados de ratos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit na presença de 6g% de albumina (controle), 1mg de veneno de *B. jararaca*, 10mg de BN 52021, 10mg de WEB 2086 e 1mg de indometacina. (n=4)**

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>	<b>Veneno</b>	<b>BN 52021</b>	<b>WEB 2086</b>	<b>Indometacina</b>
10	62.93±5.04	67.60±2.04	64.45±5.60	66.30±4.23	55.90±8.57
20	61.18±5.45	67.83±2.62	70.60±5.01	65.88±4.24	54.43±6.60
30	64.28±5.51	69.03±1.69	69.20±5.86	63.75±4.42	54.77±5.20
40	65.63±4.19	63.70±2.64	69.13±6.06	63.85±3.21	45.16±2.10
50	68.33±4.35	56.73±2.24*	54.32±11.0	48.87±9.48	34.87±4.53*
60	69.45±3.27	57.73±3.97*	48.49±15.3*	48.05±10.6	20.46±7.41*
70	70.73±3.26	55.37±5.42*	45.65±15.0*	42.88±13.2*	15.83±9.18*
80	71.90±2.12	50.70±9.74*	52.80±7.39*	41.68±15.0*	11.71±10.5*
90	72.50±2.16	57.37±7.03*	55.76±1.43*	52.95±11.5	17.7±9.71*

(1) %TK: percentual de potássio transportado;

\* Significância a 95%.

Os dados expressam a média e o erro padrão da média dos resultados obtidos em quatro experimentos.

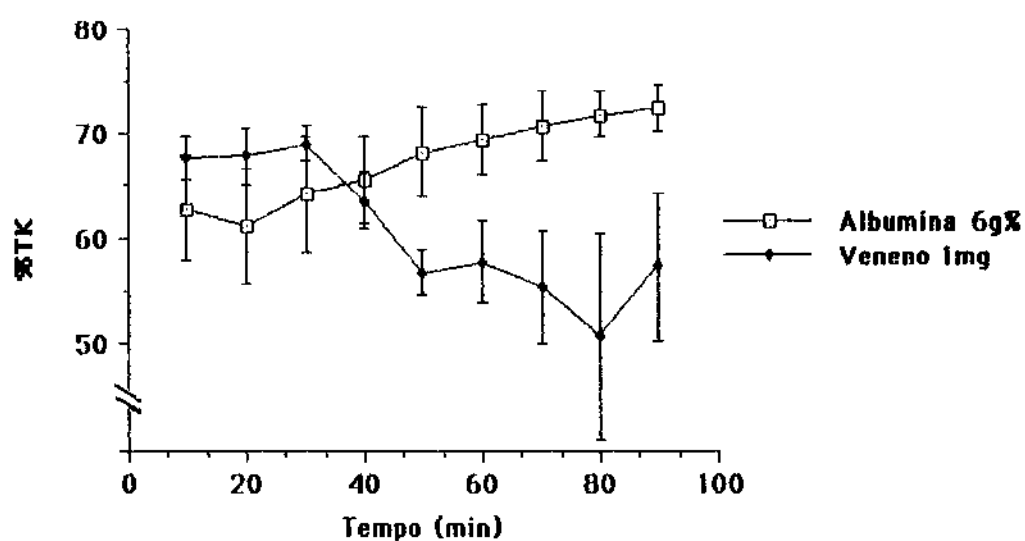


Figura 25: Comparação entre o percentual de potássio transportado de rins perfundidos dos grupos controle e tratado com veneno de B. Jararaca.

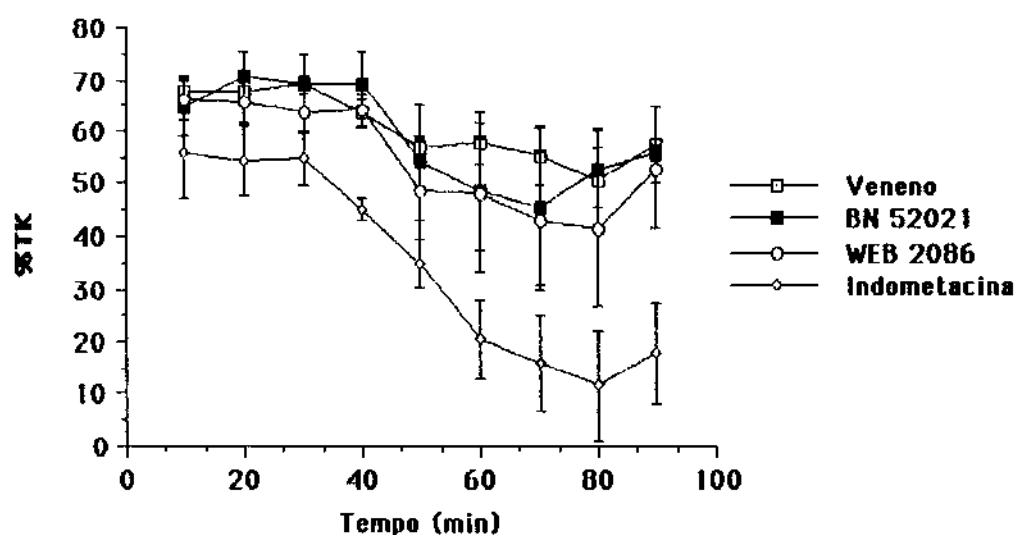


Figura 26: Comparação entre o percentual de potássio transportado de rins perfundidos nos diversos grupos estudados.

do veneno. O percentual de TK apresentou diminuição mais acentuada após os 40 minutos de perfusão (indometacina + veneno) do que após uso isolado do veneno (figura 26).

### **Composição Hidroeletrolítica do Tecido Renal nos Rins Perfundido e Controle**

Os dados apresentados na tabela 16 mostram os resultados obtidos pela dosagem de sódio e potássio tissular no rim perfundido (RP) e no rim controle (RC) contralateral, percentual de potássio tissular no RP e percentual do peso seco no RP em perfusões com solução de Krebs Henseleit. Os diferentes grupos de perfusão incluem o controle e os diversos grupos tratados com veneno de *B. jararaca*, BN 52021, WEB 2086 e indometacina (Figuras 27, 28, 29 e 30).

Os resultados experimentais com o uso do veneno apresentaram diminuição no sódio tissular quando comparados ao controle. Ao utilizar o BN 52021 e o WEB 2086, houve um significativo bloqueio deste efeito. O uso de indometacina apresentou diminuição discreta do Na<sup>+</sup>, sem significância estatística quando comparado ao rim contralateral, semelhante ao controle (Figura 27).

O percentual de Na<sup>+</sup> não apresentou alteração significativa com o uso de veneno. Nos experimentos com BN 52021 e WEB 2086 foi observado o aumento com significância estatística, deste parâmetro quando comparado ao controle (figura 28).

O grupo do veneno apresentou uma nítida redução do íon potássio quando comparado ao rim contralateral (Figura 29).

**Tabela 16: Composição eletrolítica tecidual de sódio e potássio em rins controle (RC) comparados com rins tratados (RP) com veneno 1mg de *B. Jararaca*, 10mg de BN 52021 + 1mg de *B. jararaca*, 10mg de WEB 2086 + 1mg de *B. jararaca* e 1mg de Indometacina + 1mg de *B. Jararaca*.**

Variáveis	Albumina (Controle)	Veneno ( <i>B. Jararaca</i> )	BN 52021	WEB 2086	Indometacina
<b>Na+</b> μEq.g-1 (peso seco)	RC 76,89 ± 4,88 RP 75,22 ± 9,86	73,05 ± 8,37 57,57 ± 1,02*	84,55 ± 5,36 105,45 ± 3,86	85,78 ± 11,38 105,26 ± 2,93	86,92 ± 15,12 77,34 ± 10,90
<b>% Na+</b> RP/RC.100	96,80 ± 7,89	80,94 ± 8,36	126,08 ± 9,83*	122,70 ± 11,16*	88,97 ± 9,03
<b>K+</b> μEq.g-1 (peso seco)	RC 157,85 ± 2,91 RP 156,30 ± 4,46	183,15 ± 11,48 118,29 ± 9,66*	186,60 ± 10,54 188,85 ± 10,44	190,92 ± 1,77 184,96 ± 0,69	141,76 ± 0,60 156,64 ± 2,54
<b>% K+</b> RP/RC.100	98,32 ± 8,20	64,07 ± 5,50*	101,78 ± 4,07	97,14 ± 6,64	110,63 ± 7,01

\*Significância a 95%  
Os dados acima representam a média e o erro padrão da média.

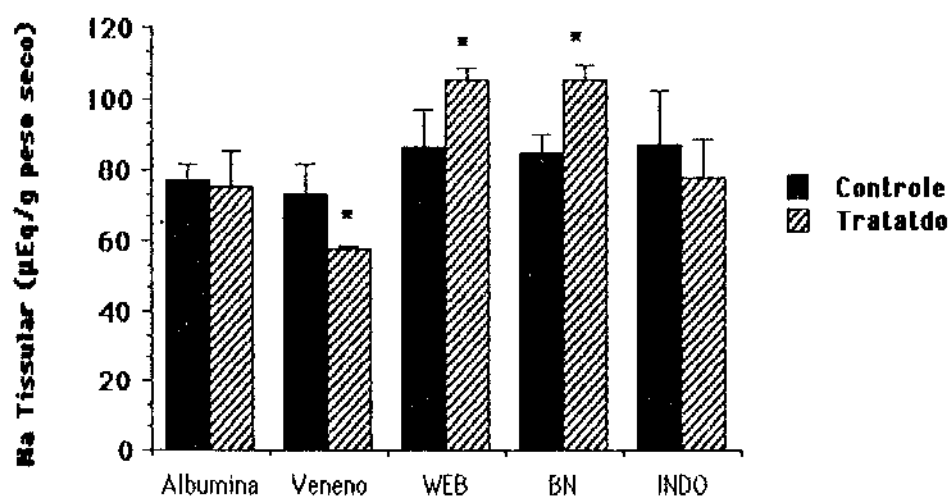


Figura 27: Composição eletrolítica tecidual de sódio nos diversos grupos.

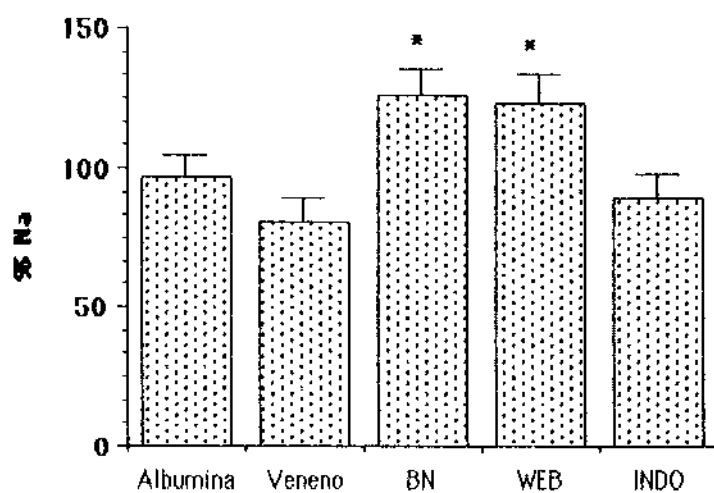


Figura 28: Percentual de sódio tecidual renal nos diversos grupos.

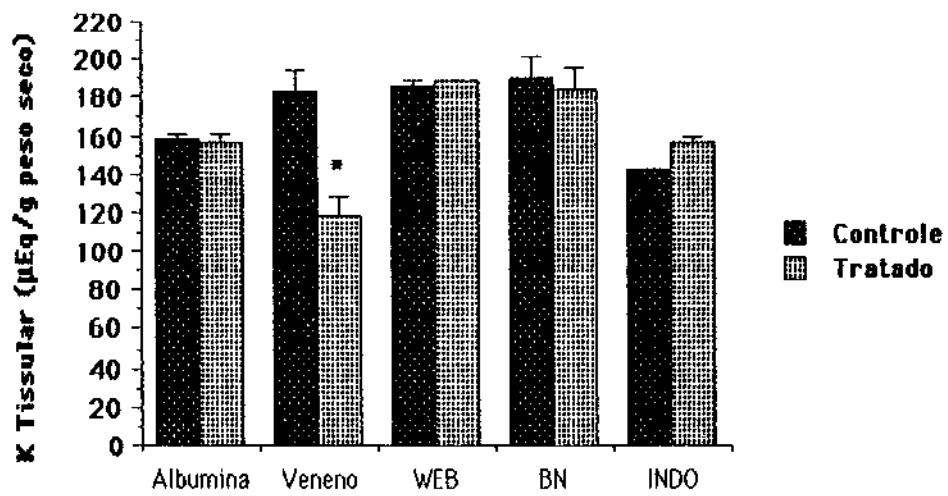


Figura 29: Composição eletrolítica tecidual renal de potássio nos diversos grupos.

