

PATRÍCIA ALINE BOER-LIMA

ALTERAÇÕES FUNCIONAIS,
HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS
RENAIS CAUSADAS PELO VENENO BRUTO DE
Bothrops moojeni (CAIÇACA) EM RATOS
WISTAR.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Patricia Aline Boer-Lima
e aprovada pela Comissão Julgadora.

26/05/98, Paulo Cesar Hoffener

UNICAMP
1998

9816387

B633a
34711/BC

PATRÍCIA ALINE BOER-LIMA



ALTERAÇÕES FUNCIONAIS,
HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAS
RENAIS CAUSADAS PELO VENENO BRUTO DE
Bothrops moojeni (CAIÇACA) EM RATOS
WISTAR.

*Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biológicas-Área
de Biologia Celular.*

*Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling
Colaborador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo*

UNICAMP
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
Título	Unicamp
B633a	
V. Et.	
TOMBO	40/34711
PROC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
N.º CPD	

CM-00115426-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Boer-Lima, Patrícia Aline

B633a Alterações funcionais, histopatológicas e ultraestruturais renais causadas pelo veneno bruto de *Bothrops moojeni* (Caiçaca) em ratos wistar/ Patrícia Aline Boer-Lima. -- Campinas, SP: [s.n.],1998.
118f.: ilus.

Orientadora: Maria Alice da Cruz-Höfling

Co-orientador: José Antônio Rocha Gontijo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

✕ 1. Rim. 2. Veneno. 3. Ultraestrutura (Biologia). I. Cruz-Höfling,
Maria Alice. II. Gontijo, José Antônio Rocha. III. Universidade Estadual
de Campinas.Instituto de Biologia. IV. Título.

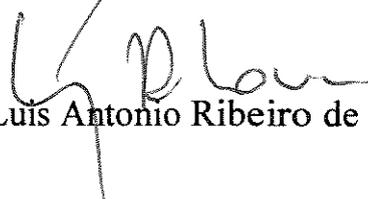
Defesa pública: Campinas 26 de maio de 1998

Banca Examinadora

Titulares:


Prof. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling


Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann


Prof. Dr. Luis Antonio Ribeiro de Moura

Suplente:

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



A Deus

A família

A nossa
respeito
carreira pro

Aos funcionários dos Departamentos de Histologia e Embriologia e de Biologia Celular.

A Gustavo Henrique da Silva pelo auxílio constante na parte técnica da tese.

Aos amigos, funcionários e professores do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela solicitude e apoio.

A Adriana Zaparolli pela contribuição nas dozações e a Dona Neide pelo carinho.

Ao Dr. Elliot W. Kitajima por permitir a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao meu filho Gabriel pelo carinho, respeito e altruísmo.

A minha irmã Sibeles por estar por perto nos momentos que mais precisei.

Aos animais que foram sacrificados para a realização desta pesquisa.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para o andamento deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

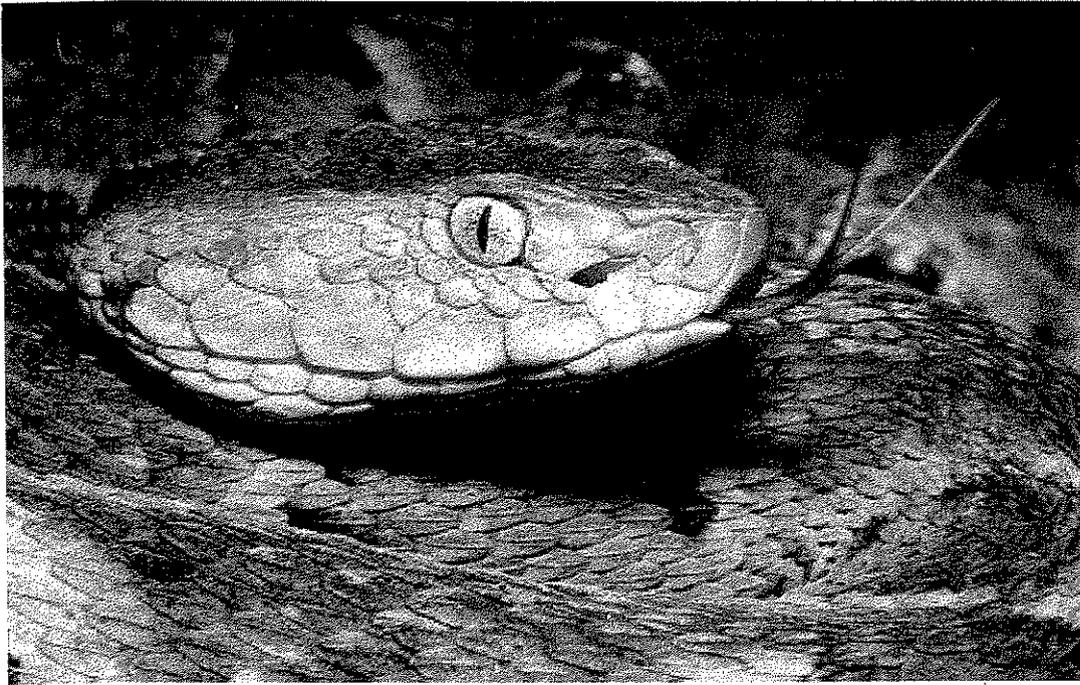
RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características das serpentes venenosas brasileiras	3
1.2. Dados epidemiológicos	7
1.3. Composição química e atividades biológicas dos venenos botrópicos	8
1.3.1. Características do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	12
1.4. Manifestações clínicas após envenenamento por serpentes	13
1.4.1. Insuficiência Renal Aguda após envenenamento ofídico	14
1.5. Alterações celulares envolvidas na IRA	20
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Aninais e veneno	26
3.2. Teste da função renal	26
3.3. Determinações bioquímicas	28
3.4. Cálculos e análise estatística	28
3.5. Medida da pressão arterial	29
3.6. Processamento para microscopia de luz	29
3.7. Processamento para microscopia eletrônica	31
3.7.1. Microscopia eletrônica de transmissão	31
3.7.2. Microscopia eletrônica de varredura	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Avaliação funcional através do clearance de creatinina e de lítio	35

4.2. Pressão arterial	43
4.3. Avaliação das alterações morfológicas	44
4.3.1. Análise histológica	44
4.3.2. Análise ultraestrutural	70
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES	104
7. ABSTRACT	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

RESUMO

Acidentes ofídicos em países tropicais são freqüentes e constituem um importante problema de Saúde Pública no Brasil. Dentre as manifestações sistêmicas após o envenenamento botrópico e crotálico destaca-se a insuficiência renal aguda, sendo esta a principal causa de morte. Interposto ao meio interno e externo e responsável pela homeostase, o rim, de uma forma geral, bem como os epitélios que constituem os vários segmentos do nefron, respondem à diversas situações sistêmicas de agressão incluindo o envenenamento ofídico. O objetivo deste estudo foi investigar as lesões morfológicas e funcionais renais provocadas pelo veneno bruto de *Bothrops moojeni*. Após 5, 16 e 48 horas da inoculação endovenosa de 0,4 μ g e 5 hs após a inoculação de 0,2 μ g/g do veneno, foram realizados estudos funcionais estimando a filtração glomerular e a manipulação tubular de sódio através do clearance de creatinina e clearance de lítio, e morfológicos através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura. Os resultados fisiológicos e morfológicos demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* causa uma série de alterações tubulares renais precoces, incluindo necrose tubular aguda (NTA). Estas alterações foram acompanhadas por modificações significativas na filtração glomerular, e importantes alterações morfológicas dos corpúsculos renais. Não foram encontradas modificações significativas da pressão arterial sistêmica, nem tampouco microcoágulos de fibrina nos capilares glomerulares e peritubulares. Nossos resultados sugerem importante papel à ação nefrotóxica direta do veneno como fator patogênico.



1. INTRODUÇÃO

Os países tropicais são conhecidos pela grande riqueza faunística que possuem, e desta forma, é proporcionalmente grande a ocorrência de serpentes sendo muitas delas peçonhentas. Conseqüentemente esta alta ocorrência repete-se no que diz respeito aos acidentes ofídicos, principalmente na zona rural e, estudos que enfoquem esta questão são de grande interesse. No sentido de entender tanto a constituição destes venenos quanto os mecanismos de ação e conseqüente quadro clínico, têm sido feitas investigações envolvendo profissionais de várias áreas do conhecimento como farmacologistas, bioquímicos, fisiologistas, patologistas, histologistas e biólogos celulares.

Os venenos ofídicos são constituídos por uma série de componentes que produzem efeitos deletérios no organismo animal, quer indiretamente, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, quer diretamente através de ações nas membranas celulares.

Dentre as conseqüências do envenenamento provocado por serpentes de grande importância epidemiológica no Brasil, destacam-se as alterações renais pois a insuficiência renal aguda (IRA) é considerada a primeira causa de morte após acidentes com estes ofídios. Interposto ao meio interno e externo e responsável pela homeostase, o rim de uma forma geral, bem como os epitélios que constituem os vários segmentos do néfron, respondem a agressões sistêmicas incluindo o envenenamento ofídico. O exato mecanismo pelo qual o veneno botrópico produz necrose tubular aguda permanece desconhecido. Assim, modelos experimentais que contribuam para a elucidação dos mecanismos nefrotóxicos e o grau de comprometimento renal são de alta relevância.

O gênero *Bothrops* compreende várias espécies de serpentes distribuídas na América, a partir do México até a Argentina (Hoge &

Romano-Hoge, 1972). Os integrantes deste gênero, como veremos, são responsáveis pela grande maioria de acidentes no Brasil. Neste trabalho nós utilizamos o veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* e nossa escolha está respaldada pelos seguintes aspectos:

- Os acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* têm grande importância em termos de Saúde Pública.
- O veneno de *Bothrops moojeni* possui uma alta atividade proteolítica associada com uma baixa ação hemorrágica. Este veneno também tem alta atividade coagulante e de fosfolipase A₂ (Assakura *et al.*, 1985; Reichl *et al.*, 1989; Furtado *et al.*, 1991).
- Existem poucos trabalhos na literatura que enfoquem a ação nefrotóxica direta das peçonhas de serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*.
- O conhecimento das alterações morfofuncionais renais causadas por tal peçonha, poderá contribuir para o esclarecimento do quadro clínico desencadeado pelo envenenamento.
- O conhecimento dos eventos celulares envolvidos em processos nefrotóxicos, após o envenenamento botrópico poderá constituir-se em ferramenta valiosa para a avaliação clínica e abordagem terapêutica.

1.1—CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES VENENOSAS BRASILEIRAS

No mundo todo existem, aproximadamente, 2.500 espécies de serpentes. Destas, 250 são conhecidas no Brasil, das quais 70 são peçonhentas e pertencentes a dois grupos. Um constituído pelos Elapídeos (corais verdadeiras) e outro, pelos que nos interessam neste trabalho, os Crotalídeos. As serpentes pertencentes ao grupo dos Crotalídeos apresentam as seguintes características: 1) fosseta loreal, 2) cabeça triangular recoberta com escamas

pequenas, 3) dentes inoculadores de veneno, grandes, ponteagudos, móveis e ocos, situados na frente da boca, 4) parte superior do corpo recoberta por escamas sem brilho, em forma de quilha, e 5) caudas diferenciadas para cada gênero que constitui este grupo, ou seja, cauda lisa, com guizo ou chocalho e cauda com escamas arrepiadas no final (Ministério da Saúde, 1991).

Os Crotalídeos pertencem à família Viperidae, subfamília Crotalinae. As serpentes pertencentes à família Viperidae possuem o mais desenvolvido mecanismo para injeção de veneno sendo classificadas, quanto à posição e estrutura dos dentes, como solenóglifas. Estas possuem presas anteriores bastante desenvolvidas e de grande mobilidade, com um canal central que se comunica pela base com o ducto excretor da glândula de veneno (Goin & Goin, 1971). Por este motivo, a forma de inoculação do veneno em suas vítimas é extremamente eficiente em termos de velocidade e quantidade de veneno injetado. As articulações frouxas entre os ossos da cabeça destas serpentes e a extrema mobilidade dos mesmos, devido a músculos cranianos apropriados, possibilitam o direcionamento das presas para frente, em posição de ataque, permitindo que a serpente possa ferir e injetar o veneno enquanto sua boca permanece aberta formando um ângulo de aproximadamente 90 graus. Ao mesmo tempo, durante a projeção da presa, a bainha retrai para cima aderindo fortemente à base, colocando o ducto da glândula de veneno em justaposição com a abertura superior da presa. Um sistema do tipo seringa é assim formado, o qual, junto com as longas presas, permite uma penetração profunda e a eficiente injeção do veneno (*cf.* Kochva, 1987). Estas características morfológicas e fisiológicas do gênero, contribuem para a grande incidência de acidentes, bem como para a gravidade dos sintomas clínicos, além da larga distribuição geográfica, reflexo do bem sucedido aprimoramento do aparato para aquisição de alimento.

Os representantes da subfamília Crotalinae distribuem-se em três gêneros: *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*.

O gênero *Lachesis* é constituído pelas surucucus, que são as maiores serpentes peçonhentas da América do Sul. São encontradas na Floresta Amazônica e Mata Atlântica e o número de acidentes provocados por elas no Brasil chega a quase 3%.

O gênero *Crotalus* é constituído pelas cascavéis, que possuem guizo ou chocalho na ponta da cauda. Com exceção da Floresta Amazônica, Mata Atlântica e regiões litorâneas, as cascavéis são encontradas no restante do país e são responsáveis por 8% dos acidentes ofídicos.

O gênero *Bothrops* é constituído pelas jararacas, que possuem cauda lisa. Este gênero é composto por mais de 30 variedades de serpentes que apresentam cores e desenhos diferentes pelo corpo, indo do verde ao negro. Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de ração), em zonas rurais. Possuem hábito noturno e são consideradas as mais agressivas. Quando se sentem ameaçadas, atacam em silêncio. Estas serpentes estão distribuídas em todo território Nacional (Ministério da Saúde, 1991; Barraviera & Pereira, 1994).

A espécie *Bothrops moojeni* que foi descrita por Hoge (1965), e cujo veneno foi utilizado neste trabalho, recebeu este nome em homenagem ao pesquisador mineiro João Moojen, que realizou diversos estudos com animais na região de Brasília. Esta é uma espécie típica do Distrito Federal e é a maior serpente peçonhenta do Planalto Central (Sebben *et al.*, 1996).

Esta serpente é conhecida popularmente como caiçaca ou jararacão, é de porte médio sendo que indivíduos grandes podem ultrapassar um metro e

meio de comprimento. Sua pele é de aspecto marrom aveludado com desenhos bem nítidos, e seu comportamento é agressivo, podendo dar botes sucessivos projetando praticamente todo o corpo, o que dificulta sua captura com o laço ou gancho. É uma espécie de hábito terrestre, vivendo em áreas abertas de regiões mais quentes e secas, sendo encontrada em parte do Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil. A incidência dos acidentes causados por estas serpentes vem aumentando por toda região Centro Oeste. Pelo fato de dominarem as regiões onde habitam, possivelmente a médio prazo, o número de acidentes crescerá muito em tais regiões (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993; Barraviera & Pereira, 1994).



Figura 1- *Bothrops moojeni*. Foto tirada em Brasília DF, pelo Dr. Ivan Sazima.

1.2 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os acidentes ofídicos constituem um sério problema de Saúde Pública em países tropicais. Ribeiro (1991), em estudo de acidentes provocados por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, verificou que os acidentes predominam nos meses de outubro a abril (época chuvosa) e no período diurno, sobretudo durante a tarde, sendo a maioria das vítimas do sexo masculino e com idade entre 5 e 50 anos. A ocupação mais relacionada aos acidentes é a de lavrador e a maioria das vítimas se encontram com as extremidades inferiores desprotegidas no momento da picada. As regiões anatômicas mais freqüentemente picadas são os pés, as mãos e as pernas.

Das 70 espécies de serpentes venenosas e (ou) peçonhentas catalogadas no Brasil, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, sendo estas responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos (Kaiser & Michl, 1971; Amaral *et al.*, 1986; Barraviera & Pereira, 1994).

De janeiro de 1990 a dezembro de 1993, a taxa de acidentes, por gênero, que foram notificados ao Ministério da Saúde é a seguinte:

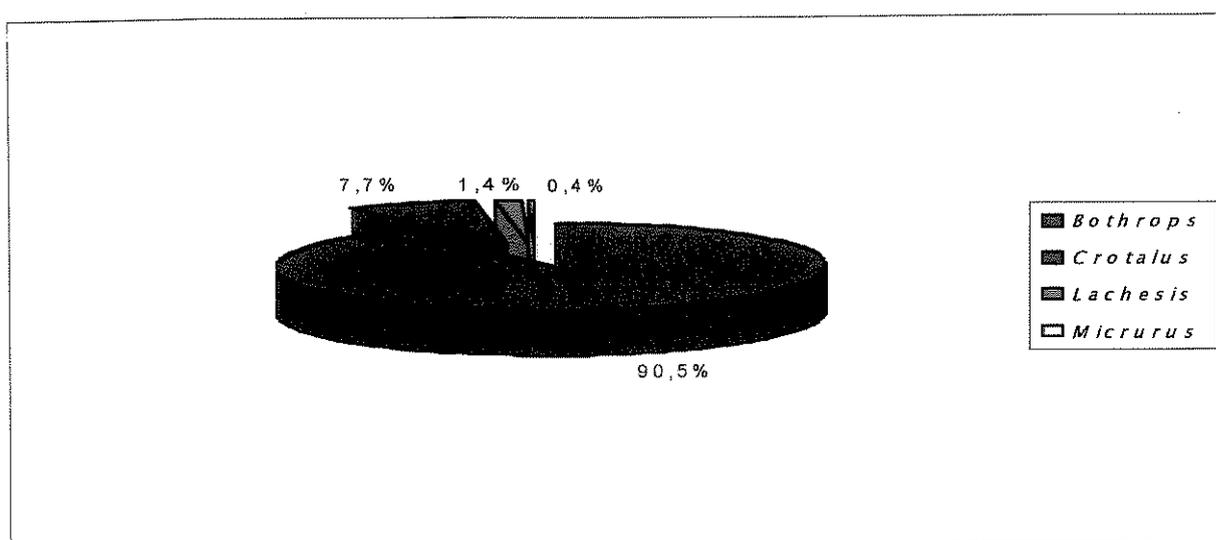


Figura 2- Acidentes ofídicos. FONTE: Ministério da Saúde, 1997.

Em 1989, foram notificados ao Ministério da Saúde 20.748 acidentes ofídicos. A maioria dos casos foi atribuída ao gênero *Bothrops*. Das 20 espécies reconhecidas, 4 são as mais freqüentemente responsáveis por acidentes humanos: *B. jararaca*, no Sudeste; *B. moojeni*, no Centro Oeste; *B. erithromelas*, no Nordeste e *B. atrox*, no Norte do Brasil (Cardoso, 1990).

1.3- COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS VENENOS BOTRÓPICOS

De uma forma geral, os venenos ofídicos são constituídos por uma mistura extremamente complexa de componentes protéicos (enzimáticos e não enzimáticos) e não protéicos (orgânicos e inorgânicos), com ações diversas, que podem ser sinérgicas ou mesmo antagônicas, o que torna difícil um tratamento eficaz no sentido de inibir os efeitos de todos estes componentes. Dentre as proteínas enzimáticas, as principais, presentes nos venenos ofídicos, são as enzimas proteolíticas e as fosfolipases (*cf.* Santo Neto, 1987).

O veneno das espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* tem efeito predominantemente proteolítico, coagulante e hemorrágico (Da Silva *et al.*, 1979; Amaral *et al.*, 1985; Rezende *et al.*, 1989; Furtado *et al.*, 1991; Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993).

A ação proteolítica é responsável pelo efeito necrótico, na região da picada, e pelo edema inflamatório (Rosenfeld, 1965; Jorge & Ribeiro, 1989) e decorre da presença de proteases, fosfolipases, hialuronidases e outras enzimas. As fosfolipases são uma família de enzimas que hidrolisam fosfolipídios gerando ácidos graxos livres, os quais têm propriedades detergentes tóxicas. No veneno, estas restringem-se quase que exclusivamente

às fosfolipases A₂ (PLA₂), que têm conjuntamente à função digestiva, uma extensa atividade biológica, incluindo neurotoxicidade, miotoxicidade, iniciação ou inibição de agregação plaquetária, efeito hemolítico, edematogênico, anticoagulante, convulsivante, hipotensor e cardiotoxico (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Kini & Evans, 1989).

Gutiérrez & Lomonte (1995) considerando o fato de algumas miotoxinas botrópicas afetarem, *in vitro*, muitos tipos celulares como neurônios, macrófagos e fibroblastos (Brusés *et al.*, 1993), além dos mioblastos de músculo esquelético, classificaram-nas mais como citotoxinas do que como miotoxinas. Estes autores estudaram o efeito de miotoxinas em células, lipossomos e músculo esquelético e sugerem o mecanismo de ação hipotético que se segue:

As miotoxinas ligam-se a um sítio imóvel, não identificado, na membrana plasmática das células. Este sítio pode ser uma proteína, um domínio fosfolipídico carregado negativamente ou outro tipo de componente de membrana. Em qualquer um destes casos, parece haver envolvimento de uma interação eletrostática entre sítios catiônicos das toxinas e grupos carregados negativamente na membrana. Após esta ligação inicial, as miotoxinas penetram a bicamada por uma interação hidrofóbica mediada por uma região citotóxica da molécula, a qual é diferente do sítio catalítico. É possível que nesta região combinem-se resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Adicionalmente, a acilação pode contribuir para a interação e penetração da toxina na membrana celular. Tal domínio tóxico hipotético poderia estar presente nas variantes enzimaticamente ativas ou inativas. É muito provável que a presença de resíduos hidrofóbicos flanqueados por resíduos catiônicos, constitua um esboço molecular comum para a região citolítica nas miotoxinas. A penetração desta região no core hidrofóbico da bicamada lipídica seria responsável pela desestabilização da membrana, com

conseqüente diminuição na regulação da permeabilidade a íons e macromoléculas. A penetração na membrana requer, provavelmente, uma membrana fluida, porque a miotoxina perde a ação citotóxica à 4^oC. Paralelamente a esta perturbação inicial da membrana, variantes enzimaticamente ativas induzem danos adicionais à membrana por hidrolizarem fosfolipídios da bicamada, um efeito não observado em miotoxinas cujo resíduo Lys-49 é enzimaticamente inativo. O desencadeamento de um influxo proeminente de cálcio seria provavelmente a conseqüência mais relevante de distúrbios na membrana, sendo responsável pelo começo de uma variedade de mecanismos desestabilizadores tais como alterações no citoesqueleto, dano mitocondrial e ativação de proteases e fosfolipases cálcio dependentes as quais, por sua vez, causam danos celulares adicionais, que em conjunto seriam as responsáveis pelos efeitos degenerativos fisiopatológicos observados.

Por outro lado, algumas dessas enzimas proteolíticas produzem hemorragia, sendo por isso chamadas de hemorraginas ou fatores hemorrágicos. Existem também fatores hemorrágicos desprovidos da atividade proteolítica. A maioria das enzimas proteolíticas, apresenta grande quantidade de carboidratos e íons cálcio ou zinco, como integrantes de sua molécula, os quais desempenham importante papel na ação enzimática. Por isso são chamadas também de metaloproteases (*cf.* Santo Neto, 1987).

A ação hemorrágica leva ao extravasamento do sangue dos capilares para o interstício na região da picada (Rosenfeld, 1965; Ohsaka, 1973).

A ação de algumas hemorraginas foi estudado por Ownby (1990) e detectado por Cruz-Höfling *et al.* (1992) com o veneno de *B. insularis*, ambos em músculo esquelético, que verificaram que a passagem de eritrócitos pelo endotélio pode ocorrer por diapedese, quando os eritrócitos passam através

das junções intercelulares das células endoteliais ou por “rhexis”, quando os eritrócitos passam através de grandes fendas nas células endoteliais causadas por degeneração e ruptura da parede endotelial, sendo que as junções intercelulares permanecem intactas.

Além disso, Araki *et al.* (1993), descreveram evidências de indução de apoptose em cultura de células endoteliais após a incubação com veneno bruto de serpentes os quais apresentam ação hemorrágica. Além da ação nas células endoteliais, Baramova *et al.* (1989), demonstraram a habilidade de hemorraginas crotálicas em degradar proteoliticamente, *in vitro*, componentes da lâmina basal e da matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, entactina, nidogênio e outros tipos de colágenos.

Já o efeito coagulante observado nos venenos botrópicos, é devido, fundamentalmente, a proteases que atuam em pontos específicos da cascata de coagulação. A maioria dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* possui, isolada ou simultaneamente, ação sobre o fibrinogênio, a protrombina, o fator X e as plaquetas, resultando em alterações na coagulação sanguínea. Nesses casos, o tempo de coagulação do sangue total pode estar prolongado e o sangue parcialmente coagulável ou incoagulável. Essas alterações são decorrentes do consumo dos fatores da coagulação, notadamente do fibrinogênio, havendo formação de microcoágulos de fibrina que são depositados em capilares e arteríolas, os quais são, posteriormente, removidos pelo sistema fibrinolítico. A ação direta do veneno botrópico sobre o fibrinogênio é chamada de atividade “thrombin-like” (Kamiguti & Cardoso, 1989; Kamiguti *et al.*, 1991; Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993).

Os componentes não protéicos dos venenos botrópicos são pouco expressivos em quantidade e menos ativos biologicamente porém, como já

citado, desempenham importante papel coadjuvante na ação enzimática (cf. Santo-Neto, 1987).

1.3.1 – CARACTERÍSTICAS DO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Brazil & Vellard (1928), consideraram o veneno de *B. moojeni* (na época descrita como *Lachesis atrox*) como o de ação proteolítica mais intensa entre os botrópicos. Além disso, foi considerado o de maior atividade coagulante entre as espécies brasileiras até então estudadas.

Vellard & Viana (1931), ao pesquisarem as alterações sangüíneas provocadas *in vivo* pelo veneno de *B. moojeni*, determinaram que a forte ação coagulante era devida à rápida destruição do fibrinogênio. Eagle (1937), mostrou que este veneno age sobre o fibrinogênio e o sangue de maneira semelhante à trombina.

Mais recentemente Assakura *et al.* (1985) verificaram que o veneno de *B. moojeni* tem baixa atividade hemorrágica comparada a dos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi*. A atividade proteolítica deste veneno é duas vezes maior que a dos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, embora a ação hemorrágica seja dez e duzentas vezes, respectivamente, menor que as destes venenos.

O veneno de *B. moojeni* possui uma alta atividade proteolítica associada a uma baixa ação hemorrágica. Este veneno também tem alta atividade coagulante e de fosfolipase A₂ (Reichl *et al.*, 1989; Furtado *et al.*, 1991).

1.4 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS APÓS ENVENENAMENTO POR SERPENTES

Os sintomas e a gravidade do envenenamento por serpentes, dependem dos seguintes fatores:

- O tamanho e idade da vítima.
- A natureza, localização, profundidade e número de picadas.
- A duração do tempo de injeção do veneno (durante a picada).
- O grau de irritação ou “preocupação” que motivou a serpente a dar o golpe.
- A quantidade de veneno injetado.
- A espécie e tamanho da serpente envolvida.
- A condição dos dentes inoculadores da serpente e de suas glândulas de veneno.
- Os patógenos presentes na boca da serpente.
- A sensibilidade da vítima ao veneno.
- A medida e espécie de tratamento de primeiros socorros e subsequente medicação.

Outros fatores influem no aparecimento de complicações após o acidente, como por exemplo o fato do veneno ser espécie-específico e não ser possível, na maioria dos casos, a identificação do animal que provocou o acidente. Desta forma um acidente com serpente pode variar em severidade, de leve a extremamente grave (Russell, 1979).

O acidente botrópico causa manifestações locais e sistêmicas que evoluem simultaneamente. As manifestações locais incluem edema e dor local, eritema, equimose, bolhas, cianose e necrose podendo haver complicações causadas por infecção caracterizada por celulite no sítio da picada (Rosenfeld, 1971; Amaral *et al.*, 1985; Jorge *et al.*, 1994).

Quanto às manifestações sistêmicas, a mais freqüente é a alteração no processo de coagulação sangüínea seguida por hemorragia. Outras manifestações são o choque e a insuficiência renal. O tratamento nestes pacientes é feito através da administração endovenosa do soro antibotrópico. Na fase aguda do envenenamento, além das medidas gerais de suporte e alívio da dor, deve ser dada atenção especial à hidratação do paciente, pois existe o risco da evolução do quadro clínico para IRA. A real incidência da IRA nos picados por *Bothrops* não está determinada, visto que somente pacientes que necessitam de tratamento dialítico têm sido notificados (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993).

1.4.1– INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA APÓS ENVENENAMENTO OFÍDICO

Dentre as alterações renais encontradas, principalmente, em pacientes envolvidos em acidentes com outros gêneros de serpente que não *Bothrops*, têm sido observadas: falência renal aguda (Seedat *et al.*, 1974; Sitprija *et al.*, 1974; Shastry *et al.*, 1977; Azevedo-Marques *et al.*, 1985), necrose tubular (Sitprija *et al.*, 1974; Chugh *et al.*, 1975; Shastry *et al.*, 1977; Aung-Khin, 1978; Da Silva *et al.*, 1979; Date & Shastry 1981; 1982; Ponraj & Gopalakrishnakone, 1997), calcificação do córtex renal (Oram *et al.*, 1963; Ponraj & Gopalakrishnakone, 1995), nefrite intersticial aguda (Sitprija *et al.*, 1982), congestão glomerular e glomerulonefrite proliferativa (Seedat *et al.*, 1974; Barnes, 1989; Barnes *et al.*, 1994).

A lesão renal mais freqüentemente encontrada é a necrose tubular, podendo ser provocada por isquemia e/ou ação nefrotóxica direta e/ou indireta. No que diz respeito às lesões glomerulares, têm sido observadas em pacientes picados por serpente glomerulonefrites e um quadro clínico

compatível a síndrome nefrótica. As características glomerulares descritas consistem essencialmente de proliferação das células endoteliais e mesangiais e deposição de fibrina e complexos imunes. Quanto às lesões vasculares, a alteração mais observada é arterite necrozante das artérias interlobulares, sendo esta lesão segmentar. Podem ocorrer lesões intersticiais severas com perda de hemoglobina no lúmen do túbulo contorcido distal e tubo coletor. Edema intersticial é uma característica constante, observada somente em casos com IRA, e é mais pronunciado na região cortical (Sitprija & Boonpucknavig, 1979). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a patogênese destas lesões, mas estes não estão esclarecidos.

No sentido de esclarecer esta questão, vários trabalhos têm sido feitos com o veneno da serpente *Vipera russelli*, que pertence à família Viperidae assim como o gênero *Bothrops*. Esta espécie, causa grande número de mortes, por IRA, em Burma e Sri Lanka, e em partes da Índia, Paquistão, Bangladesh e Tailândia (Sanguanrungririkui *et al.*, 1989; Ratcliffe *et al.*, 1989; Than-Than *et al.*, 1989; Soe-Soe *et al.*, 1990).

Segundo Than-Than *et al.* (1989), embora existam várias evidências histológicas da ação direta do veneno de *Vipera russelli* sobre os túbulos renais, não é possível determinar a causa da necrose tubular aguda utilizando apenas exames histológicos.

A evidência mais persuasiva da nefrotoxicidade direta deste veneno foi obtida por Ratcliffe *et al.* (1989), que trabalhando com rim isolado de rato, constataram alterações funcionais relacionadas à dose do veneno de *V. russelli* sobre o “clearance” de inulina e excreção de sódio. Estes autores sugerem que, devido à alta incidência de falência renal após o envenenamento por serpentes Sul Americanas do gênero *Bothrops*, estes venenos podem conter nefrotoxinas.

Soe-Soe *et al.* (1990), em estudo da ação nefrotóxica do veneno de *V. russelli* por microdissecção de rins de animais envenenados experimentalmente, e por experimentos *in vitro*, diferenciam a necrose tubular em dois tipos. O tipo nefrotóxico, é causado por ação direta das toxinas, produzindo destruição das células tubulares da parte proximal, sendo que a membrana basal se mantém preservada. Na nefrotoxicidade direta todos os túbulos proximais do rim seriam afetados igualmente. Ao contrário, no tipo isquêmico, produzido por isquemia renal de alguma causa, o dano tubular seria casual, todas as porções do túbulo, proximal ou distal de um mesmo néfron, seriam destruídas e ocorreria ruptura da membrana basal, porém nem todos os néfrons seriam afetados. Este conceito, entretanto, parece não ter base prática, uma vez que o teor de veneno/toxina que atingirá os túbulos dos 2.000 néfrons de cada rim do indivíduo por certo não será o mesmo, e portanto seria impossível que o grau de lesão fosse igual em todos eles.

Mais recentemente, Willinger *et al.* (1995), também com o objetivo de verificar a nefrotoxicidade direta do veneno de *Vipera russeli*, trabalharam com perfusão artificial de rim isolado assim como Ratcliffe *et al.* (1989). Estes fizeram uma análise morfológica das alterações em rim isolado. Além das alterações fisiológicas similares às encontradas por Ratcliffe *et al.* (1989), os autores encontraram alterações morfológicas caracterizadas por destruição do filtro glomerular, lise de paredes vasculares e vários graus de injúria epitelial em todos os segmentos tubulares. Além disso, os autores trabalharam com cultura de células mesangiais e epiteliais (LLC-PK₁ e MDCK) que foram expostas ao veneno (100 a 1000 µg/ml). Em células mesangiais o veneno induziu completa destruição em concentração de 200 µg/ml. Em células epiteliais somente doses extremamente altas levaram a danos microscopicamente discerníveis.

Em uma série de 400 pacientes picados por serpentes tropicais venenosas, Sitprija & Boonpucknavig (1979) observaram falência renal em 5% dos casos, proteinúria leve em 4%, e hematúria em 35%. Por esta razão consideraram necessário o estudo detalhado das alterações patológicas, da patogênese e manifestações do envolvimento renal em acidentes ofídicos. Na figura abaixo, é mostrada a patogênese das lesões renais sugerida por estes autores.

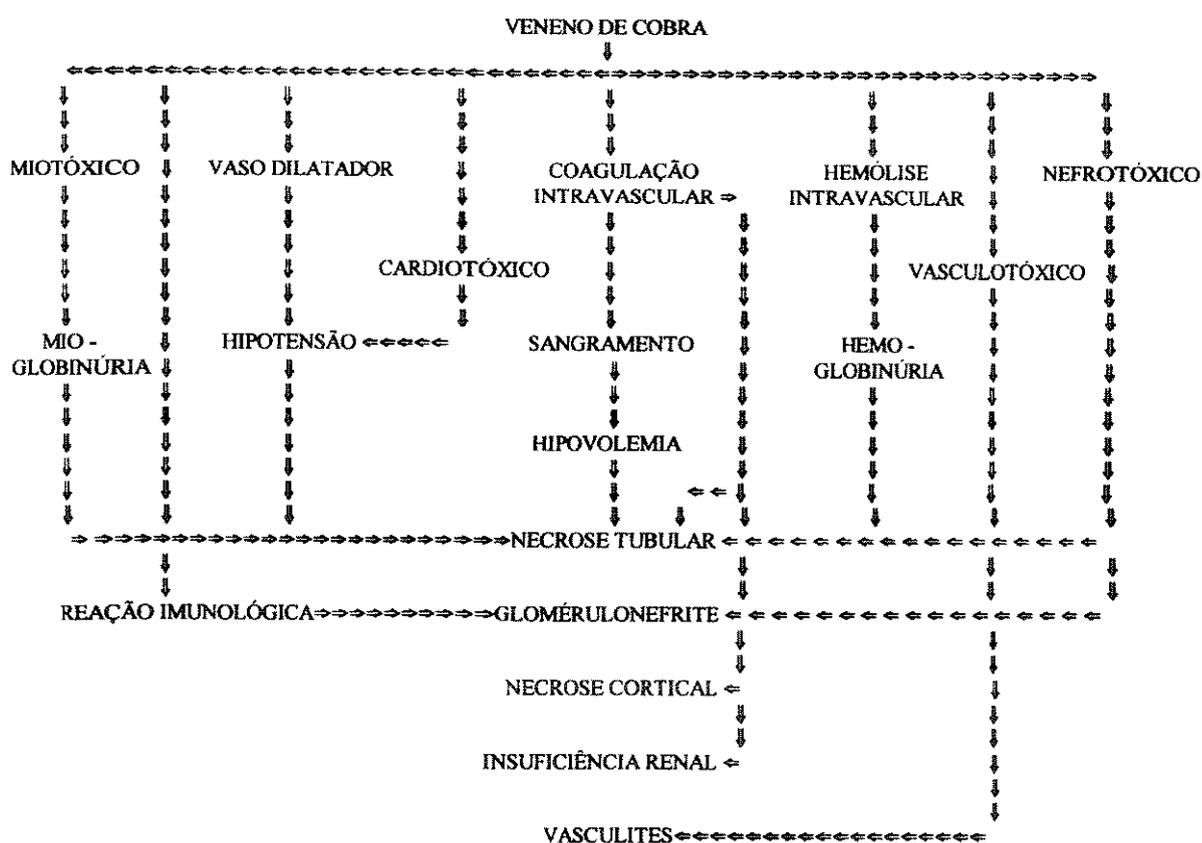


Figura 3- Patogênese das lesões renais sugerida por Sitprija & Boonpucknavig, 1979.

Com relação aos estudos das lesões renais causadas por venenos botrópicos, existem poucos dados na literatura, e estes referem-se a relatos das disfunções renais de pacientes acidentados (Azevedo & Teixeira, 1938; Da Silva *et al.*, 1979; Amaral *et al.*, 1985;1986; Barraviera & Pereira, 1994) ou a estudos experimentais que procuram, através de abordagens diferentes,

enfocar aspectos que contribuam para caracterizar as lesões renais e tentar elucidar qual(is) o(s) agente(s) desencadeante(s) das mesmas (Chaves *et al.*, 1989; Rezende *et al.*, 1989; Burdmann *et al.*, 1993; D'Abreu *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1996).

A IRA tem sido considerada a primeira causa de morte por envenenamento botrópico. Em uma descrição de 63 pacientes com IRA após acidente ofídico, 32 (51%) foram causados por *Bothrops* enquanto 31 (49%) foram causados por *Crotalus*. Do primeiro grupo 7 apresentaram necrose cortical renal (Amaral *et al.*, 1986).

A ação proteolítica do veneno decorrente da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas, somada à ação coagulante com formação e deposição de microtrombos na rede capilar, poderiam contribuir para desencadear a IRA (Amaral *et al.*, 1986; Chaves *et al.*, 1989; Barraviera & Pereira, 1994).

Da Silva *et al.* (1979), verificaram que em pacientes com falência renal aguda, provocada por veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, ocorreram alterações como necrose tubular, necrose cortical bilateral e insuficiência renal crônica. Estes autores, atribuíram estas alterações à ação nefrotóxica do veneno, hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada ou síndrome de defibrinação, hipotensão ou choque.

Chaves *et al.* (1989), em estudo das alterações renais provocadas pelo veneno de *B. asper* em camundongos, verificaram primeiro a ocorrência de congestão glomerular e depois de lesões tubulares e, sugeriram que estas foram provenientes da isquemia resultante da hemorragia e coagulação intravascular.

Rezende *et al.* (1989), estudaram as alterações renais, utilizando ratos injetados (i.p.) com veneno de *B. jararaca*, e a indução de falência renal aguda e lesões degenerativas das células epiteliais tubulares. Eles sugeriram que estas características eram provenientes, primeiro, das mudanças hemodinâmicas e isquemia renal, tendo estas importante papel na etiologia da patogênese das alterações renais histopatológicas e funcionais.

Burdmann *et al.* (1993), estabeleceram um modelo experimental para o estudo da falência renal aguda induzida pelo veneno de *B. jararaca*. Através de estudos funcional e morfológico, os autores determinaram que a isquemia relacionada com a coagulação glomerular e hemólise, foi o mais importante fator patogênico causando um decréscimo no índice de filtração glomerular, embora a nefrotoxicidade direta do veneno não possa ser excluída.

D'Abreu *et al.* (1995), em estudo da ação nefrotóxica do veneno bruto e de uma fração com atividade de PLA₂, do veneno de *Bothrops insularis* (i.v.) em rim de pintainho, concluem que as alterações renais encontradas tiveram provavelmente, origem isquêmica.

Pérez *et al.* (1996) após injeção intramuscular da dose de aproximadamente 2,5µg/g do veneno de *B. alternatus*, verificaram a partir de 6 horas, congestão glomerular, tumefação e degeneração hidrópica dos túbulos proximais e distais, com presença de cilindros hialinos na luz dos túbulos.

Os estudos existentes no sentido de elucidar a gênese das lesões renais, mais especificamente tubulares, provocadas por venenos botrópicos, atribuem-nas geralmente à isquemia. Isto pode ocorrer na maioria dos casos mas a nefrotoxicidade direta também tem sido sugerida.

Desta forma, o fator ou fatores exatos pelos quais os venenos de *Bothrops* produzem necrose tubular aguda não são concludentes. Com base nas ações proteolítica e coagulante destes venenos, os mecanismos que têm sido propostos para explicar as lesões renais são: 1) a coagulação intravascular disseminada que acarreta a formação e deposição de microtrombos na rede capilar e, 2) a nefrotoxicidade direta atribuída à ação proteolítica do veneno e/ou espasmo dos vasos renais decorrente da liberação de substâncias vasoativas (Amaral et al., 1985; 1986; Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1993).

Devemos considerar ainda, que o veneno é eliminado principalmente através dos rins e o endotélio vascular neste órgão entra em contato com o veneno mais que em outros órgãos já que os rins possuem grande irrigação sangüínea (Azevedo & Teixeira, 1938).

1.5 – ALTERAÇÕES CELULARES ENVOLVIDAS NA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA

Vários eventos moleculares e metabólicos que ocorrem nas células dos túbulos renais e suas conseqüências na função glomerular estão envolvidos na patogênese da IRA . Quando estes eventos são decorrentes de isquemia renal, ocorre depleção do ATP celular que está envolvido em uma série de processos essenciais para a função celular como a síntese proteica, a lipogênese e o transporte ativo através da membrana (Iaina & Schwartz, 1994).