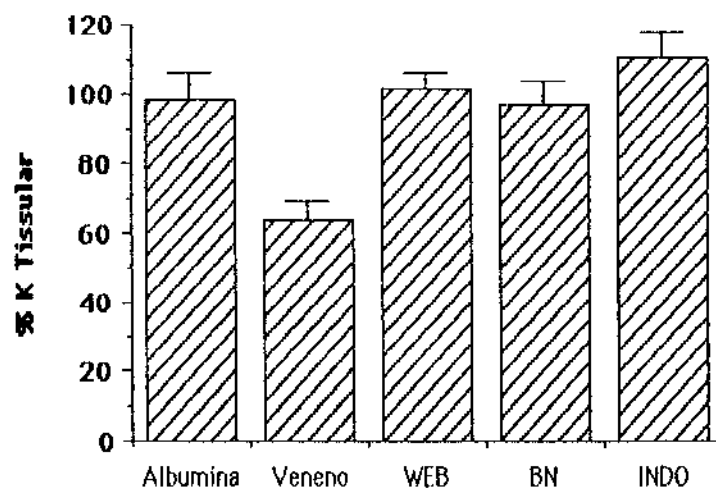


Figura 30: Percentual de potássio tecidual renal nos diversos grupos.

Todos os grupos tratados (BN 52021, WEB 2086, Indometacina) comportaram-se como o controle com a albumina, demonstrando um bloqueio total ao efeito do veneno.

O percentual de  $K^+$  retido nos tecidos apresentou-se diminuído com o uso do veneno. Os grupos nos quais foram utilizados BN 52021, WEB 2086 e indometacina demonstraram bloqueio total ao efeito do veneno (figura 30).

### **Correlação entre alguns parâmetros estudados**

A correlação entre os parâmetros RFG e  $TNa^+$  nos diversos grupos experimentais encontram-se nas figuras 31, 32, 33, 34 e 35. Uma correlação positiva foi obtida entre os dois parâmetros dos experimentos controle, tratados com veneno e com BN 52021. Nos grupos tratados com o WEB 2086 e indometacina a correlação é negativa. Estes grupos apresentaram aumento do RFG demonstrando bloqueio ao efeito do veneno e queda do percentual de  $TNa^+$  de forma mais acentuada do que com o uso isolado do veneno.

### **Estudo Histopatológico dos Grupos Controle e Tratado com Veneno de *B. Jararaca***

#### Grupo controle

Foi observada moderada tumefação celular e dilatação nos túbulos de todos animais controle (figura 36b). A presença de material proteico nos glomérulos, mesmo em pequena quantidade, foi evidenciada em apenas um dos animais. Nos demais, os glomérulos examinados tinham aparência normal

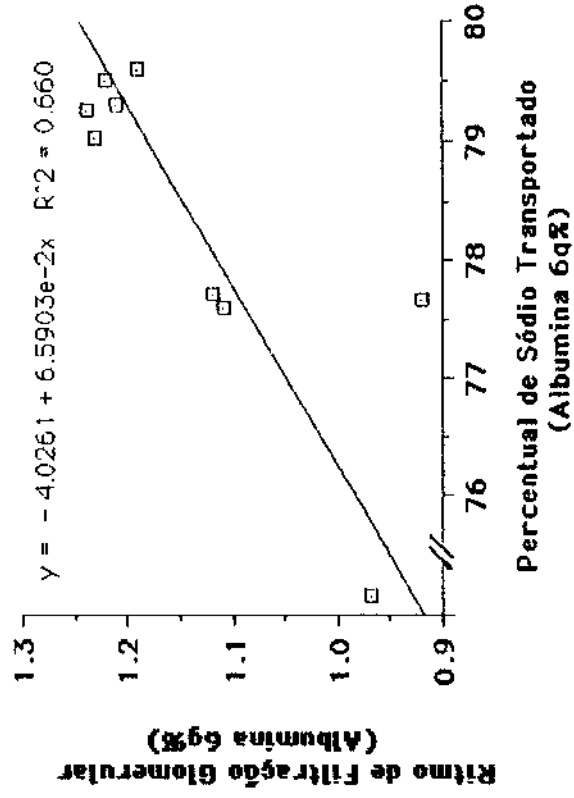


Figura 31: Correlação linear do balanço glomérulo-tubular de rins controles perfundidos.



Figura 32

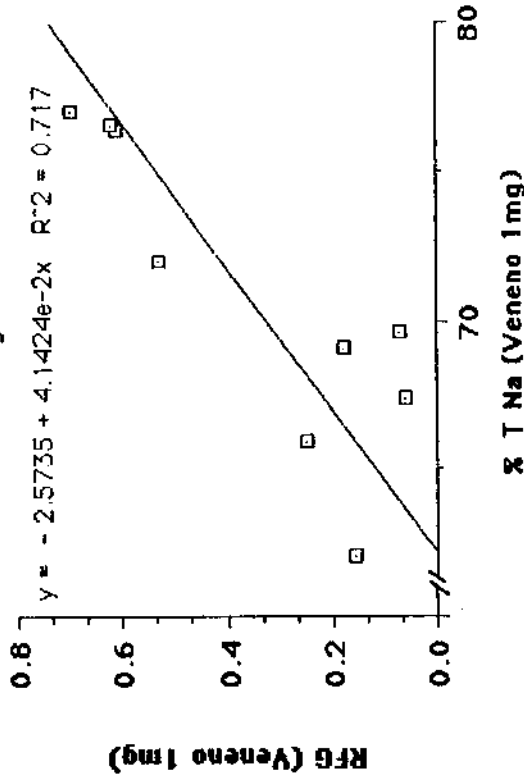


Figura 33

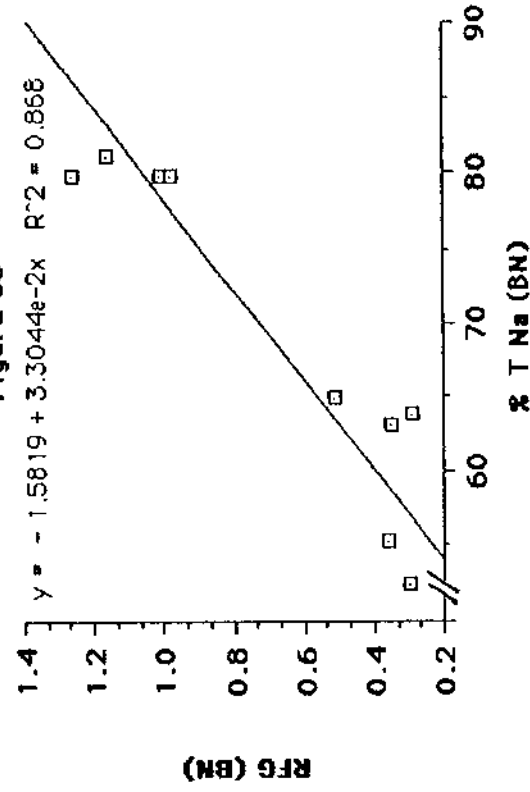


Figura 34

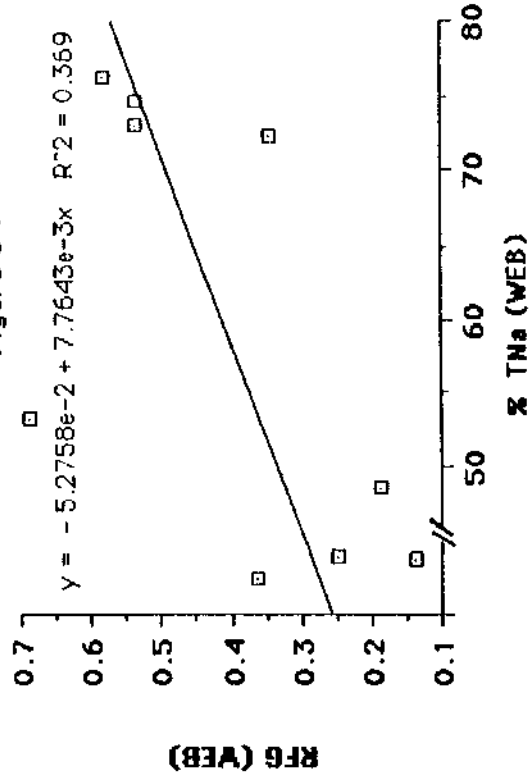
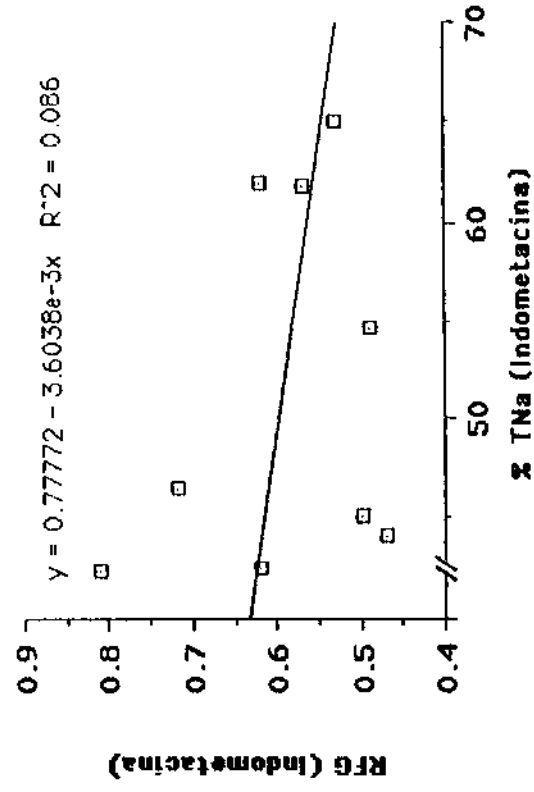


Figura 35



Figuras 32, 33, 34 e 35: Correlação linear do balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos nos diversos grupos tratados.

(figura 36a). A presença de material proteico nos túbulos corticais ocorreu de forma escassa em quatro animais e moderada em um outro. Não evidenciamos a presença de hemácias em nenhum animal controle.

Estas alterações parecem ser devido à técnica de perfusão de rim isolado com presença de albumina no líquido perfusor. Este fenômeno foi descrito anteriormente em rim perfundido de coelho nas mesmas condições (Moraes, 1984).

#### Grupo Tratado

Além das alterações encontradas nos animais controle, descritas acima, observamos a presença de material proteico nos espaços uriníferos dos glomérulos (figura 37) e lúmens tubulares (figura 38) que variou de moderada a intensa (tabelas 17 e 18).

A necrose de células tubulares múltiplas foi encontrada em dois animais (figura 39).

Um dos animais apresentou hemácias em quantidade moderada nos espaços uriníferos de alguns glomérulos, o que pode ser interpretado como artefato da técnica.

**Tabela 17: Alterações histopatológicas de rins controle perfundidos com 6g% de albumina e de rins perfundidos com 1mg de veneno de *B. jararaca* .**

Animal	Dilatação de Túbulos		Tumefação de Túbulos		Necrose de Túbulos		Material Proteico		Hemácias	
	Esc	Mod. Int.	Esc.	Mod. Int.	Esc.	Mod Int.	Glomérulo	Túbulos	Esc. Mod Int.	Túbulos
C1	+		+					+		
C2	+		+					+		
C3	+		+			+			+	
C4	+		+				+			
C5	+		+				+			
T1	+			+				+		+
T2	+		+		+				+	
T3	+		+					+		
T4	+		+		+				+	
T5	+		+			+			+	

C: Controle Albumina

T: Tratado com 1 mg de veneno de *E. jararaca* .