Molitoris *et al.* (1988) e Molitoris (1991), verificaram que após 10 minutos de isquemia, a atividade da Na⁺-K⁺ ATPase, que normalmente é encontrada na região basolateral das células do túbulo contorcido proximal, é encontrada na membrana apical indicando ocorrência de alteração na

polaridade das células epiteliais destes túbulos. Este fenômeno estaria relacionado à actina (componente majoritário do citoesqueleto), uma vez que, a polimerização destes microfilamentos é ATP dependente. Além disso, sendo o volume celular controlado pela bomba de Na^+ e K^+ , alterações na sua atividade provocam acúmulo de sódio e cloro, e como resultado, alterações do volume celular. A célula absorveria água e incharia o que contribuiria para a obstrução tubular e isquemia medular, dois fenômenos principais no desenvolvimento da necrose tubular aguda (Mason *et al.*, 1981).

Além disso, durante injúrias tóxicas ou isquêmicas é observado acúmulo de cálcio intracelular provavelmente devido à inibição da Ca^{++} -ATPase e da Na^+ - K^+ -ATPase pela falta de ATP (Schatzman, 1966; Snowdowne & Borle, 1985). Este acúmulo de cálcio também acarreta alterações citoesqueléticas. Em concentrações intracelulares normais de Ca^{++} ($<10^{-6} - 10^{-7}\text{M}$), a vilina, uma proteína citoplasmática, age como um fator de empacotamento de microfilamentos. A vilina age formando um “cap” funcional em uma das extremidades dos microfilamentos impedindo a adição de monômeros. Se a concentração de cálcio excede $10\mu\text{M}$, a vilina divide os microfilamentos em pequenos fragmentos (Glenney *et al.*, 1981; Walsh *et al.*, 1984; Coudrier *et al.*, 1988).

Por outro lado, o cálcio ionizado pode provocar detrimientos às células causando edema mitocondrial (Lehninger, 1970), desacoplamento da fosforilação oxidativa (Rossi & Lehninger, 1964), e liberação de ácidos graxos livres (Chan & Higgins, 1978). O acúmulo de cálcio ainda é o responsável pela ativação de fosfolipases e proteases endógenas dependentes de cálcio. Estas fosfolipases degradam os fosfolipídios de membrana, alterando sua permeabilidade e as proteases dependentes de cálcio atuam causando, como já citado, mudanças na actina (Cotran *et al.*, 1994). Microfilamentos, compostos por actina F, são os componentes primários do

citoesqueleto de microvilos de células que possuem membranas com bordadura em escova (Mooseker, 1985). Nas células do túbulo proximal, os filamentos de actina, além de estarem localizados nos microvilos, situam-se sob a rede terminal ancorando os microfilamentos microvilares (Coudrier *et al.*, 1988). No entanto existem controvérsias quanto ao fato do aumento nos níveis de cálcio intracelular ser a causa ou conseqüência das injúrias celulares (Iaina & Schwartz, 1994).

Outro fator envolvido na injúria celular é a produção de radicais livres, pois o metabolismo intracelular de agentes tóxicos pelo retículo endoplasmático altera a função de oxidases resultando na formação de metabólitos reativos, alguns dos quais são radicais livres tóxicos às células (Younes & Siegers, 1984).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar as lesões renais provocadas pelo veneno bruto de *Bothrops moojeni*, procurando estabelecer as relações com a gênese destes processos. Aliada às técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão e varredura, será feita uma análise fisiológica da ação do veneno através do *clearance* de lítio. De acordo com os resultados encontrados, este trabalho poderá fornecer subsídios para a caracterização dos tipos de lesão que acometem o néfron. Dará elementos para trabalhos subseqüentes que visam caracterizar qual o componente do veneno responsável pela ação nefrotóxica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS E VENENO

Foram utilizados 51 ratos machos adultos, Wistar Hannover (200-300g), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. O veneno bruto, liofilizado de *B. moojeni* foi fornecido pelo Instituto Butantan e estocado à -20°C. Seis destes animais foram utilizados para os procedimentos de microscopia eletrônica.

Os 45 animais restantes foram, em princípio, divididos em dois grupos: grupo experimental (GE), injetado com solução de veneno e grupo controle (GC), injetado com solução salina. Os animais do GE receberam uma injeção i.v de veneno, diluído na hora de ser utilizado, em solução salina estéril na concentração de 0,4 mg/ml.

A utilização da dose de 0,4 mg/kg está respaldada pelos seguintes aspectos: A quantidade de veneno geralmente encontrada na glândula de uma serpente do gênero *Bothrops* é de aproximadamente 50 mg (Rosenfeld, 1971). A partir deste dado e do fato de que as serpentes nunca injetam todo o conteúdo da glândula em uma picada, Burdmann *et al.*, 1993, estabeleceram esta dose por ser comparativa à dose injetada por estas serpentes nos acidentes com seres humanos (50 mg de veneno em uma pessoa de 70 kg = 0.7 mg/kg).

Um único grupo foi injetado com a dose de 0,2 mg/kg. Os animais do GC receberam uma injeção, pela mesma via, de 0,1 ml/100g de peso corporal, de solução salina estéril.

3.2- TESTE DA FUNÇÃO RENAL

Os experimentos fisiológicos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hidro-Salino do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental

da UNICAMP. A função renal foi avaliada 5 horas (GE_{5h}, n=10 e GC, n=5), 16 horas (GE_{16h}, n=11 e GC, n=4) e 48 horas (GE_{48h}, n=10 e GC, n=5) após a injeção. Para um único grupo (GE_{0,2}, n=5 e GC, n=5), foi dada a dose de 0,2 mg/kg e avaliada a função renal 5 horas após.

As injeções, tanto de solução de veneno quanto de solução salina, foram feitas através da veia peniana estando os ratos anestesiados com éter. Quatorze horas antes do teste renal (Garcia *et al.*, 1991), os animais receberam cloreto de lítio (Merck), 60 µmol/100g de peso corporal (Thomsen, 1984), administrado por gavagem (introdução de uma sonda gástrica através da cavidade oral). O *clearance* de lítio renal tem sido usado como um método não invasivo para o estudo da função renal. Os íons de lítio são reabsorvidos através dos túbulos proximais na mesma proporção que os íons sódio e água, contrariamente ao que acontece no néfron distal (Thomsem, 1984; Koomans, 1989). Assim, este método permitire o estudo das alterações funcionais no néfron proximal e distal separadamente. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em jejum para ração sólida, ingerindo água *ad libitum*. Para a obtenção de um fluxo urinário regular e estável durante a coleta de urina, os animais receberam, também por gavagem, uma sobrecarga hídrica de 5% do peso corporal. Decorridos 60 minutos, os animais receberam nova sobrecarga de água de igual volume (Garcia *et al.*, 1991). Após um tempo de equilíbrio de 20 minutos cada rato foi colocado em uma gaiola metabólica individual, sem restrição de movimentos, em jejum e a urina eliminada espontaneamente, foi coletada, por um período de 2 horas, em um tubo de centrífuga graduado.

Após a coleta de urina, os animais foram anestesiados com éter, e a seguir foi realizada laparotomia medial, através do ventrículo direito. Foram obtidas amostras de sangue por punção cardíaca e os rins retirados e processados para análises morfológicas.

3.3 - DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

As concentrações no plasma e urina de sódio, potássio e lítio foram medidas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil), enquanto as concentrações de creatinina foram determinadas por espectrofotometria (Micronal, 362, São Paulo, Brasil) pelo método picrato alcalino (Brod & Sirota, 1948).

3.4 - CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O clearance renal (C) foi calculado pela fórmula padrão $C = VU/P$ ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), sendo U a concentração urinária, V o volume urinário por minuto e P a concentração plasmática de creatinina ou lítio.

O clearance de creatinina (Ccr) foi usado para estimar a taxa de filtração glomerular (RFG) e o clearance de lítio (CLi) foi usado para medir a manipulação tubular renal de sódio e água ($\mu\text{l}/\text{min}\%$).

A fração de excreção de sódio (FENa^+) e de potássio (FEK^+) foram calculadas como CNa^+/Ccr (%) e CK^+/Ccr (%), onde CNa^+ é o clearance de sódio, CK^+ é o clearance de potássio e Ccr é o clearance de creatinina.

As frações de excreção proximal (FEPNa^+) e pós-proximal (FEPPNa^+) de sódio, foram calculadas como $1-\text{CLi}/\text{Ccr} \times 100$ e $1-\text{CNa}^+/\text{CLi} \times 100$ respectivamente.

O aporte distal de sódio a partir dos túbulos proximais (DDNa), foi calculado como $\text{CLi} \times \text{PNa}^+$ onde, PNa^+ é a concentração de sódio no plasma expressa como $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}/100\text{g}$ do peso corpóreo⁻¹.

O tratamento estatístico dos dados se deu pela análise de variância “one-way” (ANOVA), para medidas repetidas. Quando os resultados foram significativos, o teste de contraste de Scheffé foi usado para determinar a amplitude das diferenças. Um valor $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3.5- MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial sistêmica foi estimada 5, 16 e 48 horas após a inoculação do veneno, com os ratos conscientes, pelo método indireto utilizando um manguito de cauda com um eletrofigmomanômetro e transdutor de pulso pneumático (Narco Biosystems Inc.). Para avaliar a pressão sangüínea foi utilizada a média de três medições consecutivas.

3.6- PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os rins foram seccionados sagitalmente na região mediana e fixados em solução de Bouin por imersão durante 24h e lavados em álcool 70% durante 12h. Estes foram então desidratados em série etanólica crescente (etanol 30%, 50%, 70%, 90% uma vez de 15 minutos cada e três vezes de 15 minutos em etanol 100%), diafanizados e incluídos em parafina (Histosec-Merck/RJ). Foram obtidas secções de 5 μm de espessura, em micrótomo rotativo manual, coletadas em lâminas histológicas e coradas pelas seguintes técnicas:

3.6.1- Hematoxilina & Eosina (Behmer *et al.*, 1976).

As secções foram desparafinizadas, hidratadas, coradas pela Hematoxilina de Harris por cinco minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, foram contra-coradas com Eosina por 10 minutos,

lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas em xilol e montadas em ENTELLAN (MERCK).

3.6.2- Hematoxilina Fosfotúngstica de Mallory (Michalany, 1980).

As secções, depois de desparafinizadas e hidratadas, foram imersas em solução de alúmen de ferro 5%, por 5 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e em água destilada por 30 minutos. A seguir, foram coradas com hematoxilina fosfotúngstica durante 24 horas, lavadas rapidamente em água destilada e diferenciadas em álcool a 95⁰, então foram desidratadas, clarificadas em xilol e montadas em ENTELLAN (MERCK).

3.6.3- Ácido Periódico Schiff (PAS, Mc Manus, 1946).

As secções, depois de desparafinizadas e hidratadas, foram oxidadas pelo ácido periódico 0,5% durante 10 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos, coradas pelo Reativo de Schiff por 9 minutos, lavadas em água destilada e descoradas com bissulfito de sódio 0,5% durante 9 minutos. Foram então lavadas em água durante 5 minutos, contra-coradas com Hematoxilina durante 5 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas, clarificadas em xilol e montadas em ENTELLAN (MERCK).

3.6.4- Reação de Feulgen (Mello & Vidal, 1978).

As secções, depois de desparafinizadas e hidratadas, foram hidrolisadas pelo HCl 4N, durante 1 hora e 30 minutos, a 25⁰C. Depois de lavadas em água destilada, foram imersas no Reativo de Schiff (Mello & Vidal, 1980) por 40 minutos à temperatura ambiente, estando as secções protegidas da luz. Estas foram lavadas em água sulfurosa (metabissulfito de sódio a 10% - HCl 1N – água destilada [1:1:18 – v/v/v]), 3 banhos de 5 minutos cada. Depois de lavagem em água destilada, foram desidratadas, clarificadas em xilol e montadas em ENTELLAN (MERCK).

O material foi observado em microscópio de luz Zeiss/Axioskop e fotomicrografado em cores com filme Kodak Gold -ASA 100-135mm.

3.7- PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Após a inoculação sistêmica do veneno, os animais foram submetidos aos seguintes tempos de sobrevivência: 5h (n=2) e 16h (n=2). O grupo controle (n=2) foi inoculado com solução salina estéril.

Os animais foram anestesiados com pentabarbital sódico (sagatal 1,6ml/kg, i.p.). Logo após foi realizada laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal, visualizando-se o coração e identificando-se a área cardíaca correspondente ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida uma agulha conectada ao sistema de perfusão. A drenagem da solução foi obtida pela secção da aurícula direita. Deu-se então início à perfusão, inicialmente com 100 ml de líquido pré-perfusão constituído por salina heparinizada à 1%. Em seguida foram perfundidos com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 20 minutos. Os rins foram retirados e foram obtidos fragmentos.

3.7.1- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os fragmentos obtidos permaneceram imersos por 3 horas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 contendo 0,1% de ácido tânico e 5% de sacarose. Após este período, os fragmentos foram lavados em solução salina glicosada (NaCl 0,1M contendo sacarose 0,2M), pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas sob refrigeração, e novamente lavados na mesma solução salina glicosada, A

seguir, foram desidratados em série etanólica crescente, embebidos em mistura de etanol-óxido de propileno na proporção 1:1 durante 30 minutos, óxido de propileno puro durante 30 minutos, mistura de óxido de propileno e resina Epon 812, na proporção 1:1 durante 3 horas em rotor e resina pura durante 24 horas em rotor. Foram então incluídos em resina Epon 812 e a polimerização conduzida à 60°C por 48 horas.

Cortes semifinos de aproximadamente 1 µm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LKB - super nova, com navalhas de vidro, e corados em solução de azul de toluidina 0,5%, com a finalidade de definir a área de interesse. Os cortes ultrafinos (60-70 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo com navalha de diamante (Diatome 45⁰), coletados em telas de cobre (200 mesh) e contrastados com acetato de uranila à 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo à 0,5% durante 5 minutos.

As observações e documentação fotográfica foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.7.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os fragmentos obtidos permaneceram imersos em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) *overnight*, em geladeira. Em seguida foram lavados no mesmo tampão durante 1 hora e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas, sob refrigeração. Foram então lavados novamente no mesmo tampão e imersos em solução de sacarose 2,3M, *overnight* em geladeira. Foi feita fratura dos fragmentos após 30 minutos de imersão em nitrogênio líquido. Os fragmentos fraturados foram lavados em tampão e desidratados

em gradiente crescente de acetona. Foi feita secagem no aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 e cobertura com ouro em metalizador Balzers MED 010.

O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940A do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, S.P. após autorização e gentileza do Dr. Elliot W. Kitajima.

4. RESULTADOS

Dentre os 31 animais injetados com a dose de $0,4\mu\text{g/g}$ de veneno bruto de *B. moojeni*, 13 morreram logo após a injeção intravenosa. Os animais sobreviventes ficaram distribuídos nos três grupos experimentais a saber: $\text{GE}_{5\text{h}}$, $\text{GE}_{16\text{h}}$ e $\text{GE}_{48\text{h}}$ integrados respectivamente por 7, 6 e 5 animais. O aspecto da urina eliminada pelos animais, após a inoculação do veneno apresentou uma coloração avermelhada sugestiva de hematúria ou hemólise, sendo este aspecto menos intenso 48h após inoculação i.v. do veneno. Um animal do $\text{GE}_{48\text{h}}$ apresentou diarreia observada 12 h após a injeção, e anúria durante as duas horas de coleta de urina para o clearance de lítio, sendo que a avaliação funcional foi prejudicada, e os dados referentes a este animal desconsiderados. Após a necrópsia deste animal através de laparotomia medial, foi verificada uma turgidez da bexiga urinária e dilatação ureteral indicando a existência de um débito urinário e rins hidronefróticos.

4.1- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ATRAVÉS DO CLEARANCE DE CREATININA (C_{cr}) E CLEARANCE DE LÍTIO (CLi):

Os resultados funcionais renais apresentaram uma queda significativa ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle, na taxa de filtração glomerular, estimada pelo clearance de creatinina (Figura 4; Tabela 1). Esta queda foi observada em todos os GE, não havendo diferenças significativas entre os tempos analisados. Porém, os animais inoculados com $0,2\mu\text{g/g}$ apresentaram pequena queda não significativa deste parâmetro.

Paralelamente, foi observado em todos os GE, um aumento significativo na excreção urinária fracional de sódio (Figura 5; Tabela 2). Quando comparada aos animais controle, esta elevação foi menos proeminente às 16h e mais acentuada às 48h após a inoculação de $0,4\mu\text{g/g}$ de veneno. Já a excreção urinária fracional de K^+ nos animais inoculados com a

dose de $0,4\mu\text{g/g}$ de veneno, teve um aumento significativo somente 16h após a inoculação, decrescendo após 48h, embora não tenha retornado a valores próximos àqueles observados no GC. Vale ressaltar aqui, que 5h após a inoculação dos animais com a dose de $0,2\mu\text{g/g}$, estes apresentaram um aumento significativo da FEK^+ , se comparado àqueles injetados com o dobro da dose (Figura 6;Tabela 3).

Verificamos que os animais inoculados com a dose de $0,4\mu\text{g/g}$, apresentaram uma elevação isolada, mas significativa do CLi 5h após a inoculação do veneno (Figura 7;Tabela 4), não sendo encontradas alterações significativas neste parâmetro após 16 e 48 horas. Um aumento significativo do CLi também foi verificado nos animais injetados com $0,2\mu\text{g/g}$. Coincidindo com estes resultados, a fração de excreção proximal de sódio (FEPNa^+) se comportou de maneira similar (Figura 8; Tabela 5). Entretanto, 48h após injeção de veneno não foi observada qualquer modificação no CLi e na FEPNa^+ , a despeito do significativo aumento na FENa^- . Porém, a observação dos valores referentes à fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa^+), nos revelou um significativo aumento após 48h, sendo que não foram encontrados valores significativamente diferentes nos outros GE. Já no $\text{GE}_{5\text{h}}$ pode ser verificada uma discreta mas não significativa diminuição na FEPPNa^+ sugerindo uma reabsorção compensatória pós-proximal de sódio (Figura 9; Tabela 6).

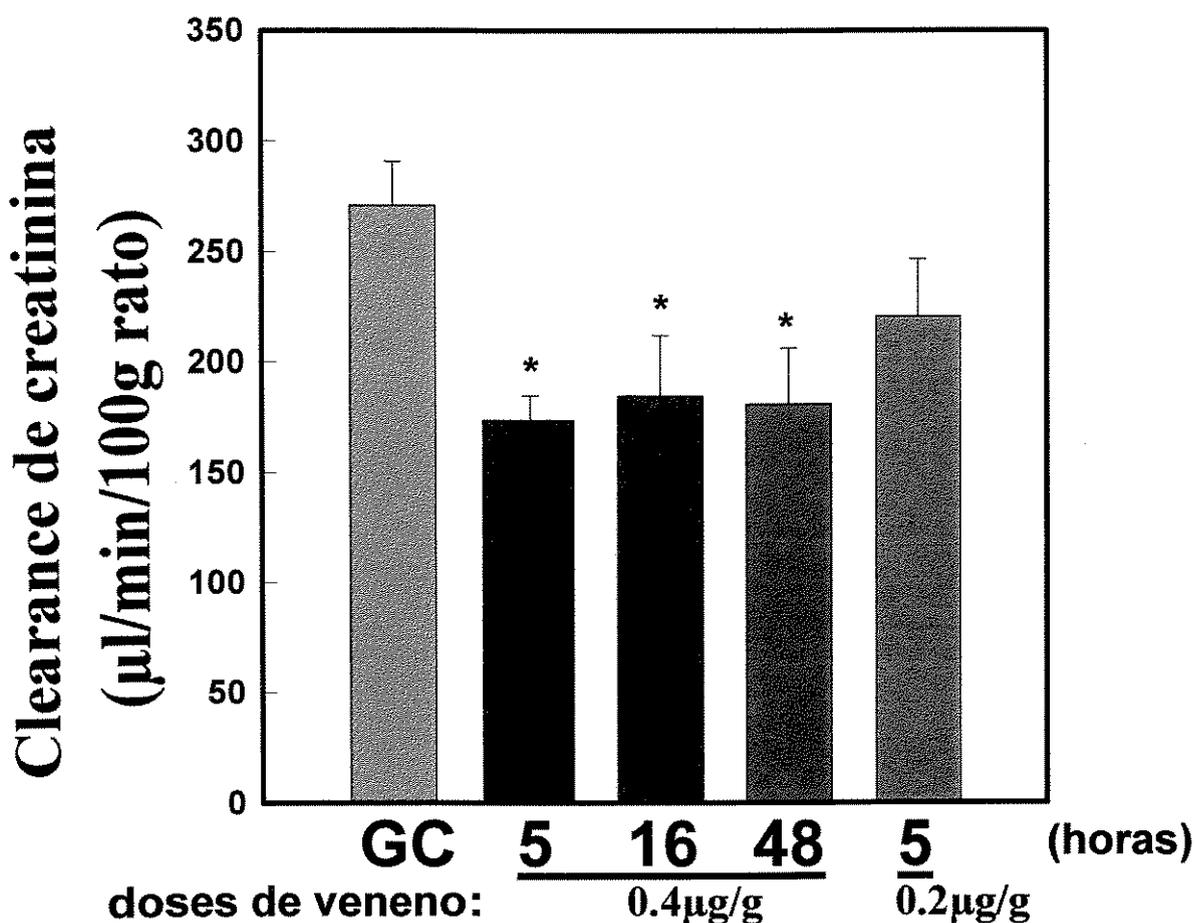


Figura 4: Clearance de creatinina 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média ±EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4µg/g 16h	48h	0,2µg/g 5h
Ccr	270,9±20	173,5±11,1*	184,5±27,6*	180,8±25,5*	220,4±26
N	19	7	6	5	5

Tabela 1: Valores obtidos para o clearance de creatinina 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em µl/min/100g, como média ±EPM. *P<0,05.

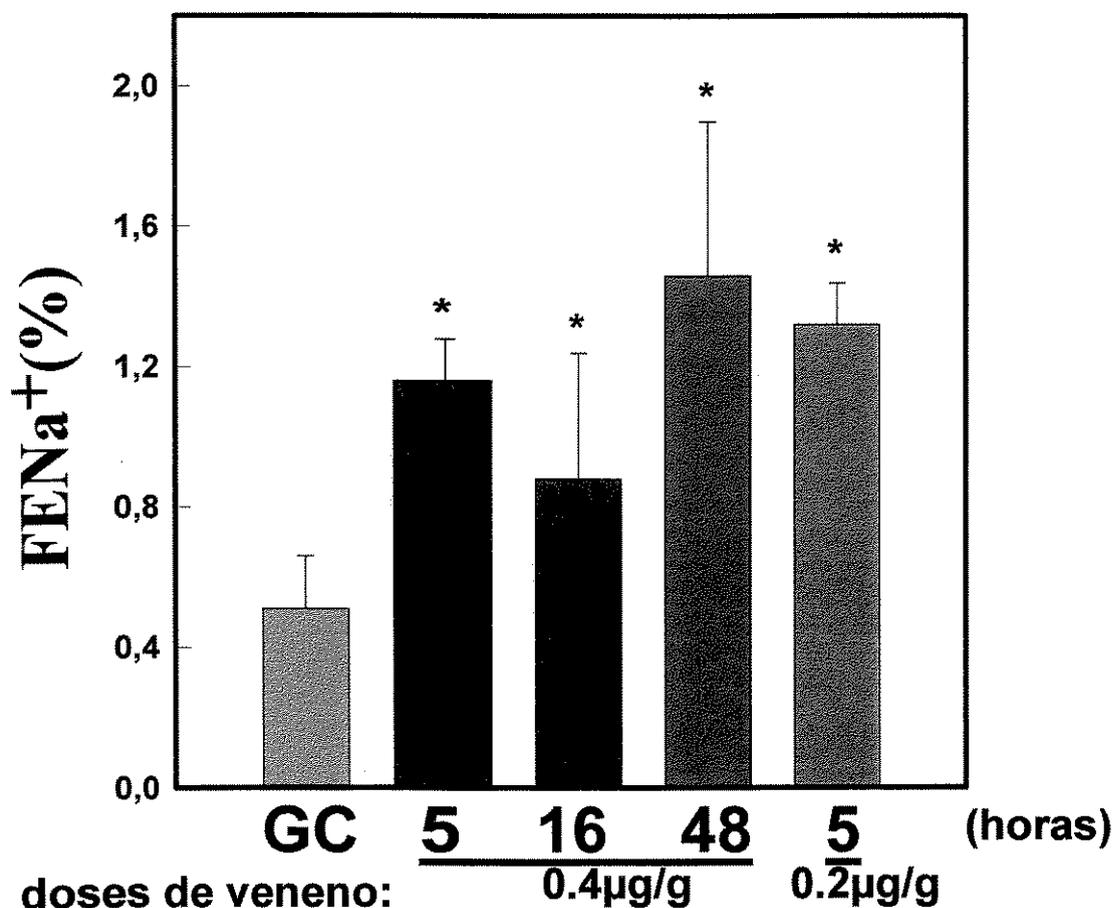


Figura 5: Excreção urinária fracional de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média ±EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4µg/g 16h	48h	0,2µg/g 5h
FENa ⁺	0,51±0,15	1,16±0,12*	0,88±0,36*	1,46±0,44*	1,32±0,12*

Tabela 2: Valores da excreção urinária fracional de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em %, como média ±EPM. *P<0,05.

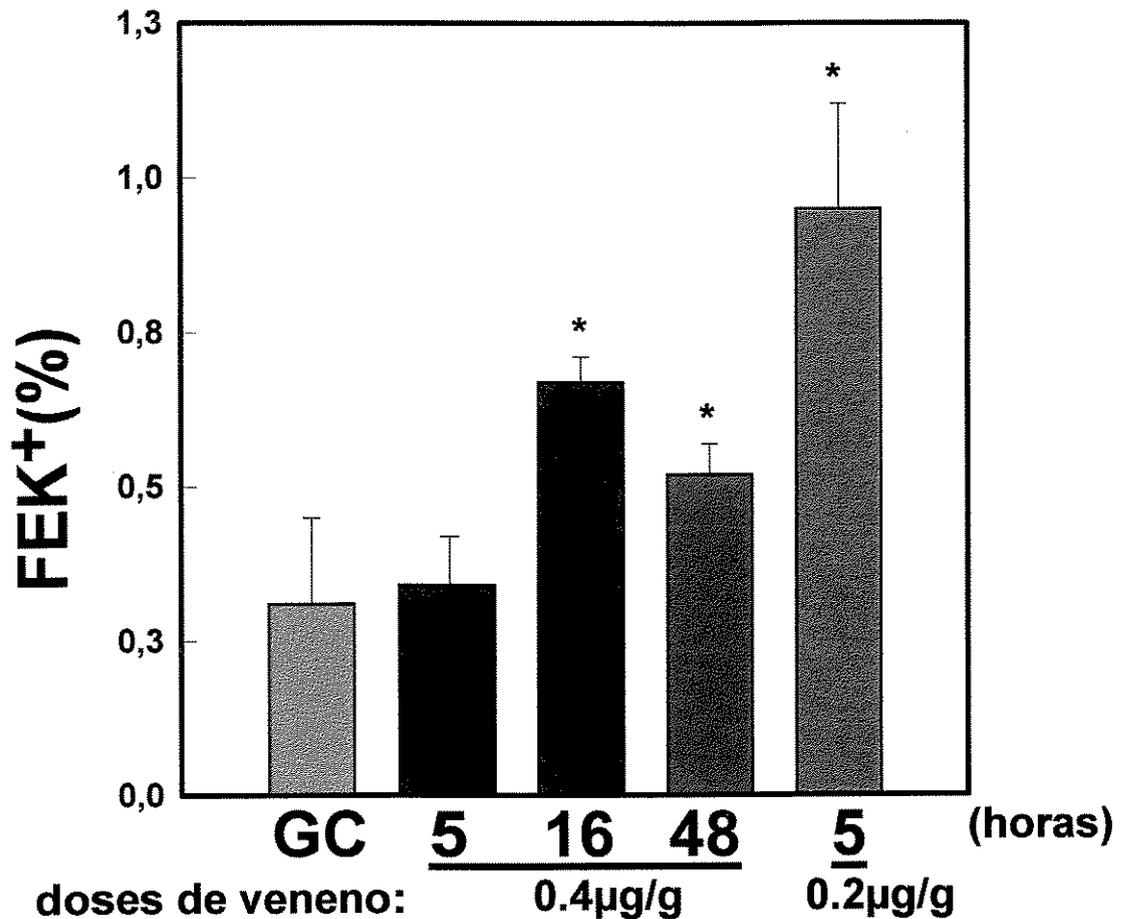


Figura 6: Excreção urinária fracional de potássio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média ±EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4µg/g 16h	48h	0,2µg/g 5h
FEK ⁺	0,31±0,14	0,34±0,08	0,67±0,04*	0,52±0,05*	0,95±0,17*

Tabela 3: Valores da excreção urinária fracional de potássio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em %, como média ±EPM. *P<0,05.

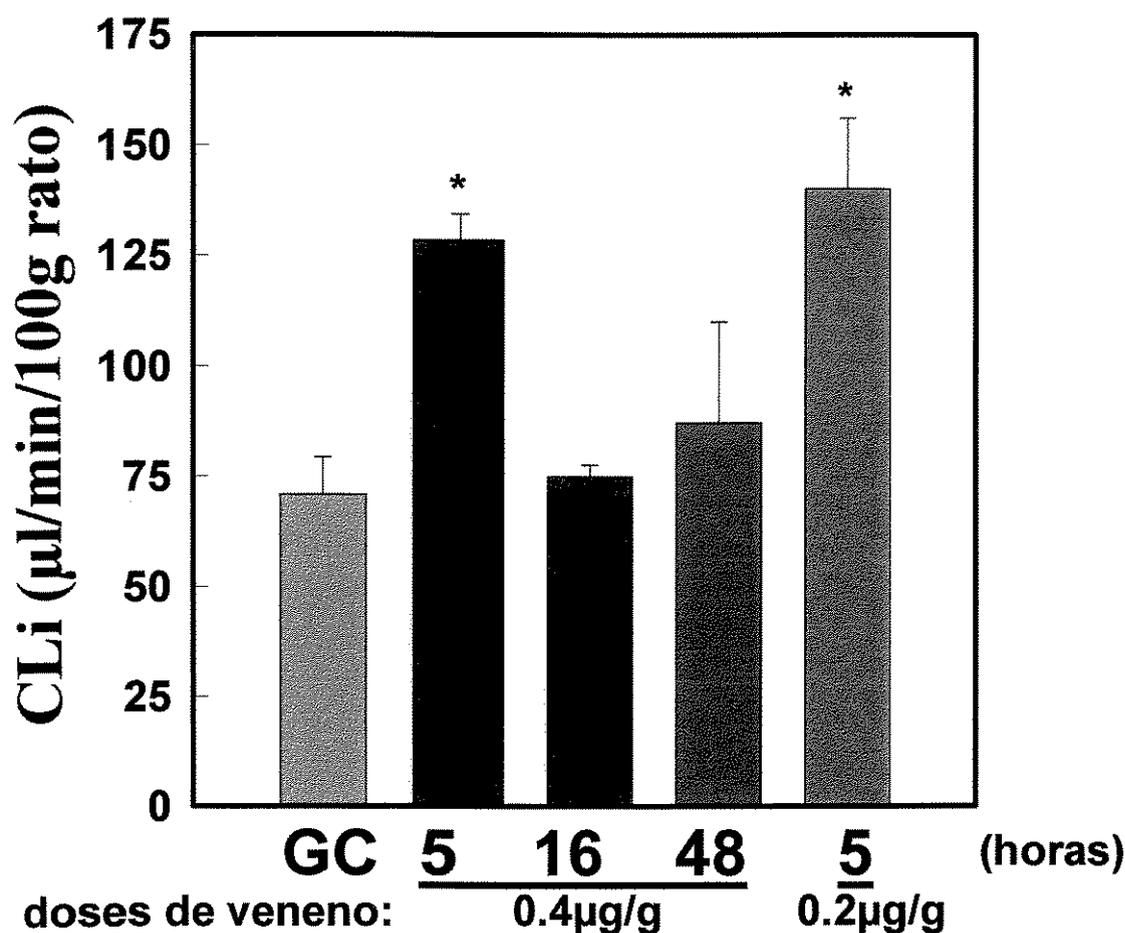


Figura 7: Clearance de lítio 5h após a inoculação da dose de 0,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média \pm EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 16h	48h	0,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 5h
CLi	71 \pm 8,4	128,6 \pm 5,9*	75,1 \pm 2,5	87,2 \pm 23	140,2 \pm 15,9*

Tabela 4: Valores obtidos para o clearance de lítio 5h após a inoculação da dose de 0,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$, como média \pm EPM. *P<0,05.

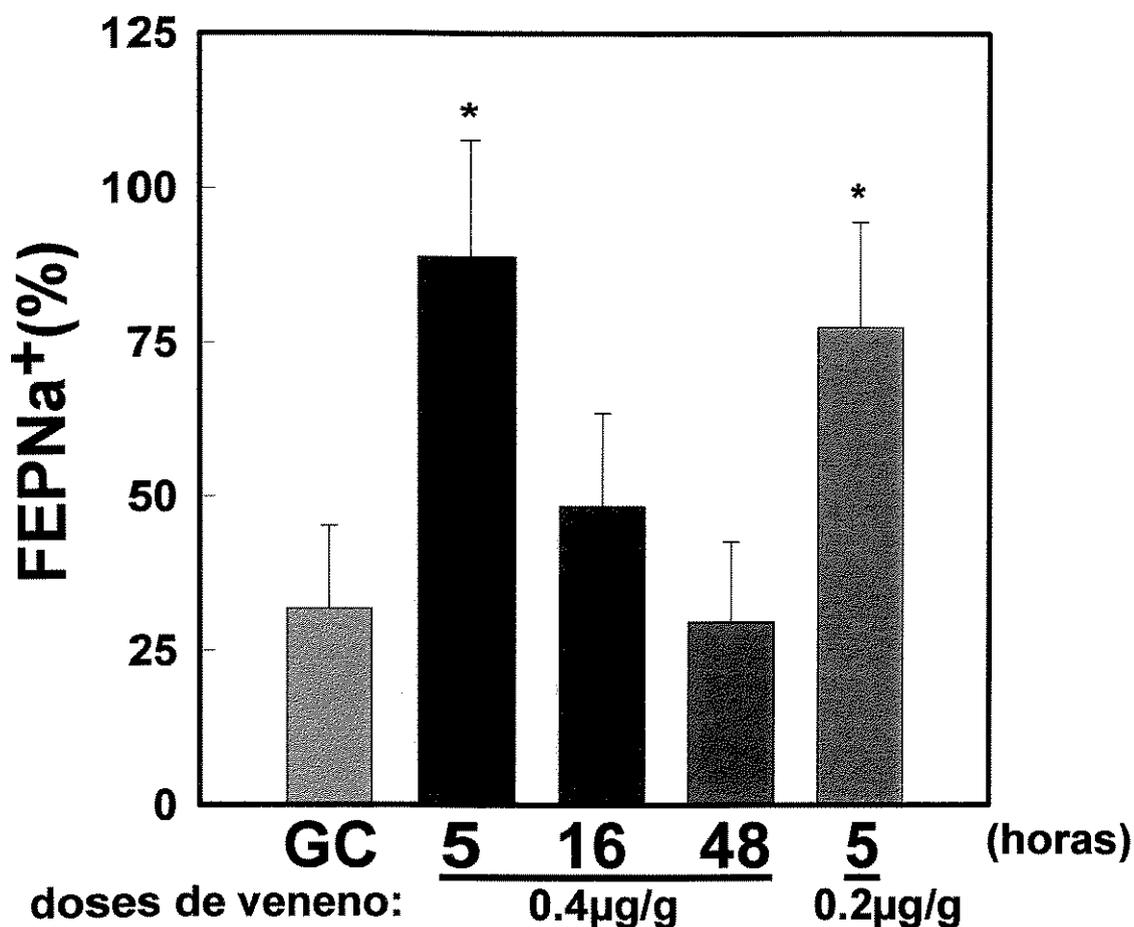


Figura 8: Excreção fracional proximal de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média ±EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4µg/g 16h	48h	0,2µg/g 5h
FEPNa ⁺	31,8±13,5	88,9±18,9*	48,5±15,1	29,7±13	77,5±17*

Tabela 5: Valores da excreção fracional proximal de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em %, como média ±EPM. *P<0,05.

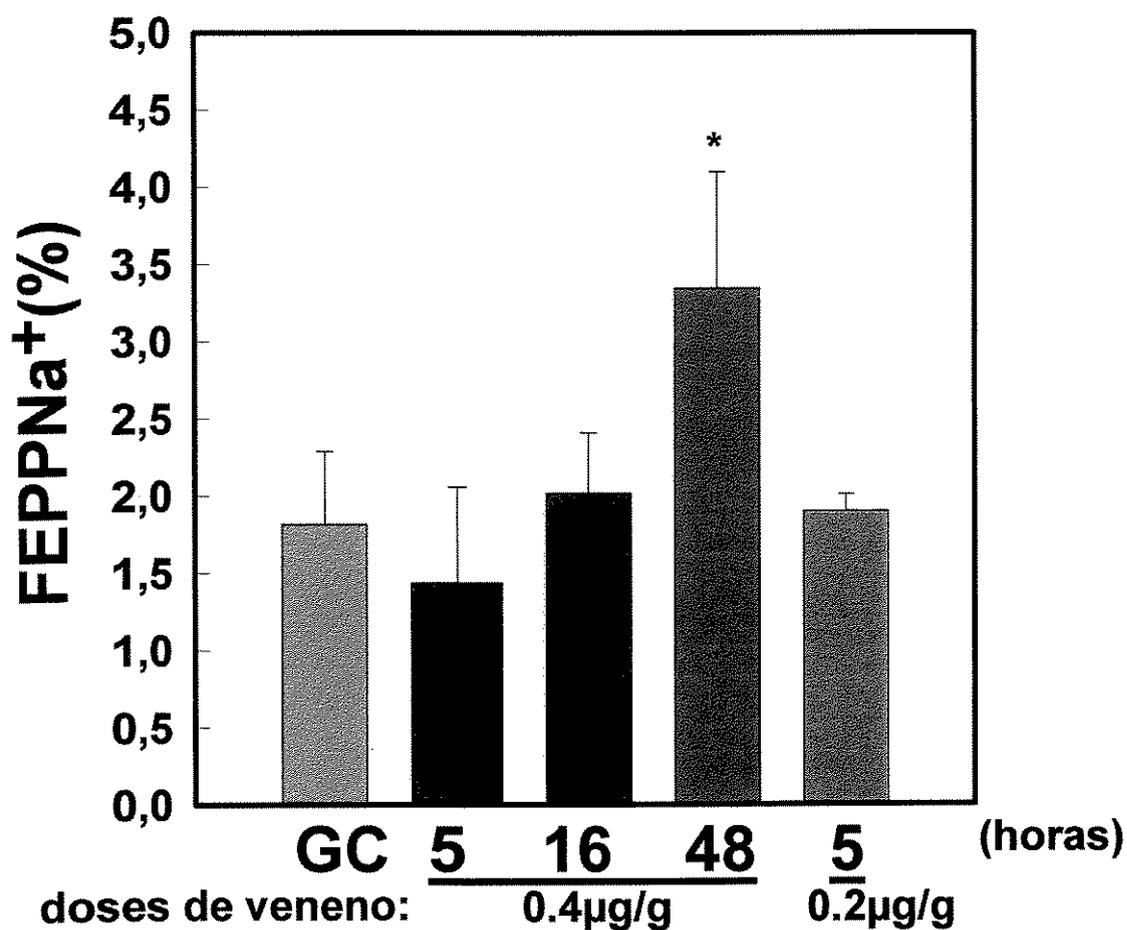


Figura 9: Excreção fracional pós-proximal de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média ±EPM. *P<0,05.

	GC	5h	0,4µg/g 16h	48h	0,2µg/g 5h
FEPPNa ⁺	1,82±0,47	1,44±0,62	2,02±0,39	3,35±0,75*	1,9±0,11

Tabela 6: Valores da excreção fracional pós-proximal de sódio 5h após a inoculação da dose de 0,2µg/g e 5, 16 e 48h após inoculação da dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os registrados estão reportados em %, como média ±EPM. *P<0,05.

4.2- PRESSÃO ARTERIAL:

Não foram encontradas alterações significativas na pressão arterial média 5, 16 e 48h após a inoculação da dose de $0,4\mu\text{g/g}$ do veneno bruto de *B. moojeni* (Figura 10; Tabela 7).

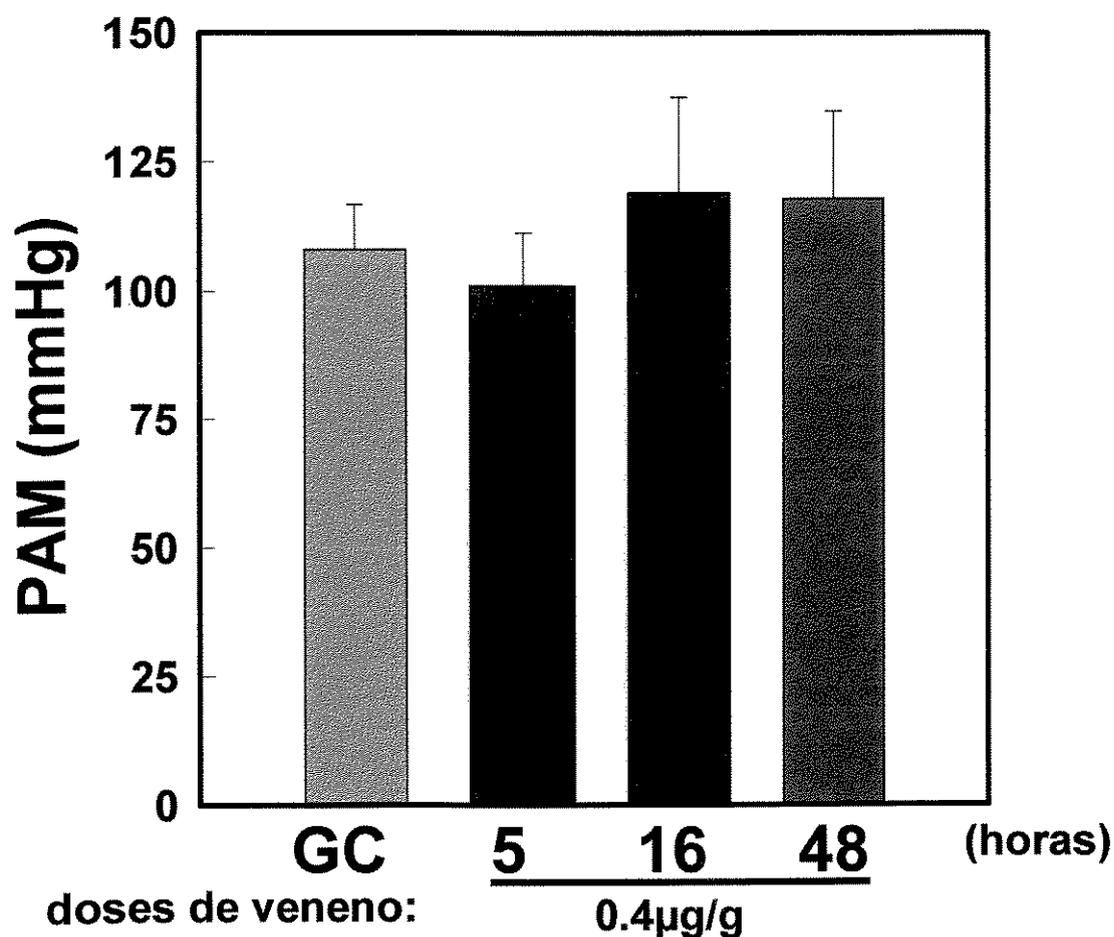


Figura 10: Pressão arterial média 5, 16 e 48h após a inoculação da dose de $0,4\mu\text{g/g}$ do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados como média \pm EPM.

	GC	5h	0,4 μg/g 16h	48h
PAM	108±8,7	101±10,3	119 ±18,6	117,9±16,9

Tabela 7: Valores da pressão arterial média 5, 16 e 48h após a inoculação da dose de $0,4\mu\text{g/g}$ do veneno bruto de *B. moojeni*. GC, grupo controle injetado com solução salina. Os resultados estão registrados em mmHg, como média \pm EPM.

4.3 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS:

As alterações morfológicas serão enfocadas do ponto de vista da análise histopatológica, sob a microscopia de luz e do ponto de vista das alterações ultraestruturais, através das microscopias eletrônicas de transmissão e varredura.

Os resultados dessas observações serão detalhadamente descritos junto às micrografias que ilustram as anormalidades morfológicas induzidas pelo veneno bruto de *B. moojeni*. Antes da análise detalhada, faremos uma exposição comparativa das alterações estruturais encontradas nos diferentes tempos experimentais.

4.3.1 – ANÁLISE HISTOLÓGICA:

A análise do parênquima renal dos animais pertencentes ao GE_{5h} nos revelou, de uma forma geral, aumento da acidofilia, indicativo de sofrimento celular, e capilares peritubulares contendo hemácias densamente agrupadas (Figuras 11B e 17A). Mais detalhadamente, no que diz respeito a lesões das células do TCP, observamos vacuolização citoplasmática, picnose nuclear e descontinuidades na bordadura em escova (Figuras 12B, 15B e 17B), que se apresentou mais delgada em relação ao GC (12A e 15A). Estas alterações foram observadas em todo parênquima cortical renal dos animais pertencentes a este grupo. Os TCD e TC apresentaram-se dilatados (Figuras 12B e 15B) e foi possível observar regiões onde ocorreu rompimento dos capilares peritubulares e da parede tubular caracterizando hemorragia (Figura 12A). Algumas regiões do córtex renal apresentaram necrose tubular aguda com completa desorganização do epitélio tubular (Figura 19A e B). Quanto aos corpúsculos renais, alguns apresentaram-se com aparente hiper celularidade,

contendo hemácias densamente agrupadas nos capilares e espaço de Bowman, quase imperceptível (Figuras 11B e 22B). Esta hiper celularidade pode ser melhor caracterizada após reação de Feulgen (Figura 23B). Mas, as características glomerulares mais freqüentemente encontradas, como pode ser constatado na figura 12B, foram retração do tufo capilar, que se apresentou lobulado e com modulações hialinas, além da presença de grande quantidade de neutrófilos nos capilares. Esta retração do tufo capilar, provocou um grande aumento do espaço de Bowman (Figura 24B e C). Na região medular, encontramos restos celulares e hemácias na luz dos túbulos (Figura 30A e B).

Já no GE_{16h} pudemos observar que os capilares peritubulares também apresentaram hemácias densamente agrupadas e a acidofilia ainda se apresentou aumentada (Figura 13A). Quanto ao TCP, foram encontradas falhas na bordadura em escova, além desta se apresentar mais delgada. Vacuolização citoplasmática e picnose nuclear foram encontradas com menor freqüência (Figura 3A e B). o epitélio destes segmentos tubulares apresentou grande quantidade de figuras mitóticas (Figuras 13B, 21A e 29A). Os TCD e TC apresentaram-se extremamente dilatados (Figura 13A e B). Freqüentemente foram encontrados restos celulares na luz destes tubos (Figuras 18A e 21A) além de túbulos rompidos (Figura 21B). Diferentemente do GE_{5h}, estes apresentaram extensas regiões de necrose tubular restritas à região córtico-medular (Figura 20A, B e C). No que se refere aos corpúsculos renais, alguns apresentaram-se necróticos (Figuras 16A, 27A e 29A), enquanto outros apresentaram-se com menor aglutinação e com núcleos hipertróficos (Figuras 26A e 27B). Quanto à região medular, foram encontrados vários restos celulares na luz dos túbulos (Figura 32A e B).

As lesões medulares presentes nos glomérulos dos animais do GE_{5h} e GE_{16h}, puderam ser caracterizadas também, pela hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (Figura 25B e C).

No GE_{48h} raramente foram encontradas alterações severas nas células tubulares tanto nos segmentos proximais quanto nos distais (Figuras 14A, 16B e 18B). Poucos corpúsculos renais com lobulações e retração do tufo glomerular foram encontrados. A maioria dos corpúsculos apresentou estrutura mais próxima ao controle (Figuras 26B e 29B).

No GE_{48h} raramente foram encontradas alterações severas nas células tubulares tanto nos segmentos proximais quanto nos distais (Figuras 14A, 16B e 18B). Poucos corpúsculos renais com lobulações e retração do tufo glomerular foram encontrados. A maioria dos corpúsculos apresentou estrutura mais próxima ao controle (Figuras 26B e 29B).

**FIGURA 11- VISTA GERAL DO CÓRTEX RENAL APÓS COLORAÇÃO
COM HE.**

- A-** GC: Parênquima cortical do rim com aspecto normal, mostrando túbulos contorcidos proximais (P), túbulos contorcidos distais (D) e corpúsculo renal (CR) (225x).
- B-** GE_{5h}: Observe o aumento da acidofilia citoplasmática no túbulo contorcido proximal, a presença de hemácias intertubulares (seta) e intraglomerulares sob a ação do veneno (225x).

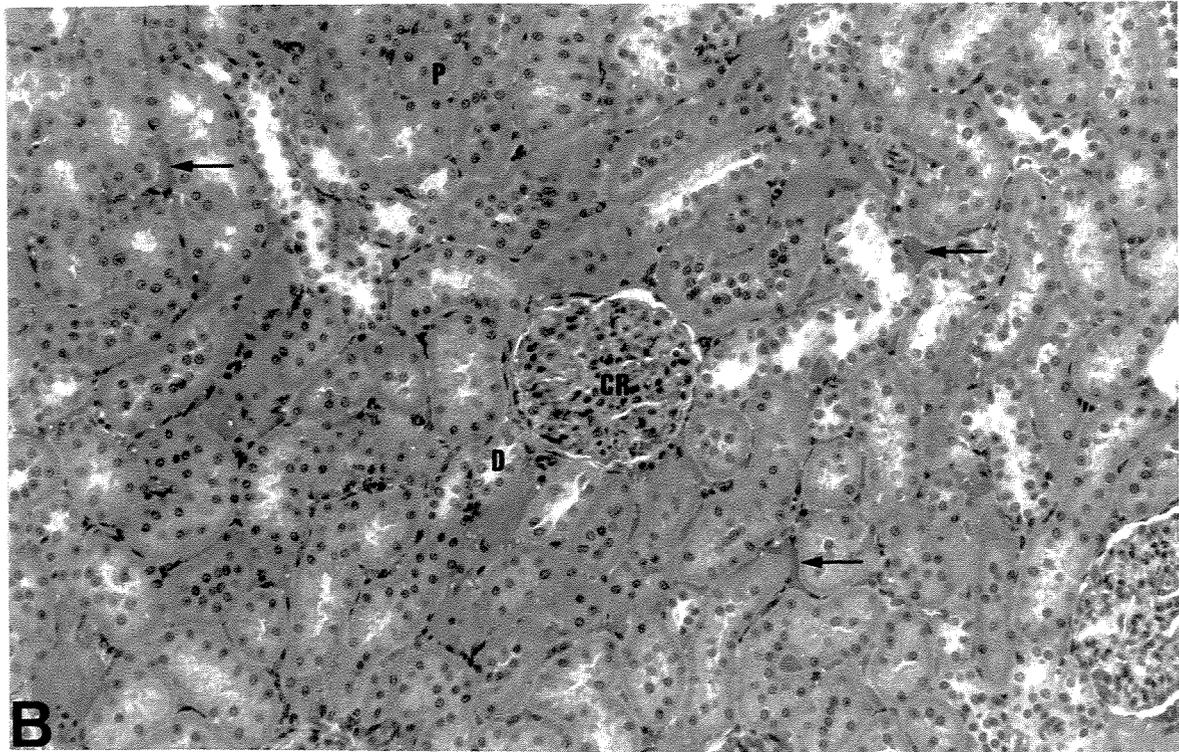
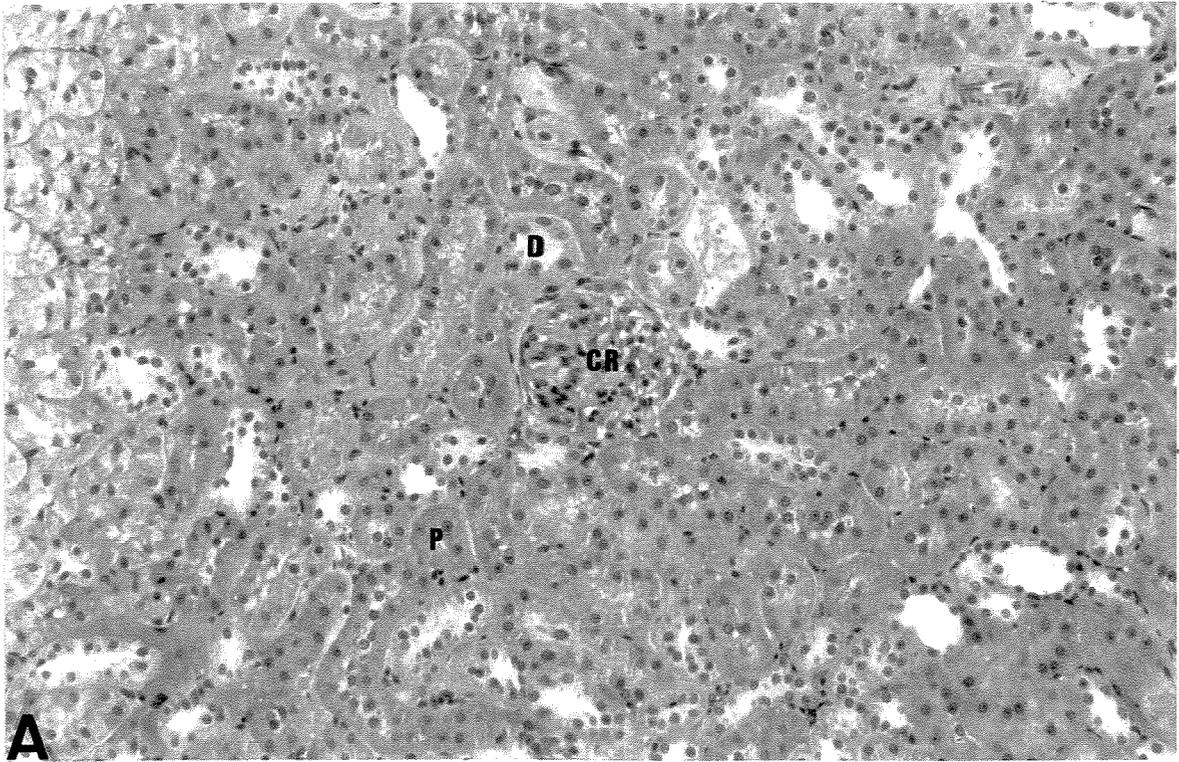
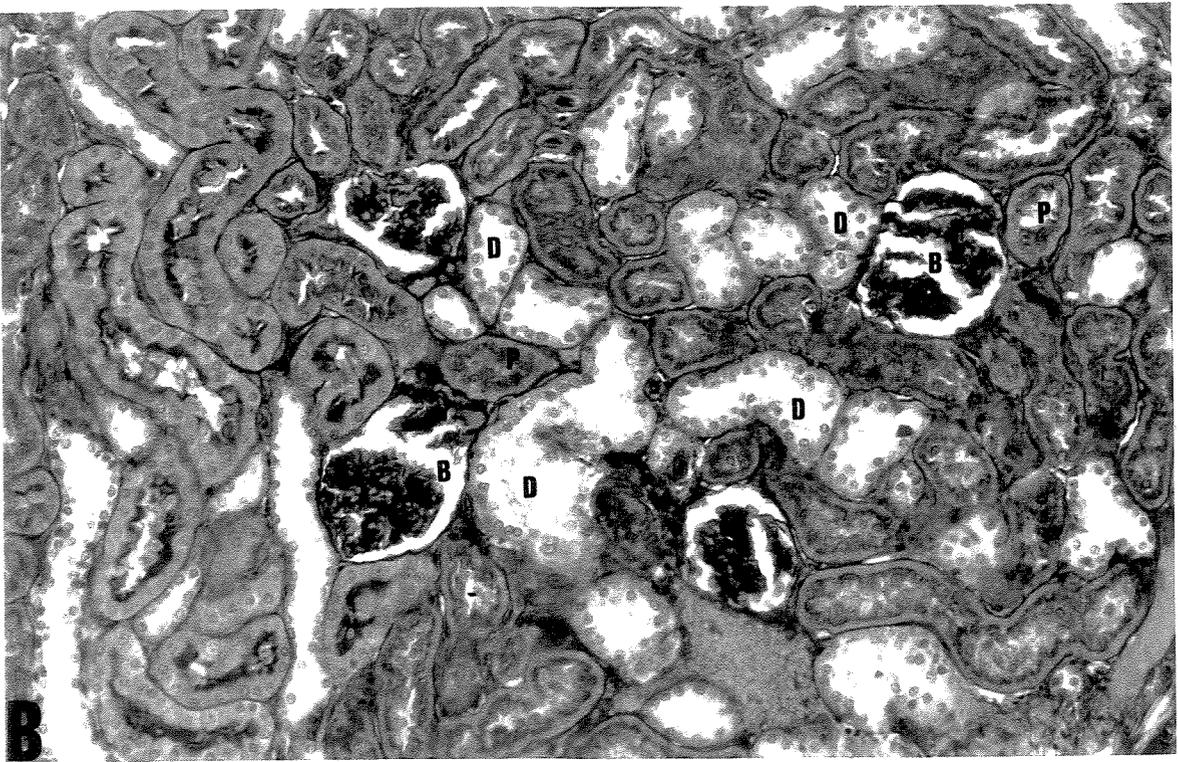
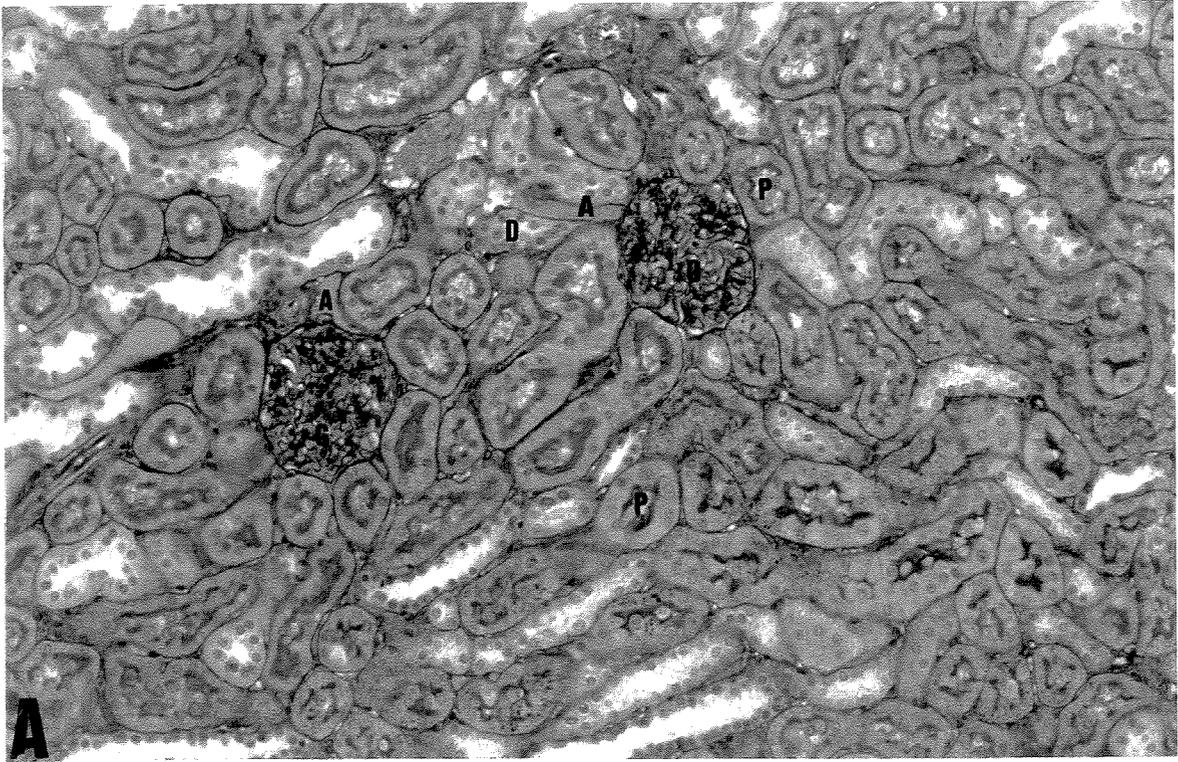


FIGURA 12- VISTA GERAL DO CÓRTEX RENAL APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A- GC: Podem ser observados túbulos contorcidos proximais (P) e túbulos contorcidos distais (D) com aspecto normal. Note dois corpúsculos renais, ambos mostrando seu polo vascular, com as arteríolas aferente e eferente (A), o tufo glomerular (G) com os núcleos das células epiteliais e endoteliais e das células mesangiais. Observe o intrincado trajeto da membrana basal e da matriz mesangial que aparece como uma linha nítida PAS+(225x).
- B- GE_{5h}: O veneno de *B. moojeni* parece ter afetado, de forma importante, a estrutura glomerular em todos os animais deste grupo. Observe o aspecto de acentuada lobulação do tufo de capilares e conseqüente aumento do espaço de Bowman (B). O veneno também afetou os túbulos contorcidos distais (D) tornando-os deformados pelo aumento do volume intraluminal e dos túbulos como um todo. Os túbulos contorcidos proximais (P) apresentaram diminuição da altura do epitélio, as vezes tornando-se cúbico, e alteração da bordadura em escova que apresentou-se sem a exuberância vista nos controles (225x).



**FIGURA 13 – VISTA GERAL DO CÓRTEX RENAL 16 HORAS APÓS A
INOCULAÇÃO**

- A-** Observe túbulos proximais (P) mal definidos, núcleos desalinhados, citoplasma floculento. Note que os túbulos do canto esquerdo inferior da foto tem melhor aspecto; túbulos distais (D) com diâmetro irregular e interrupções do epitélio de revestimento (seta). Corpúsculos renais e capilares peritubulares congestos. (HE, 225x).
- B-** Vista de secção corada com PAS, delineando as membranas basais e bordadura em escova dos túbulos proximais (P). Os aspectos mais notáveis referem-se aos túbulos distais (D) com aumento e distorção do diâmetro intraluminal e o aspecto lobular do glomérulo renal (225x).

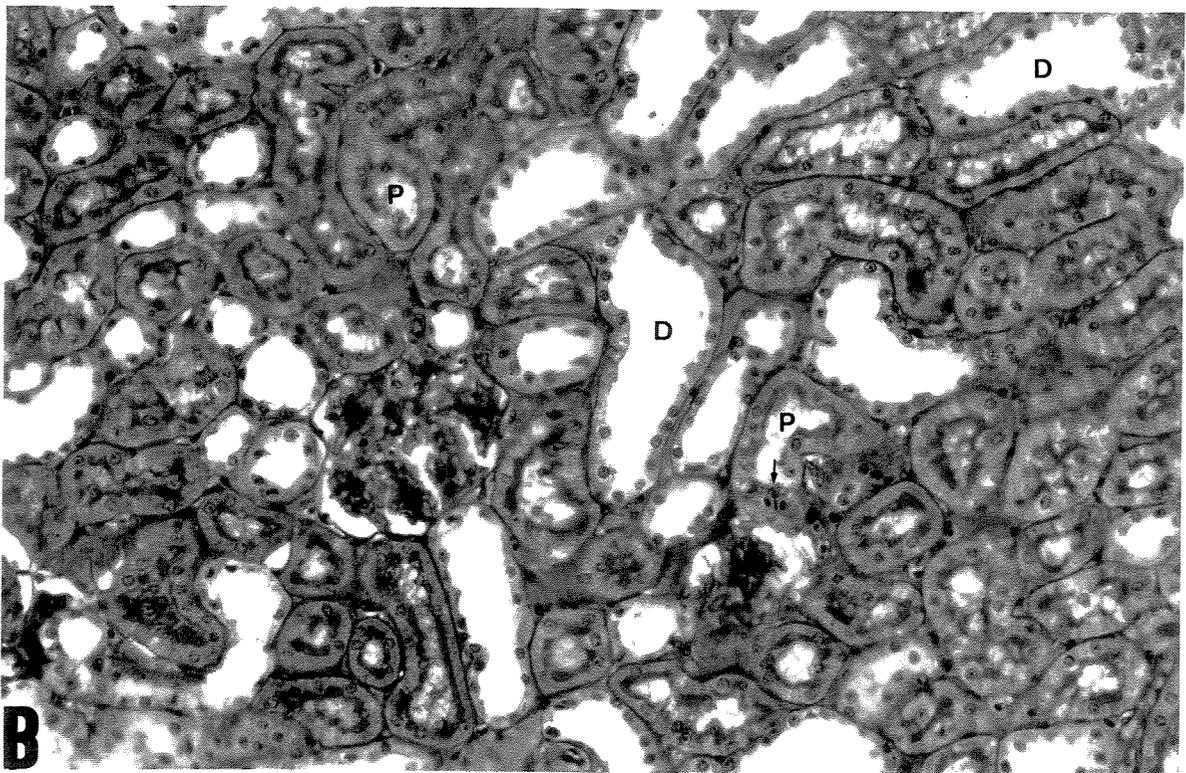
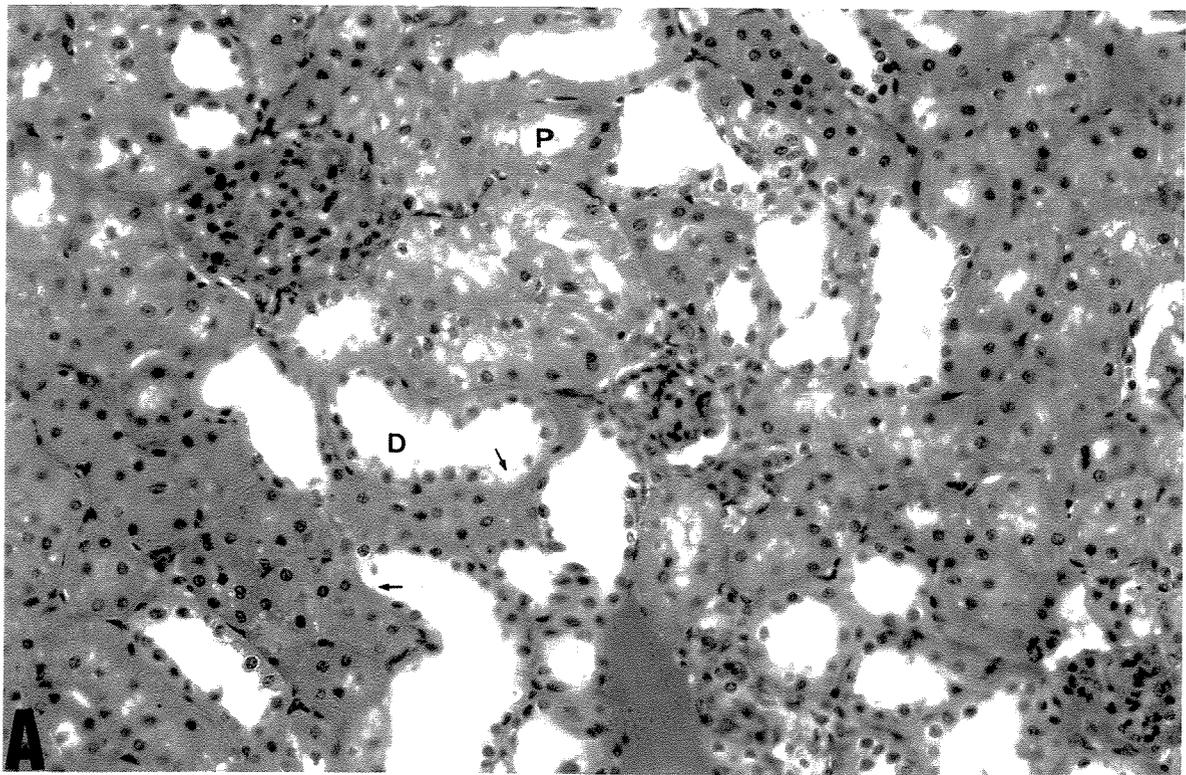


FIGURA 14 – VISTA GERAL DA REGIÃO CORTICAL DO RIM APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A-** GE_{48h}: Note a baixa reatividade da membrana basal e bordadura em escova ao PAS em relação aos controles. O epitélio dos TCP (P) voltou a ter o aspecto cúbico e os TCD (D) já não se encontram tão dilatados (225x).
- B-** GE_{0,2}: Note que não existem alterações significativas nos TCP (P) e nos TCD (D). Os corpúsculos renais apresentaram grande espaço de Bowman (B) devido ao plano de corte. O tufo glomerular apresenta capilares visíveis (225x).

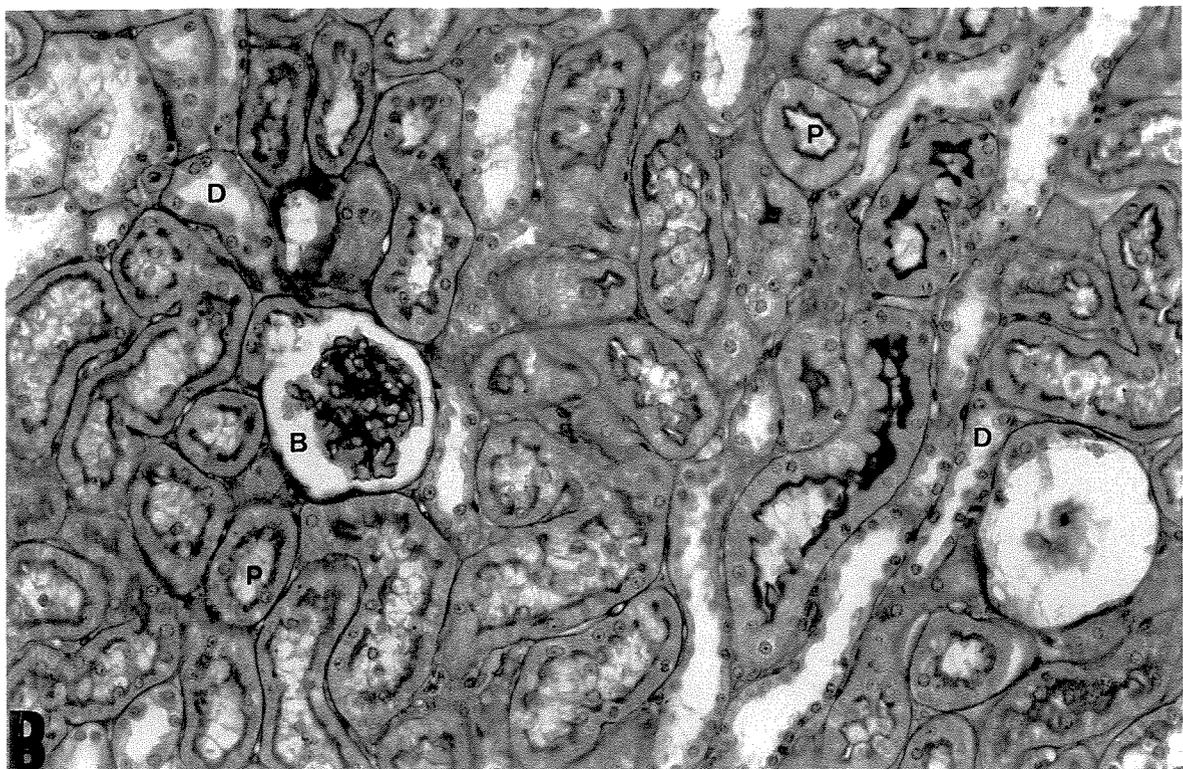
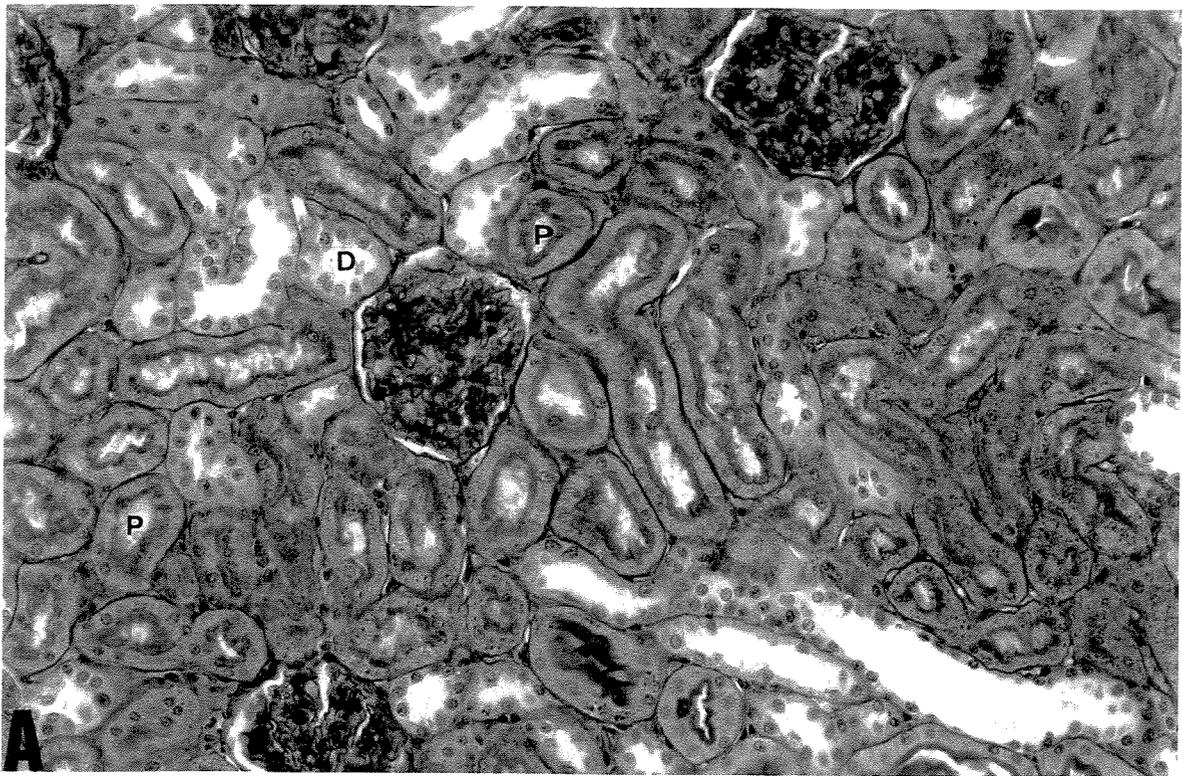


FIGURA 15 - REGIÃO CORTICAL DO RIM, EM MAIOR AUMENTO, APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A - GC:** Observar através desta técnica que os túbulos contorcidos proximais (P) ficaram claramente distingüidos, por causa da presença da bordadura em escova corada em magenta, dos túbulos contorcidos distais (D) que não possuem bordadura em escova. O citoplasma das células do túbulo contorcido proximal se apresentou corado de forma homogênea e os núcleos se apresentaram com cromatina frouxa e nucléolo evidente (450x).
- B – GE_{5h}:** Observe que várias células do túbulo contorcido proximal apresentaram núcleo picnótico (N) e aparentemente houve diminuição do número de núcleos por túbulo. A coloração do citoplasma não foi homogênea, exibindo vacuolização citoplasmática (seta), evidenciada pela baixa densidade do material citoplasmático. Além disso houve edema tubular expresso pelo aumento do diâmetro. Note que os túbulos contorcidos distais parecem ter um epitélio cúbico mais baixo que nos animais controle (450x).

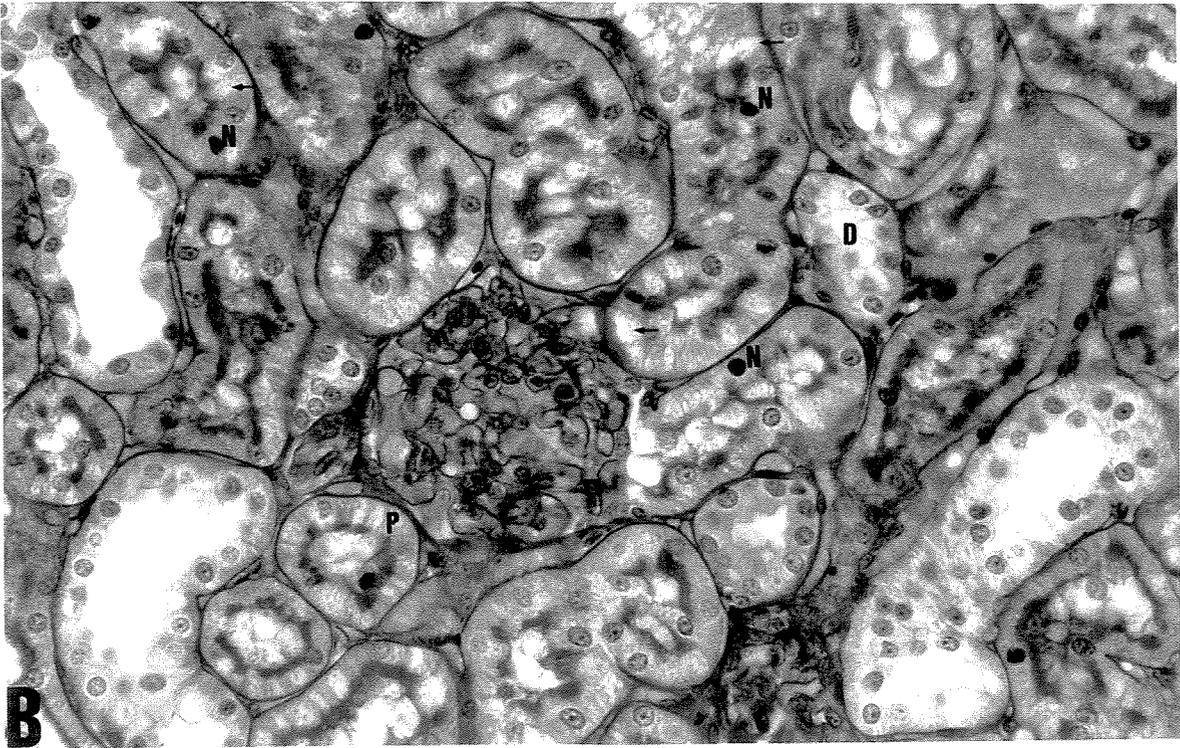
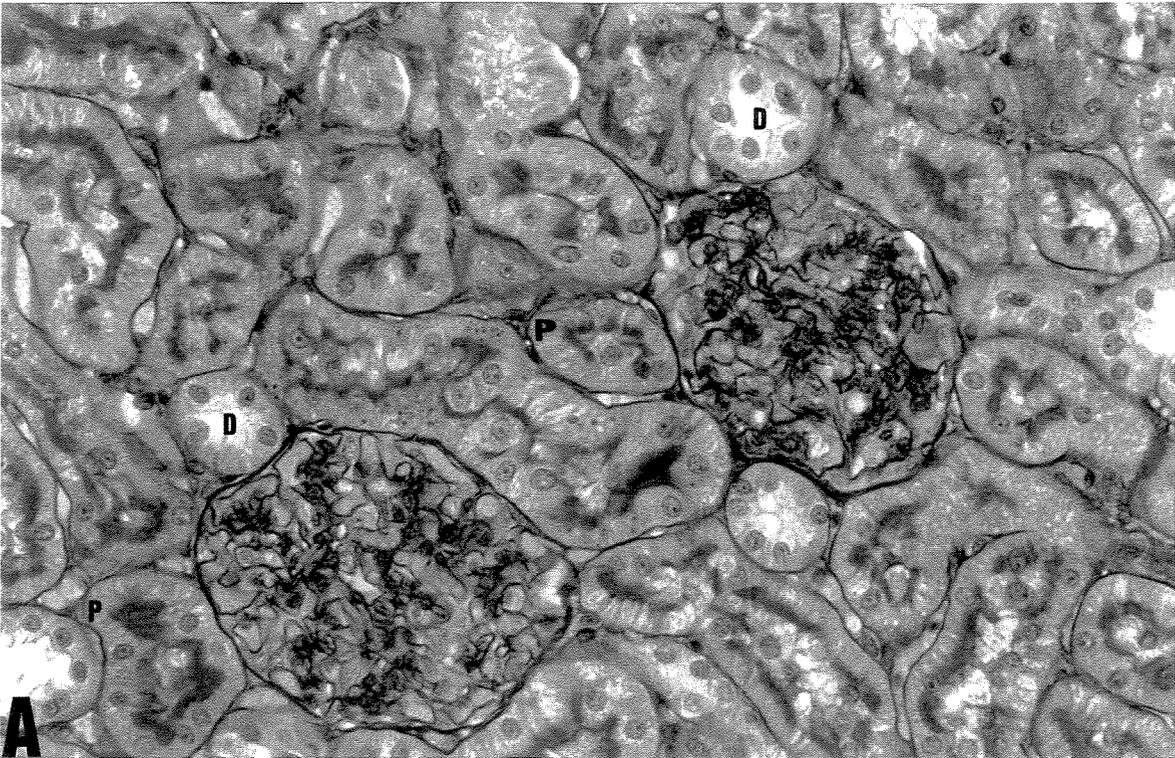
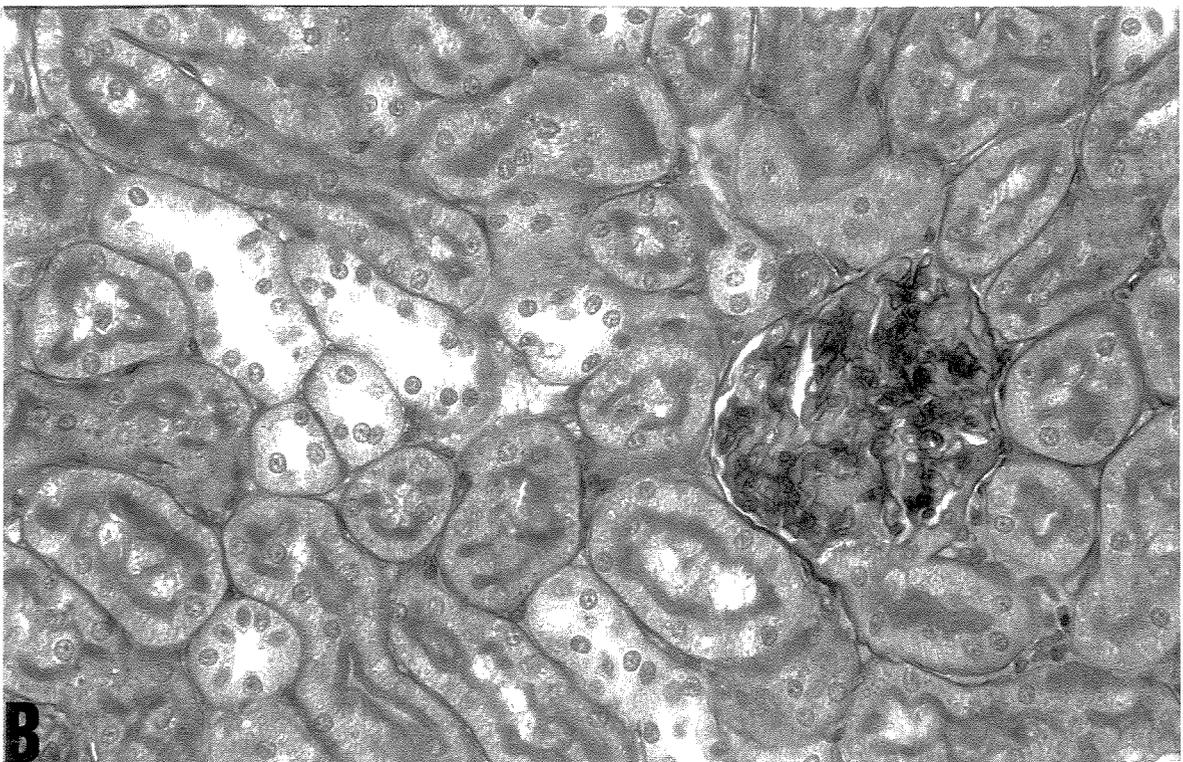
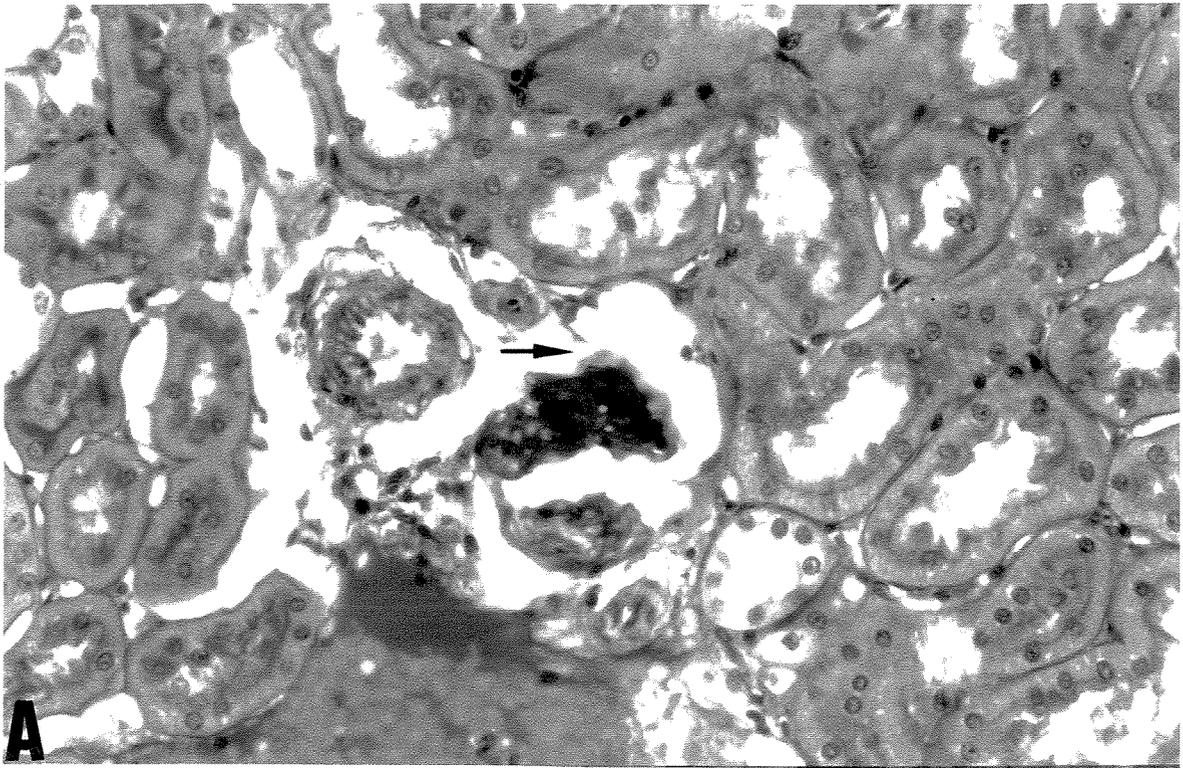