Esc: Escasso

Mod: Moderado

Int: Intenso

**Tabela 18: Frequência relativa em percentual das alterações histopatológicas de rins controle perfundidos com 6g% de albumina e de rins perfundidos com 1mg de veneno de *B. jararaca* .**

Animal	Dilatação de Túbulos		Tumefação de Túbulos		Necrose de Túbulos		Material Proteico		Hemácias					
	Esc	Mod. Int.	Esc.	Mod. Int.	Esc.	Mod. Int.	Glomérulo	Túbulos	Glomérulo	Túbulos				
Controle	0	100	0	100	0	0	20	0	80	20	0	0	0	0
Tratado	0	100	20	80	0	40	20	20	20	60	20	0	20	0

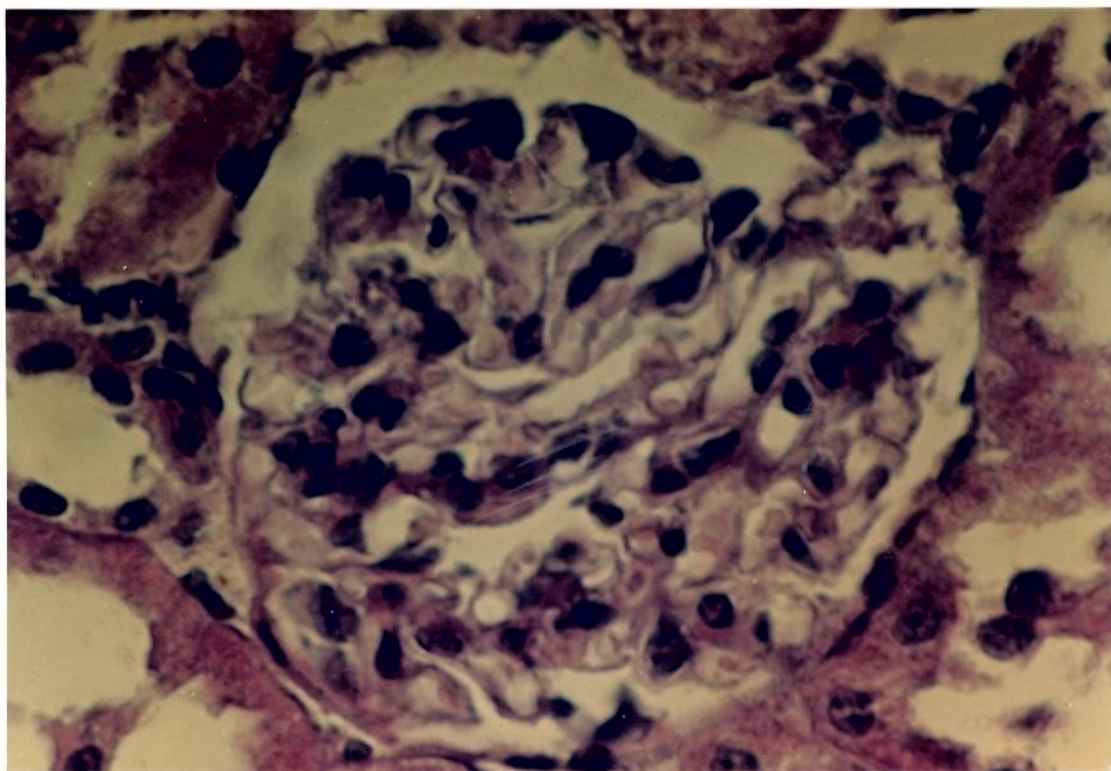
Controle: Albumina (6g%)

Tratado: 1mg de veneno de *B. jararaca*

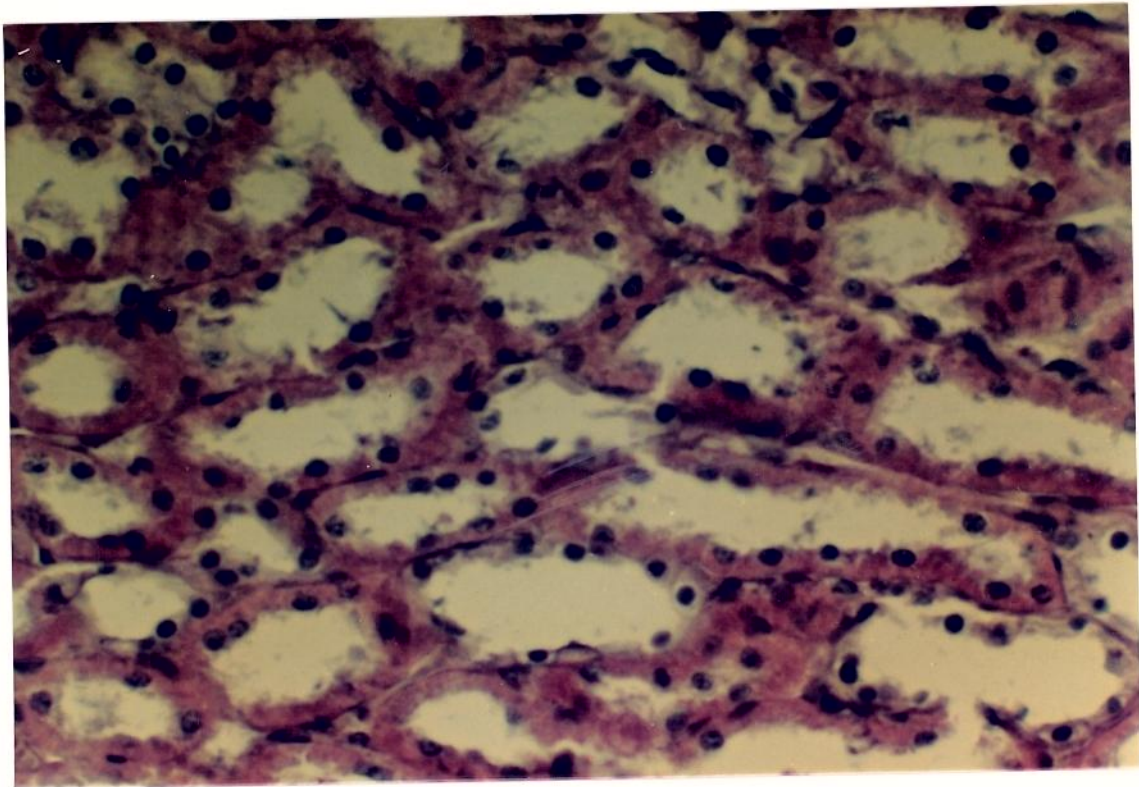
Esc: Escasso

Mod: Moderado

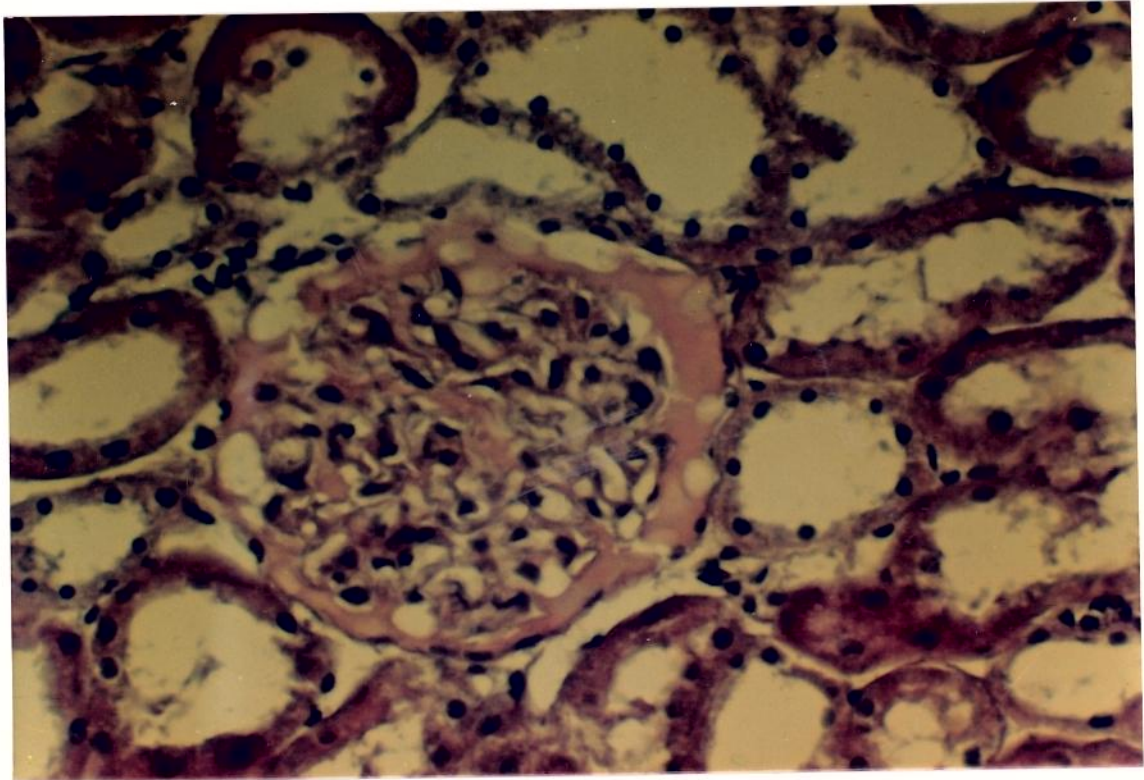
Int: Intenso



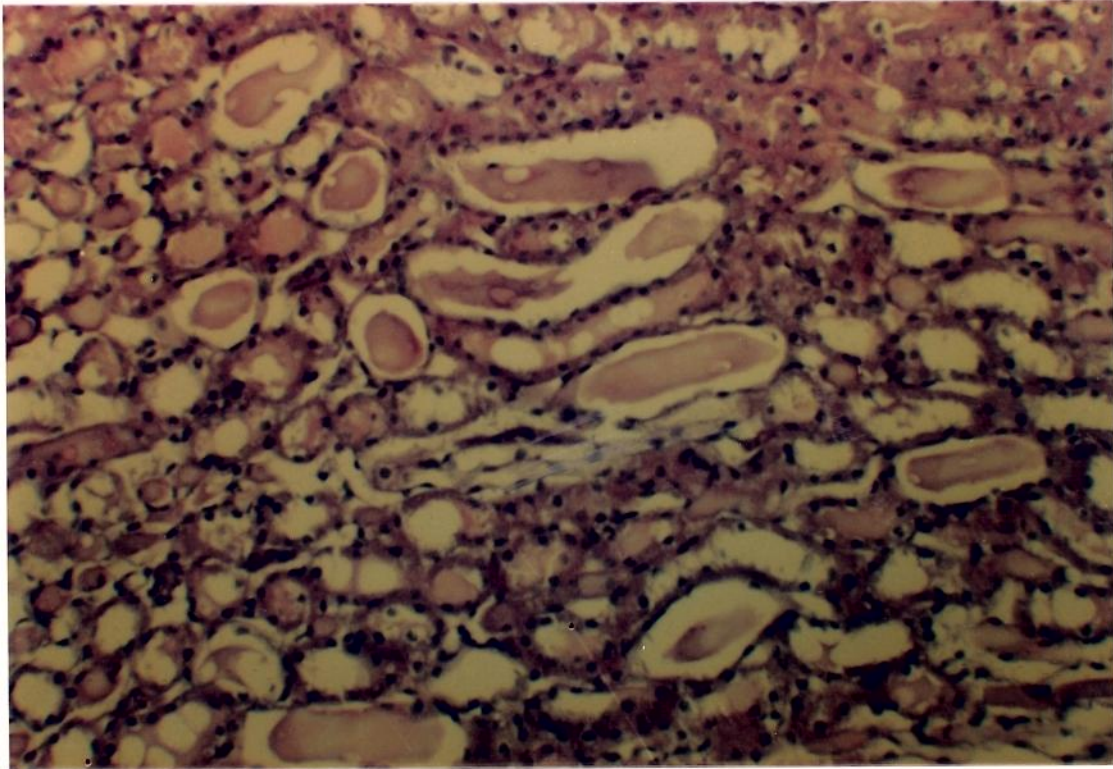
**Figura 36a: Animal Controle - Rim apresentando glomérulo sem alterações. (H.E. 800x)**