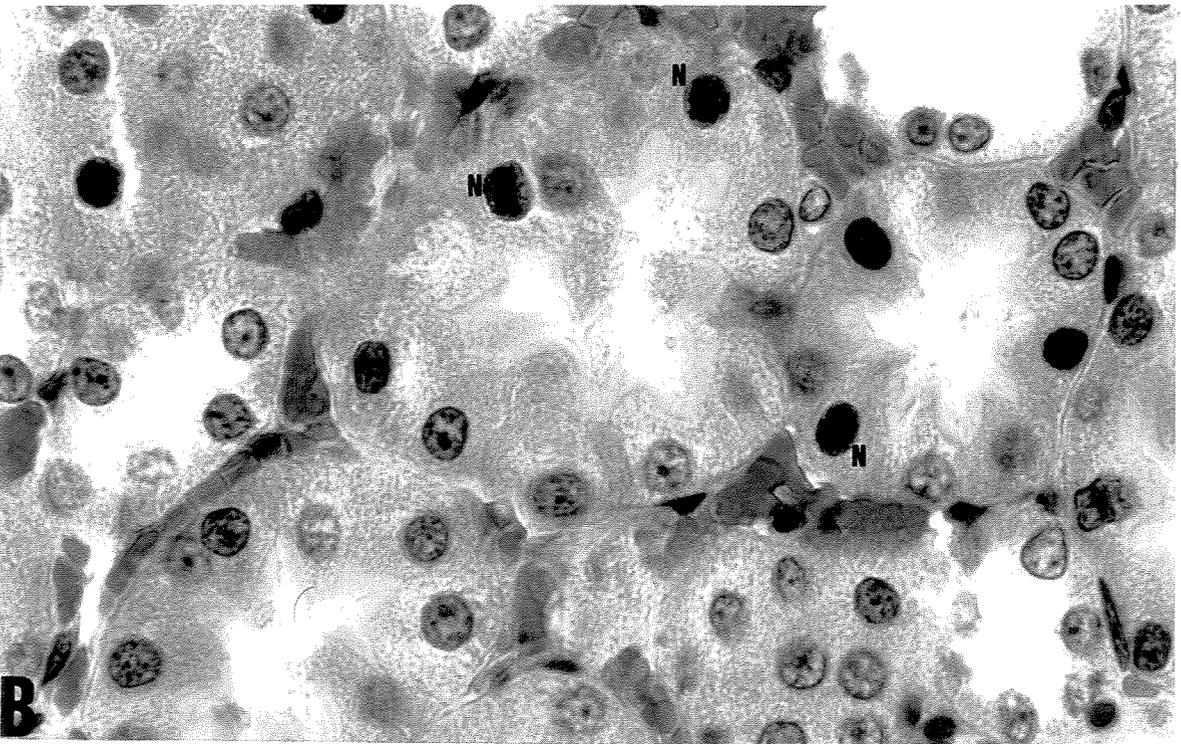
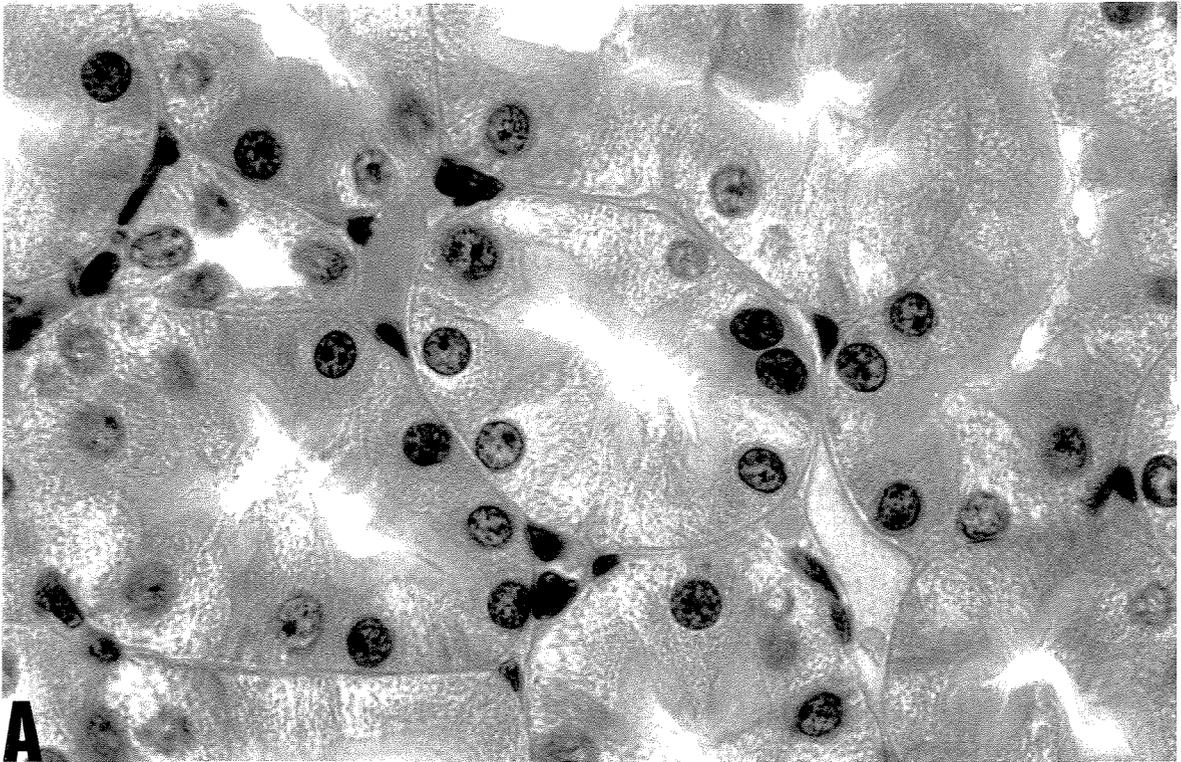
FIGURA 16 – REGIÃO CORTICAL DO RIM, EM MAIOR AUMENTO, APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A – GE_{16h}:** Nesta micrografia pode-se observar que ocorreu rompimento da cápsula de Bowman (seta) e total desarranjo da estrutura glomerular. Os TCP apresentaram células achatadas em relação ao controle e bordadura em escova delgada e descontínua que se corou fracamente. Os TCD ainda se apresentaram dilatados e seu epitélio com aparência cúbica (450x).
- B – GE_{48h}:** Após 48 horas o epitélio dos TCP parece ter recuperado sua forma cilíndrica e a bordadura em escova recuperou sua espessura apresentando-se mais contínua, embora fracamente corada pela técnica de PAS. As células do TCD também recuperaram sua forma normal e provavelmente em consequência disso a luz destes já não se apresenta tão ampla (450x).



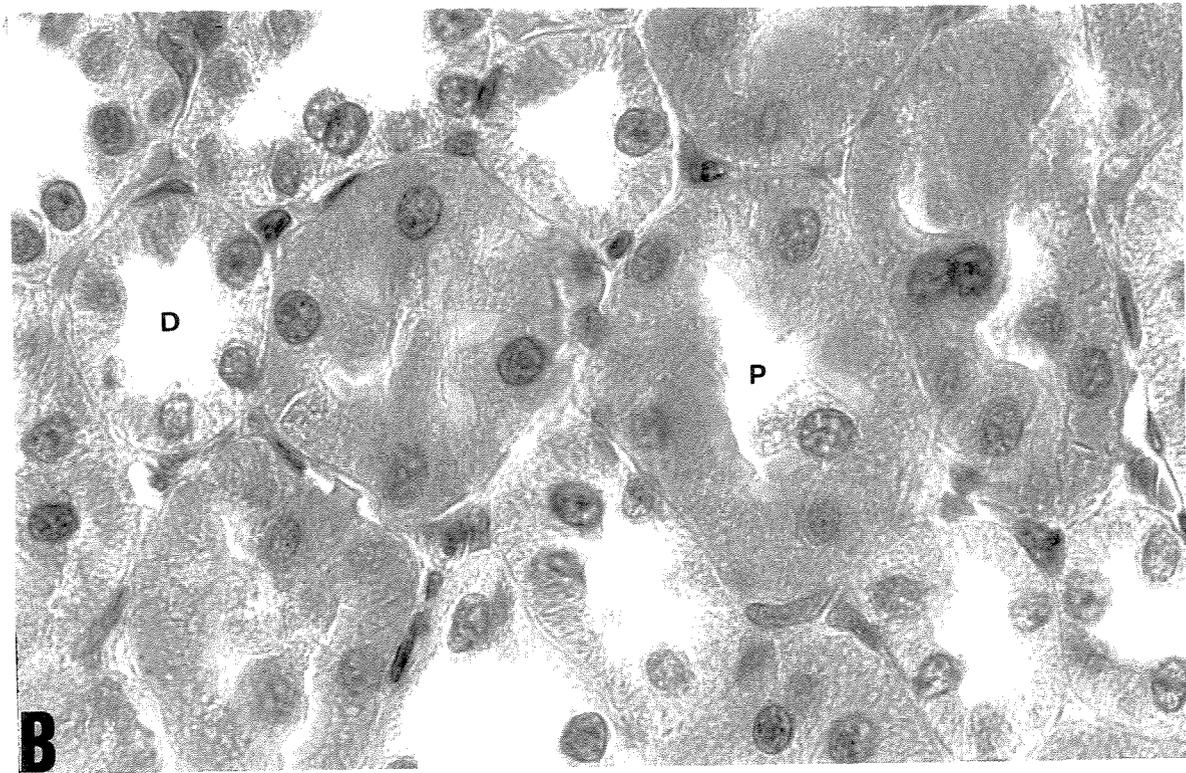
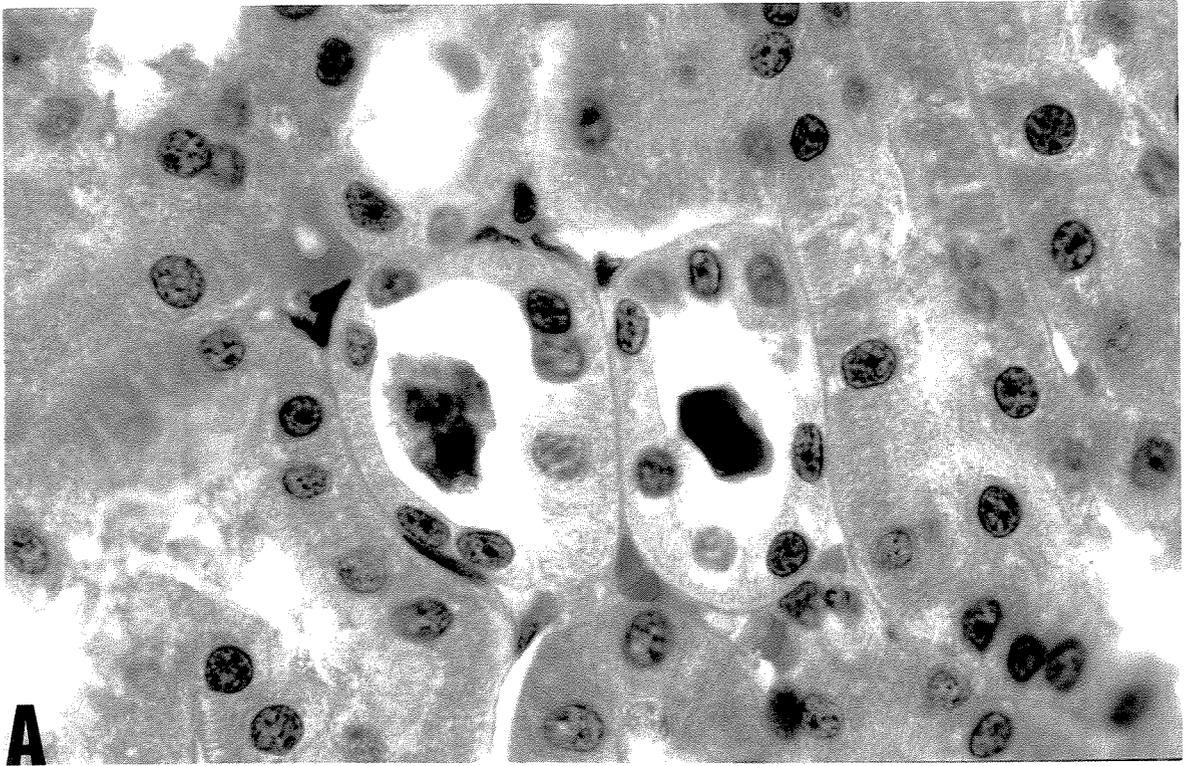
**FIGURA 17 - DETALHE DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
TUBULARES APÓS COLORAÇÃO POR HE.**

- A - GC:** Observe, em corte transversal, porções dos túbulos proximais mostrando núcleos com morfologia normal, citoplasma claro e bordadura em escova bem delineada. Notar que os capilares peritubulares são pouco evidentes (1.125x).
- B- GE_{5h}:** Observar a congestão dos capilares peritubulares com hemácias densamente agrupadas. Os túbulos proximais apresentam várias células com núcleo picnótico (N). Houve aumento evidente da acidofilia citoplasmática indicativa de sofrimento celular, e a bordadura em escova não se apresentou tão bem desenhada como nos animais controle (1.125x).



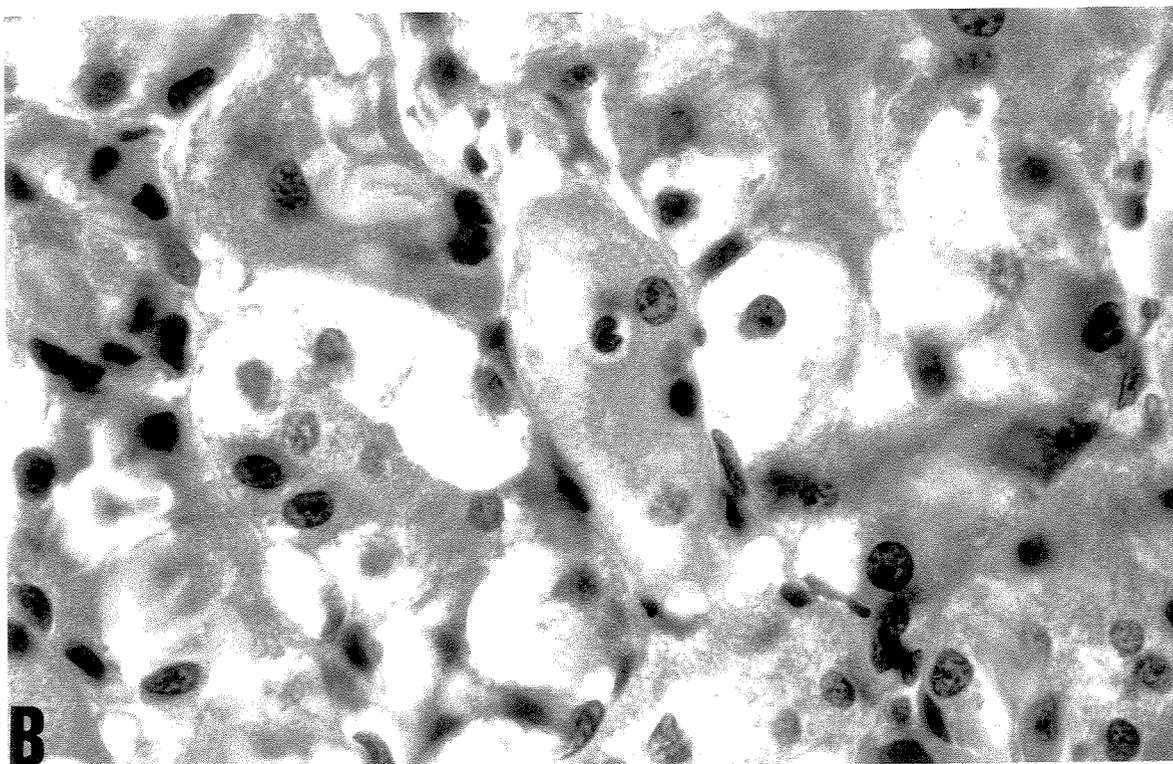
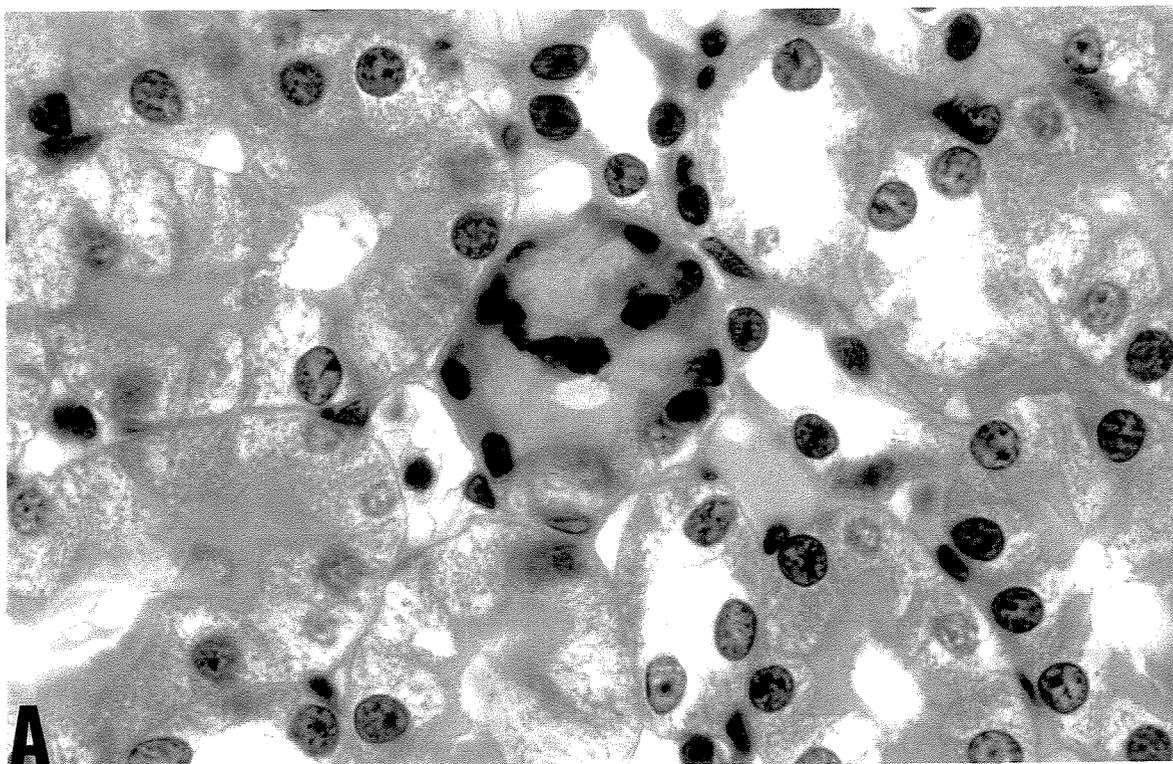
**FIGURA 18 - DETALHE DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
TUBULARES APÓS COLORAÇÃO POR HE.**

- A** – GE_{16h}: Podem ser observados TCD contendo aglomerados de restos celulares que, provavelmente, são resultantes da descamação de regiões anteriores deste néfron. Os capilares peritubulares também apresentam hemácias densamente agrupadas (450x)
- B** – GE_{48h}: Os TCP (P) já não apresentam alterações como as que foram vistas nos outros tempos analisados. Compare o diâmetro, tanto do lúmen quanto do TCD (D) como um todo, nesta foto aos cortes de TCD presentes na foto anterior. Houve evidências de recuperação morfológica tubular após 48 horas (450x).



**FIGURA 19 - DETALHE DA REGIÃO CORTICAL DO RIM DE ANIMAIS DO
GE_{5h}**

- A** - Em destaque, no centro, necrose tubular aguda que caracteristicamente mostrou a alta acidofilia, principalmente do citoplasma basal, e a degeneração dos núcleos com cromatina altamente condensada, os túbulos contorcidos proximais ao redor apresentaram-se com aspecto lavado (HE, 1.125x).
- B** - Observar que a citoarquitetura dos túbulos foi drasticamente alterada, não sendo possível observar a delimitação dos mesmos (HE, 1.125x).



**FIGURA 20 – DETALHE DA REGIÃO CORTICOMEDULAR DO RIM APÓS
COLORAÇÃO COM HE.**

- A** – GE_{16h}: Em menor aumento é possível constatar a ocorrência de grandes áreas de necrose (450x).
- B** –GE_{16h}: Detalhe de região de necrose tubular mostrando uma drástica desorganização tubular (1.125x).
- C** – GE_{16h}: Nesta micrografia é mostrada uma região, onde ainda é possível ver a delimitação dos túbulos, mas as células apresentam citoplasma com aspecto lavado, extensa vacuolização (seta) e picnose nuclear (N) (1.125x).

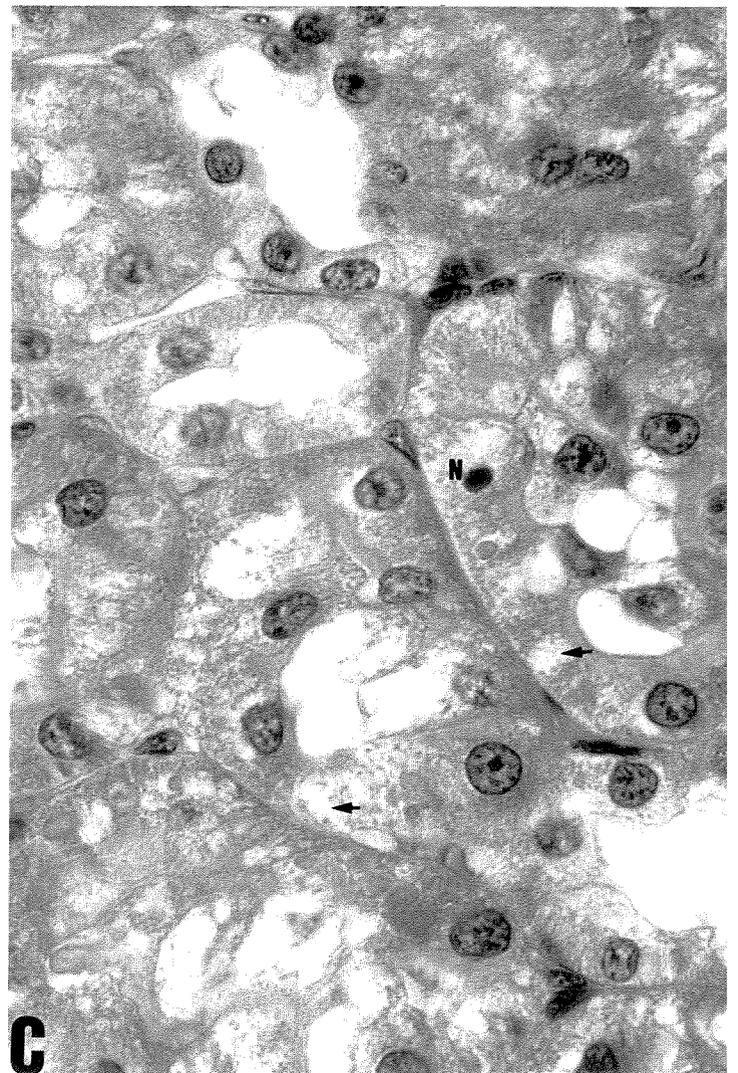
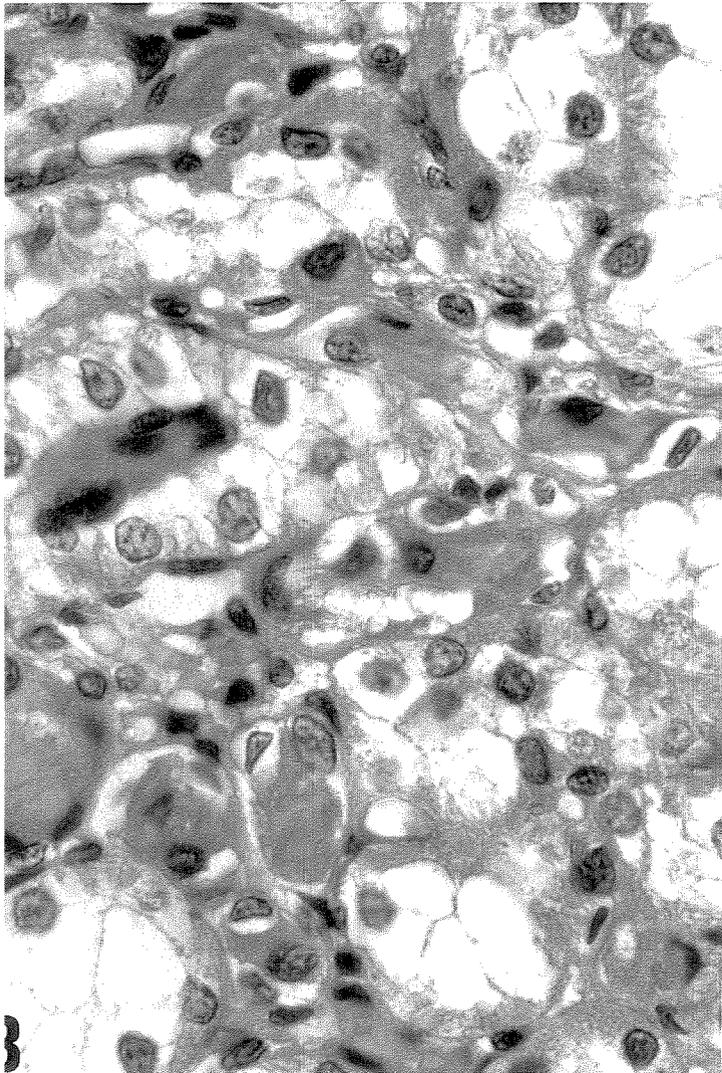
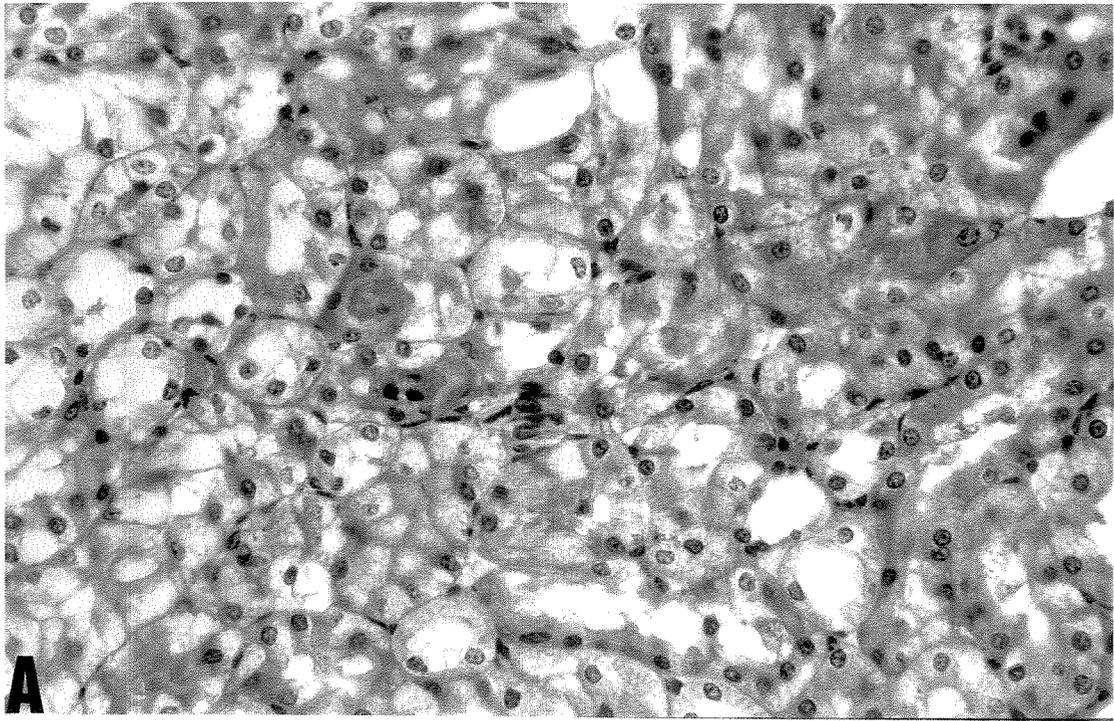
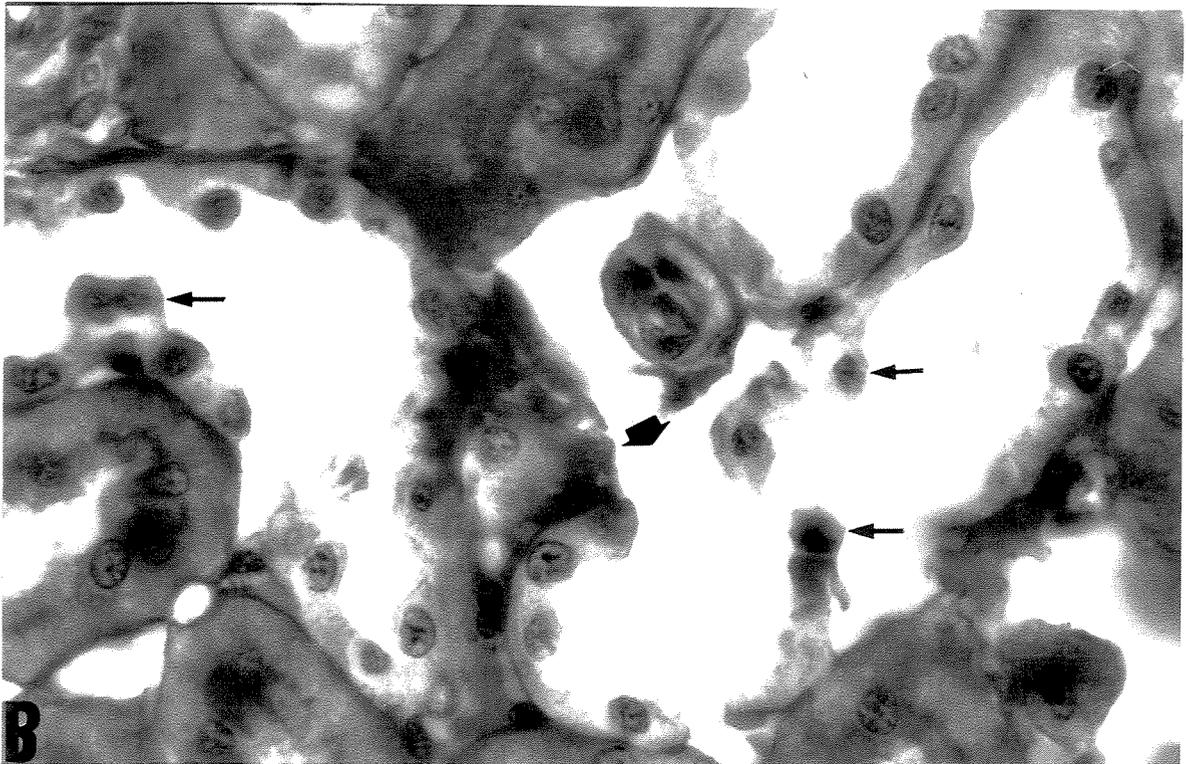
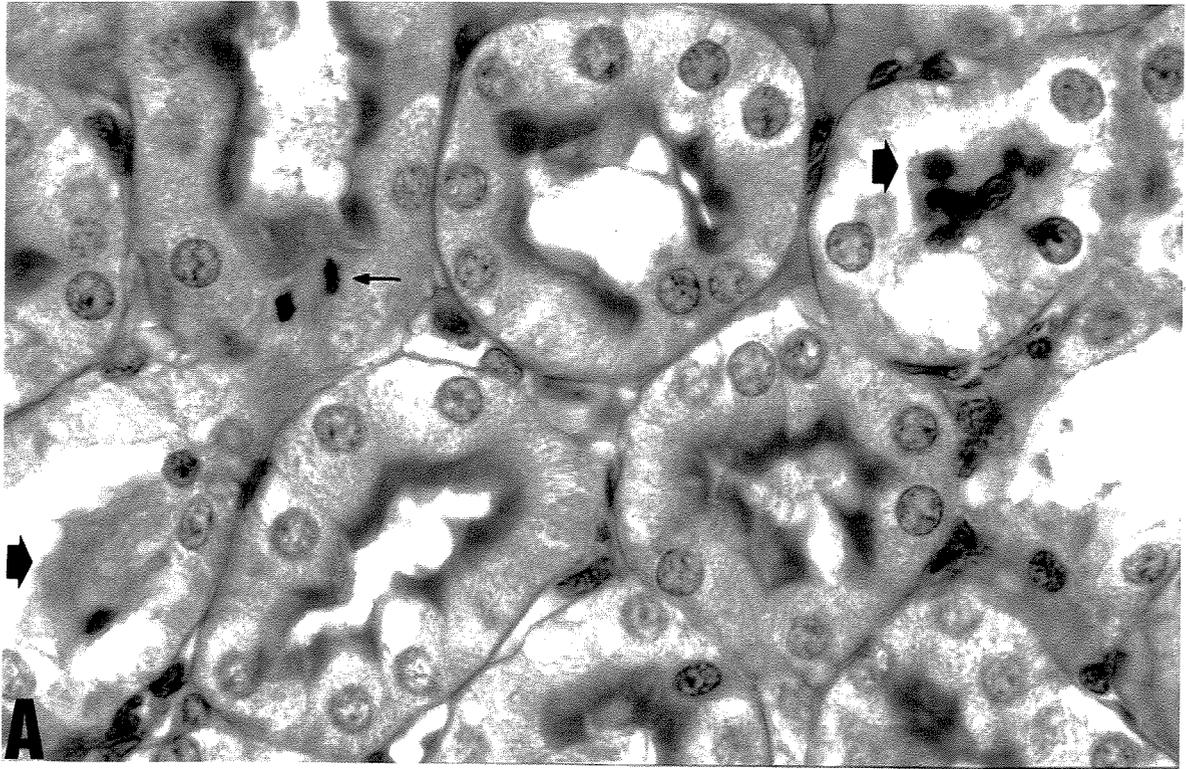


FIGURA 21 – DETALHE DOS TÚBULOS CORTICAIS APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A** – GE_{16h}: Podem ser observados TCP cujo epitélio apresentou citoplasma lavado e vários restos celulares na luz (cabeça de seta). Em contrapartida, pode-se observar uma figura mitótica (seta) em um TCP (1.125x).
- B** – GE_{16h}: Em outras regiões foi observado rompimento de túbulos distais e membrana basal (cabeça de seta) e perda de várias células (seta) demonstrando importante comprometimento destes (1.125x).



**FIGURA 22 - DETALHE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS
CORPÚSCULOS RENAIIS.**

- A - GC:** Corpúsculo renal onde podem ser vistas as células do epitélio parietal (EP), os podócitos (PO), as células mesangiais (M) e as células do endotélio dos capilares glomerulares (E) (HE, 1.125x).
- B – GE_{5h}:** Nos animais envenenados outro aspecto observado nos corpúsculos renais que parecem mostrar hiper celularidade glomerular. Notar a presença de neutrófilos (seta) (HE, 1.125x).

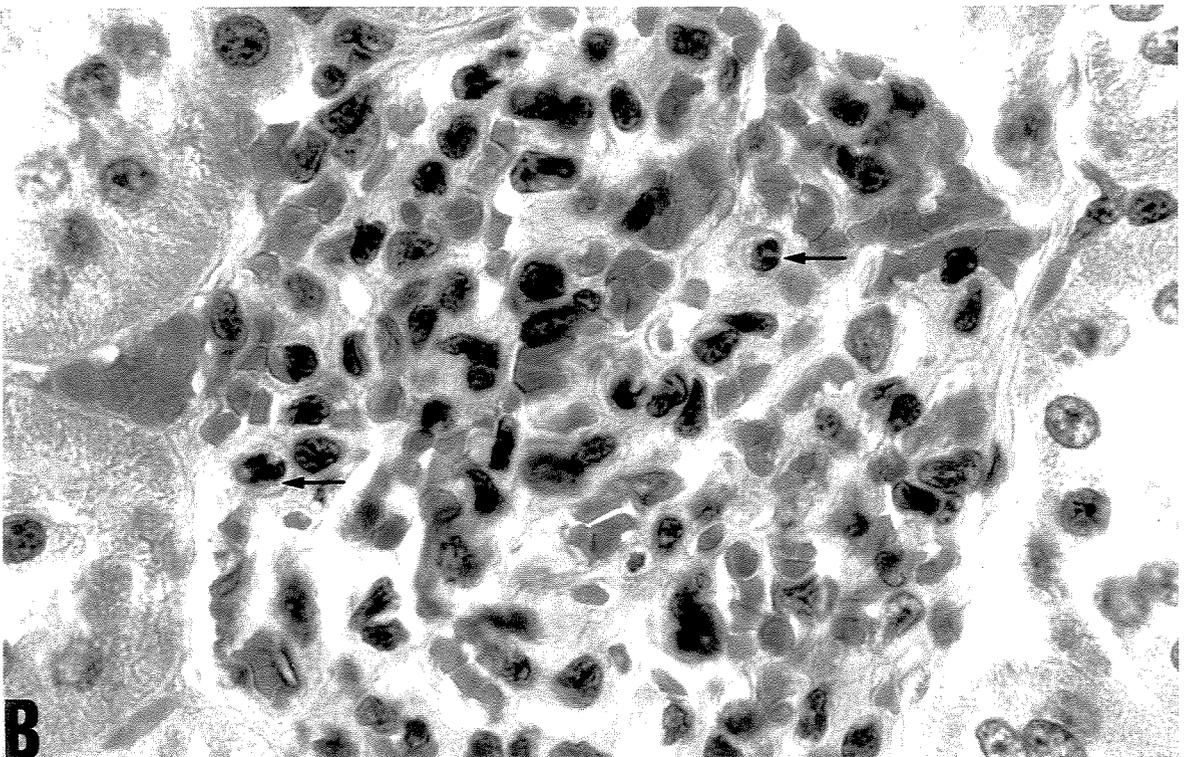
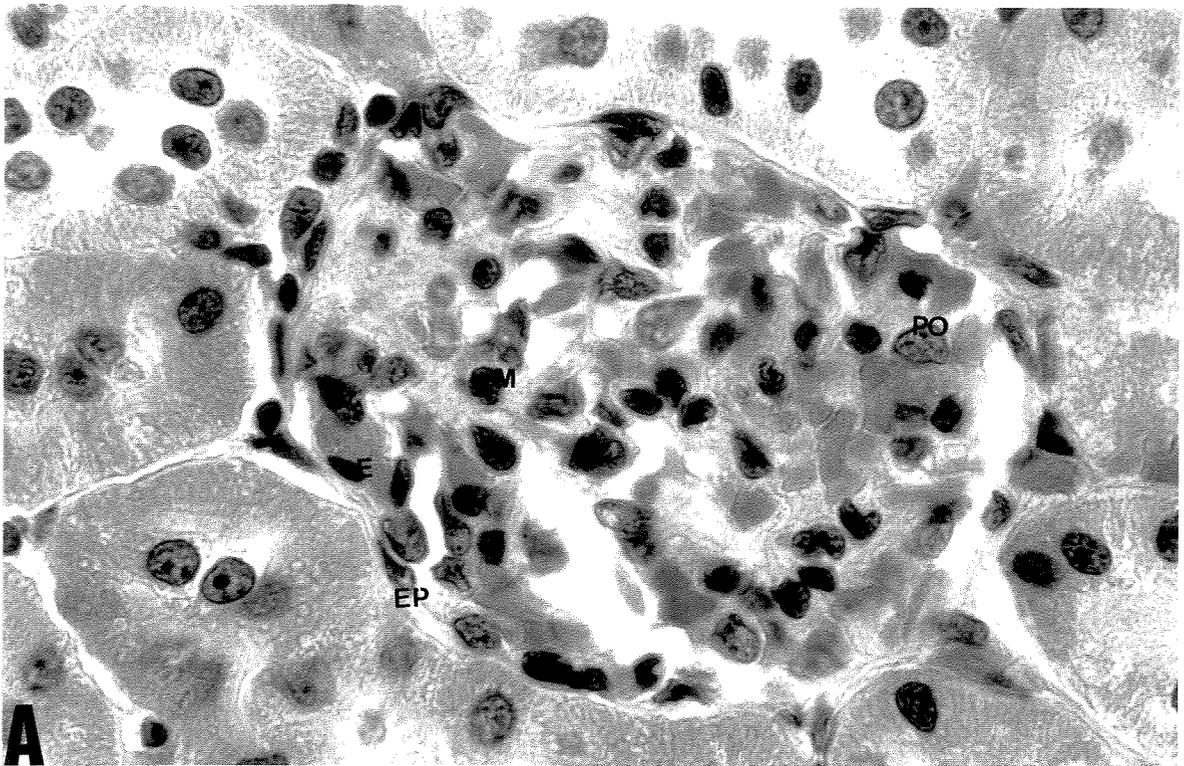


FIGURA 23 - REAÇÃO DE FEULGEN EM CORPÚSCULOS RENAIIS.

- A** - GC: Note o destaque dado pela reação aos núcleos dos diferentes tipos de células (1.125x).
- B** - GE_{5h}: Sob a ação do veneno, parece ocorrer aumento na celularidade do glomérulo. Note ainda a condensação da cromatina nuclear evidenciada por esta reação que cora o DNA (1.125x).

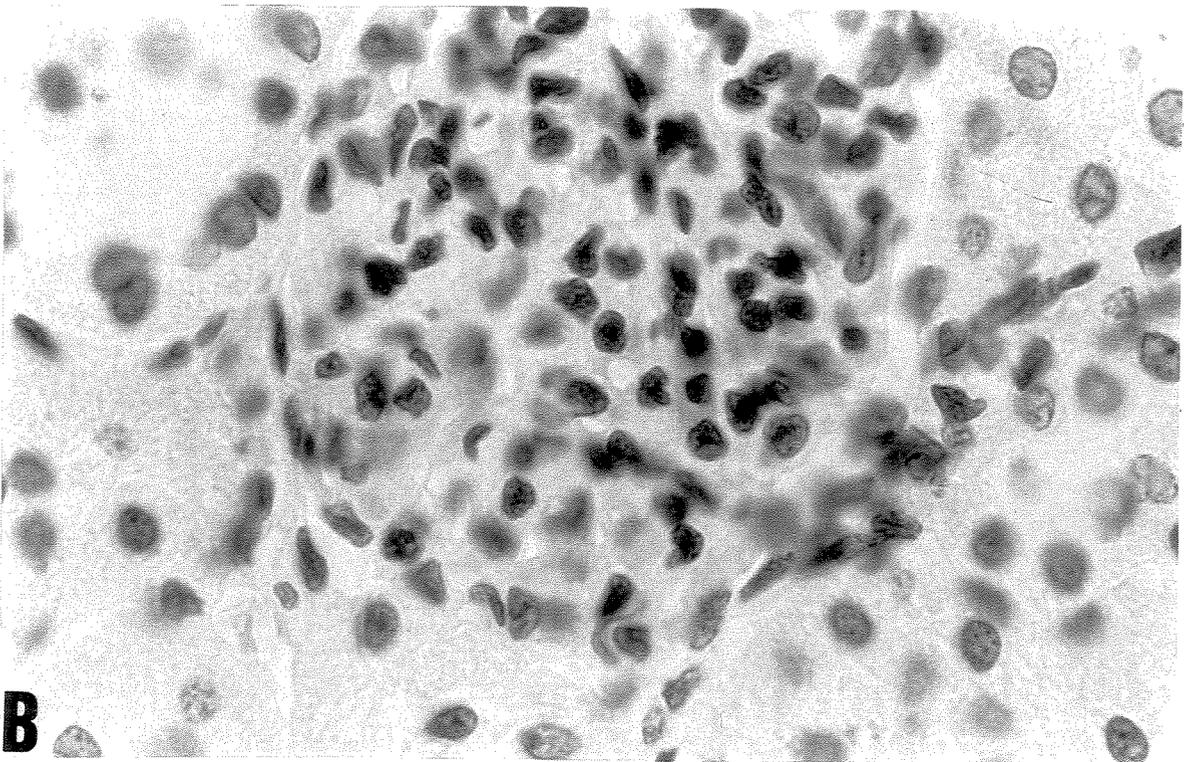
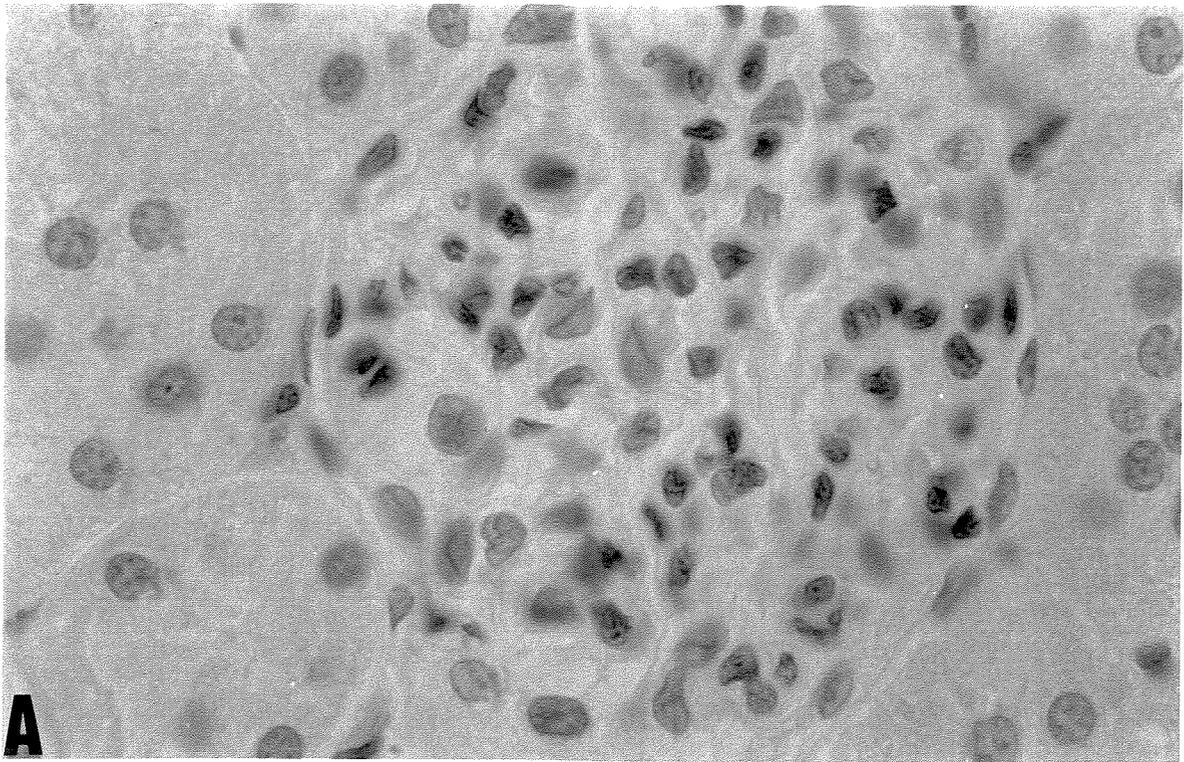
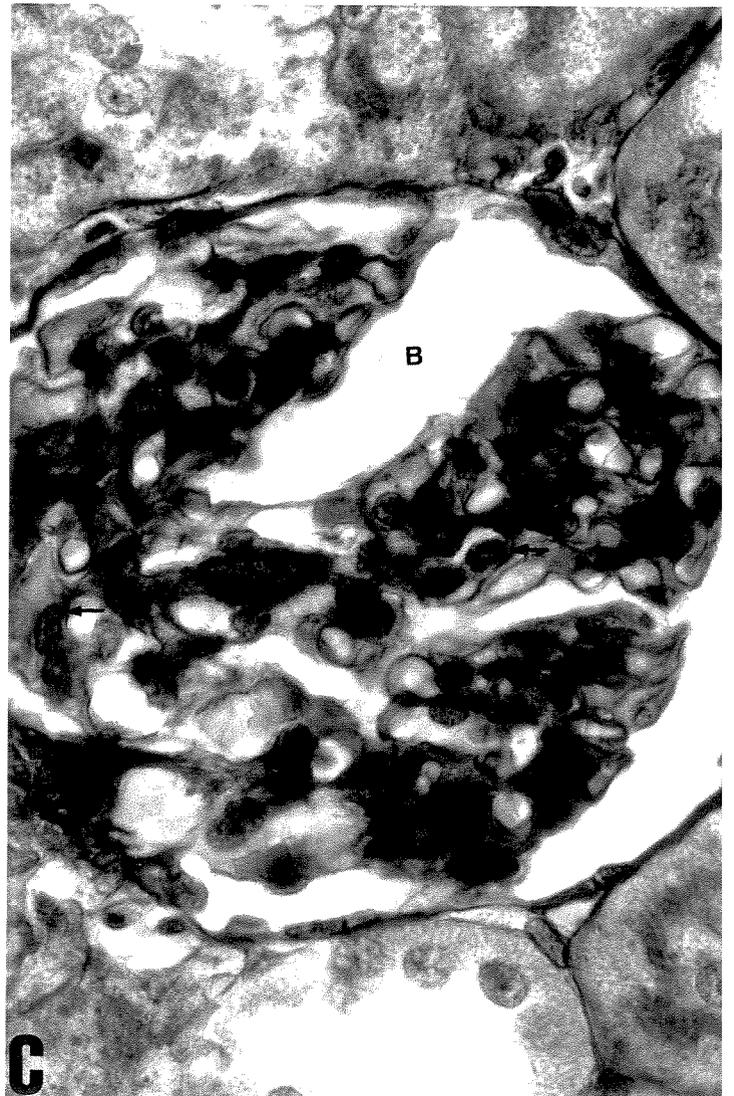
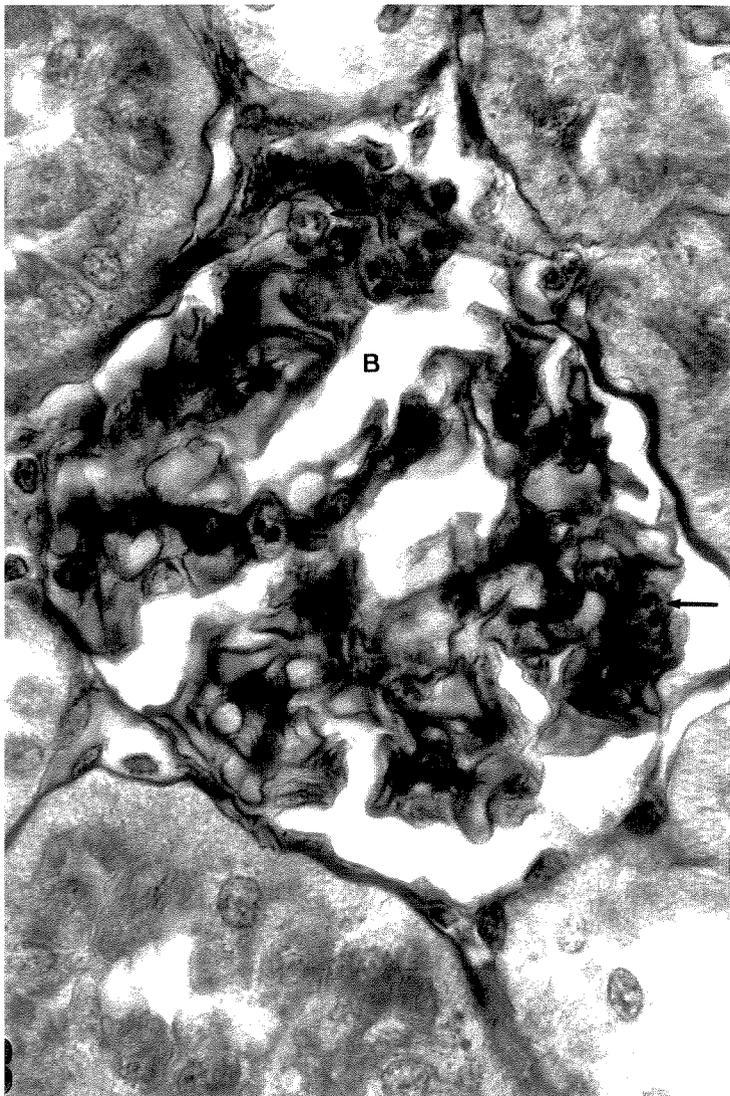
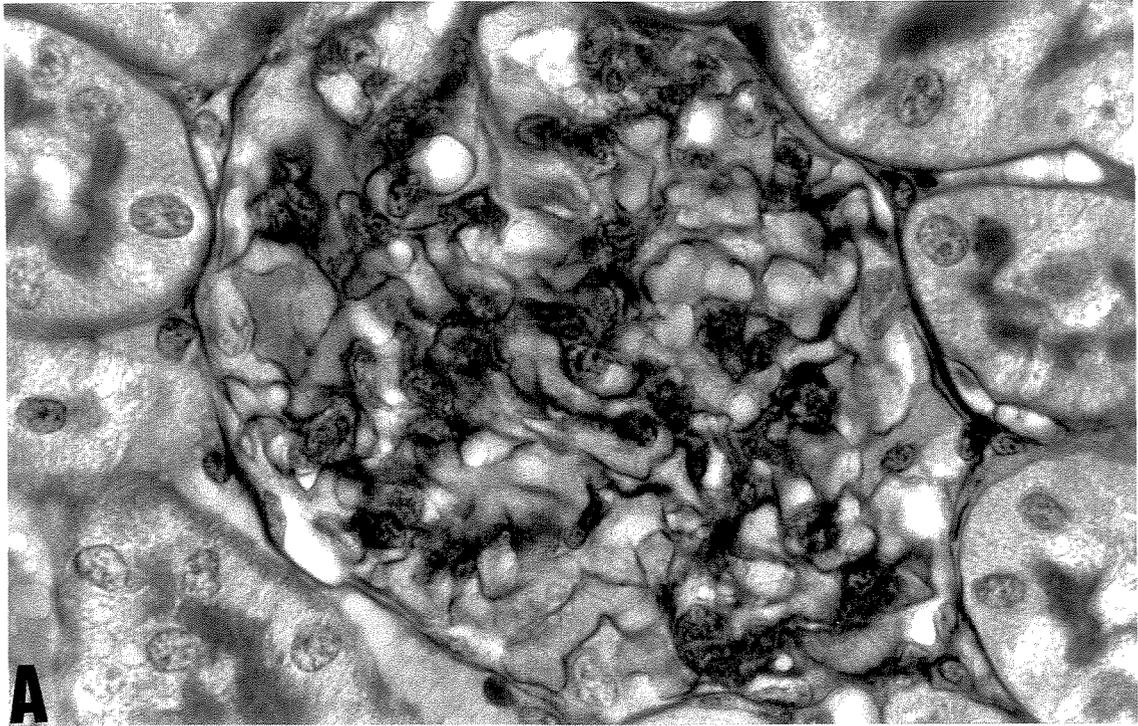


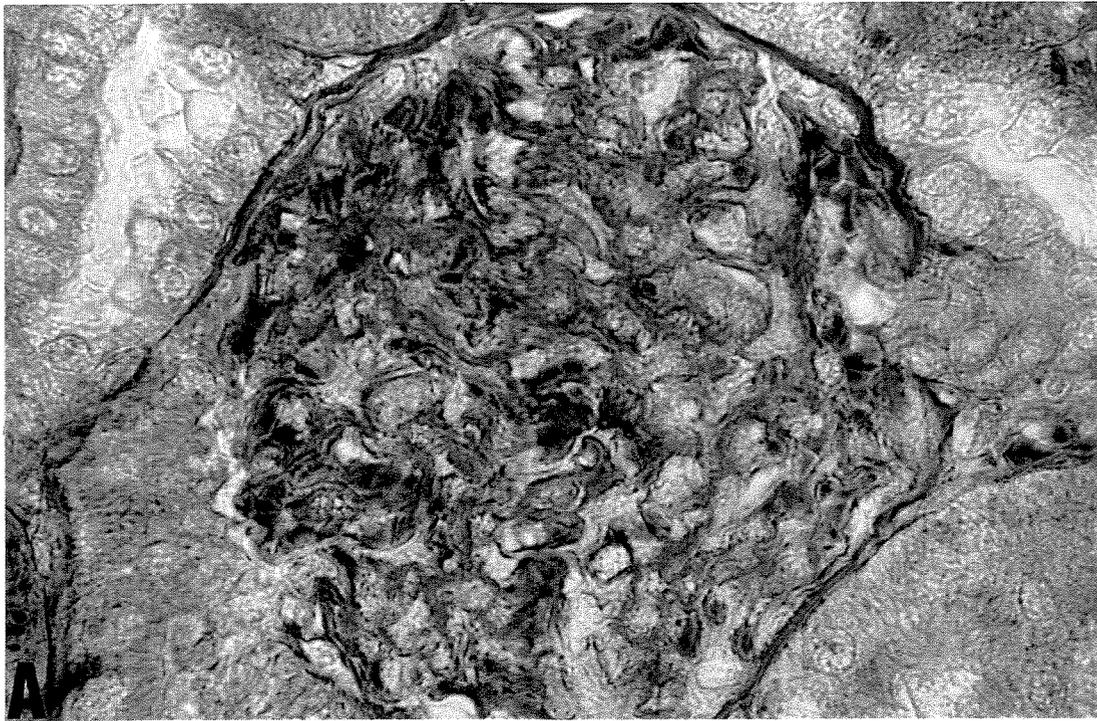
FIGURA 24 - DETALHE DE CORPÚSCULOS RENAIIS APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A - GC:** Estrutura normal do corpúsculo renal como descrito na figura anterior. Ao redor uma série de túbulos contorcidos proximais com estrutura íntegra (1.125x).
- B e C – GE_{5h}:** Sob ação do veneno, os corpúsculos renais em aumento maior, evidenciando extravasamento mesangial difuso (*) e a formação de lesões lobulares separadas pelo espaço de Bowman (B) aumentado. Infiltração neutrofílica (seta) também pode ser observada (1.125x).



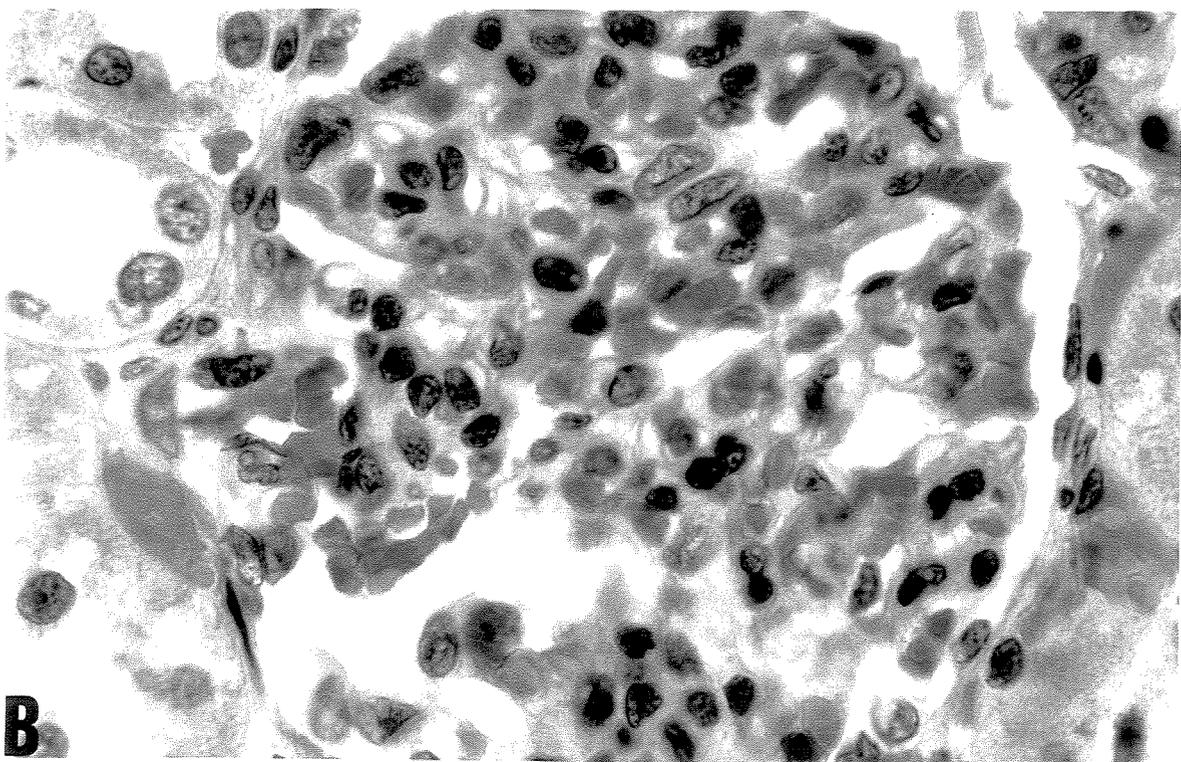
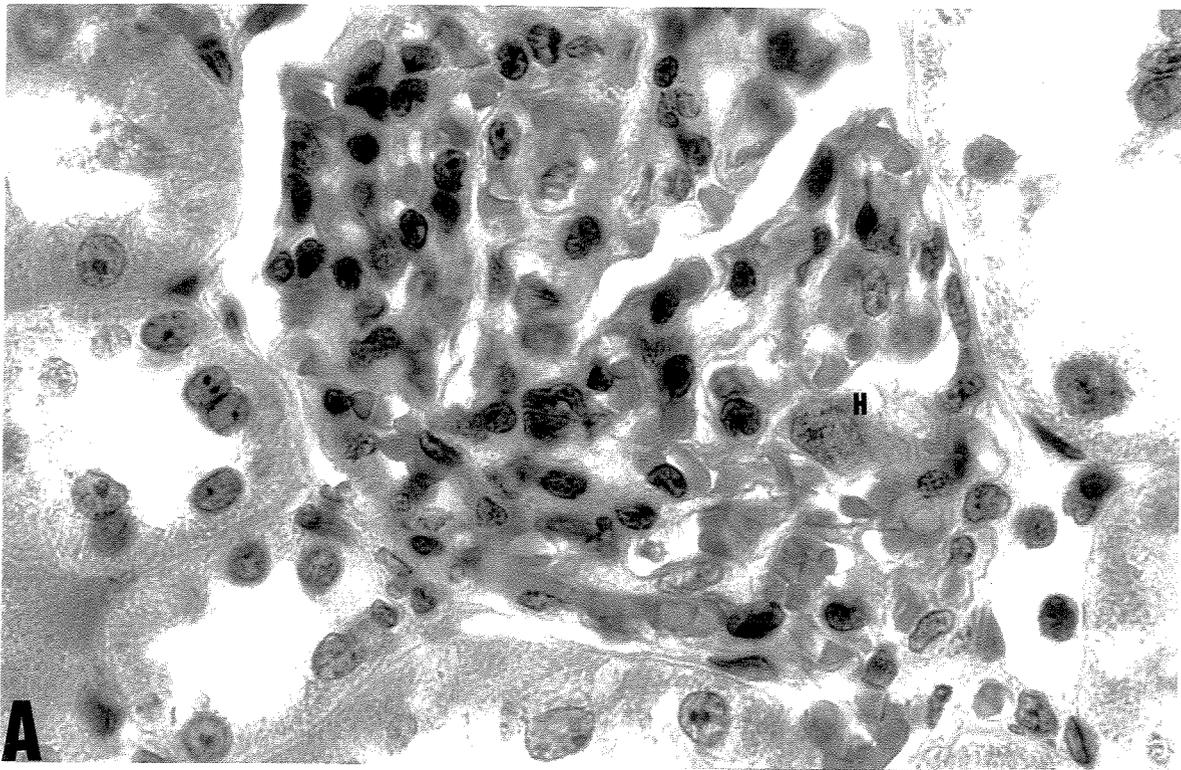
**FIGURA 25 – DETALHE DE CORPÚSCULOS RENAI APÓS COLORAÇÃO
PELA HEMATOXILINA FOSFOTÚNGSTICA DE MALLORY.**

- A** – GC: Estrutura normal do corpúsculo renal. Repare no contorno dos capilares em vermelho alaranjado. Em roxo, hemácias na luz dos capilares. Repare que o citoplasma das células epiteliais dos túbulos se apresentou pouco corado. No canto inferior direito, um corte de TCP. Note que a bordadura deste cora-se em laranja claro. Esta técnica é específica para detecção de fibrina que, se presente, cora-se em azul-negro (1,125x).
- B** – GE_{5h}: O tufo capilar sofreu retração e conseqüentemente o espaço de Bowman está aumentado. Repare aqui, que os nódulos vistos nas micrografias anteriores, são compostos por elementos da matriz extracelular (*) pois coraram – se intensamente de vermelho alaranjado. Não foi observado fibrina no glomérulo. O citoplasma basal do epitélio dos túbulos se apresentou intensamente corado de roxo (1.125x).
- C** – GE_{16h}: Aqui podemos observar uma condensação maciça dos capilares glomerulares. Já não é possível distinguir o limite dos mesmos. Observe que os túbulos ao redor apresentam células destruídas (1.125x).
- Repare ainda que em A, os túbulos ao redor do corpúsculo apresentam-se com pequenas pontuações, coradas em roxo, na porção basal das células representando as mitocôndrias. Já em B e C podemos observar intensa coloração basal nestes túbulo devida à alterações mitocôndriais.



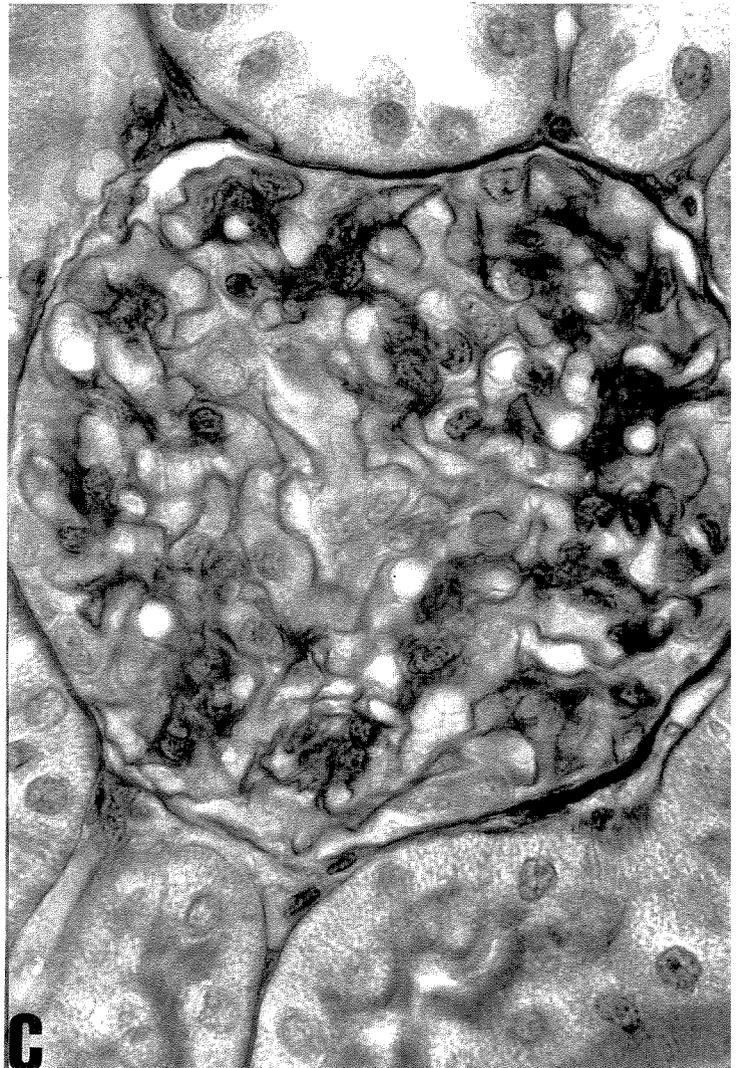
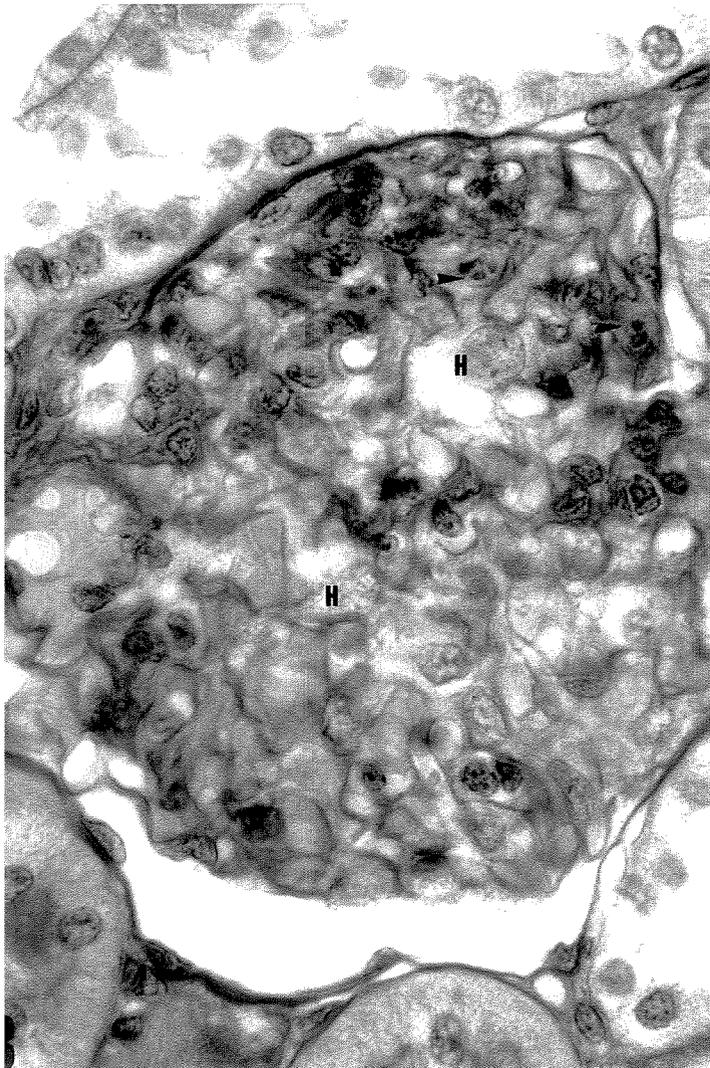
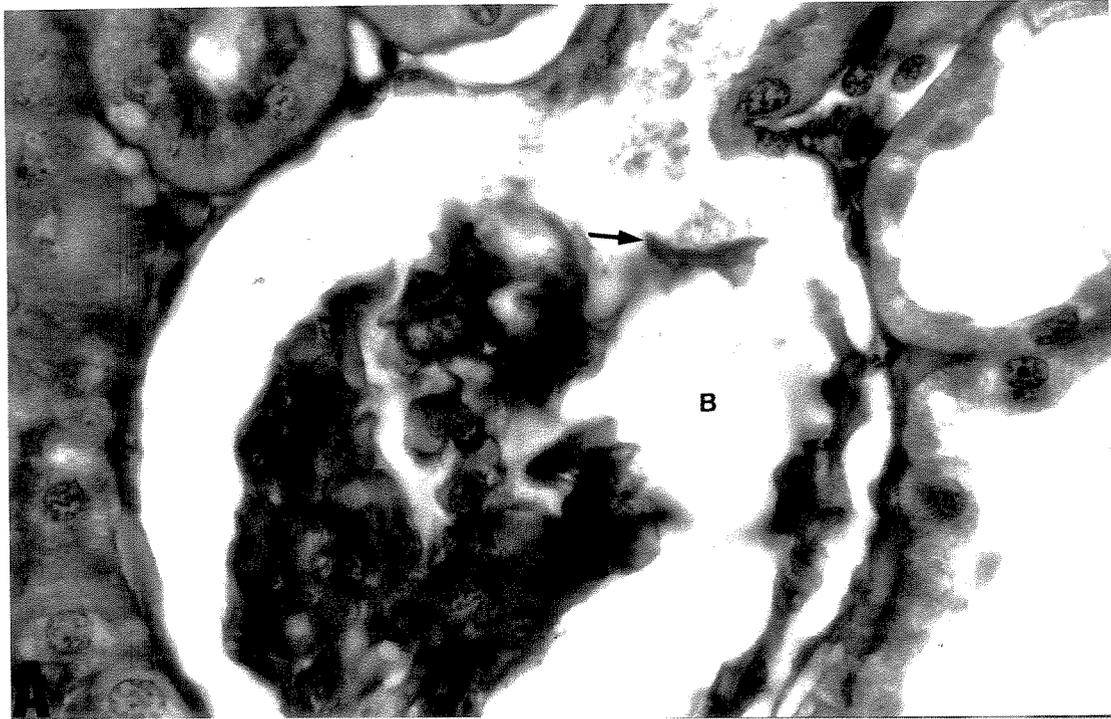
**FIGURA 26 –DETALHE DE CORPÚSCULOS RENAIIS APÓS COLORAÇÃO
COM HE.**

- A** – GE_{16h}: Nos animais deste grupo a lobulação do tufo glomerular foi menos evidente. Porém, foram encontrados vários núcleos hipertróficos (H) (1.125x).
- B** – GE_{48h}: Após 48 horas não foram encontradas lobulações nem tampouco neutrófilos nos tufos glomerulares (1.125x).



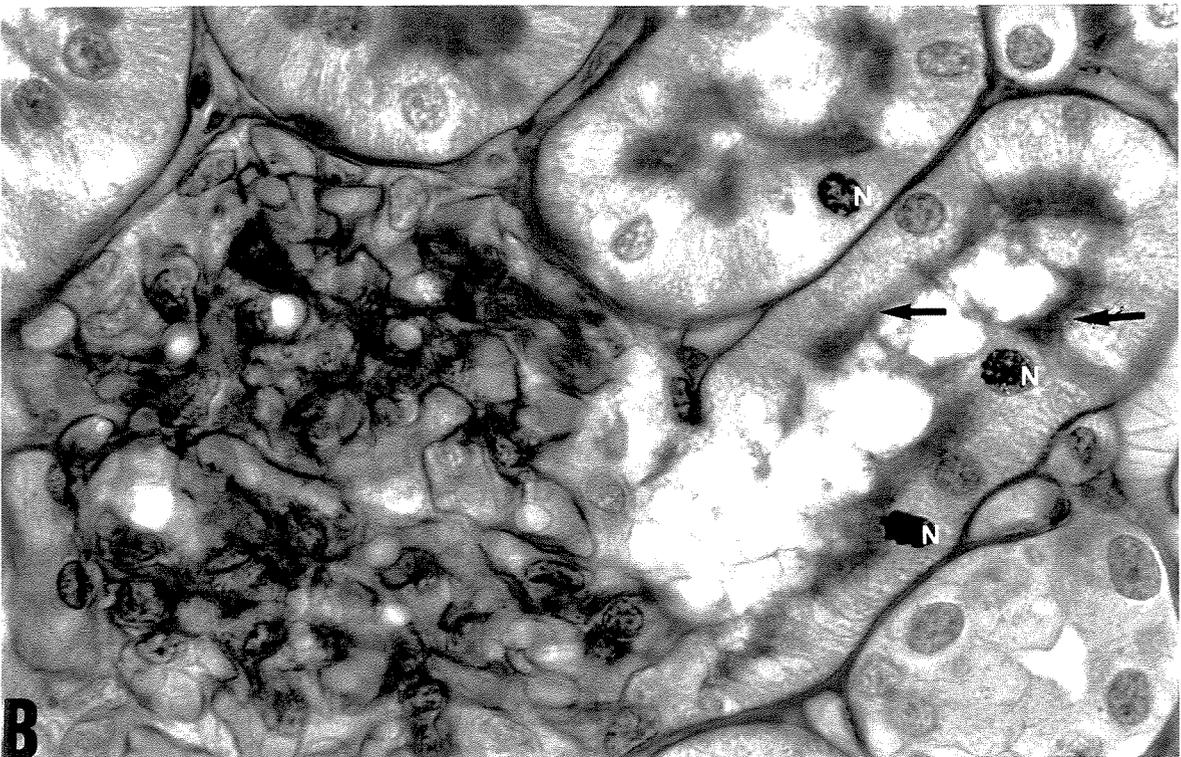
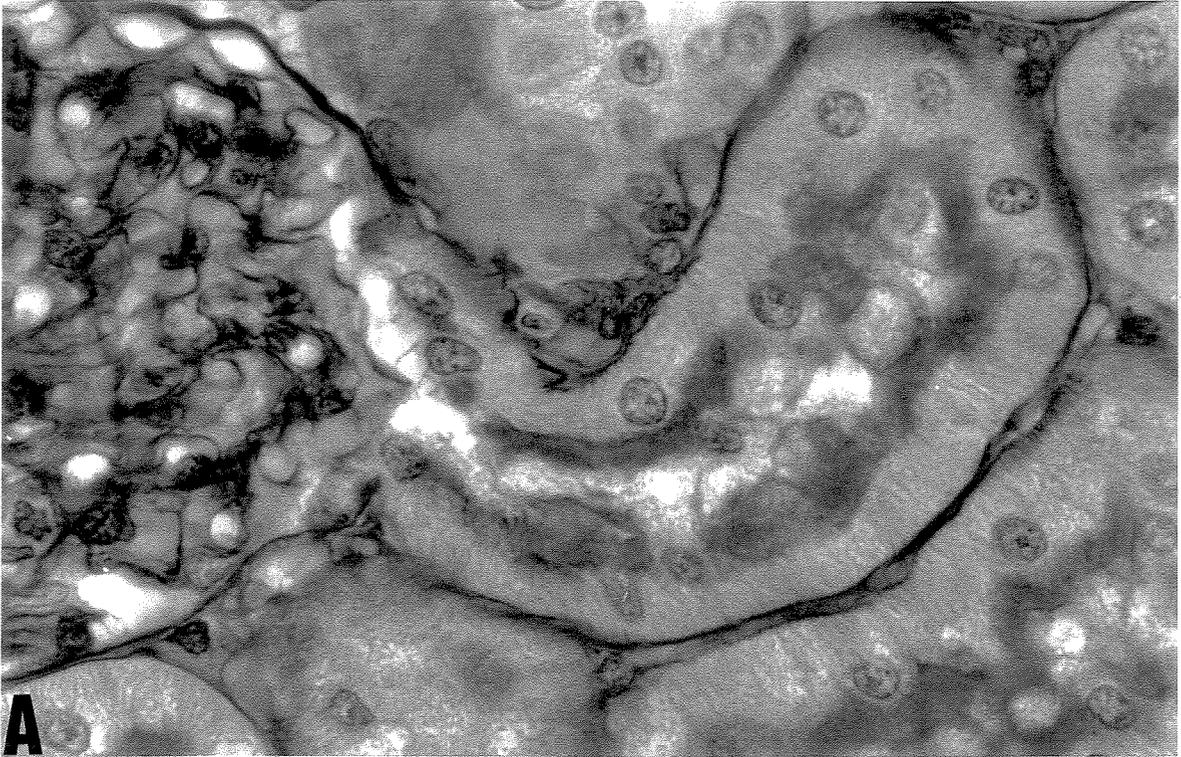
**FIGURA 27– DETALHE DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE
CORPÚSCULOS RENAI APÓS REAÇÃO DE PAS.**

- A** – GE_{16h}: Embora tenham sido raramente encontrados glomérulos com lobulações, alguns deles apresentaram alterações severas. Repare que a matriz mesangial se apresentou espessa e aglutinada estando densamente corada, não sendo possível observar as alças capilares. Conseqüentemente, o espaço de Bowman (B) apresenta-se dilatado. Foi possível observar perdas de porções do tufo glomerular (seta). O epitélio dos túbulos distais, a direita, apresentou-se descontínuo e achatado (1.125x).
- B** – GE_{16h}: Outros corpúsculos se apresentaram corados com menor intensidade, devido ao comportamento difuso da matriz mesangial, permitindo melhor visualização das alças capilares. Note novamente a presença de núcleo hipertrófico (H) e neutrófilos (cabeça de seta) (1.125x).
- C** – GE_{48h}: Observe que o comportamento da matriz mesangial se assemelha ao da foto anterior. O espessamento mesangial difuso visto nos glomérulos do GE₁ não ocorreu, ao invés disso são vistas grandes áreas de matriz fracamente corada se comparada ao GC. Não foram encontrados neutrófilos (1.125x)



**FIGURA 28 - DETALHE DO POLO URINÁRIO DE CORPÚSCULOS RENAIIS
APÓS REAÇÃO DO PAS.**

- A - GC:** Observar que no polo urinário, onde nasce o túbulo contorcido proximal, as células deste se apresentam com núcleos claros e nucléolo evidente, citoplasma corado de forma homogênea, bordadura em escova bem delineada e a estriação do citoplasma é bem nítida (1.125x).
- B – GE_{5h}:** O citoplasma de algumas células apresentou coloração mais fraca, sendo que nas regiões mais claras houve ausência da estriação basal; outras apresentaram núcleos picnóticos (N) e a bordadura em escova se apresentou aglutinada (seta). Note que estas características, já demonstradas nas figuras anteriores, acometem o TCP desde a sua origem (1.125x).



**FIGURA 29– DETALHE DO POLO URINÁRIO DE CORPÚSCULOS RENAIIS
APÓS REAÇÃO DO PAS.**

- A** – GE_{16h}: Este tufo glomerular também apresentou perda de porções (cabeça de seta) e espaço de Bowman (B) dilatado. Frequentemente, foi possível observar figuras mitóticas (seta) próximas a regiões severamente afetadas (1.125x).
- B** – GE_{48h}: Repare que em algumas regiões deste tufo glomerular é possível observar a delimitação dos capilares e em outras não, estando a matriz aglutinada e espessa. O epitélio do TCP no polo urinário, apresenta células altas com espessa bordadura em escova (1.125x).