**Figura 36b: Animal Controle - Rim apresentando túbulos com moderada tumefação celular. (H.E. 800 x)**

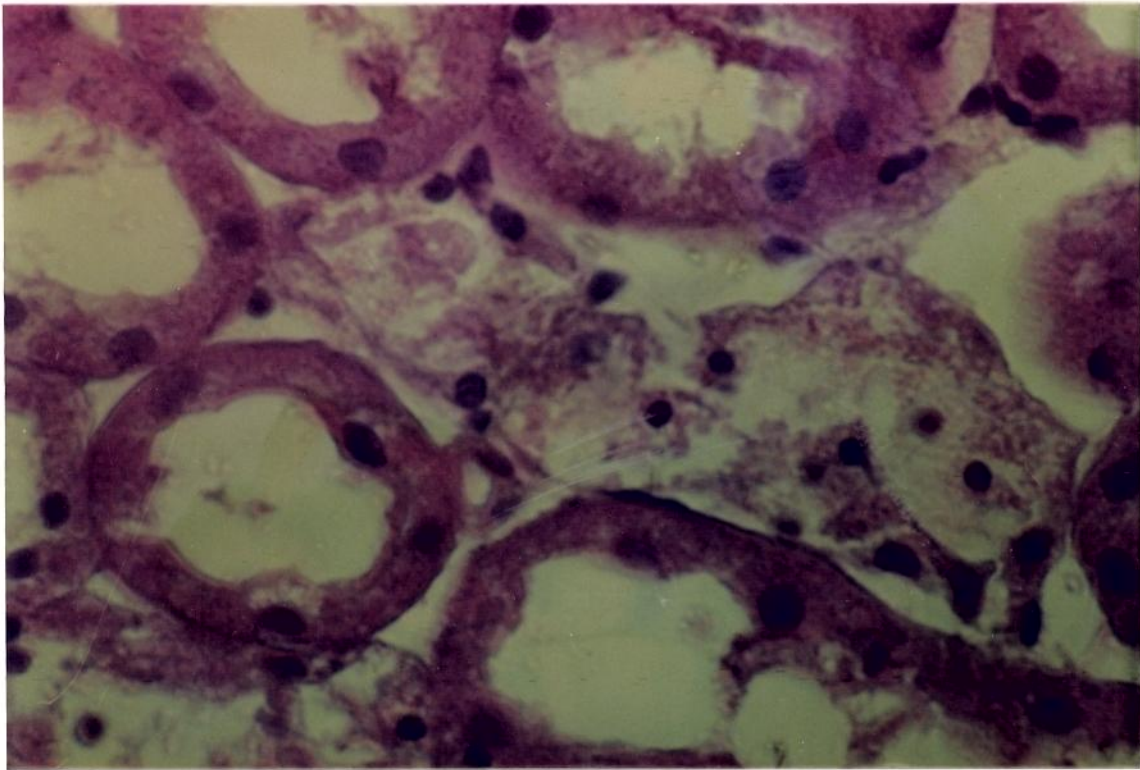


**Figura 37:** Animal Tratado com 1mg de veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando glomérulo com material proteico no espaço urinífero. Túbulos dilatados com moderada tumefação e borramento da borda em escova. (H.E. 800 x)



**Figura 38:** Animal Tratado com 1mg de veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando túbulos moderadamente dilatados, contendo material protéico em grande quantidade. (H.E. 800 x)





**Figura 39:** Animal Tratado com 1mg de veneno de *B. jararaca*. Rim apresentando foco de necrose de células tubulares. (H.E. 800 x)

## **Discussão**

Os acidentes ofídicos pela frequência com que ocorrem, pela morbidade e mortalidade constituem um importante problema de saúde pública nos países tropicais. No Brasil estima-se que ocorram de 80.000 a 115.000 acidentes, com 2.000 óbitos anuais. A maioria deste acidentes são causados por *Bothrops*, *Crotalus* e em menor frequência *Micrurus* e *Lachesis* (Amaral et al., 1986).

No nosso trabalho estudamos os efeitos nefrotóxicos da peçonha de *B. jararaca*, pela maior frequência de acidentes entre nós e pela gravidade das lesões renais. Os resultados aqui discutidos objetivam um maior conhecimento destes efeitos.

Utilizando o sistema de perfusão de rim isolado, obtivemos um modelo experimental para o estudo de efeitos diretos do veneno, excluindo outros fatores que poderiam interferir nos resultados. Nos experimentos nos quais utilizamos o veneno notamos alteração funcional com diminuição acentuada da diurese e da maioria dos parâmetros renais estudados.

Como parte inicial deste estudo foram realizadas análises dos parâmetros funcionais renais em perfusões com solução de Krebs-Henseleit modificada, na presença de 2g%, 4g% e 6g% de albumina.

A solução de Krebs-Henseleit com glicose e um agente oncótico em perfusões renais tem sido utilizada por vários pesquisadores em rins de coelho e de rato (Nishiitsutji-Uwo et al., 1967; Bowman, 1970 e 1974; Schurek et al., 1978, 1980 e 1981; Ross, 1972; Little and Cohen, 1974; Cohen et al 1977; Moreira Lima, 1983; Moraes, 1984; Campos, 1989).

Alguns pesquisadores utilizaram colóides sintéticos, tipo Dextran,

Haemacel, Pluronic, em perfusão renal (Ross, 1978) por apresentarem baixo custo quando comparados à albumina. Entretanto, tais substâncias apresentam a desvantagem de promover uma excreção excessiva de íons potássio (Schurek et al., 1970). O uso de albumina bovina como agente oncótico, é preferível porque mantém estável os parâmetros funcionais do rim perfundido, mantendo-os próximos à aqueles observados *in vitro*, o que justificam a nossa escolha neste trabalho.

A perfusão renal com 2g% de albumina permaneceu estável durante todo o experimento, porém quando comparado às outras preparações com 4g% e 6g% de albumina, observou-se uma melhora dos parâmetros renais com o aumento na concentração de albumina, fato já descrito anteriormente por Moreira Lima (1983), Moraes (1984) em experimentos com ratos e coelhos respectivamente.

O valor médio obtido com 2g% para o RFG foi de  $0,86 \pm 0,08$  ml/ g/min e para o percentual de  $\text{TNa}^+$  foi  $76,62 \pm 5,75$ , não houve diferença estatística com os valores obtidos com 4g% de albumina (RFG =  $0,97 \pm 0,09$  e percentual de  $\text{TNa}^+ = 76,94 \pm 3,07$ ). Com esses dados pode-se observar que as preparações com 2 e 4g% de albumina não apresentaram diferenças entre si, porém, quando comparadas às preparações com 6g% de albumina, notou-se uma melhora dos parâmetros renais. Portanto, os valores funcionais médios obtidos com 6g% de albumina foram superiores aos observados com 2 e 4g%. A influência da concentração de albumina no perfusato, sobre a função renal foi estudada por inúmeros pesquisadores (Bowman e Maack, 1974; Little e Cohen, 1974; Moreira Lima, 1983; Moraes, 1984). Os resultados aqui apresentados confirmam o importante papel que a presença de albumina no perfusato desempenha na reabsorção de sódio.

Na preparação com 6g% de albumina observamos uma estabilidade durante todo tempo de perfusão para os parâmetros RVR, FU, RFG e percentual de TNa (tabela 4), que permaneceram constantes durante 90 minutos. Os outros parâmetros  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{pTNa}^+$ ,  $\%d\text{TNa}^+$  e  $\%dTNa^+$  apresentaram aumento no decorrer dos 90 minutos (Tabela 5). Os resultados obtidos nos experimentos com 6g% de albumina demonstram a qualidade do sistema e da preparação, o que pode ser observado pela uniformidade dos dados apresentados, tornando esta preparação um modelo para estudo de efeitos diretos de drogas sobre o rim.

A insuficiência renal aguda (IRA) secundária a acidentes botrópicos é uma das principais complicações renais (Steinbeck, 1960; Amaral et al., 1980; Chugh et al., 1975; Lopez et al., 1972).

O grande número de acidentes ofídicos e muitas vezes a ausência ou dose inadequada de antiveneno leva a esta grave complicação, resultante de alterações anatômicas como glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e necrose cortical. Portanto, outros estudos complementares se fazem necessários para melhores esclarecimentos dos mecanismos envolvidos na patogênese da IRA.

Os mecanismos atualmente propostos para explicar as lesões renais são coagulação intravascular disseminada (CID), nefrotoxicidade direta atribuída à ação proteolítica do veneno e/ou espasmo dos vasos renais decorrente da liberação de substâncias vasoativas pelo veneno (W. Raab e E. Kaiser, 1966; Amaral et al., 1986; Amaral et al., 1985). Em alguns casos de IRA não são identificadas alterações histopatológicas (Chugh et al., 1975; Amaral et al., 1986). O estudo em pacientes vítimas de acidentes ofídicos demonstrou que o intervalo de tempo entre o acidente e o início da oligúria ou anúria, variava de 18 horas a 5 dias. A admissão dos pacientes no hospital ocorria entre o 4º e 7º dia, já com IRA

(Amaral et al., 1986).

A IRA em geral se caracteriza pela oligúria ou mesmo anúria porém pode ocorrer com alto débito e elevação progressiva dos níveis séricos de uréia e creatinina.

Amaral et al. (1985), realizaram estudos em pacientes picados por *B. jararaca*, tratados com antivenenos e constataram que estes soros não impediram o desenvolvimento de necrose cortical e insuficiência renal. Este fato pode ter ocorrido por dose inadequada e/ou excesso de tempo decorrido entre a picada e sua administração.

A patogênese da necrose cortical em decorrência da inoculação do veneno de *B. Jararaca* não está ainda bem esclarecida, embora tenha sido constatado um efeito tóxico direto, proteolítico, no endotélio vascular e/ou vasoespasmo, assim como a participação de um fator pró-coagulante. Todos os casos de necrose cortical apresentam como denominador comum a presença deste fator que é capaz de ativar o mecanismo de coagulação (Matlin e Garry, 1974). A hemólise intra-vascular e CID contribuem portanto para a insuficiência renal, causando nefrotoxicidade com necrose cortical aguda e necrose tubular aguda (Chugh et al., 1975). A necrose tubular aguda também pode ser causada por efeito tóxico direto do veneno sobre o rim (Amaral et al., 1985).

Como podemos concluir são vários os trabalhos na literatura que estudam o fenômeno de nefrotoxicidade pelo veneno de *B. jararaca*. Além dos já mencionados, destacamos Lopez et al., 1972; Amaral et al., 1985; Kouyoumdzian, 1986; Amaral et al., 1986; Rezende et al., 1989.

Amaral et al. (1986) estudaram pacientes que apresentara IRA

secundária a acidentes botrópicos nos qua se verificou uremia (100%), hiperpotassemia (89%), anemia (78%), infecção urinária (37%), hiperhidratação (17%), parada cardíaca (14%), edema agudo de pulmão (11%) e necrose cortical (22,4%).

No estudo histopatológico dos rins observamos que os grupos controle e tratado com o veneno apresentaram dilatação e tumefação de túbulos, sendo provavelmente em consequência da técnica utilizada.

No grupo tratado com o veneno ocorreu necrose de túbulos em dois animais, sugerindo um efeito tóxico direto, já descrito anteriormente em acidentes ofídicos por *B. jararaca* (Sitprija, 1979; Chugh et al., 1975; Amaral et al., 1985; Amaral et al., 1986), Estes autores sugeriram que as manifestações poderiam ser resultados dos efeitos de componentes tóxicos dos venenos, agindo de forma direta ou indireta sobre o rim.

A presença de material proteico no interior dos túbulos e glomérulos nos rins controle foi provavelmente devido à presença de albumina na solução perfusora, o que já foi descrita anteriormente por Moraes (1984) em rim perfundido de coelho. No entanto, os controles não apresentaram alterações funcionais.

A presença de material proteico em glomérulos e túbulos ocorreu tanto nos controles como nos tratados com veneno, porém este último grupo apresentou maior intensidade, provavelmente decorrente do efeito tóxico direto do veneno no capilar glomerular e tubular, por aumento da permeabilidade dos vasos e/ou lesão do endotélio, necessitando para maiores esclarecimentos de um estudo mais acurado de microscopia eletrônica, não realizado neste trabalho.