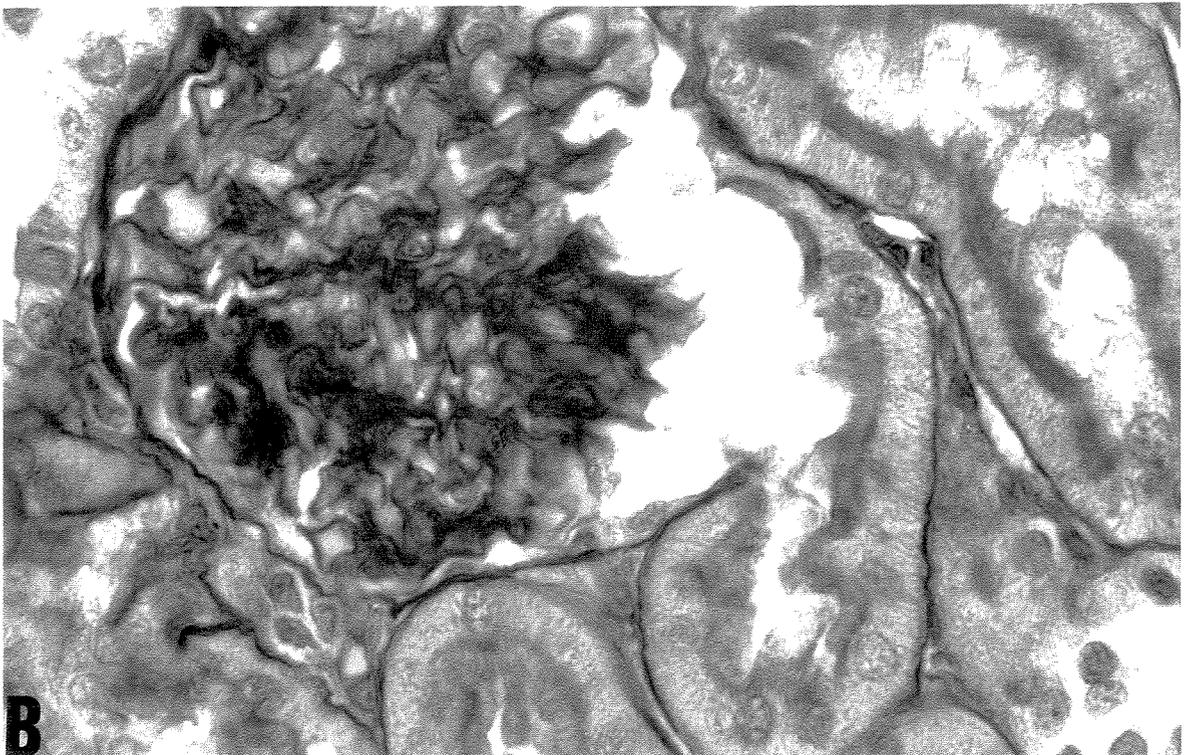
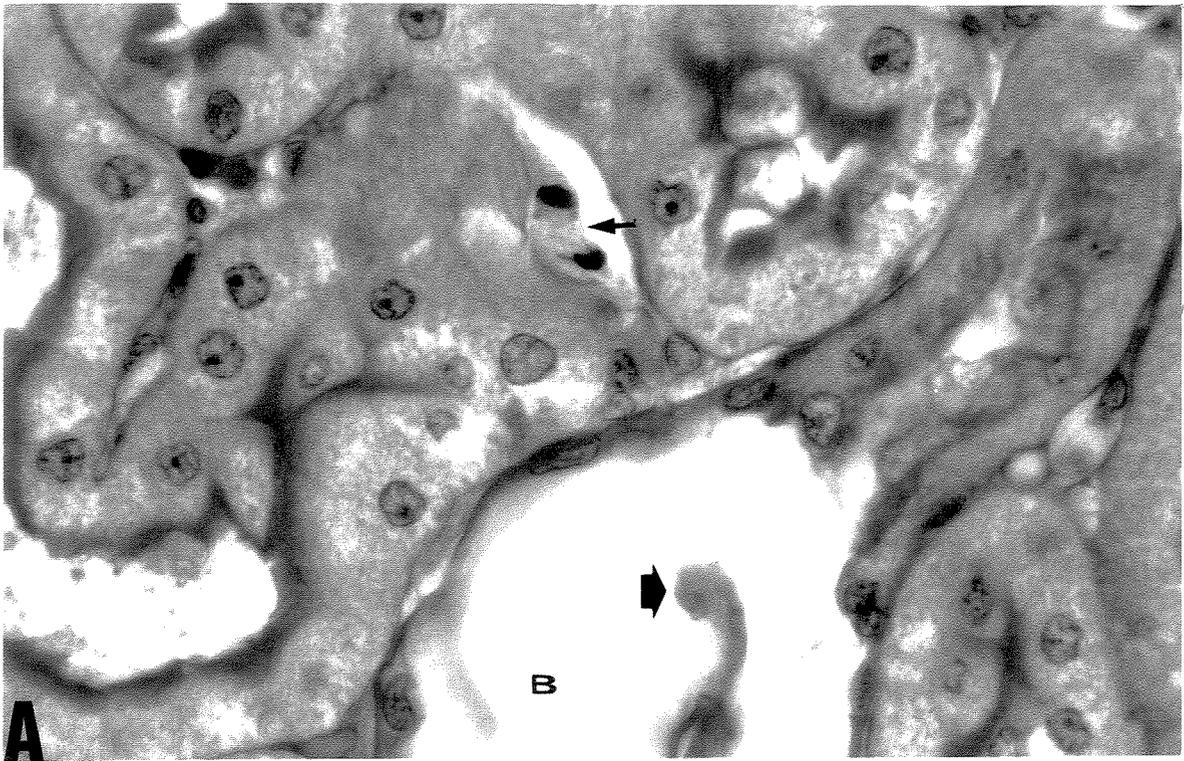


FIGURA 30 - REGIÃO MEDULAR DO RIM APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A** – GE_{5h}: Sob a ação do veneno, os ductos coletores (C) apresentaram-se edematosos e com contornos mais sinuosos. A região demonstrou grande quantidade de segmentos dos ramos finos da alça de Henle (H). Interessantemente, na luz dos ductos coletores aparecem restos de células degeneradas ou necróticas que descamaram (seta) (225x).
- B** – GE_{5h}: Em maior aumento, outra região da porção medular permitindo melhor observação de restos celulares (seta) na luz de túbulos coletores cujos contornos também se apresentam sinuosos (450x).

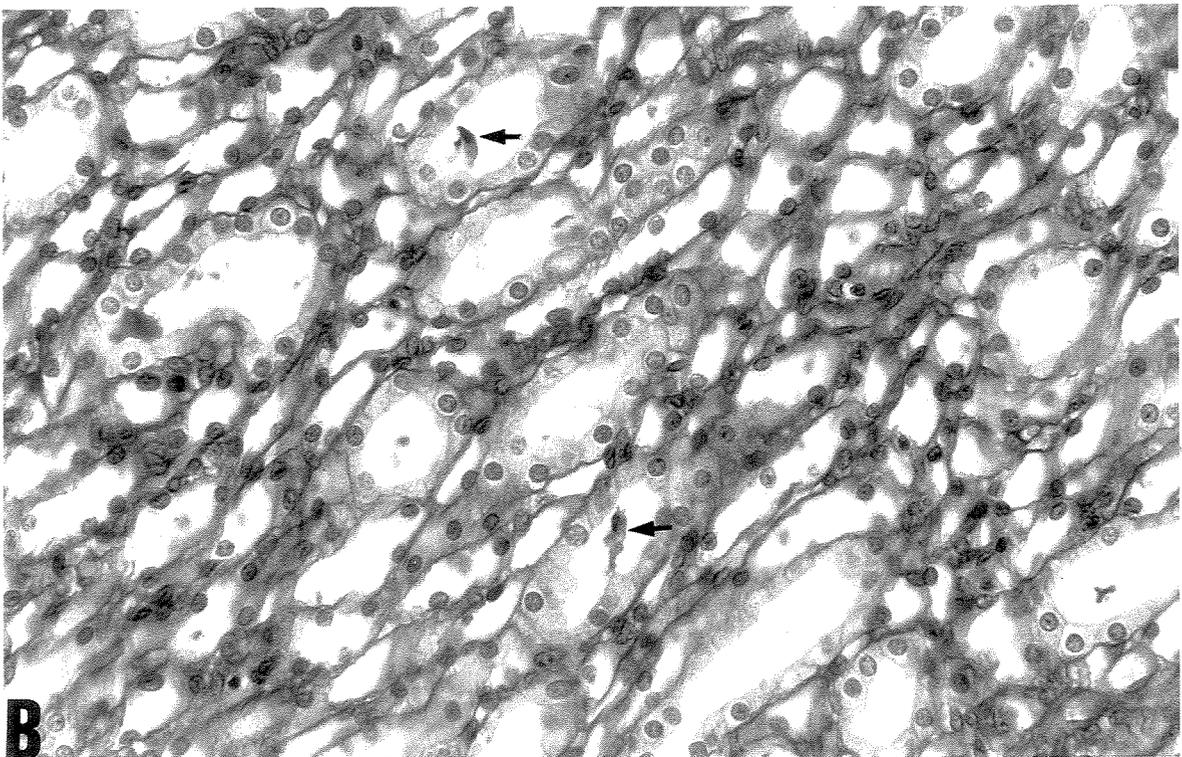
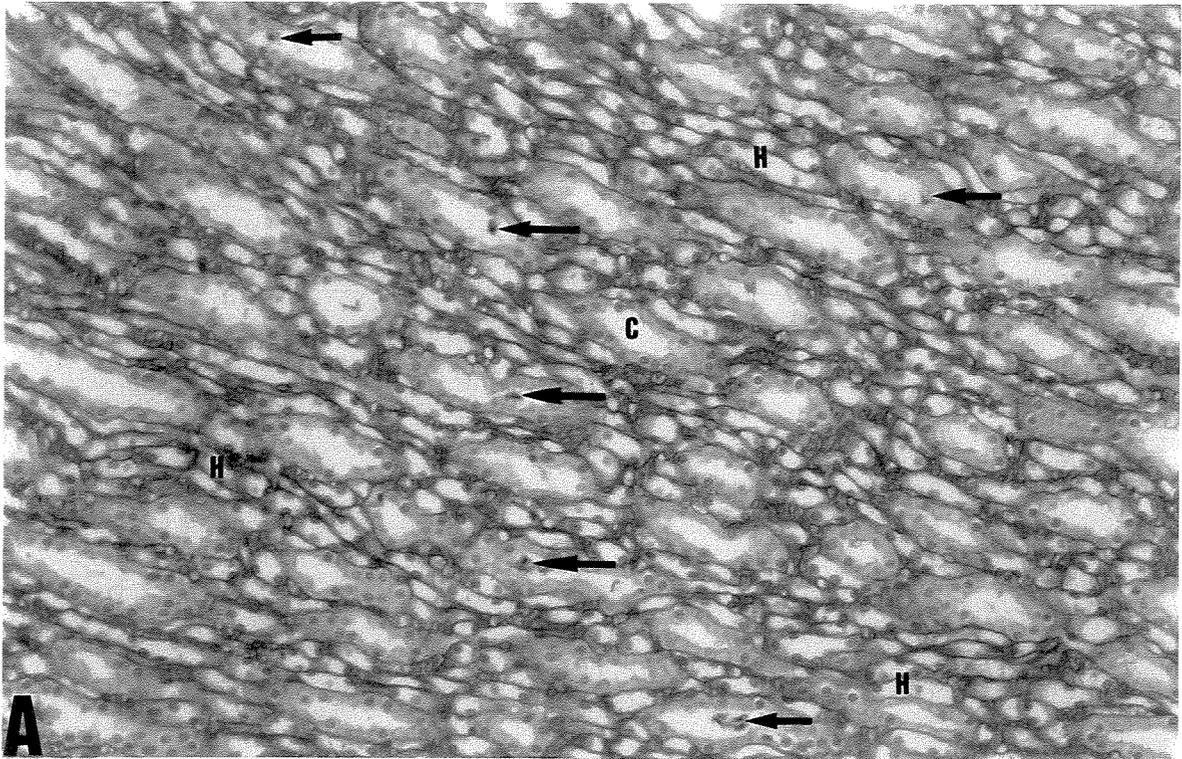


FIGURA 31– CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO DE HEMATÚRIA.

- A** – GE_{5h}: Na região cortical, foi possível observar o epitélio tubular descontínuo. Ocorreu rompimento das lâminas basais do túbulo e do capilar peritubular, com conseqüente extravasamento de hemácias (seta) para a luz do túbulo (HE, 1.125x).
- B** – GE_{5h}: Como na foto acima, os capilares peritubulares se apresentam congestos, na região medular, com hemácias densamente agrupadas. Na luz do ducto coletor notou-se hemácias (seta), caracterizando o quadro de hematúria. Houve descontinuidade do revestimento epitelial que apresentou-se mais acidófilo (HE, 1.125x).

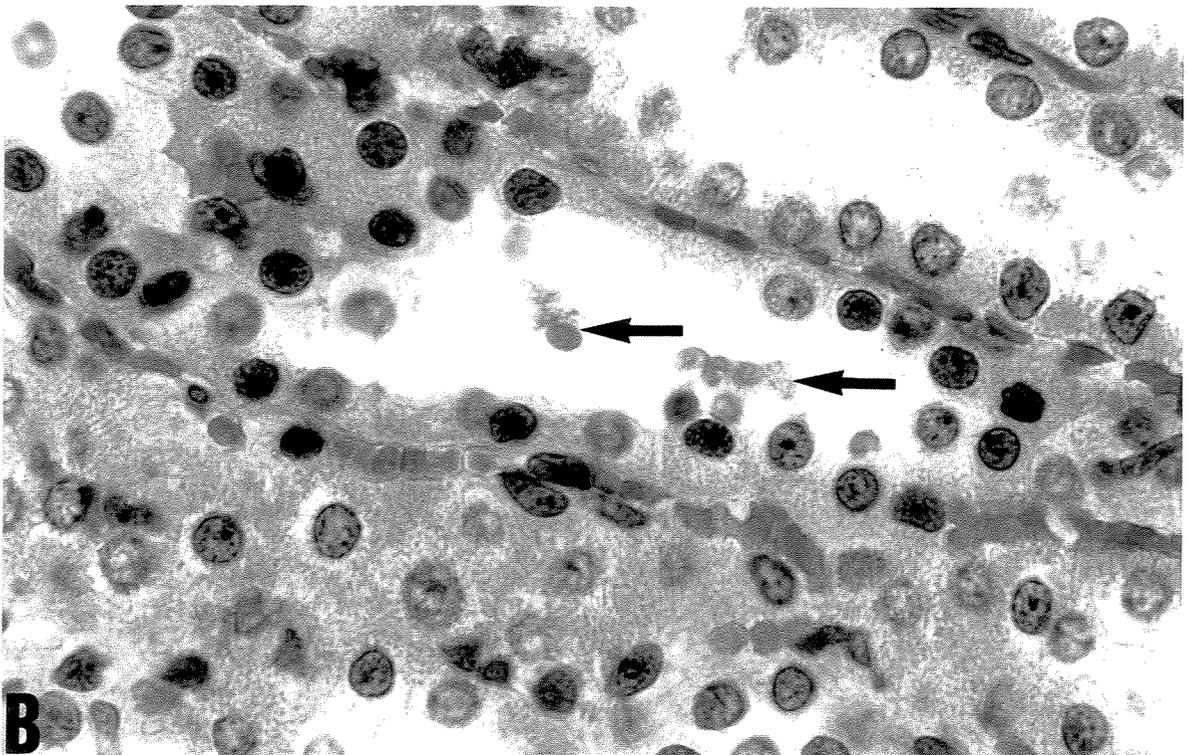
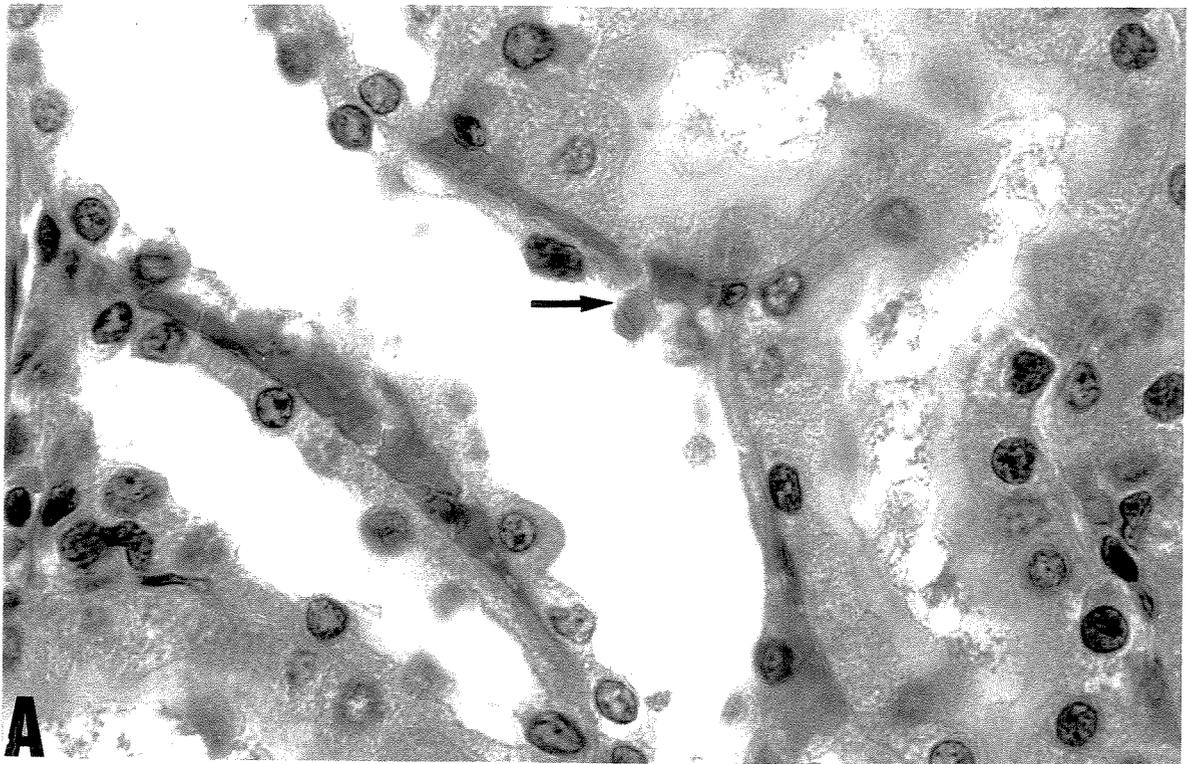
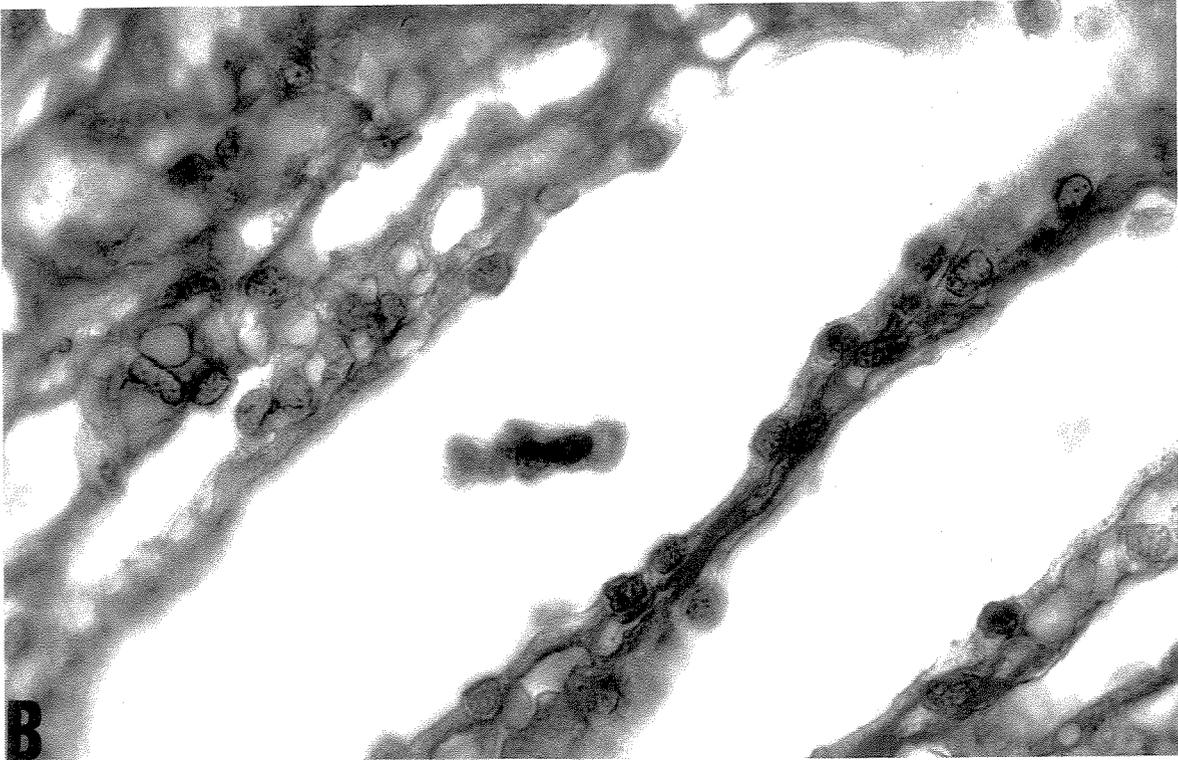
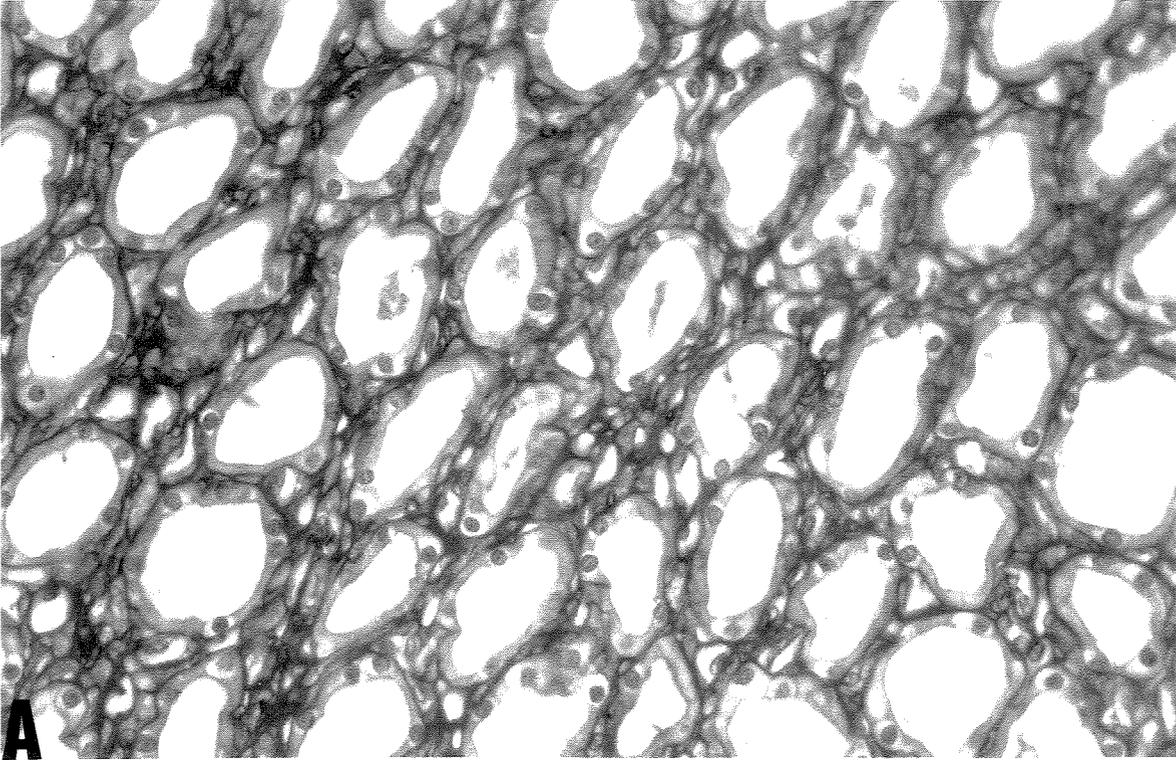


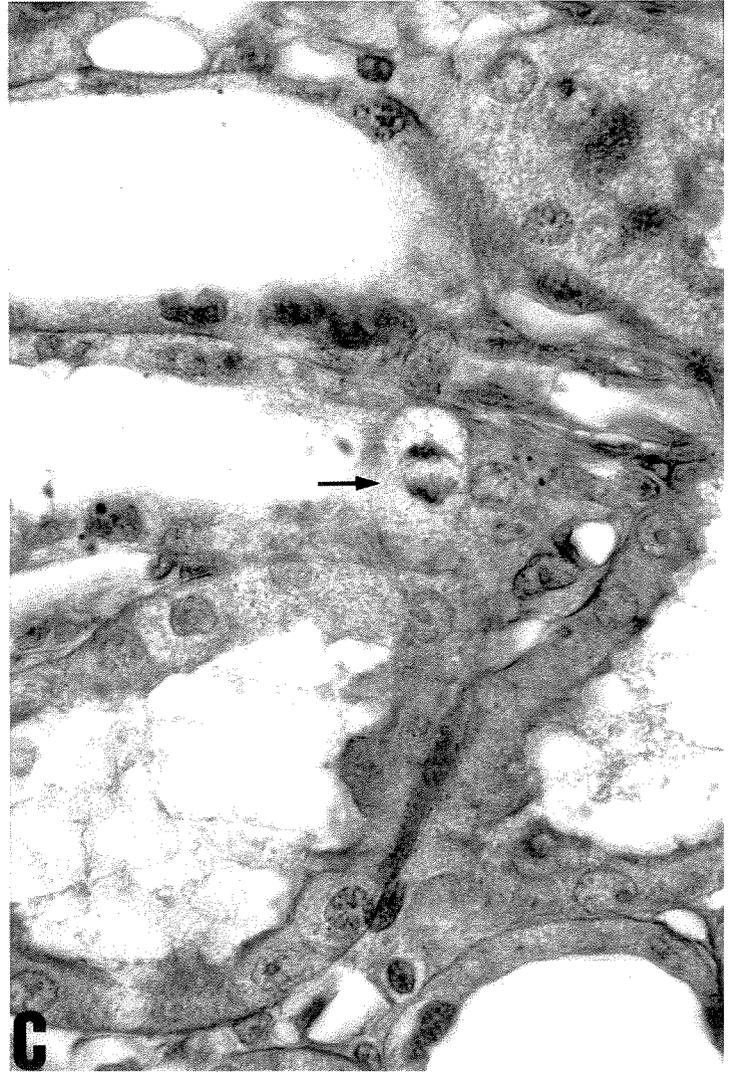
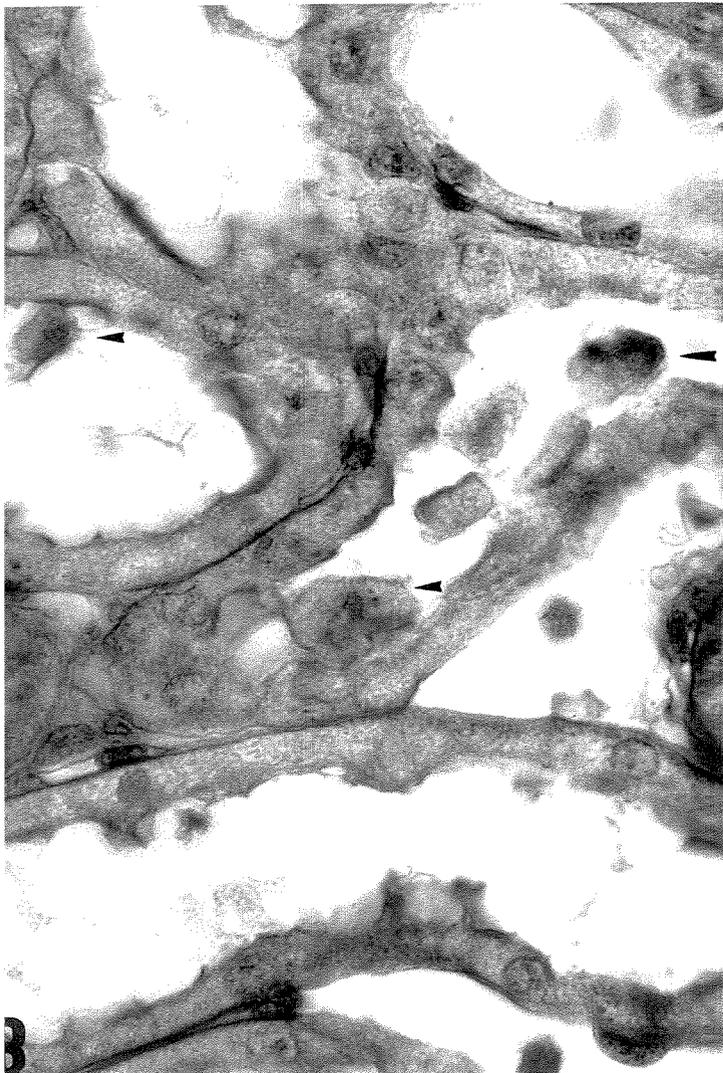
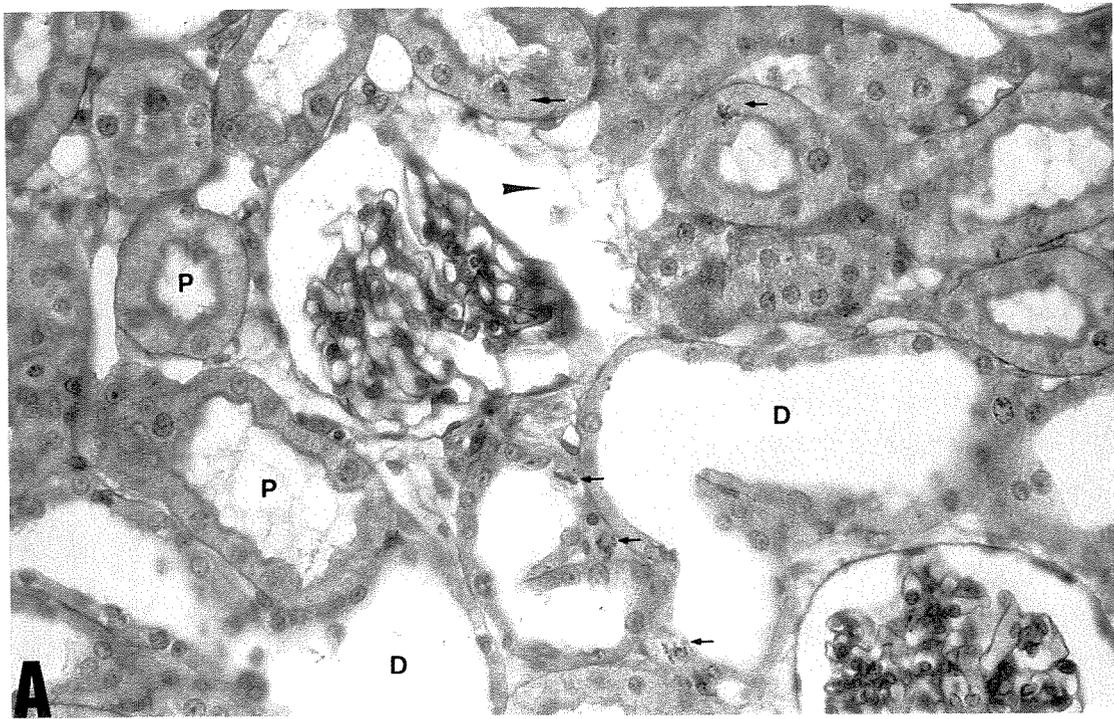
FIGURA 32 – DETALHE DA REGIÃO MEDULAR APÓS REAÇÃO DO PAS.

- A** – GE_{16h}: Neste grupo também puderam ser observados restos amorfos na luz dos dutos coletores, cujo epitélio se apresenta achatado. Tanto a luz quanto os dutos coletores como um todo se apresentam com diâmetro maior (450x)
- B** – GE_{48h}: Após 48 horas ainda foram observados restos celulares na luz dos dutos coletores (1.125x).



**FIGURA 33 – CARACTERÍSTICAS CORTICAIS DO RIM DE UM ANIMAL DO
GE_{48h} APÓS REAÇÃO DO PAS.**

- A** – Como já citado, o veneno provocou reações singulares em um dos animais deste grupo. Os rins deste animal que macroscopicamente se apresentaram hipertróficos, quando analisados à microscopia de luz revelaram grande dilatação de todos os segmentos do néfron. Observe o aumento de diâmetro dos TCP (P) e dos TCD (D). Pode ser observado um corpúsculo renal cuja cápsula foi rompida (cabeça de seta). Apesar destas severas alterações, repare no grande número de figuras mitóticas (seta) tanto nos TCP quanto nos TCD (450x).
- B** – Em maior aumento, pudemos observar túbulos exibindo grande quantidade de restos celulares (cabeça de seta) na luz, epitélio achatado e bordadura em escova descontínua (1.125x).
- C** – Embora os túbulos apresentem as mesmas características observadas na foto anterior, aqui, podemos observar em maior aumento uma figura mitótica (seta) em destaque (1.125x).



4.3.2- ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL:

Os resultados ultraestruturais comprovaram as alterações severas nos corpúsculos renais observadas à microscopia de luz. Pela microscopia eletrônica de varredura observamos, 5 e 16 horas após a inoculação, que os podócitos apresentaram transformação vilosa e simplificação podocitária refletindo na perda das fendas de filtração e da estrutura coesa do glomérulo (Figuras 34B e 35B e C). A microscopia eletrônica de transmissão confirmou tais alterações, as quais foram vistas no GE_{5h} e no GE_{16h} (Figuras 36B, 38B e 40). Além disso, 16h após o envenenamento os podócitos apresentaram formação de lacunas, por vezes com conteúdo floculento (Figuras 38A e 41) e dilatação de cisternas do retículo endoplasmático rugoso contendo material eletrondenso (Figura 42A e B). Foi observada 5h após o envenenamento, formação de microaneurisma no capilar glomerular (Figura 39). Após 16h foram encontradas alterações no mesângio, caracterizadas pela presença de seus componentes na luz capilar (Figuras 43 e 44A) e, em algumas regiões foi observado estrangulamento de células endoteliais entre o mesângio e a parede capilar (Figura 45A e B). Quanto às alterações nos túbulos contorcidos proximais, foi verificada, no GE_{5h}, a presença de corpos fagocíticos polimorfos, hiperplasia do aparelho endocitótico, vacúolos, alterações mitocondriais, retículo endoplasmático agranular muito desenvolvido e complexo de Golgi com cisternas dilatadas (Figuras 46B, C e D, 47A e B). Foi observada, no GE_{5h} e GE_{16h}, fusão e rarefação das microvilosidades das células tubulares proximais (Figura 48).

FIGURA 34 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

- A – GC: Micrografia mostrando o arranjo tridimensional da face externa do epitélio visceral, constituído pelo arranjo peculiar entrelaçado dos podócitos. É possível observar a região do corpo celular (c) onde situa – se o núcleo e três ordens de ramificação dos processos podocitários: 1^{ário}, 2^{ário} e os pedicelos (cabeça de seta). (4.000x) a - Em maior aumento observar entre os pedicelos justapostos, as fendas de filtração e uma coesão entre os capilares que constituem o tufo glomerular (6.000x).
- B – GE_{5h}: Após 5hs da administração i.v. do veneno de *B. moojeni*, os podócitos apresentam transformação vilosa com prolongamentos finos, compridos e desorientados com prejuízo das fendas de filtração. Observe os espaços entre as alças capilares confirmando a lobulação observada à microscopia de luz (Fig. 24 B e C) (4.400x). b – Em maior aumento verificamos a desorganização dos pedicelos e das fendas de filtração (7.000x).

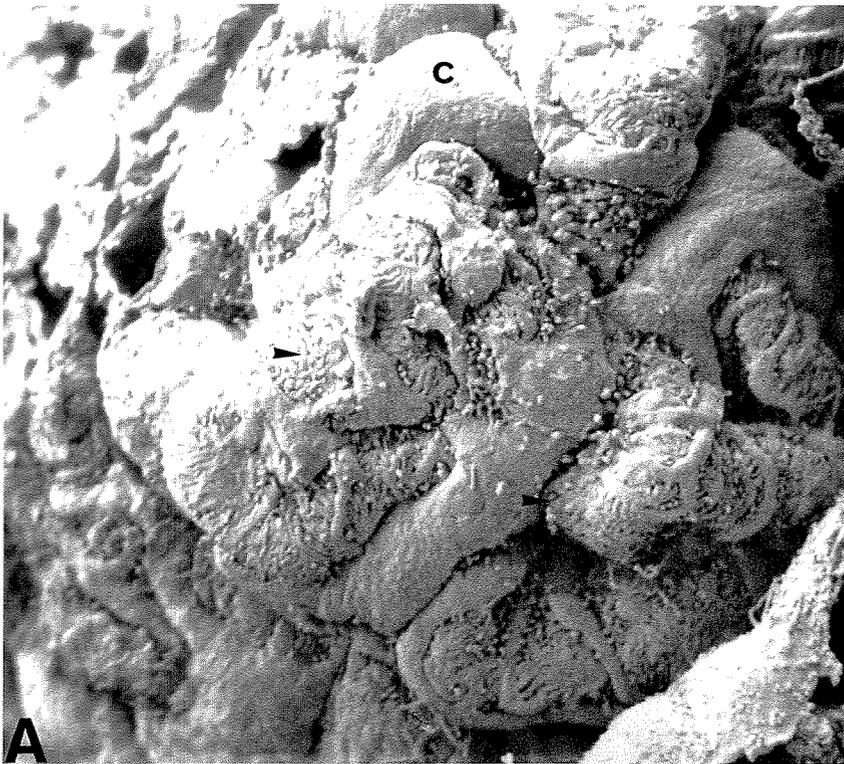


FIGURA 35 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE GLOMÉRULOS EM MAIOR AUMENTO.

- A** – GC: Aspecto tridimensional da organização do podócito no epitélio visceral : **c**- corpo celular; **1** – ramificação 1^{ária}; **2** – ramificação 2^{ária}; (cabeça de seta) – ramificação 3^{ária}. A seta indica a fenda de filtração (13.500x).
- B** – GE_{16h}: Após 16hs, o veneno de *B. moojeni* induz à desestruturação do epitélio visceral decorrente do desalinhamento dos pedicelos (ramificações 3^{árias}). Como consequência há perda das fendas de filtração (10.000x). **b** – Em maior aumento (16.000x).

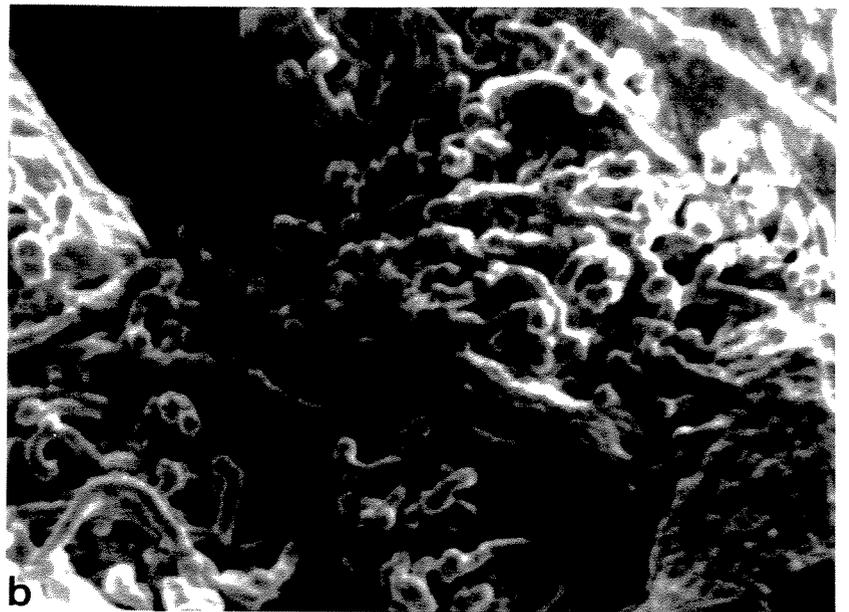
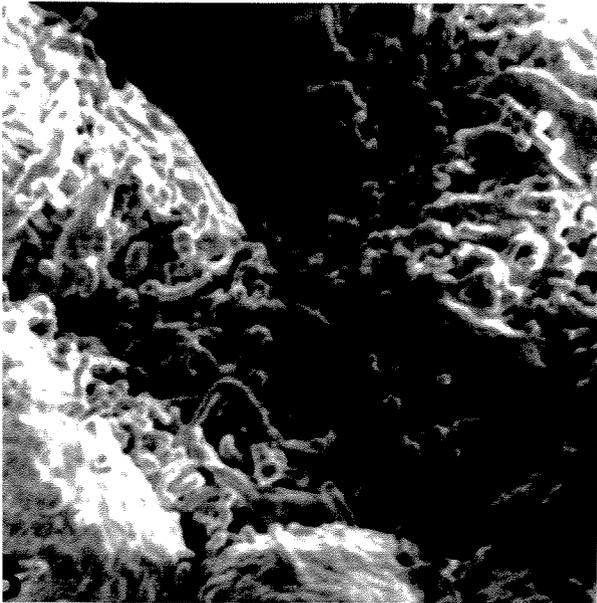
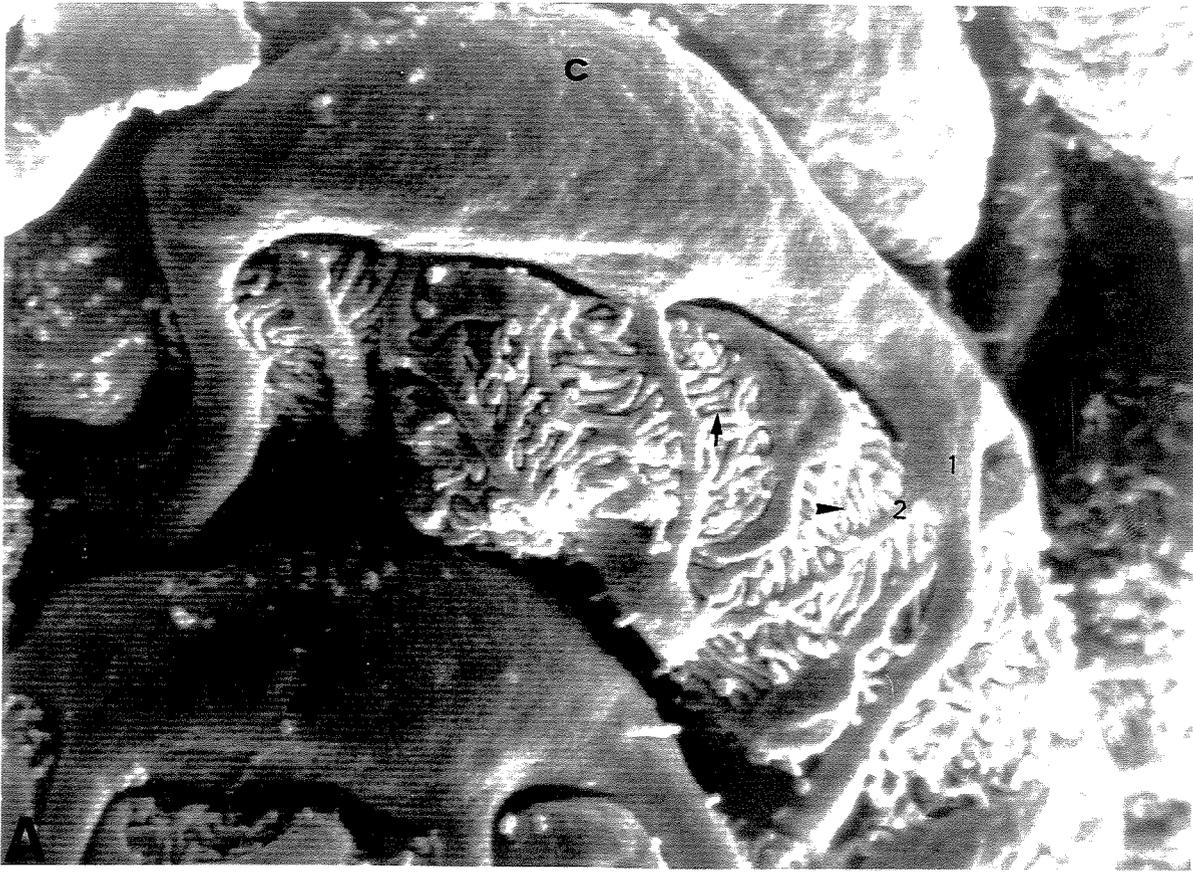


FIGURA 36 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE REGIÕES DA BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM CORPÚSCULO RENAL DE RATOS.

- A** – GC: Nesta eletromicrografia é possível observar os componentes estruturais da barreira de filtração: o endotélio glomerular interrompido pelas fenestrações (cabeça de seta), as membranas basais do podócito e das células endoteliais (fundidas) com suas três camadas (a lâmina rara externa, a lâmina densa e a rara interna), os pedicelos dos podócitos (p) separados pela fenda de filtração atravessada por tênues diafragmas (seta) (69.500x).
- B** – GE_{5h}: Cinco horas após a administração do veneno de *B. moojeni*, verificou-se que as alterações atingem a tríade, componente da barreira de filtração: há diminuição no número de fenestrações do endotélio glomerular e simplificação do epitélio visceral que apresenta indefinição do perfil dos processos podocitários e desorganização do citoesqueleto no interior dos mesmos, com conseqüente desaparecimento das fendas de filtração e do diafragma. Note a rarefação dos três estratos da lâmina basal (61.160x).
- C** – GE_{16h}: Outro detalhe da barreira de filtração após 5hs o envenenamento, evidenciando a severidade da desestruturação da mesma. Note que a dispersão da lâmina basal atinge tanto a região de barreira física (a lâmina densa, local de colágeno IV), como as duas regiões de barreira de cargas (lâminas raras, local de sítios aniônicos devido à presença de moléculas de heparansulfato) (83.500x).
- D** – GE_{16h}: Após 16hs do envenenamento parece haver repolarização dos elementos do citoesqueleto, muito embora, com aspecto impactado evidenciado pelas regiões eletrondensas. Nesta região, observamos um certo grau de recuperação da estrutura trilaminar usual da lâmina basal (69.500x).

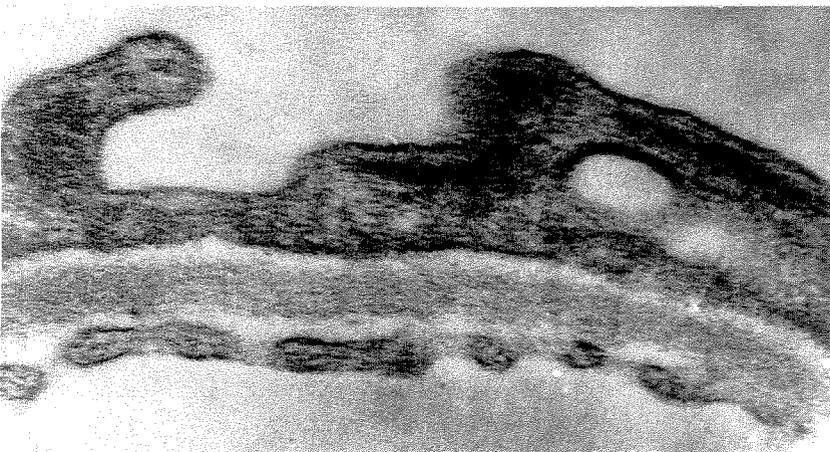
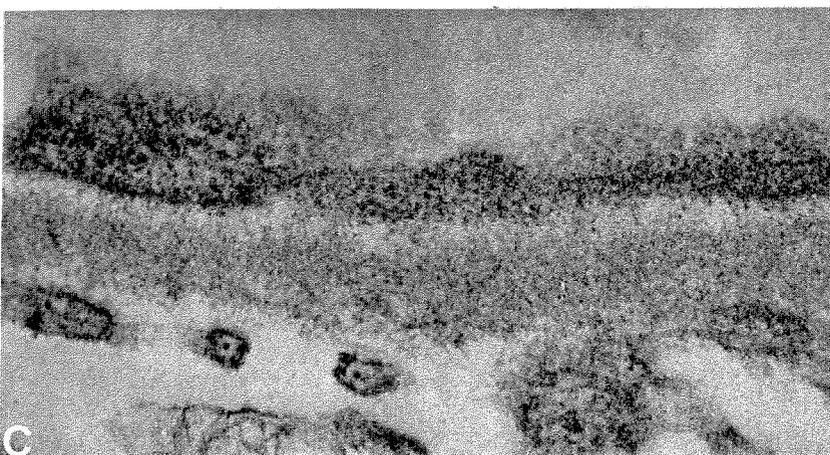
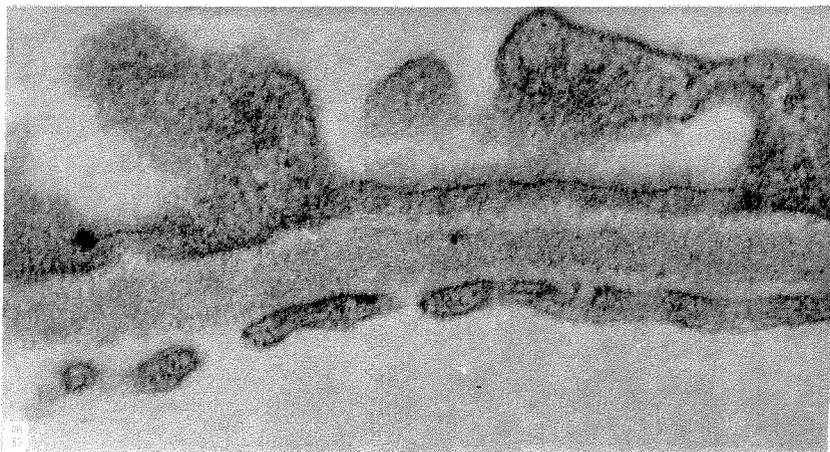
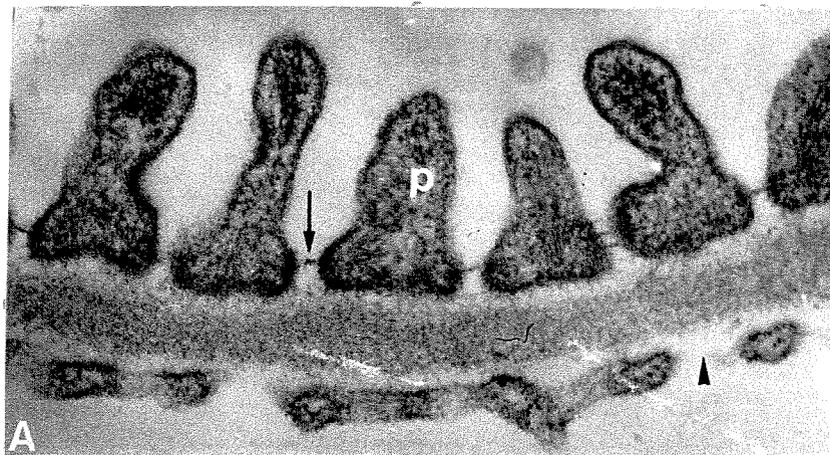


FIGURA 37 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE REGIÕES DA BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR.

- A – GC:** Assim como na figura anterior, podemos verificar entre dois capilares glomerulares (c), a disposição organizada do epitélio visceral formado pelos pedicelos interpostos pelo diafragma das fendas de filtração. Entre eles o espaço de Bowman ou espaço urinário (u). A seta indica elementos do citoesqueleto dos pedicelos (38.410x).
- B – GE_{5h}:** Após 5 horas da administração i.v. do veneno, há drástica alteração da estrutura do epitélio visceral: simplificação podocitária e diminuição do número de fendas de filtração; esta simplificação é acompanhada da aglutinação do citoesqueleto formando massas polimorfas (*). Além disso, há distorção do diâmetro da lâmina basal, com perda do seu padrão trilaminar. Note a diminuição das fenestrações endoteliais (38.410x).
- C – GE_{16h}:** Após 16 horas do envenenamento, já é observado uma recuperação da estrutura da lâmina basal que, entretanto, não é acompanhada pela reorganização do epitélio visceral, visto que este mostra perda da integridade do plasmalema apical (38.410x).

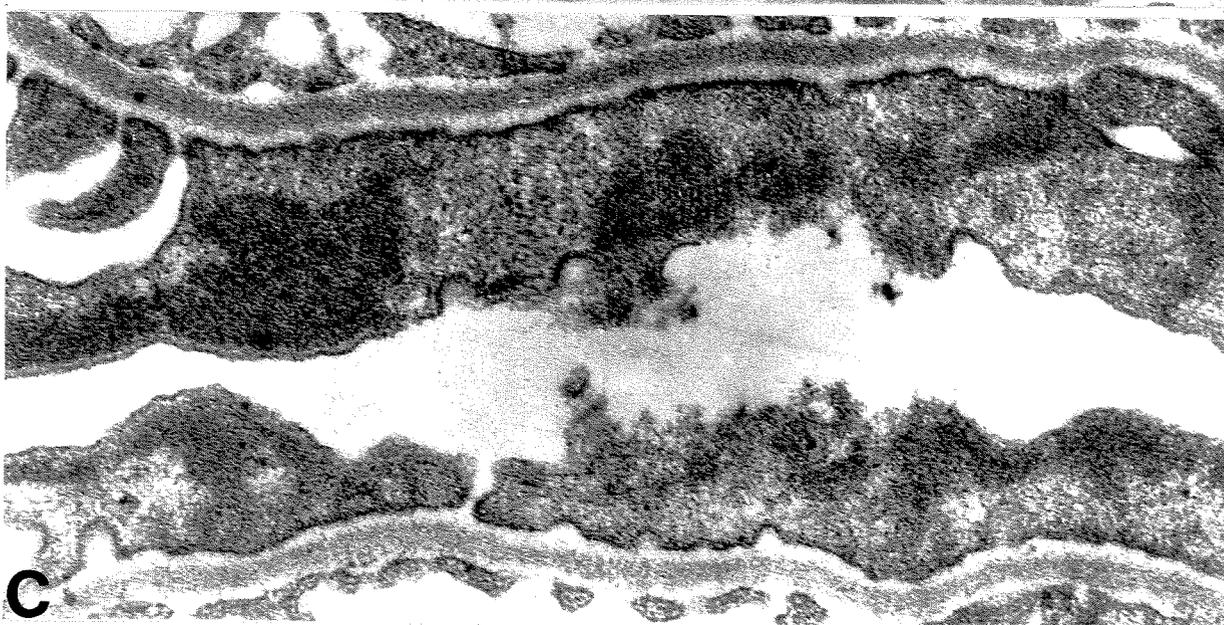
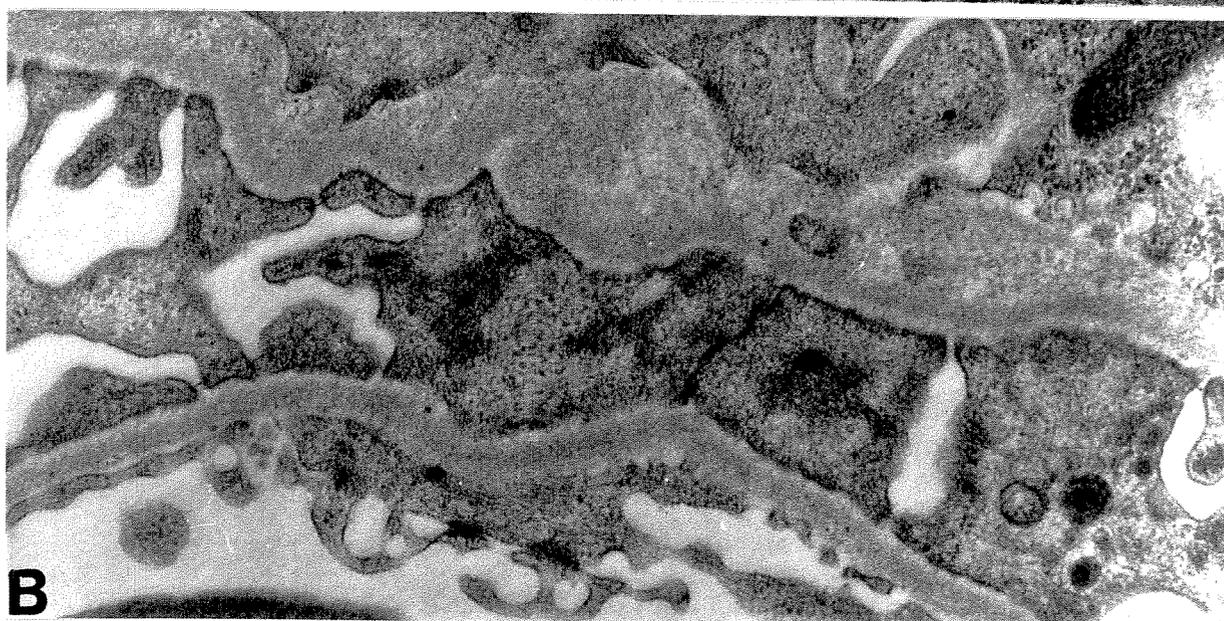


FIGURA 38 – ASPECTOS DA ESTRUTURA GLOMERULAR DE CORPÚSCULO RENAL DO GE_{5h}.

- A** – Porção do corpúsculo renal mostrando retração dos prolongamentos podocitários e deposição do corpo celular sobre a barreira (cabeça de seta) levando à perda de padrão da barreira de filtração (fendas). Nesses locais, massas (m) não envolvidas por membrana com diferentes eletrondensidades, podem ser vistas (7.238x). Ver detalhe em maior aumento (11.136x) das massas eletrondensas e, justaposta a elas, esfacelamento do processo podocitário com deposição de material granular no local. cm: célula mesangial (7.238x).
- B** – Em detalhe, célula mesangial (cm) e seus prolongamentos interpostos à matriz mesangial (mm). Observe a escassez das fendas e ausência de diafragma, bem como a retração dos pedicelos dando lugar a regiões expandidas dos podócitos acoladas à lâmina basal. Note ainda, a desestruturação da lâmina basal levando à perda do padrão trilaminar comum. Nesta eletromicrografia podemos observar vários cortes de pedicelos na região do espaço urinário (cabeça de seta), caracterizando novamente a transformação vilosa vista à microscopia eletrônica de varredura (Fig. 34B) (13.200x).

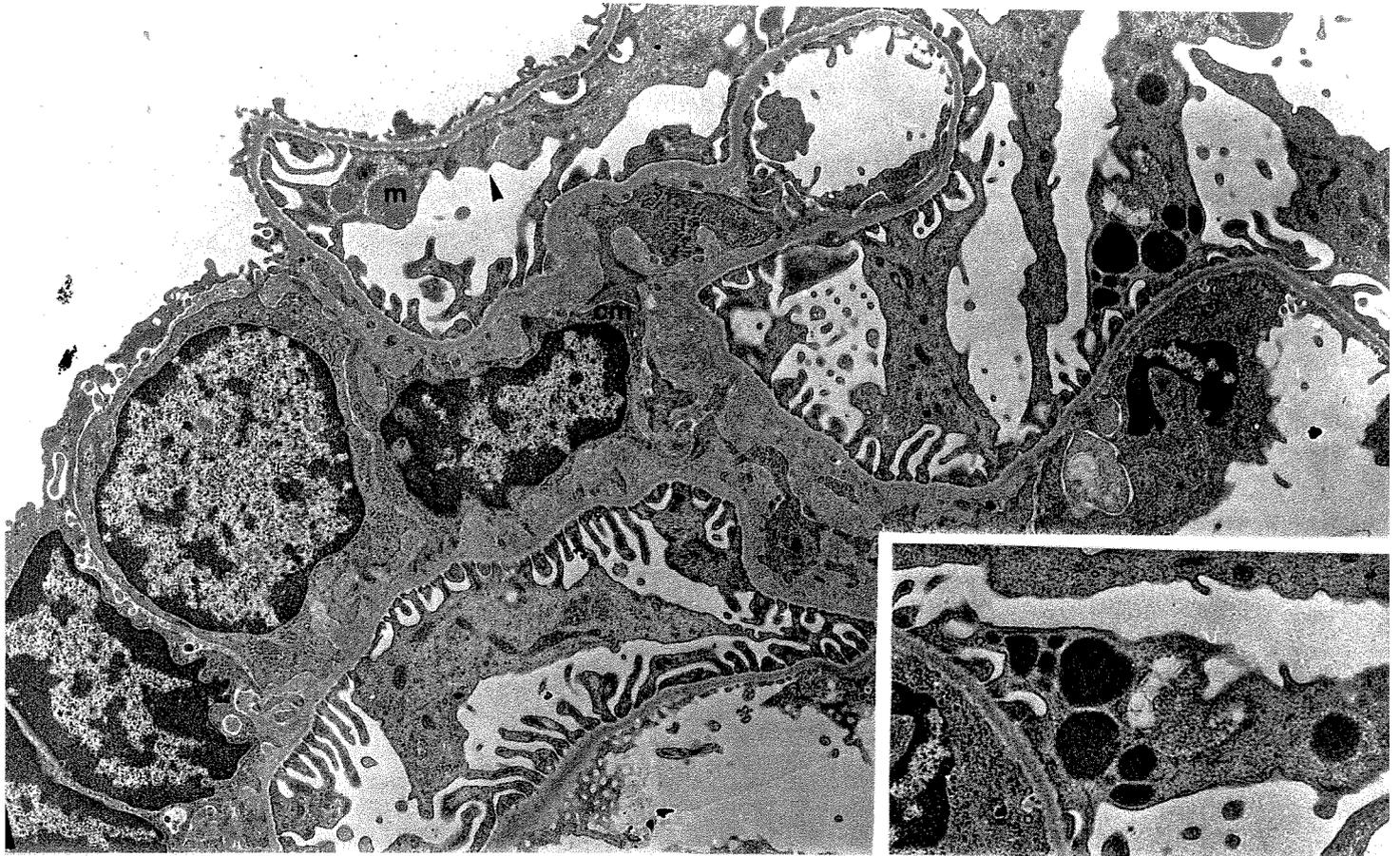


FIGURA 39 – VISÃO PARCIAL DE GLOMÉRULO DO GE_{5h}.

A - Observe as inter – relações topográficas dos seus componentes do glomérulo (4.175x). Nesta micrografia e no detalhe ampliado em B observamos, que anormalmente uma célula mesangial (cm) encontra – se abaixo do endotélio (e) (9.686x). Outras células mesangiais, bem posicionadas junto à matriz mesangial (mm). Observar que o capilar c1 representa um microaneurisma. Fragmentos vistos no seu interior representam porções da matriz mesangial (fm) e das células endoteliais (fe). c: capilar; p: processos podocitários; lb: lâmina basal; co : fibras colágenas.

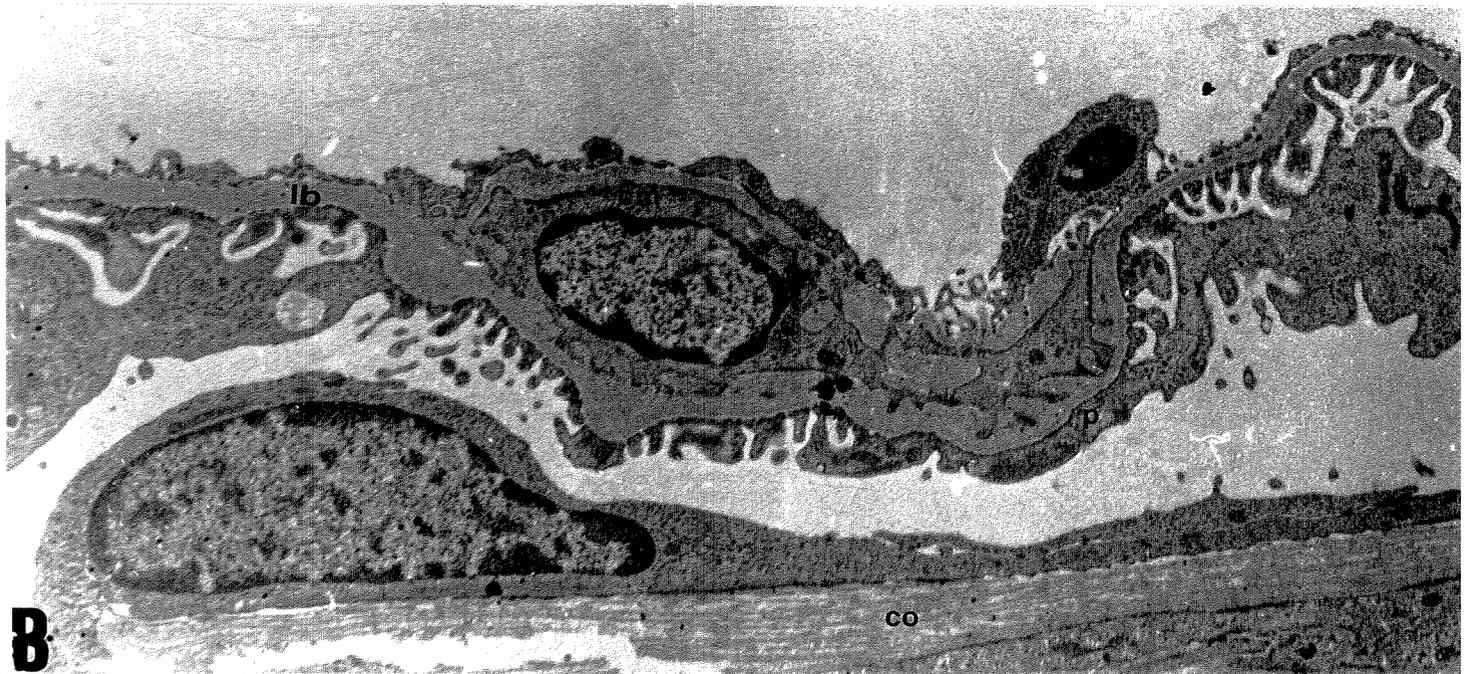


FIGURA 40 – REGIÕES DA BARREIRA DE FILTRAÇÃO.

- A – GC:** Observar que os processos podocitários de 2ª ordem (2) posiciona-se ao redor do capilar (c) em direção ao qual emite os pedicelos num ângulo aproximado de 90^0 (26.000x).
- B – GE_{16h}:** O processo podocitário (2') retraiu vários pedicelos, de forma que o próprio corpo do processo justapõe-se à lâmina basal (lb), diminuindo drasticamente o número de fendas de filtração. Repare que em **A** há 17 fendas numa extensão de aproximadamente 14 μ m, enquanto em **B** há 13 fendas numa extensão de 42 μ m (26.000x).

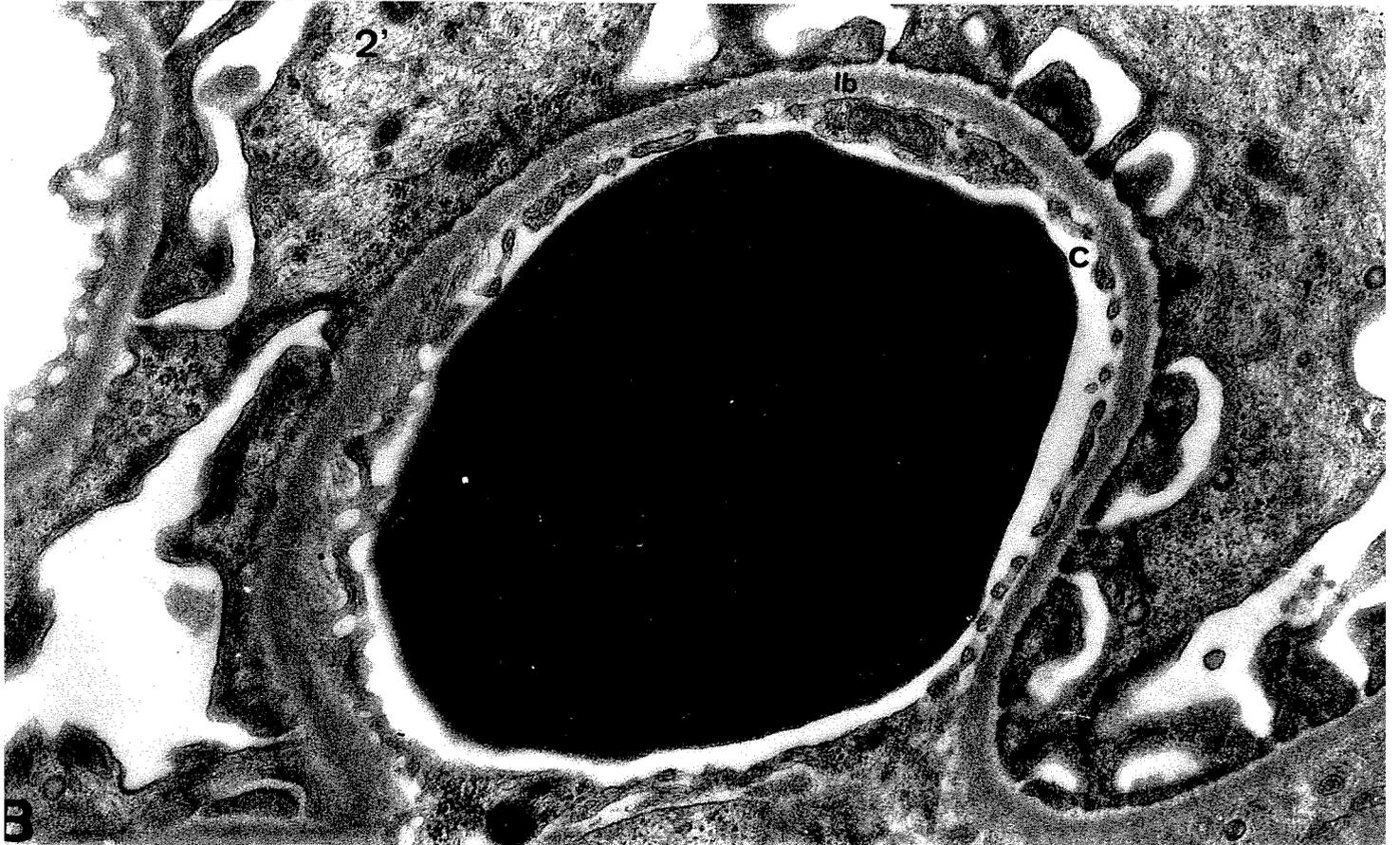
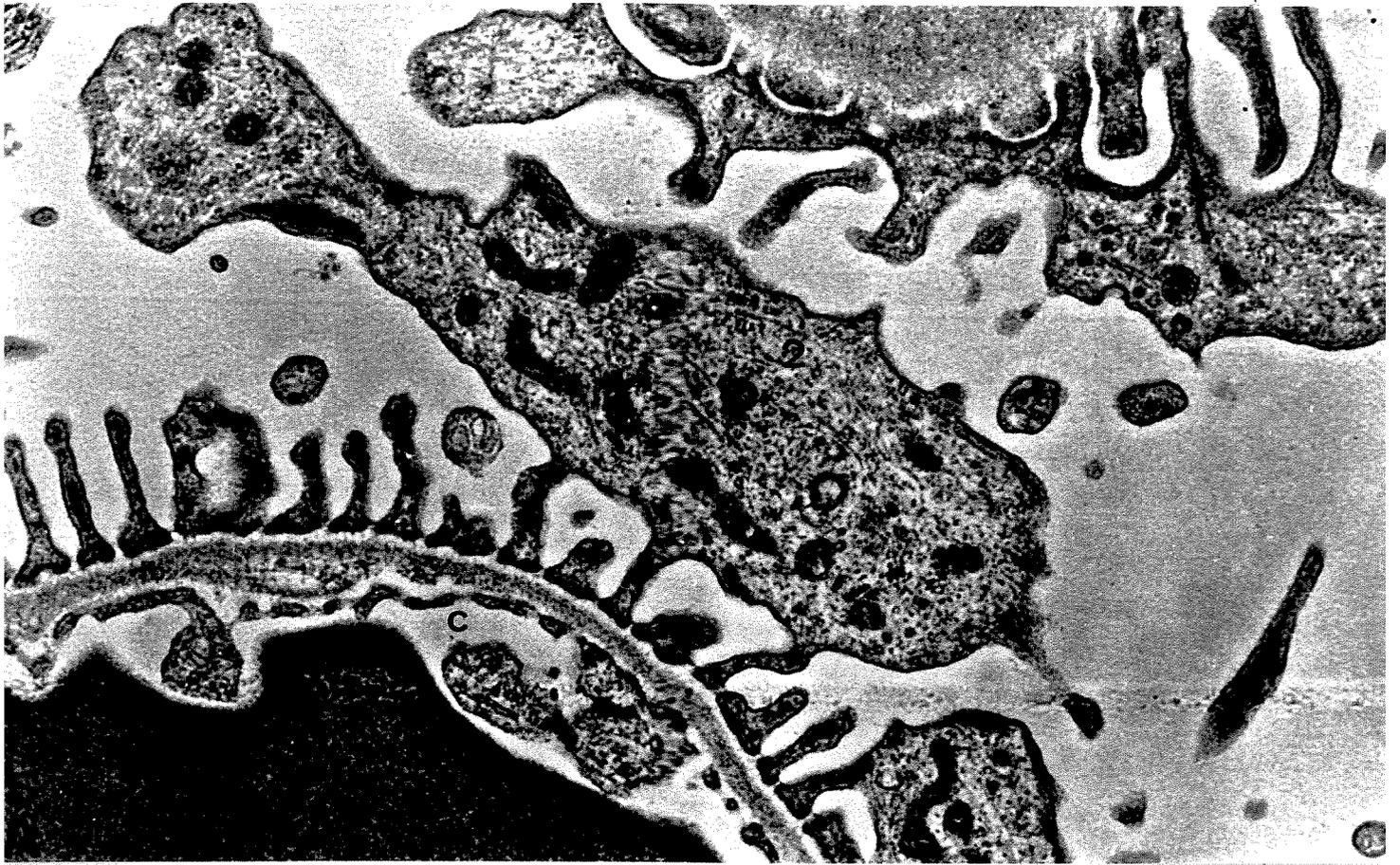
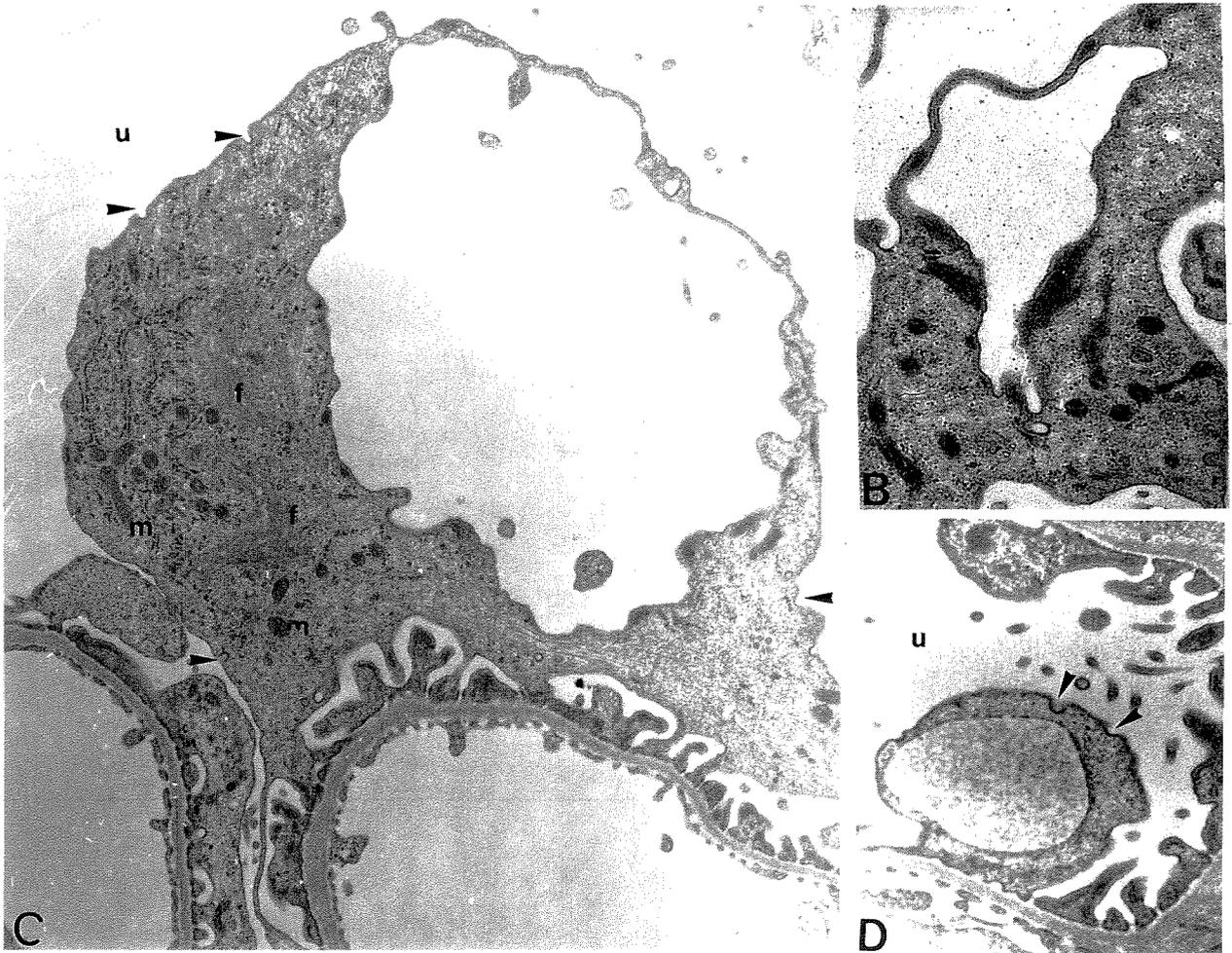
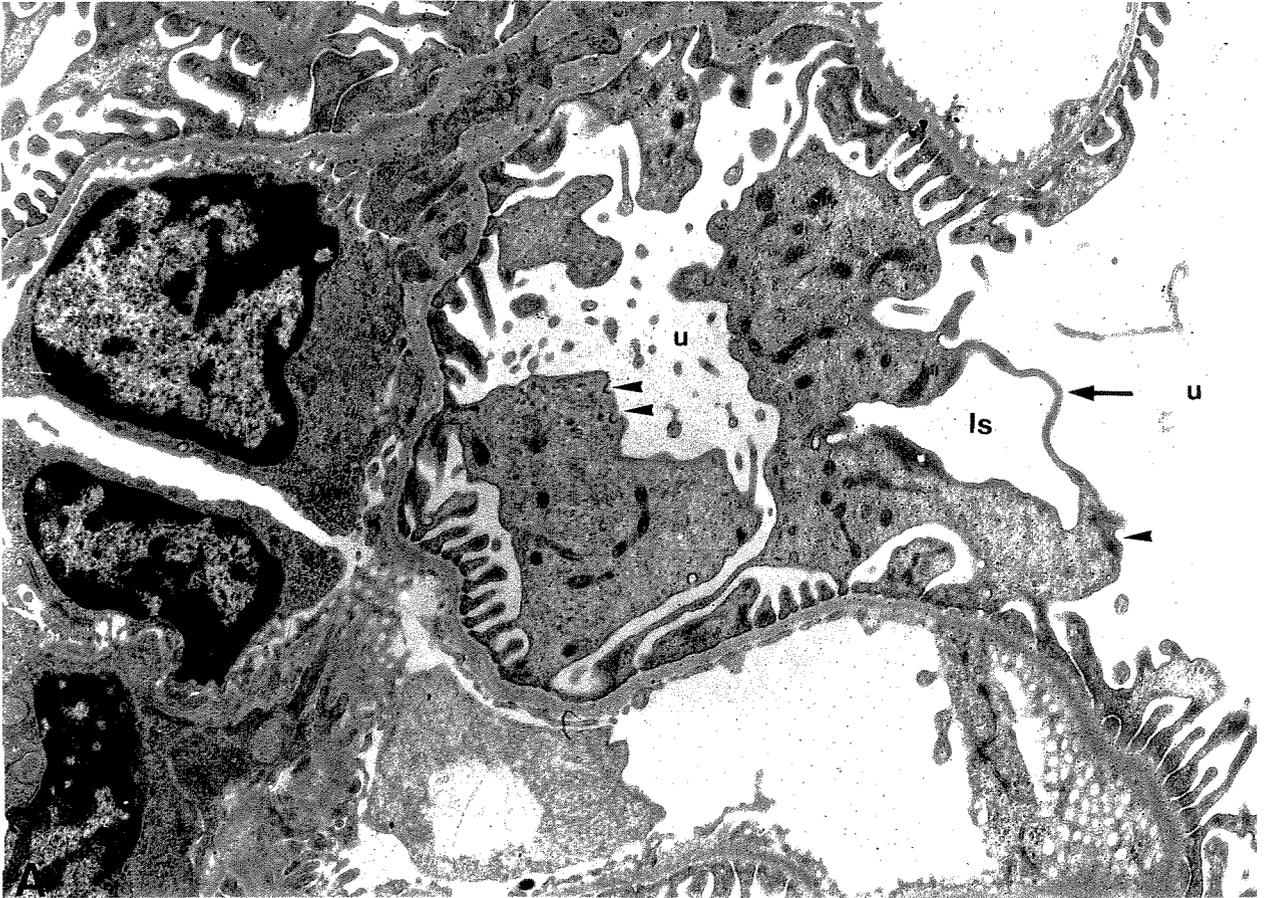


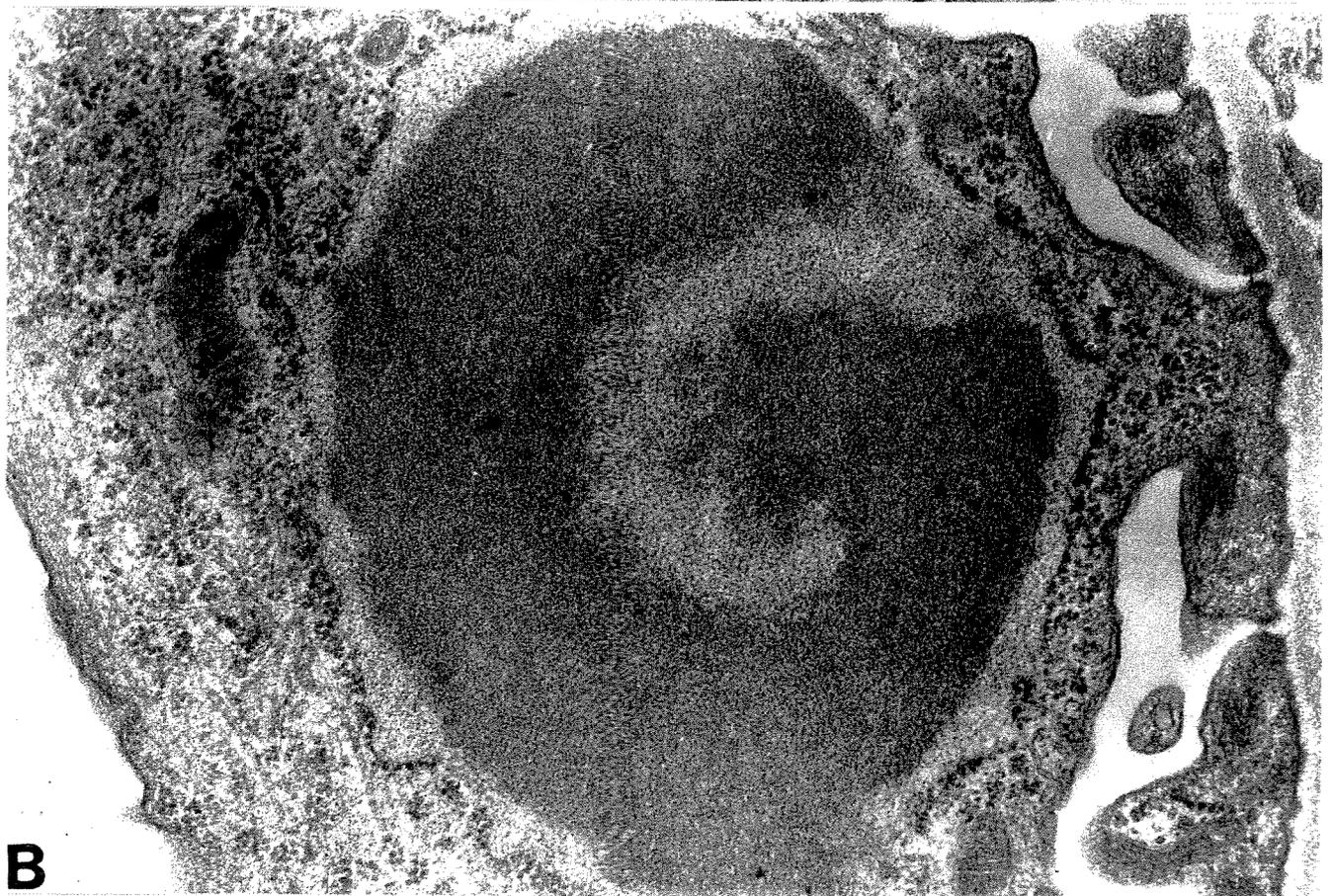
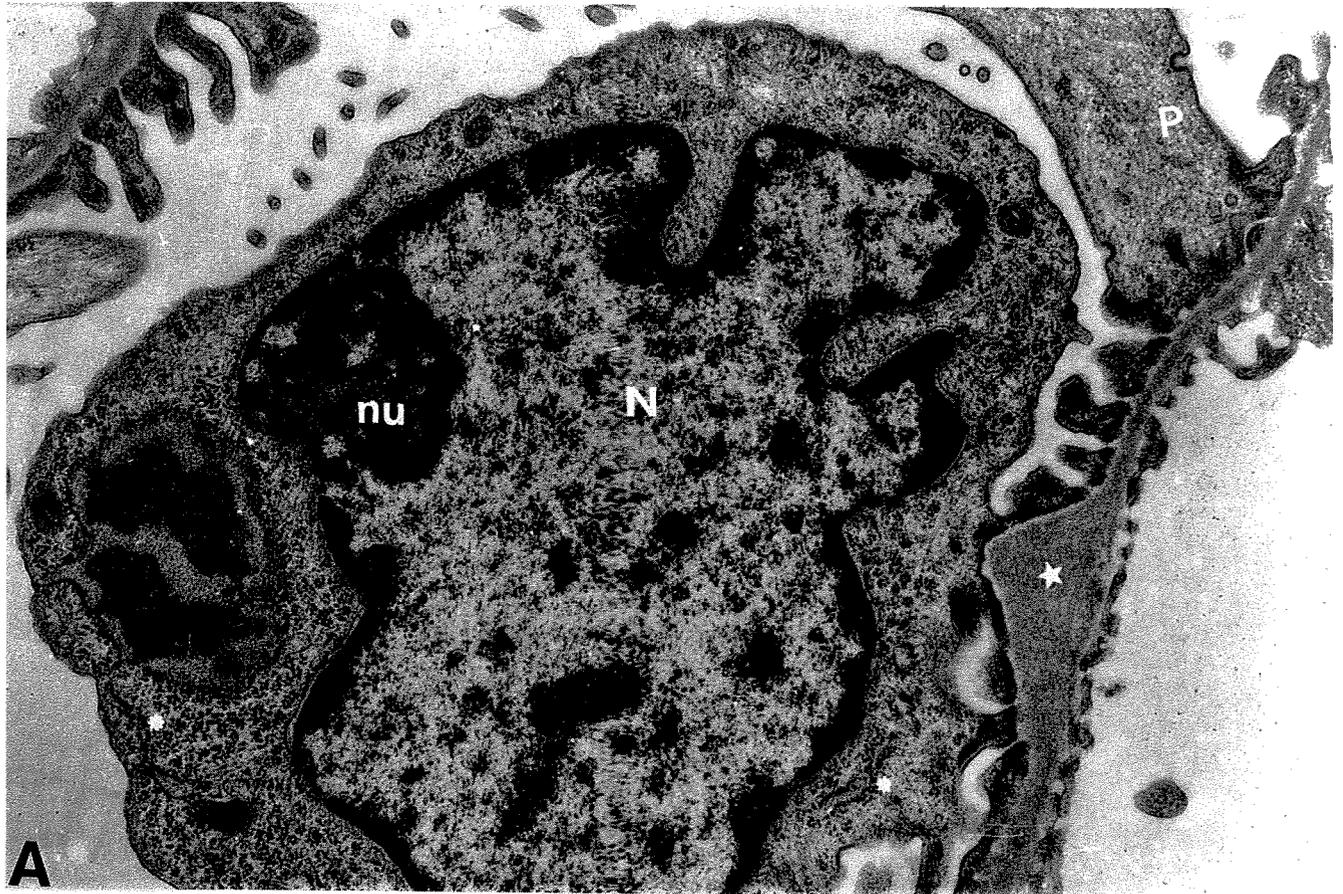
FIGURA 41 – DETALHE DE PODÓCITOS DE ANIMAIS DO GE_{16h}.