Rezende et al. (1989) descreveram alterações histopatológicas induzidas pelo veneno de *B. jararaca* em ratos após 2, 5 e 24 horas. Constataram albuminúria logo após administração do veneno, que pode ter sido secundária a ativação do sistema renina-angiotensina. Observaram também um aumento da permeabilidade glomerular para macromoléculas provavelmente em decorrência da liberação de substâncias vasoativas do veneno e/ou a redução tubular de proteínas filtradas. Além das alterações fisiopatológicas descritas acima foi também constatada a proliferação da matriz mesangial com glomerulonefrite e alteração degenerativa dos túbulos com diminuição da borda em escova e vacuolização citoplasmática, sem sinais de necrose tubular. Levantaram então a hipótese de que as lesões foram secundárias às alterações hemodinâmicas ou hemoglobinúria. Notaram também a presença de material proteico no lúmen tubular, com alterações renais mais pronunciadas após 5 horas, que tendem a melhorar após 24 horas. Estes autores concluíram ainda que a injeção intra-peritoneal do veneno induziu alterações funcionais compatíveis com IRA e lesões degenerativas de células tubulares. Foi então sugerido que as alterações hemodinâmicas levaram a isquemia renal, desempenhando importante papel na patogênese das alterações funcionais e histopatológicas.

Nos experimentos aqui descritos utilizando a técnica de rim isolado, foram afastados outros fatores sistêmicos e após exposição por 90 minutos foi observada a dilatação nos túbulos, acompanhada de moderada tumefação e borramento da borda em escova, descrita anteriormente por Rezende et al. (1989). Também foi constatada necrose tubular não encontrada por estes autores. Chegou-se então a conclusão de que estas alterações podem ter sido causadas por efeitos diretos do veneno sobre o rim, mesmo com uma menor exposição ao



mesmo.

Estudando os parâmetros funcionais observou-se uma queda acentuada do FU, RFG,  $\text{TNa}^+$ ,  $\%\text{TNa}^+$  e RVR após adição do veneno, que nos fala a favor de alteração funcional compatível com IRA. Também notou-se uma queda de  $\text{TK}^+$ ,  $\%\text{TK}^+$ ,  $\text{Na}^+$  tissular e  $\text{K}^+$  tissular.

Amaral (1986) descreveu hiperpotassemia em 89% dos pacientes picados por *B. jararaca* após 24 horas do acidente. No presente trabalho foi evidenciada redução deste íon imediatamente após exposição ao veneno, o que pode ter ocorrido em consequência de danos metabólicos no tecido renal. A remoção do potássio neste caso poder provir do próprio rim ou de outros órgãos.

Qualquer condição em que haja um aumento agudo na excreção de sódio, encontra-se associada a um aumento na excreção de potássio. Em contraste, quando pouco ou nenhum sódio é reabsorvido distalmente a secreção de potássio é mínima (Selkurt, 1986).

Na análise segmentar do néfron o veneno promoveu queda dos parâmetros estudados  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{dTNa}^+$ ,  $\%\text{dTNa}^+$ ,  $\text{pTNa}^+$  e  $\%\text{pTNa}^+$ . Estes resultados demonstram defeito tubular distal como resultado da toxicidade da peçonha, com diminuição da osmolaridade urinária. Contudo, o modelo experimental de rim perfundido não é adequado para o estudo de néfron distal porque a preparação produz urina geralmente hipotônica, com pequena margem de observação. Esse defeito distal no rim perfundido de rato foi descrito por DeMello e Maack (1976).

A teoria metabólica de auto-regulação quando aplicada ao rim deve levar em consideração dois importantes componentes humorais: sistema renina-

angiotensina e as prostaglandinas. A renina sintetizada no aparelho justa glomerular (AJG) converte o angiotensinogênio do plasma em Angiotensina I que sob ação da enzima conversora é convertido em Angiotensina II. Foi proposto um papel regulador intra renal para o sistema renina-angiotensina, podendo desempenhar papel, na autoregulação renal do fluxo sanguíneo. Evidências recentes indicam que as prostaglandinas podem ativar o sistema renina-angiotensina. Fluxo renal reduzido decorrente de vasoconstrição neurogênica ou humoral, ou a isquemia renal aumentam a síntese e a liberação de prostaglandinas. Pesquisas recentes indicam que certas prostaglandinas ( $PGI_2$ ) são também sintetizadas no córtex possivelmente pelo endotélio dos vasos sanguíneos corticais. A produção e liberação aumentadas de prostaglandinas não exercem influência sistêmica porque normalmente os pulmões metabolizam a maior parte das prostaglandinas (Seikurt, 1986; Mudge & Weiner, 1987). No modelo experimental utilizando o rim isolado, as prostaglandinas podem ter um efeito direto mais intenso sobre o rim, uma vez que fica excluída a participação do pulmão no metabolismo das mesmas.

Outro fator que desempenha papel importante é o fator potenciador de bradicinina (BPF), que é uma fração farmacologicamente ativa preparada do veneno *B. jararaca*. Este fator inibe a enzima conversora que inativa a bradicinina e bloqueia a conversão de angiotensina I em angiotensina II (Ferreira et al., 1970).

O fator ativador de plaquetas (PAF) é um mediador fosfolipídico definido como 1-O-alkil-2-(R)-acetil-glicero-3-fosforilcolina (Benveniste et al., 1979; Demopoulos et al., 1979). Inicialmente Benveniste et al (1972) descreveram um fenômeno de ativação plaquetária induzido por uma substância produzida por basófilo de coelhos sensibilizados por IgE. Esta substância foi semi-purificada e

caracterizada como um novo mediador da anafilaxia (Benveniste et al., 1979), podendo ser produzida por uma variedade de células inflamatórias incluindo neutrófilos monócitos, eosinófilos, macrófago, plaquetas e células endoteliais (Braquet et al., 1987). O PAF não é acumulado nas células mas sim o seu precursor 1-O-Alquil-acilglicerofosfolina. A biossíntese enzimática pode ocorrer através de duas vias diferentes, iniciando-se com a ativação da fosfolipase  $A_2$  que atua sobre os fosfolípidios da membrana celular em um processo cálcio dependente (Ballou et al., 1983). A primeira via, a alquilacetil glicerol é responsável pela manutenção dos níveis fisiológicos do fosfolípido, com alterações na célula em repouso, sendo a via biossintética predominante no rim. A segunda via conhecida como liso-PAF é inativa (sofre acetilação para formar PAF), está relacionada ao processo inflamatório e tem baixa atividade na célula em repouso. A inativação intracelular do PAF é feita através da ação de duas acetilidrolases, uma plasmática e outra citosólica, levando a formação de liso-PAF (Blank et al., 1981), que é o produto intermediário, precursor ou metabólito, que sofre desacetilação e acetilação na dependência da via predominante, se sintética ou catabólica (Braquet et al, 1987; Vargaftig e Braquet, 1987).

Por outro lado a proteína quinase C é responsável pela ativação da fosfolipase  $A_2$  na formação do composto intermediário liso-PAF (Braquet et al., 1987), estando seus inibidores entre aquelas substâncias capazes de bloquear a síntese de PAF. O cálcio inibe várias enzimas participantes da síntese e da degradação do fosfolípido (Touqui et al., 1987), sendo essencial para as etapas sintéticas via Liso-PAF. A regulação da produção do PAF nas células endoteliais depende da concentração de cálcio e de proteína quinase C (Ralph et al., 1989).

O PAF é conhecido por induzir a agregação e secreção de plaquetas (Chignard et al., 1979) e leucócitos polimorfonucleares (O' Flaherty et al., 1981).

Quando injetado intravenosamente em cobaias e coelhos induz trombocitopenia, neutropenia, hipotensão e choque (Mc Manus et al., 1980). Após injeção subcutânea, aumenta a permeabilidade vascular com exudação de plasma independente da acumulação leucocitária (Pirotzky et al., 1985). Estas propriedades implicam o PAF como um mediador potente da doença renal. As lesões renais são caracterizadas por um aumento na permeabilidade glomerular com deposição de imunocomplexos nas paredes capilares do glomérulo e infiltração de células inflamatórias, processos patogênicos nos quais o PAF pode estar envolvido. A liberação de PAF sob estímulo imunológico e o reconhecimento de sua produção pelas células corticais renais sugere a participação do fosfolipídio nas doenças glomerulares. O PAF também pode ser produzido no rim isolado de rato em resposta ao ionóforo A 23187, com outros mediadores ( Pirotzky et al., 1984).

Os túbulos renais não produzem o fosfolipídio, porém, tem sido identificado o precursor liso-PAF e a atividade de acetil-transferase no glomérulo e nas células medulares (Pirotzky et al., 1984). Experimentos realizados em cães demonstraram redução do fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular e diminuição na excreção urinária de sódio após infusão venosa de PAF. O tratamento prévio dos animais com inibidores de ciclooxigenase, reverteu os efeitos hipotensores, porém, não foi capaz de alterar os parâmetros renais (Hebert et al., 1987), concluindo que os efeitos do PAF sobre o rim são diretos, não mediados por prostaglandinas e independentes das variações tensionais sistêmicas.

Em ratos a infusão de PAF não modifica a pressão arterial, nem diminui a taxa de filtração glomerular, mas é capaz de induzir um aumento na reabsorção de sódio, cálcio e magnésio (Pirotzky et al, 1989).

O PAF é também um potente estimulador da produção renal de prostaglandinas e tromboxanos (Weisman et al., 1985), sendo provável que as alterações no fluxo plasmático renal após infusão de PAF sejam causadas em parte pelo efeito do PAF diretamente no rim e também pela liberação secundária, por células renais, de mediadores com ações diretas sobre a produção renal do próprio PAF (Whatley, 1989).

As interrelações entre o fosfolipídio e outros sistemas mediadores renais, a participação do PAF em processos renais de natureza inflamatória como em doenças auto imunes e na rejeição pós transplante, deixam antever a riqueza e a complexidade de seu papel na fisiologia renal ( Braquet et al., 1987).

A descoberta de antagonistas do mediador foi de grande importância no estudo das ações biológicas e das propriedades farmacológicas do PAF. Os bloqueadores de canais de cálcio (Coeffier et al., 1983), os antagonistas da calmodulina (Levy, 1983) e a mepacrina (Braquet et al.,1987; Albert e Snyder, 1983) demonstraram a participação decisiva do cálcio e da fosfolipase  $A_2$  nas etapas biossintéticas. Compostos como naloxano, antagonistas de troboxanos e leucotrienos antagonizam os efeitos sobre vários sistemas celulares (Feuerstein et al.,1985; Chilton et al., 1982). Estas substâncias exercem uma ação antagônica inespecífica. Os antagonistas específicos do PAF englobam uma vasta quantidade de substâncias bioquimicamente distintas, algumas análogas ao PAF porém sem ação agonista, muitos derivados de produtos naturais e outras obtidas sinteticamente, todos porém, inibem competitivamente o acoplamento do fosfolipídio ao receptor celular.

Dois destes compostos foram utilizados no presente trabalho, sendo um derivado natural da *Ginkgo biloba* (árvore milenar chinesa), BN 52021, e outro

antagonista farmacológico, WEB 2086, na tentativa de bloquear efeitos nefrotóxicos do veneno de *B. jararaca*. Os antagonistas naturais do PAF, compostos derivados da *Ginkgo biloba*, possuem uma complexa estrutura molecular com 20 carbonos, que apresentam diferença no número e na posição de grupos hidroxilas em C1, C3 e C7, determinando o surgimento de isômeros denominados ginkgolídios A, B, C, J, e M (nomenclatura adotada pelo Instituto Henri Beaufour-Paris, França). Destes isômeros o que apresenta maior antagonismo é o B (BN 52021), tendo sido por este motivo escolhido para o presente trabalho.

Kornecki et al. (1985) demonstraram que os triazolobenzodiazepínicos (drogas psicotrópicas) eram capazes de inibir a resposta agregante plaquetária induzida pelo PAF. Este composto é um derivado benzodiazepínico com anel triazol que possui efeitos anti-PAF independente das suas ações hipnóticas e sedativas (Casals-Stenzel e Weber,1987). Estes efeitos inibitórios sobre a agregação de plaquetas humanas são específicos para o PAF e não se reproduzem quando o indutor é o ácido araquidônico, colágeno, A 23187 ou trombina. Recentemente foi sintetizado um novo triazolobenzodiazepínico destituído de efeito hipnótico e capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo PAF. Este composto, o WEB 2086, é capaz de inibir em animais de experimentação os efeitos circulatórios e brônquicos da infusão de PAF (Casals-Stenzelet al.,1986; Casals-Stenzel e Weber, 1987). Utilizamos esta droga na tentativa de bloquear efeitos nefrotóxicos do veneno de *B. jararaca*.

Portanto, tanto o BN 52021 quanto o WEB 2086 foram utilizados na tentativa de bloquear efeitos nefrotóxicos do veneno. Mesmo sendo o mais potente inibidor do PAF dentre aqueles originados da *Ginkgo biloba*, a análise dos resultados não mostrou eficiência do BN 52021 na proteção aos efeitos tóxicos do

veneno, o que pode estar relacionado à dose empregada. Na presente pesquisa, o WEB 2086 foi bastante eficaz no bloqueio a vários efeitos nefrotóxicos do veneno. O efeito na diurese e no RFG além de causar bloqueio total à ação nefrotóxica do veneno, eleva estes parâmetros acima dos encontrados no grupo controle, sugerindo uma potenciação destes mesmos efeitos. O  $TNa^+$  e  $\% TNa^+$  apresentaram queda ainda mais acentuada do que nos grupos tratados somente com o veneno. Porém, o  $Na^+$  e  $K^+$  tissular não diferiram do controle, demonstrando que a droga impediu a perda destes íons no tecido renal, fato observado com o uso do veneno. Quanto ao efeito na pressão de perfusão, há um retardamento no início da queda, o que demonstra que houve uma leve proteção.

Analisando estes resultados, tudo indica que os efeitos sobre a diurese e o RFG são semelhantes sendo bloqueados pelo WEB 2086, enquanto o efeito sobre a pressão de perfusão é apenas parcialmente bloqueado. Parece que o PAF poderia estar envolvido com o efeito nefrotóxico direto do veneno sobre o rim, o que explicaria o bloqueio causado pelo WEB 2086. Com este resultado podemos levantar a hipótese da liberação do PAF pelo veneno causando alterações nefrotóxicas.

Os outros parâmetros  $CH_2O$ ,  $dTNa^+$  e  $\% dTNa^+$  se apresentaram negativos, quando comparados ao grupo controle. Quando o  $CH_2O$  é positivo, a urina apresenta-se mais diluída que o plasma. Quando o  $CH_2O$  é negativo a urina é mais concentrada que o plasma sendo mais convenientemente expressa pela designação  $TCH_2O$ . Com cargas muito baixas de soluto e/ou na presença de fluxo urinário baixo, o valor de  $TCH_2O$  diminui.

Os efeitos da indometacina nas inflamações mediadas por histamina, 5-hidroxitriptamina, bradicinina e prostaglandina  $E_2$  tem sido bastante estudados.

A indometacina nas doses de 10 à 160µg/ml exibe um efeito inibitório na contração induzida pelos mediadores acima descritos, em útero isolado de rato e íleo de cobaia. Alguns autores têm demonstrado que a indometacina foi cerca de 4 vezes mais efetiva no seu efeito inibitório sobre a PGE<sub>2</sub> do que sobre a histamina, serotonina e bradicinina (Sorrentino et al., 1972; Northover, 1975).

Os dois mecanismos produtores da inflamação são o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos que podem ser consequência da liberação de vários mediadores na área inflamada (Willoughby e Di Rosa, 1971).

A indometacina inibe também a contração da musculatura lisa em concentração semelhante àquela que é requeridas no sangue para uma ação anti-inflamatória. Em contraste o contacto prolongado com quantidade diminuta, abaixo das concentrações anti-inflamatórias, algumas vezes potencia a resposta contrátil, sendo a razão deste fenômeno ainda obscura, e não será objeto de discussão nesse nosso trabalho (Northver, 1977).

O efeito inibitório é qualitativamente independente do tipo de estímulo envolvido na contração da musculatura lisa. Contudo, respostas contráteis do músculo liso causadas pelas prostaglandinas são inibidas mais completamente pela indometacina do que outras respostas de substâncias espasmogênicas.

Vários estudos comprovam que a indometacina reduz o conteúdo de cálcio na musculatura lisa gástrica não estimulada, reduz o ganho de cálcio e sódio em resposta à estimulação elétrica, mas diminui levemente a queda de potássio em resposta à estimulação elétrica (Northover, 1972). Muitas respostas ao cálcio são também inibidas pela indometacina (Northover, 1975; Northover, 1977). A liberação de enzimas lisossômicas de leucócitos polimorfonucleares em



respostas a vários estímulos requer a presença de cálcio. A indometacina e drogas correlatas inibem a liberação dessas enzimas (Andrews e Phelps, 1971; Perper e Oronsky, 1974; Ackerman e Beebe, 1975; Smith 1977). E de grande interesse a investigação no sentido de se determinar se o efeito inibitório da indometacina envolve a participação do cálcio. A indometacina possui algumas ações antagonistas ao cálcio em várias situações biológicas (Northover, 1977).

Diversos trabalhos demonstram que as células endoteliais possuem propriedades de contratilidade semelhantes às apresentadas pela musculatura lisa. As células endoteliais possuem um sistema actinmiosina que é morfológica e imunologicamente semelhante ao músculo liso (Becker e Murphy, 1969; Becker, 1970; Becker e Nachman, 1973). O cálcio por analogia estaria envolvido no fenômeno excitação e contração semelhante ao que ocorre com o músculo liso. A indometacina inibe vários fenômenos mediados pelo cálcio nas células do endotélio vascular possuindo uma ação de antagonismo. Existe uma correlação entre a potência anti-cálcio e potência anti-inflamatória que pode ser uma relação causa e efeito.

A indometacina apresentou efeito semelhante ao do WEB 2086 no fluxo urinário e RFG com bloqueio total dos efeitos nefrotóxicos causados pelo veneno. O  $\text{TNa}^+$  e  $\% \text{TNa}^+$  também continuaram baixos de forma semelhante ao que ocorreu com o uso do WEB 2086. A pressão de perfusão e a resistência vascular renal permaneceram baixas semelhantes ao uso do veneno, não havendo bloqueio destes parâmetros. O  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{dTNa}^+$  e  $\% \text{dTNa}^+$  também se apresentaram negativos. O uso da indometacina impediu a redução dos íons sódio e potássio no tecido renal. Com o uso da indometacina levantamos a possibilidade da participação das prostaglandinas e do cálcio nas alterações renais descritas acima.

A correlação entre os parâmetros RFG e % TNa<sup>+</sup> foi positiva com aumento dos dois parâmetros no grupo controle. Também foi positiva com o uso prévio do BN 52021, porém com diminuição dos dois parâmetros. No caso do WEB 2086 e indometacina a correlação foi negativa; estes grupos apresentaram aumento do RFG (bloqueio ao efeito do veneno) e queda do % TNa<sup>+</sup> de forma mais acentuada do que o causado pelo uso isolado do veneno.

O veneno de *B. jararaca* causa nefrotoxicidade direta sobre o rim com alterações funcionais de todos os parâmetros estudados, bem como alterações histopatológicas compatíveis à insuficiência renal aguda. Estes efeitos parecem resultar da presença de várias substâncias como bradicinina, histamina, prostaglandinas, cálcio e PAF pela infusão de veneno, causando alteração e/ou lesão no endotélio vascular renal nos glomérulos e túbulos.

## **Conclusões**

1) Com a técnica utilizada nos experimentos dispomos de um modelo para estudo dos efeitos tóxicos diretos de drogas sobre o rim.

2) O veneno de *B. Jararaca* produziu alterações notáveis em todos os parâmetros estudados, quando comparado ao controle, especialmente com queda acentuada de FU, RFG, RVR, PP, TNa<sup>+</sup>, % TNa<sup>+</sup>, TK<sup>+</sup>, % TK<sup>+</sup>; bem como a diminuição dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> no tecido renal após a exposição ao veneno.

3) O BN 52021 não apresentou proteção aos efeitos tóxicos do veneno, exceto ao evitar a diminuição de sódio e potássio tissulares, após o uso do veneno.

4) O inibidor de PAF (WEB 2086) exerceu efeito protetor a nível de FU, RFG e evitou a diminuição de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> do tecido renal após exposição ao veneno. Causou bloqueio parcial na PP com retardo no início do efeito tóxico.

5) A indometacina protegeu os parâmetros FU e RFG e evitou a diminuição de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> no tecido renal, após o uso do veneno. Apresentou diminuição de TNa<sup>+</sup> e % TNa<sup>+</sup> mais acentuada do que o uso isolado do veneno. Não apresentou efeito protetor quanto à PP.

6) O exame histopatológico revelou a presença de material proteico em glomérulos e túbulos tanto no controle como no grupo tratado com o veneno, sendo neste último em maior intensidade. Observamos a presença de necrose tubular em alguns animais após a exposição ao veneno.

7) O estudo que se inicia deverá ter continuidade, uma vez que levanta

vários aspectos importantes como alteração funcional e histopatológica renais, com provável envolvimento de vários mediadores químicos.

## **Referências Bibliográficas**

1. ACKERMAN, N. R. & BEEBE, J. R. Effects of pharmacologic agents on release of lysosomal enzymes from alveolar macrophages J. Pharmacol. Exp. Ther., **193**: 603-13, 1975.
2. ALBERT, D. H. & SNYDER, F. Biosynthesis of 1- alkyl 2-acetyl sn - glycerol 3-phosphocholine (platelet - activating factor) from 1-alkyl 2-acyl-sn-glycerol 3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. J. Biol. Chem., **258**: 97-102, 1983.
3. AMARAL, C.F.S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópicos e crotálicos. Análise de 63 casos. Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo, **28**: 220-7, 1986.
4. AMARAL, C.F.S. et al. Renal cortical Necrosis Following Bothrops jararaca and B. jararacussu snake bite. Toxicon, **23**(6): 877-85, 1985.
5. AMORIM, M.F.; FRANCO, R.M.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Mem. Ins. Butantan, **23**: 63-108, 1951.
6. ANDREWS, R. & PHELPS, P. Release of lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes after phagocytosis of monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate crystals; effects of colchicine and indomethacin. Arthritis Rheum, **14**: 368, 1971.
7. AZEVEDO, A.P. & TEIXEIRA, J.C. Intoxicação por veneno de cobra: necrose simétrica da córtex renal. Uremia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **33**: 23-37, 1938.
8. BAHLMANN, J.; GIEBISH, G.; OCHWADT, B.; SCHOEPPPE, W. Micropuncture study of isolated perfused; rat Kidney, Am. J. Physiol., **212**: 77-82, 1967.
9. BALLOU, L.R. & CHEUNG, W.Y. Marked increase of human platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity in vitro and demonstration of an endogenous inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **80**: 5203- 7, 1983.
10. BDOLAH, A. The venom glands of snakes and venom secretion In: LEE, CY ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. cap 3, p. 41-57.
11. BECKER, C.G. Investigations of cardiovascular contractile proteins. Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl., **40**: 31-49, 1970.

12. BECKER, C.G.& MURPHY, G.E. Demonstration of contractile protein in endothelium and cells of the heart valves, endocardium, intima atherosclerotic plaques, and Aschoff bodies of rheumatic heart disease. Am. J. Pathol., 55: 1-37, 1969.
13. BECKER, C.G.& NACHMAN, R.L. Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle. Am. J. Pathol., 71: 1-18, 1973.
14. BELLUOMINI, H.E. apud VITAL BRAZIL, O. Peçonhas in: CORBETT, CE ed. Farmacodinâmica Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982 cap 71, p. 1044-74.
15. BENVENISTE, J.; HENSON, P.M; COCHRANE, C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets the role of IgE, basophils and a platelet-activating factor J. Exp. Med., 136: 1356, 1972
16. BENVENISTE, J. et al. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (PAF): PAF-acether and alkyl ether analog. of lysophosphatidylcholine. CRC. Acad. Sci., 289D: 1037-40, 1979.
17. BIEBER, A.L. metal and nonprotein constituents in snake venoms In: LEE, CY ed. snake venoms. New York, Springer Verlag, 1979. Cap 9, p. 295-306.
18. BLANK, ML et al. Specific acetylhydrolase for 1-alkyl 2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet - activating lipid) J. Biol. Chem., 256: 175, 1981.
19. BONILLA, C.A; FAITH, M.R; MINTON, S.A. L-Amino acid oxidase, phosphodiesterase, total proteins and other properties of juvenile timber rattlesnake (C.H. horridus) venom at different stages of growth. Toxicon, 11: 301-3, 1973.
20. BOWMAN, R.H. Gluceneogenesis in the isolated perfused rat kidney. J. Biol. Chem., 245(7); 1604 - 12, 1970.
21. BOWMAN, RH & MAACH, T. Effect of albumin concentration and ADH on H2O and eletrolyte transport in perfused rat kidney. Am. J. Physiol., 226 (2): 426-30, 1974.
22. \_\_\_\_\_. Glucose transport by the isolated perfused rat Kidney. Am. J. Physiol., 222(6): 1499-504, 1972.

- 23- BRAQUET, P. et al. Perspectives in platelet activationg factor research. Pharmacol. Rev., 39(2):92-145,1987.
- 24- BRUNINGA, G.L. Complement: A review of the chemisty and reaction mechanism. Am. J. Clin. Path., 55:273-82,1971.
- 25- CALICH, V.L. et al. , Brazilian snake serum and venom: studies of the alternative pathway and C3 in man and serpent. J. Immunol., 120: 1767, 1978.
- 26- CAMPOS, H.H. Efeitos renais da ciclosporina isolada ou associada a um antagonista do PAF (BN 52021): Avaliação de parâmetros funcionais do rim de coelho isolado e artificialmente perfundido 1989. Tese (Doutorado) Escola Paulista de Medicina.
- 27- CASALS-STENZEL, J. & WEBER, K.H. Triazolodiazepines: dissociation of then PAF (platelet - activation factor) antagonistic and CNS activity. Br.J. Pharmacol., 90:139-46,1987.
- 28- CASALS-STENZEL, J.; MUSCENIC, G.; WEBER, K. H. WEB 2086 a new and specific antagonist of platelet - activating factor (PAF) Arch. Pharmacol., 334(Suppl): R44, 1986.
- 29- CASALS-STENZEL, J. et al. Inhibition of platelet activationg factor (PAF) induced effects in vitro and in vivo by WEB 2086, a new and specific PAF antagonist In: INTERNATIONAL CONFERENCE PLATELET-ACTIVATING FACTOR AND STRUCTURALLY RELATED ALKYL ETHERLIPIDS, 2º, Gatlinburg, 1986.
- 30- CHEYMOL,J.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER, M. Venins et toxines de serpents. Effets neuromusculaire. Actualités Pharmacol., 25: 179-240, 1972.
- 31- CHIGNARD, M., et al. The role of platelet-activating factor in platelet aggrcgation. Nature275: 799-800,1979.
- 32- CHILTON, F.H. et al. Platelet activating factor. Stimulation of the lipoxygenase pathway polymorphonuclear leukocytes by 1-0-alkyl-2-0-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. J.Biol. Chem., 257: 5402-7,1982.
- 33- CHUGH, K.S. et al. Acute renal Failure following snake bite. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24(4):692-7,1975.



- 34- CLARKSON, A.R. et al. Glomerular coagulation in acute ischaemic renal failure. Q.J. Med., 39: 585-99, 1970.
- 35- COEFFIER, E. et al. Inhibition of rabbit platelet aggregation by the Ca<sup>2+</sup>-antagonists verapamil and diltiazem and by trifluoperazine Thromb. Res., 31: 565-76, 1983.
- 36- COHEN, J.J.; KOOK, Y.J.; LITTLE, J.R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat Kidney: effects of lactate and glucose J. Physiol., 226: 103-21, 1977.
- 37- CONDREA, E. Hemolytic effects of snake venoms In: LEE, CY ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag; 1979. p.448-79.
- 38- DAMERAU, B. et al. Histamine release formation of prostaglandin like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 287: 141-56, 1975.
- 39- DeMELLO, G. & MAACK, T. Nephron function of the isolated perfused rat Kidney. Am. J. physiol., 231: 1699-707, 1976.
- 40- DEMOPOULOS, C.A; PINCKARD, RN; HANAHAN, D.J. platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2 acetyl- sn-glyceril-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators) J. Biol. Chem., 254: 9355-8, 1979.
- 41- DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytic activities of snake venoms. J. Biol. Chem., 216: 17-26, 1955.
- 42- DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E.; DEULOFEU, V. eds. Venoms animals and their venoms. New York, Academic Press, 1968. v.1, p. 119-65.
- 43- DOERY, H.M. Additional purine compounds in the venous of the tiger snake (*Notechis sculatus*) Nature, 180: 799-800, 1957.
- 44- \_\_\_\_\_. Purine compounds in snake venoms Nature, 177: 381-2, 1954.
- 45- EL-HAWARY, M.F.S & HASSAN, F. Proteins and amino acids of *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera*. Egypt. J. Phys. Sci. 1: 9-18, 1974a.

- 46- \_\_\_\_\_. Egypt. J. Phys. Sci. 1:19-37,1974b.
- 47- FERREIRA, S.H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. Biochemistry, 9 (13): 2583-93,1970.
- 48- FEUERSTEIN, G. et al. Trytrotropin-releasing hormone blocks. The hypotensive effects of platelet activating factor in the unanesthetized Guinea-pig J. Cardiovasc. Pharmacol., 7: 335-40,1985.
- 49- FIDLER, H.K.; GLASGOW, R.D., CARMICHAEL, E.B. Pathological changes produced by subcutaneous injection of Rattlesnake (Crotalus) Venom into Macaca mulatta monkeys. Am. J. Pathol., 16: 355-64,1940.
- 50- FISCHER, F.G. & DORFEL, H. Adenosine in Bitis arietans and Dendroaspis viridis. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 297: 278-82,1954.
- 51- FONTELES, M.C. Efeito do ácido 2- tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. 1980 Tese (Docência) UFC. Centro de Ciências da Saúde.
- 52- FONTELES, M.C. & MOREIRA LIMA, A. A. Functional comparison of Kidney perfused with fatty acid-free and rich albumin. Braz. Med. Biol. Res. 15 (4-5): 296,1982.
- 53- FRIEDRICH, C. & TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase, and proteolytic activities Biochem. Pharmacol., 20: 1549-56,1971.
- 54- GANS, C. & ELLIOT, W.B. Snake venoms: production, injection, action. Adv. Oral Biol. 3: 45-81, 1968.
- 55- GRONOW, G. The direct hidrolisis inulin method. Revised inulin method, 1979. Mimeografado.
- 56- GUIMARAES, J.A. et al. Acidentes Ofídicos: Indentifique-trate. Fortaleza, SUDS,1989.
- 57- \_\_\_\_\_. Estudo epidemiológico do ofidismo no Ceará no período de janeiro de 1987 à agosto de 1980. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA TROPICAL, 25º, Florianópolis, 1989.
- 58- HAAD, J.S. Accidentes Humanos por las serpientes de los gêneros Bothrops y

Lachesis. Mem. Inst. Butantan 44/45:403-23,1980/1981.

- 59- HADLER, W.A. & BRAZIL, O.V. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV Nephrotoxicity. Mem. Inst. Butantan, 33: 1001-8, 1966.
- 60- HAMILTON, R.L. et al. A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. J. Lipid. Res., 15:182-6, 1974.
- 61- HANSON, R.W. & BALLARD, F.J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. J. Lipid. Res., 9: 667-8, 1968.
- 62- HARRIS, J.B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. Pharmacol. Ther. 31: 79-102, 1985.
- 63- HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A.; MacDONELL, C.A. Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins In: EAKER, D. & ADSTROIN, T. eds. Natural toxins Oxford, Pergamon Press, 1980. p.569.
- 64- HEBERT, R.L. et al. apud BRAQUET, P. et al. Perspectives in platelet activating factor research. Pharmacol. Rev., 39(2):92-145, 1987.
- 65- HERRHOLZER, K. & WIEDERHOLT, M. Some aspects of distal tubular solute and water transport. Kidney Int., 9:198-213, 1976.
- 66- HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Mem. Inst. Butantan, 36: 109, 1972.
- 67- HOGUE-ANGELETTI, R.A. & BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor in snake venous In: LEE, C.Y. ed. Snake Venous. New York, Springer Verlag, 1979. Cap. 8, p. 276-94.
- 68- HOUSSAY, B.A. Classification des action des venins de serpents sur L'organisme animal. C.R. Soc. Biol. Paris, 105: 308, 1930.
- 69- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. Cap4, p 61-158.
- 70- JIMENEZ PORRAS, J.M. Biochemistry of snake venoms. (a review) Clin. Toxicol., 3:389-431, 1970.
- 71- KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms, In: LEE, C.Y. ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. cap 5, p. 159-212.

- 72- KLOBUSITZKY, D. Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. Am. J. Med. Sci. 242: 107, 1961.
- 73- KOCHIVA, E. & GANS, C. Salivary glands of snakes. Clin. Toxicol., 3: 363-87, 1970.
- 74- KORNECKI, E., EHRLICH, Y.H.; LENOX, R.H. Platelet-activating factor induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines, Science, 226: 1454-6, 1985.
- 75- KOUYOUMDJIAN, J.A. & KOUYOUMDJIAN, N.C.V. Acidentes ofídicos: Estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto. Arg. Curandi, 19(8): 55-92, 1986.
- 76- KOUYOUMDJIAN, J.A. & POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: Correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 31(2): 84-90, março-abril, 1989.
- 77- LEE, C.Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. Ann. Rev. Pharmacol., 12: 265- 86, 1972.
- 78- LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P.V. Nerve growth factor. Physiol. Rev., 48: 434-569. 1968.
- 79- LEVY, J.V. Calmodulin antagonists inhibit aggregation of human, guinea pig and rabbit platelets induced with platelet activating factor. FEBS. Lett., 154: 262-4, 1983.
- 80- LIMA VERDE, J.S. Apontamentos de aulas. Fortaleza, Laboratório Regional de Ofiologia de Fortaleza (LAROF), 1987.
- 81- \_\_\_\_\_. Fisiologia e etiologia de algumas serpentes da Chapada do Apodi, Estado do Ceará e Rio Grande do Norte. Adrenalectomia e glicemia de LYGOPHIS, LINEATUS, DILEPIS cope, 1862 1972. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo p.104.
- 82- LITTLE. J.R. & COHEN, J.J. Effect of albumin concentration on function of isolated perfused rat kidney. Am. J. Physiol., 226(3) : 512- 7, 1974.
- 83- LOPEZ, M. et al. Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. Rev. Ass. Med. Minas Gerais, 23: 107-12, 1972.

- 84- MAACK, T. Physiological evaluation of the isolated perfused rat Kidney Am. J. Physiol., 238: 71-8, 1980.
- 85- MAC CLURE, E. Glomerulonefrite aguda difusa, conseqüente a envenenamento por cobra (*Bothrops jararacussu*) Bol. Secret. Saúde Ass., 1: 35-49, 1935.
- 86- Mc MANUS, L.M., et al. Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphoryl choline (AGEPC), a synthetic platelet-activating factor (PAF) in the rabbit. J. Immunol. 124:2919-2924, 1980.
- 87- MAGALHAES, O. Hemiplegias orgânicas provocadas pelos venenos Ophídico e Escorpiónico Rev. Médico- Cirúrgica Brasil 43: 113-8, 1935.
- 88- MALLORY, F.B. et al. apud AMORIM, M. F.; FRANCO, R. M.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Mem. Inst. Butantan, 23: 63-408, 1951.
- 89- MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA, M.T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes Toxicon, 26(4):379-85, 1988.
- 90- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAI, Y. eds. Animal, plant and microbial toxins. London, Plenum press, 1976. v1, p.111.
- 91- MATLIN, R.A. & GARY, N.E. Acute cortical Necrosis. Am. J. Med. 56: 110-8, 1974.
- 92- MEBS, D. Chemistry of animal venoms, poisons and toxins. Experientia, 29: 1328-34, 1973.
- 93- \_\_\_\_\_. Preliminary studies on small molecular toxic components of Elapid venoms. Toxicon, 6: 247-53, 1969.
- 94- MELDRUM, B.S. The actions of snake venoms on nerve and muscle. The pharmacology of phospholipase A and polypeptide toxins. Pharmacol. Rev., 17:393-445, 1965.
- 95- MITCHELL, S.W. & REICHERT, E.T. apud NOGUCHI, H. Snake venoms an

investigation of venomous snakes with special reference to the phenomenon of their venoms. Washington, Carnegie Institute of Washington, 1909.

- 96- MORAES, M .E. A. Perfusão de rim isolado de coelho: Estudo comparativo de aminoglicosídeos, 1984. Tese (mestrado) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.
- 97- MOREIRA LIMA., A.A. Estudos dos efeitos das toxinas da cólera e E. Coli no rim isolado de mamífero, 1983. Tese (mestrado) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.
- 98- MUDGE,G.H. & WEINER, I.M. Drogas que afetam a função renal e o metabolismo eletrolítico In: GOODMAN & GILMAN. As Bases farmacológicas da terapêutica 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. cap.35, pag. 575-9.
- 99- NISHITSUTJI-UWO, J.M.; ROSS, B.D.; KREBS, H.A. Metabolit activities of the isolated perfused rat Kidney. Biochem. J., 103: 852-62, 1967.
- 100-NIZET, A. The isolated perfused Kidney: possibilities, limitations and results. Kidney Int., 7: 1-11, 1975.
- 101-NOGUCHI, H. Snake venoms - an investigation of venoms snakes with special reference to the phenomenon of their venoms. Washington, Carnegie Institute of Washington, 1909.
- 102-NORTHOVER, A.M. Action of histamine on endothelial cells of guinea-pig isolated hepatic portal vein and its modification by indomethacin or removal of calcium. Br. J. Exp. Pathol., 56: 52-61, 1975.
- 103-NORTHOVER, B.J. The effects of indomethacin on calcium, sodium, potassium and magnesium fluxes in various tissues of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol., 45: 651-9, 1972.
- 104-\_\_\_\_\_. Indomethacin a calcium antagonist. Gen. Pharmacol.,8: 293-6, 1977.
- 105-O' FLAHERTY, J.T.et al. A novel clase of neutrophil stimulants. Am. J. Pathol. 103: 70-9, 1981.
- 106-OHSAKA, A.Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y.ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. cap. 14, p 480-546.

- 107-OHSAKA, A.; JUST, M.; HABERMANN, E. Action of the snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. Biochim. Biophys. Acta., 323: 415-28, 1973.
- 108-ORAM, S. et al. Renal cortical calcification after snake bite. Br. Med. J., 1: 1647-8, 1963.
- 109-PEARCE, R.M. An experimental glomerular lesion by venom (*Crotalus adamateus*) J. Exp. Med., 11: 532-40, 1909.
- 110-PEGG, D.E. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. Cryobiology, 8: 431-40, 1971.
- 111-PEIRIS, O.A.; WIMALARATNE, K.D.P.; NIMALASURIYA, A. Exchange transfusion in the treatment of Russel's viper bite. Postgrad. Med. J., 45: 627-9, 1969.
- 112-PERPER, R.J. & ORONSKY, A.L. Enzyme release from human leukocytes and degradation of cartilage matrix. Effect of antirheumatic drugs. Arthritis Rheum., 17: 47-55, 1974.
- 113-PIROTZKY, E. et al. Biosynthesis of platelet -activating factor VI. Precursor of platelet-activating factor and acetyl transferase activity in isolated rat kidney cells. Lab. Invest., 51: 567-72, 1984.
- 114-PIROTZKY, E. et al. Involvement of platelet -activating factor in renal processes. 1989. mimeografado.
- 115-PIROTZKY, E. et al. Vascular permeability induced by PAF-acether (platelet-activating factor) in the isolated perfused rat kidney. Agents Actions, 16: 1-2, 1985.
- 116-PITTS, R.F. Metabolism of aminoacids by the perfused rat kidney. Am. J. Physiol., 220(4): 862-7, 1971.
- 117-QUEIROZ, L.S. et al. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon., 23: 341, 1985.
- 118-RAAB, W. & KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venom. Mem. Inst. Butantan, 33: 1017-20, 1966.

- 119-RAUDONAT, H.W. & ROCHA E SILVA, M. apud IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. Cap.4, p.61-158.
- 120-REZENDE, N.A. et al. Functional and histopathological renal changes induced in rats by Bothrops jararaca venom. Braz. J. Biol. Res., 22: 407-16, 1989.
- 121-ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. Instituto Biológico, São Paulo, Brazil. Am. J. Physiol., 156(2):261-73, 1949.
- 122-ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E.; DEULOFEU, V. eds. Venoms animals and their venoms. New York, Academic Press, 1968. v.2, p.345.
- 123-ROSS, B.D. The isolated perfused rat kidney. Clin. Sci. Mol. Med., 55: 13-21, 1978.
- 124-ROSS, B.D.; EPSTEIN, F.H.; LEAF, A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. Am. J. Physiol., 225(5):1165-71, 1973.
- 125-ROTHSCHILD, A.M. & ROTHSCCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms In: LEE, C.Y. ed. Snake Venoms. New York, Springer Verlag, 1979. cap16, p 591-620.
- 126-ROTTER, W. apud AMORIM, M.F.; FRANCO, R.M.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Mem. Inst. Butantan, 23: 63-108, 1951.
- 127-RUDDY, S.; GIGLO, I.; AUSTEN, K.F. The complement system in man. Part IV N. Engl. J. Med., 287: 642-6, 1972.
- 128-SANT, S.M. & PURANDARE, N.M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to renal lesions. J. Postgrad. Med., 18: 181-8, 1972.
- 129-SARKAR, N.K. & DEVI, A. Enzymes in snake venoms. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E., DEULOFEU, V. eds. Venomoms animals and their venoms. New York Academic Press, 1968. v.1, p.167-216.
- 130-SCHENBERG, S. et al. Unparallel regeneration of snake venom components in



- successive milkings. Toxicol. 8: 152, 1970.
- 131-SCHUREK, H.J. Application of the isolated perfused rat kidney. Contrib. Nephrol. 19: 176-90, 1980.
- 132-SCHUREK, H.J. & ALT, J. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. Am. J. Physiol. 240(9): 569-76, 1981.
- 133-SCHUREK, H.J.; LOHFERT, H.; HIERHOLZER, K. Na<sup>+</sup> reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na<sup>+</sup>-load) Pflugers Arch. Ges. Physiol. 319: 1285, 1970.
- 134-SCHUREK, H.J. et al. Albumin filtration and effective pressure in nephrons in the isolated perfused rat kidney In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NEPHROLOGY, 7<sup>e</sup>, Montreal, 1978. Proceedings...
- 135-SEEDAT, Y.K.; REDDY, J.; EDINGTON, D.A. Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. Nephron, 13: 455-63, 1974.
- 136-SELKURT, E.E. Função renal In: FISILOGIA 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1986. cap. 22, p. 387-422.
- 137-SITPRIJA, V. & BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. In: LEE, C.Y. ed. Snake Venoms. New York, Springer-Verlag, 1979. p. 997-1018.
- 138-SLOTTA, K. Chemistry and biochemistry of snake venoms. Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 12: 406-65, 1955.
- 139-SMITH, R.J. Modulation of phagocytosis by and lysosomal secretion from guinea-pig neutrophils: effect of non-steroidal anti-inflammatory agents and prostaglandins. J. Pharmac. Exp. Ther. 200: 647-57, 1977.
- 140-SORRENTINO, L.; CAPASSO, F.; DIROSA, M. Indomethacin and prostaglandins. Eur. J. Pharmacol. 17: 306-8, 1972.
- 141-SOTO, J.G.; PEREZ, J.C.; MINTON, S.A. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. Toxicol 26(9): 875-82, 1988.
- 142-STEINBECK, A.W. Nephrotic syndrome developing after snake bite. Med. J. Aust. 1: 543-5, 1960.

- 143-TAUBE, H.N. & ESSEX, H.W. Pathologic changes in the tissues of the dog following injections of rattlesnake Venom. Arch. Pathol., 24: 43-51, 1937.
- 144-TOUQUI, L. et al. The role of calcium in regulating the catabolism of PAF-acether (1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) by rabbit platelet. Biochem. J., 241: 555-60, 1987.
- 145-TRIMBLE, M.E. & BOWMAN, R.H. Renal Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport: effects of glucose, palmitate and alfa-bromopalmitate. Am. J. Physiol., 225 (5): 1057-62, 1973.
- 146-TU, A.T. Neurotoxins of animal venoms: snakes. Ann. Rev. Biochem., 42: 235-58, 1973.
- 147-UNDERWOOD, G. Classification and distributions of venomous snakes in the world. In: LEE, C.Y ed. Snake Venous. New York, Springer Verlag, 1979. cap 2 p.15-40.
- 148-VARAGUNAM, T. & PANABOKKE, R.G. Bilateral cortical necrosis of the kidney following snake bite. Postgrad. Med. J., 46: 449-51, 1970.
- 149-VARGAFTIG, B.B & BRAQUET, P.G. PAF-acether today relevance for acute experimental anaphylaxis Br. Med. Bull 41(2): 312-35, 1987.
- 150-VARGAFTIG, B.B. & DAO, N. Mode d'action et antagonisme de la substance a contraction differée C<sup>"</sup> liberée per lo phospholipase A, a partir du jaune d'oeuf. J. Pharmacol. 2, 287-304, 1971b.
- 151-VARGAFTIG, B.B; BIIARGAVA, N.; BONTA, I.L. Hemorrhagic and permeability increasing effects of Bothrops jararaca and other crotalidae venoms as related to amine or kin in release Agents Actions 413, 163-8, 1974.
- 152-VASSALI, P.& McCLUSKEY, R.T. The coagulation process and glomerular disease. Am. J. Med., 39, 179-82, 1965.
- 153-VITAL BRAZIL apud VITAL BRAZIL, O. History of the primordia of snake bite accident serotherapy. Mem. Inst. Butantan, 49(1): 7-20, 1987.
- 154-VITAL BRAZIL. A defesa contra o ofidismo. São Paulo, Pocai e Weiss, 1911.
- 155-VITAL BRAZIL, O. History of the primordia of snake bite accident serotherapy. Mem. Inst. Butantan, 49(1): 7-20, 1987.

- 156-\_\_\_\_\_. Neurotoxins from the South American rattlesnake venoms. J. Formosan Med. Ass., 71: 394, 1972.
- 157-\_\_\_\_\_. Peçonhas. In: CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. cap 71, p.1044-74.
- 158-VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCH, J.P.; WAISBICH, E. Pharmacology of crystalline crotoxin I. toxicity. Mem. Inst. Butantan, 33: 973, 1966.
- 159-VOGT, W. et al. Alternative pathway for the activation of complement in human serum. Formation and composition of the complex with Cobra venom factor that cleaves the third component of complement. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355: 171-83, 1974.
- 160-WEISMAN, S.M.; FELSEN, D.; VANGHAN, E.D. platelet-activating factor is a potent stimulus for renal prostaglandin synthesis: possible significance in unilateral ureteral ligation. J. Pharmacol. Exp. Ther., 235: 10-5, 1985.
- 161-WEISS, C.; PASSOW, H.; ROTSTEIN, A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. Am. J. Physiol., 196(5): 1115-8, 1959.
- 162-WELSH, J. H. Serotonin and related tryptamine derivatives in snake venoms. Mem. Inst. Butantan, 33:509-18, 1966.
- 163-WHATLEY, R.E. et al. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. J. Biol. Chem. 264(11):6325-33, 1989.
- 164-WILLOUGHBY, D.A. & DIROSA, M. A unifying concept for inflammation: a new appraisal of some old mediators. In: FORSCHER, B. ed. Immunopathology of inflammation. Amsterdam, Excerpta médica, 1971. P. 28-38.
- 165-YAUNG, C.C.; CHANG, C.C.; LION, I.F. Studies on the status of arginine residues in cobrotoxin. Biochim. Biophys. Acta, 365: 1-14, 1974.
- 166-ZLOTKIN, E. Chemistry of animal venoms. Experientia, 29:1453-66, 1973.