- A-** Porção de corpúsculo renal focalizando alterações dos processos podocitários, caracterizadas por formações lacunares superficiais (ls) limitadas por uma lâmina fina de citoplasma (seta) (8.992x).
 - B-** Detalhe de porção da micrografia A (14.388x).
 - C-** Observar perfis delicados de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias (m), feixes de microfilamentos (f) (8.992x).
 - D-** Vacuolação floculenta de processo podocitário (15.600x).
- Em A, B, C e D podem ser vistas invaginações pinocitóticas (cabeça de seta) voltadas para o espaço urinário (u).



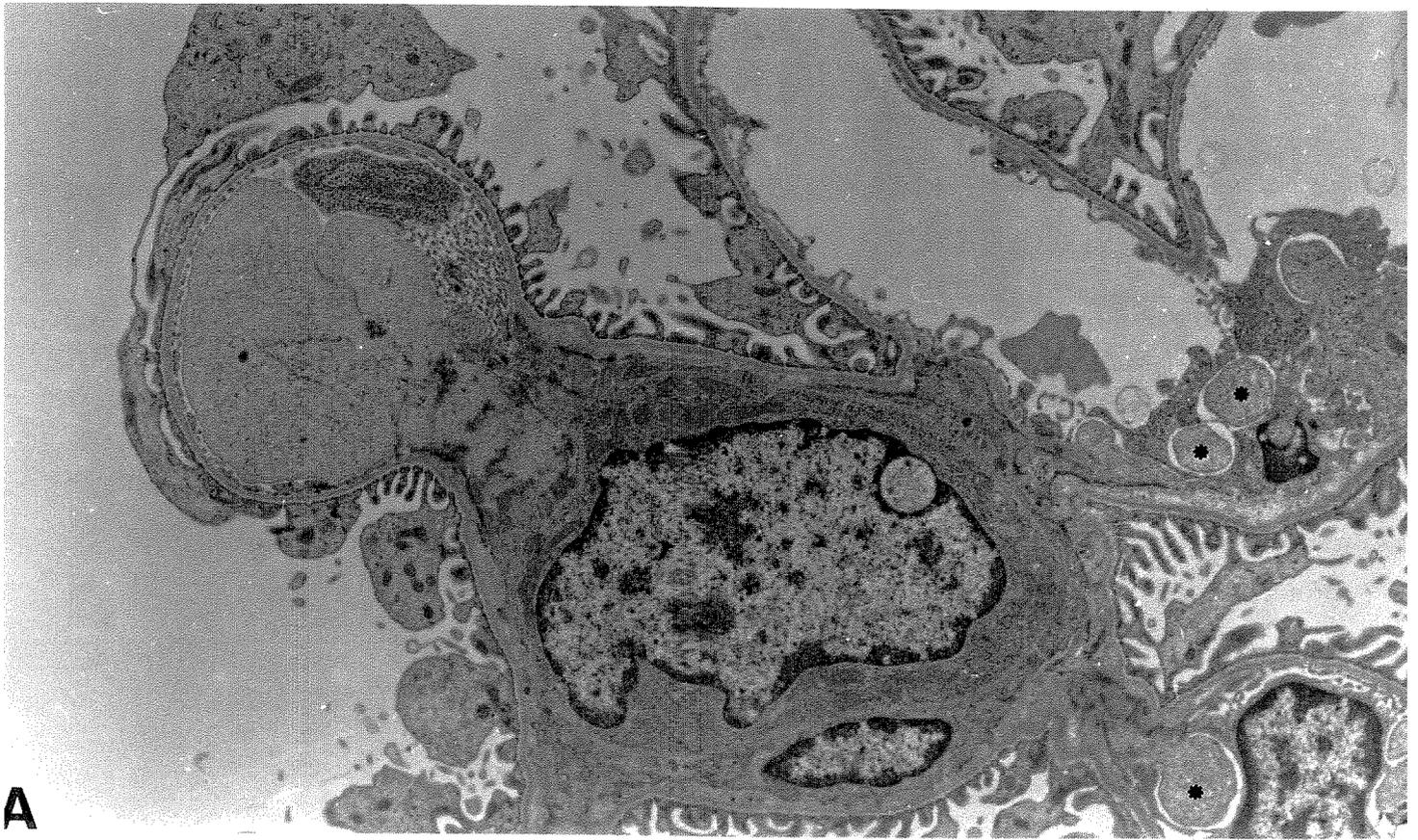
**FIGURA 42 – MICROGRAFIA DE GRANDE AUMENTO ENFOCANDO O
CORPO CELULAR DE PODÓCITOS DO GE_{16h}.**

- A- Núcleo (N) de contorno irregular, heterocromatina em grumos na periferia e nucléolo (nu) exuberante. No citoplasma, vê-se grande população de polirribossomas em meio a qual pode ocorrer pequenos perfis de cisternas achatadas (*) de retículo endoplasmático rugoso (RER) que subitamente, expandem-se e contém no interior, material secretado polimórfico, de média e alta eletrondensidade. No corpo celular e principalmente nos processos podocitários (P) há profusão de elementos do citoesqueleto. Na (*) observar expansão varicosa da lâmina basal com perda do padrão trilaminar (20.150x).
- B- Detalhe em grande aumento de material proteináceo englobado em cisterna dilatada do REG (43.420x).

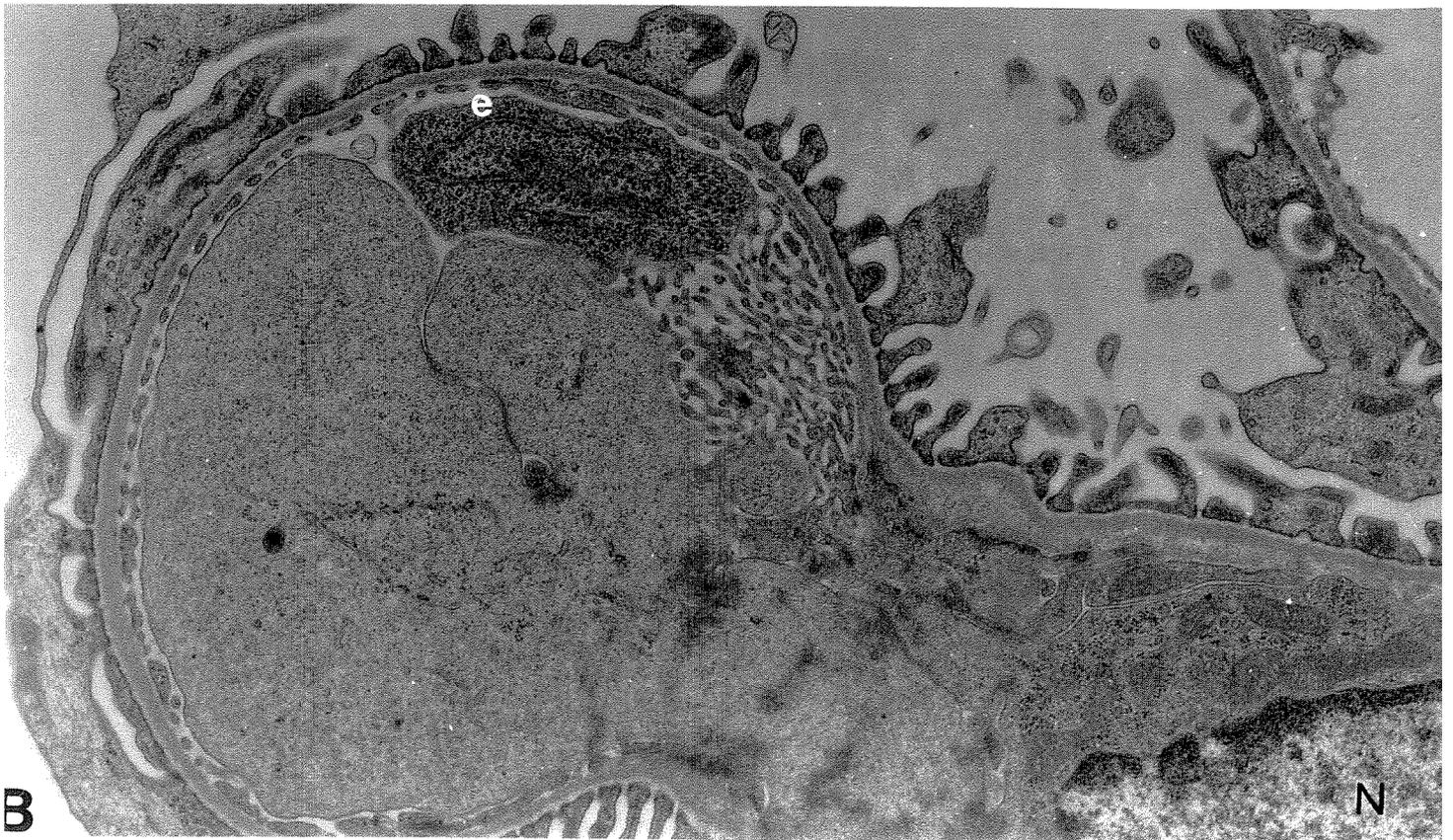


**FIGURA 43 – DETALHE DE PORÇÃO DO GLOMÉRULO RENAL DE RIM
DE RATO DO GE_{16h}.**

- A** – Três capilares glomerulares sendo invadidos por componentes do mesângio intraglomerular (provavelmente em resposta ao estímulo tóxico presente no sangue circulante). Em dois capilares são vistas projeções mesangiais bulbosas (*) de eletrondensidade menor do que a apresentada pelo endotélio. Em um capilar, a luz está ocluída por células mesangial e elementos da matriz mesangial. Em outro, esse fato pode ser melhor observado: matriz mesangial e parte do citoplasma de uma célula endotelial (e) rica em polirribossomas ocluem a luz capilar (7.238x).
- B** – Detalhe de A. As projeções em forma de rede representam o endotélio fenestrado em secção tangencial; N: núcleo da célula mesangial (15.600x).



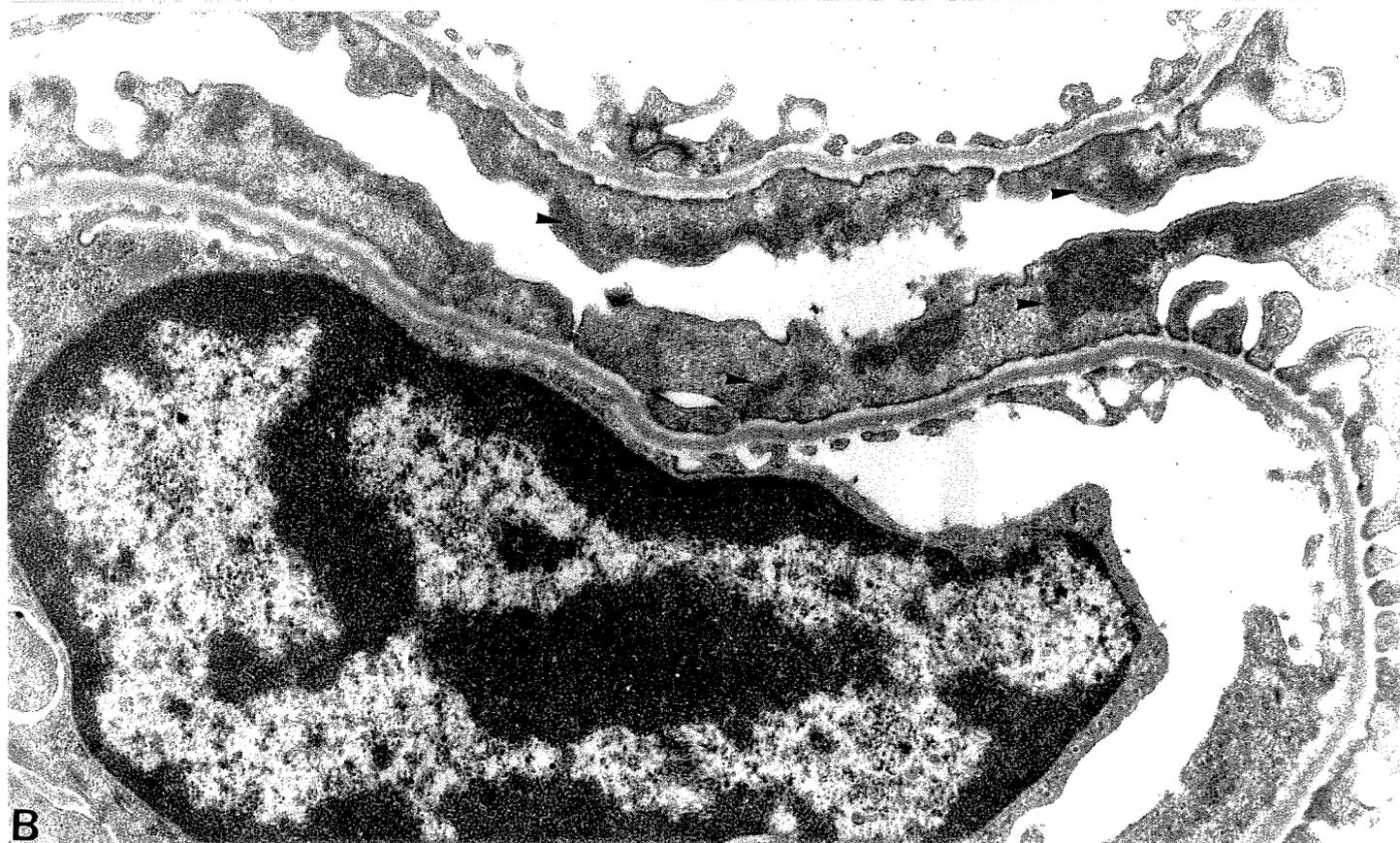
A



B

**FIGURA 44 – DETALHE DE PORÇÃO DO GLOMÉRULO RENAL DE RATO DO
GE_{16h}.**

- A-** Outra imagem mostrando oclusão do capilar glomerular pela célula mesangial (cm) e pelo corpo da célula endotelial (e); (*) complexo de Golgi hipertrófico da célula mesangial. À direita, restos celulares dentro do capilar glomerular (12.080x).
- B-** Detalhe de célula endotelial obstruindo a luz capilar, vendo-se no canto inferior esquerdo a ausência de fenestrações no endotélio. Concomitantemente, há também ausência de pedicelos pois em seu lugar, porções expandidas dos podócitos ficam apoiadas sobre a lâmina basal. Observe as estruturas densas (cabeça de seta) aí localizadas, que supostamente representam a condensação das proteínas constituintes dos elementos do citoesqueleto, agora desestruturados e portanto, responsáveis pela perda do padrão podocitário na região da barreira de filtração (20.150x).



**FIGURA 45 – VISÃO PARCIAL DE UM GLOMÉRULO RENAL DE ANIMAL DO
GE_{16h}.**

- A-** São vistas relações dos processos citoplasmáticos dos podócitos. Repare em um fino prolongamento (cabeça de seta) emitido pelo podócito, como visto à microscopia eletrônica de varredura (FIG.34B) (7.238x).
- B-** Detalhe da Figura A mostrando um estrangulamento de uma célula endotelial confinada entre o mesângio e a própria parede capilar (15.600x).

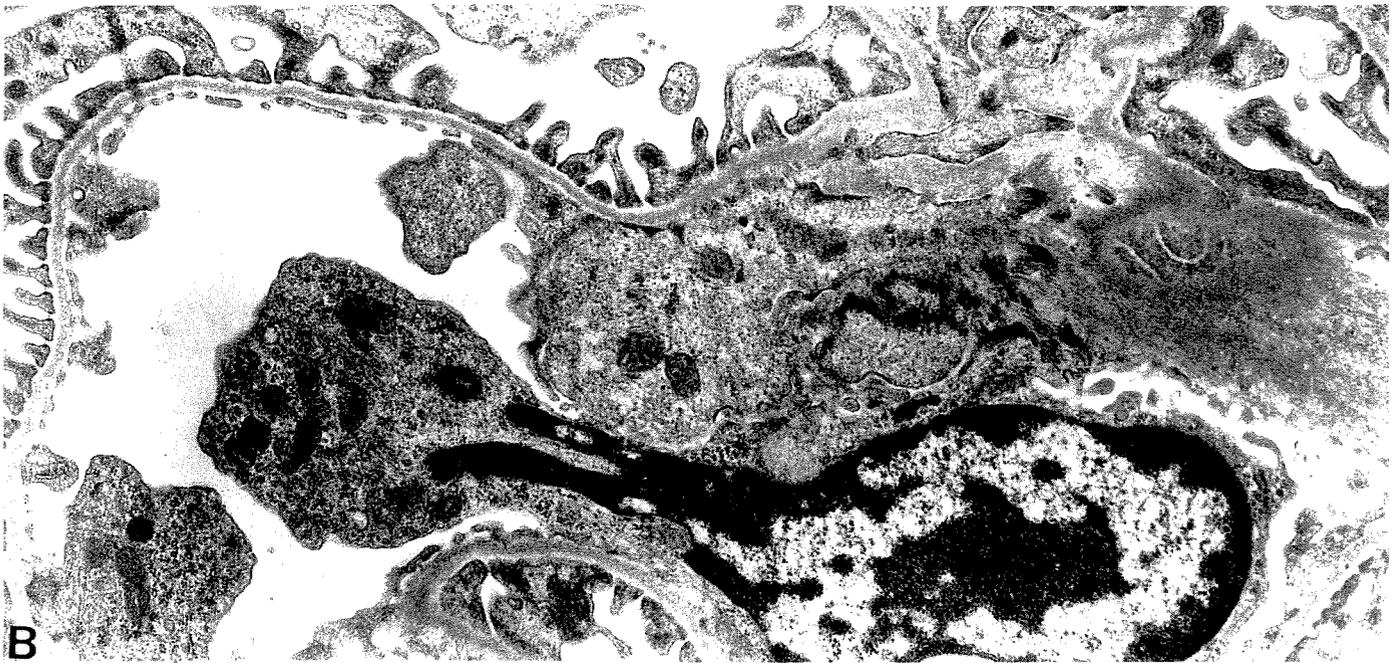


FIGURA 46 – CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS DO TCP.

- A- GC: Eletromicrografia de parte da parede de um túbulo proximal de rim de rato controle mostrando as porções mediana e apical de duas células com a estrutura típica desse segmento do néfron: grande quantidade de mitocôndrias pleomórficas com cristas lamelares e matriz mitocondrial de eletrondensidade média; abaixo da bordadura em escova, o aparelho endossômico – lisossômico; pequenos perfis de RER e polirribossomas entremeiam-se nas demais organelas.
- B, C e D- GE_{5h}: Corpos fagocíticos polimórficos (f) aparecem junto aos lisossomas ²ários e ao mesmo tempo, há aumento do sistema endossômico-lisossômico (ver em C). A coalescência de vesículas pinocíticas provavelmente da origem aos vacúolos (v) de diferentes tamanhos, que apresentam material floculento no interior (ver em C e D). Observe que as mitocôndrias têm a matriz mais eletrondensa, e há menos definição das cristas, quando comparadas às dos animais controles (B e C: 9.600x; D: 12.400x).

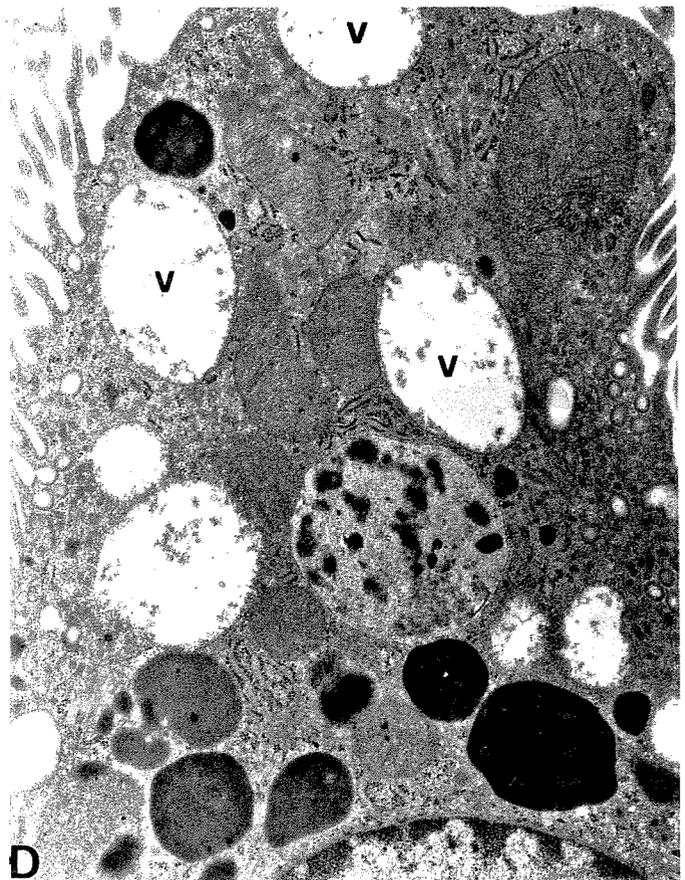
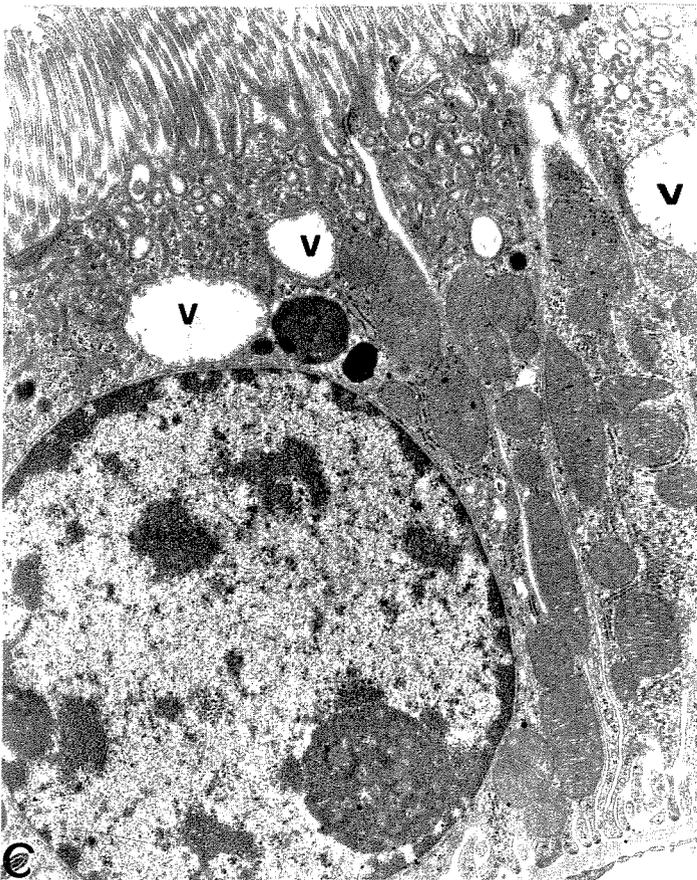
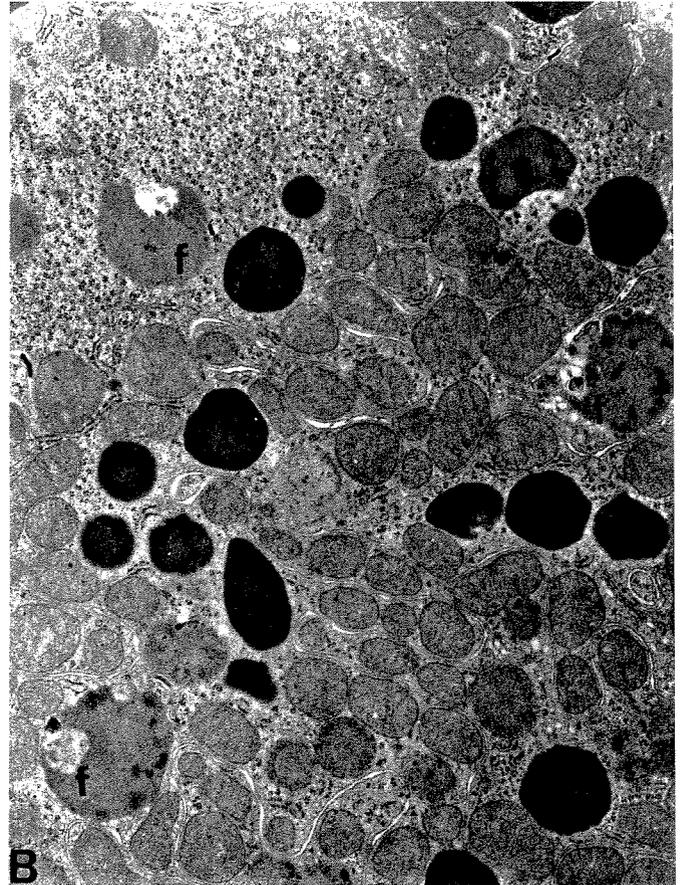
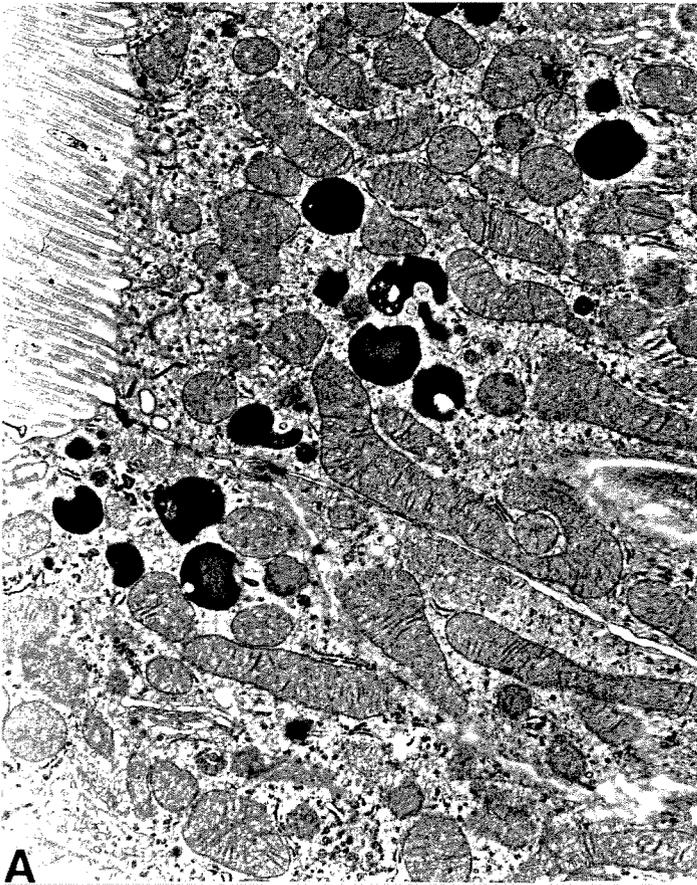


FIGURA 47: DETALHES DE PORÇÕES DE CÉLULAS DO TCP DE ANIMAIS DO GE_{5h} EM DIFERENTES AUMENTOS.

A e B- As alterações mais dramáticas observadas dizem respeito às mitocôndrias: Matriz mitocondrial muito eletrondensa, cristas dilatadas e vesiculares (ao invés de lamelares), forma arredondada sugerindo alteração da permeabilidade da membrana e edema mitocondrial (ao invés do pleomorfismo característico nos controles) e ruptura das cristas (ou cristólise). Outra observação interessante é a presença de retículo endoplasmático liso (rel) muito desenvolvido, geralmente com localização subplasmalemal, complexo de Golgi (g) com múltiplas cisternas dilatadas (A: 10.221x; B: 22.000x).

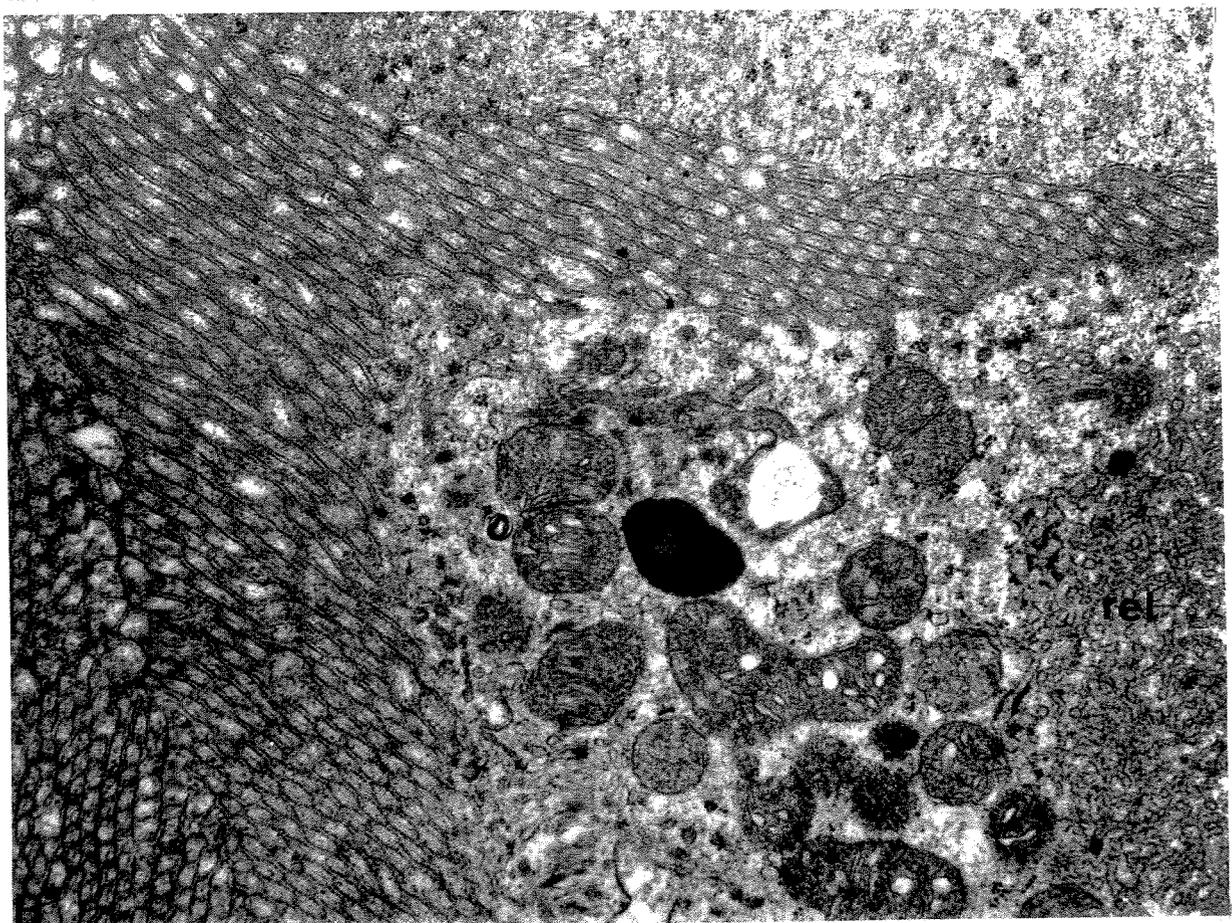
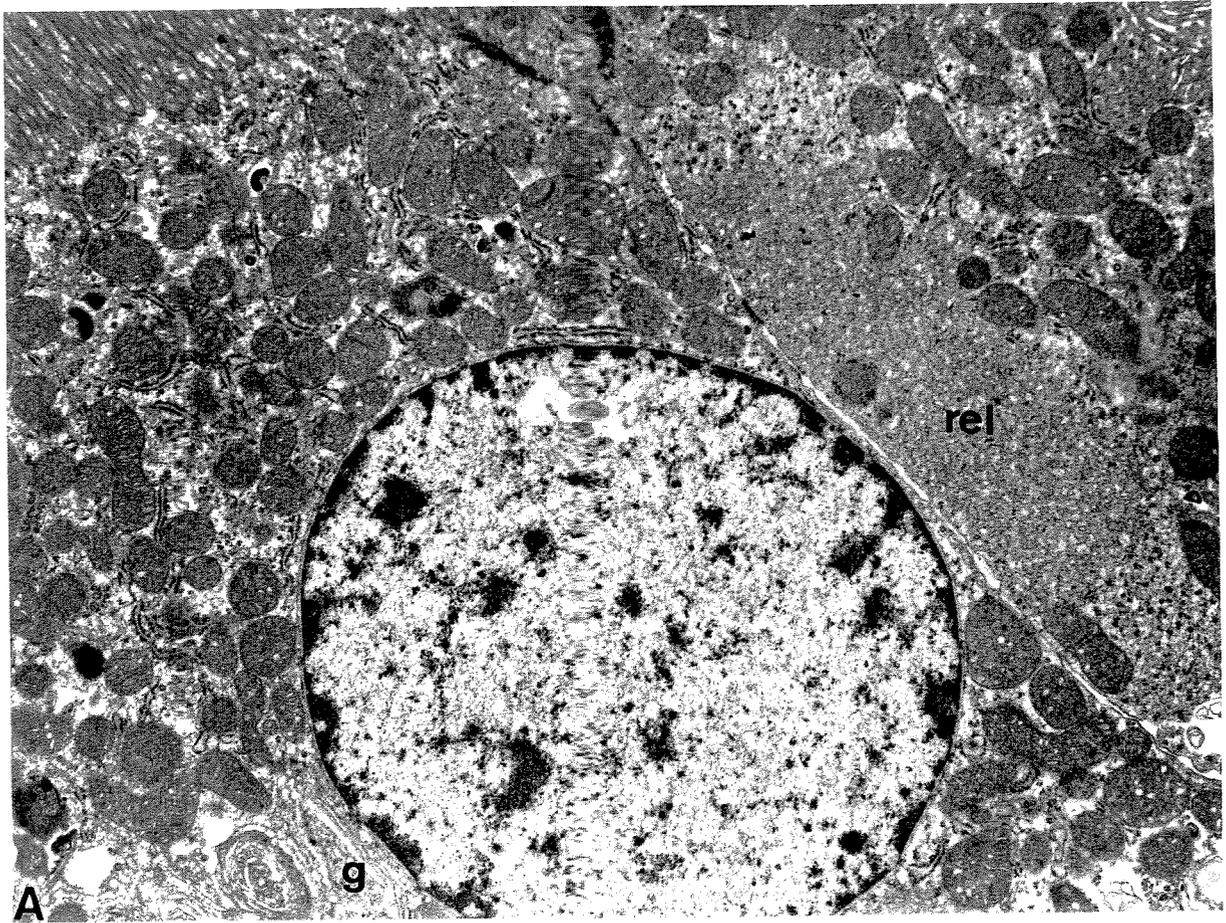
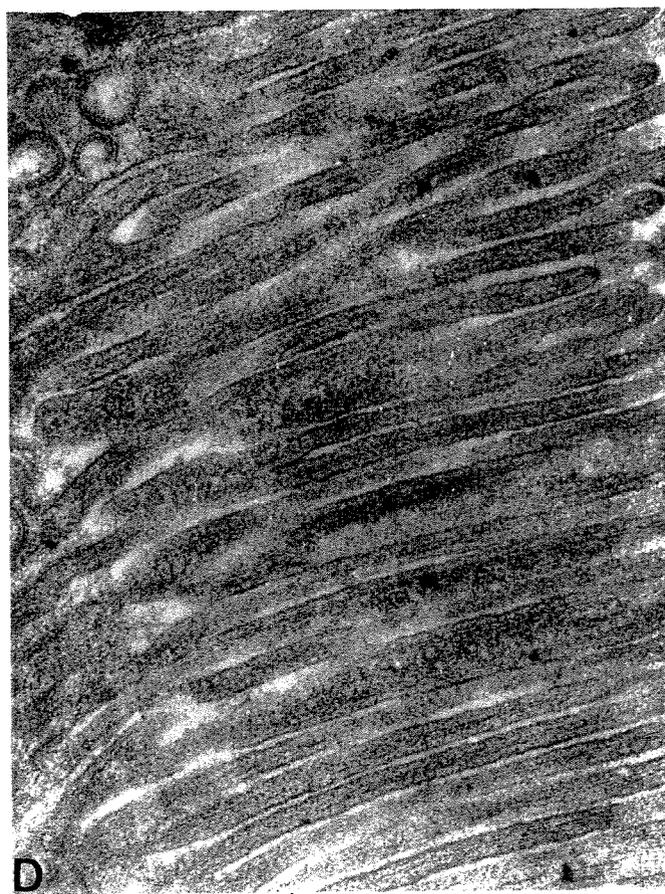
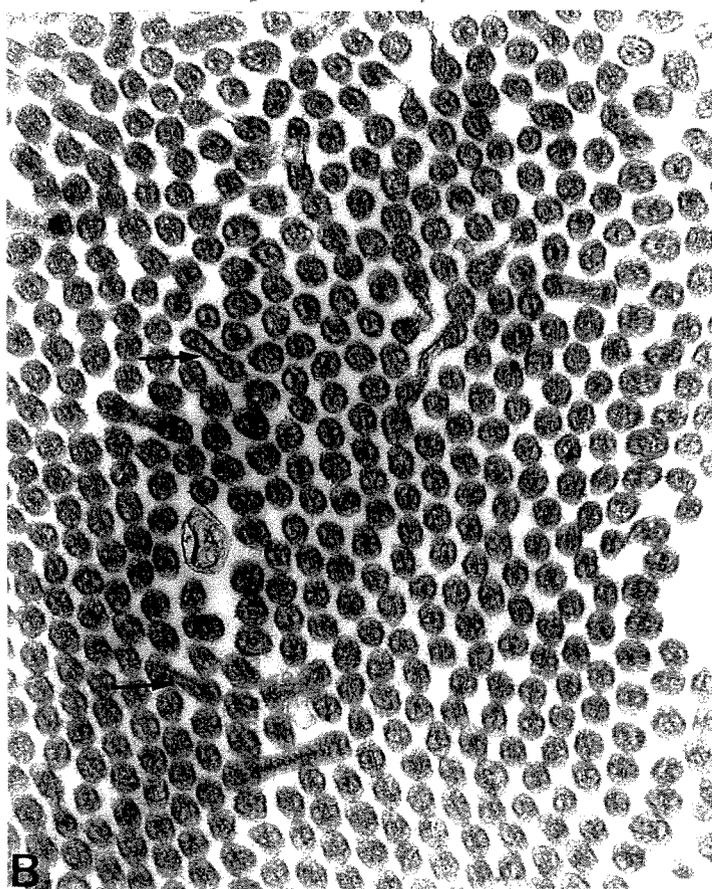
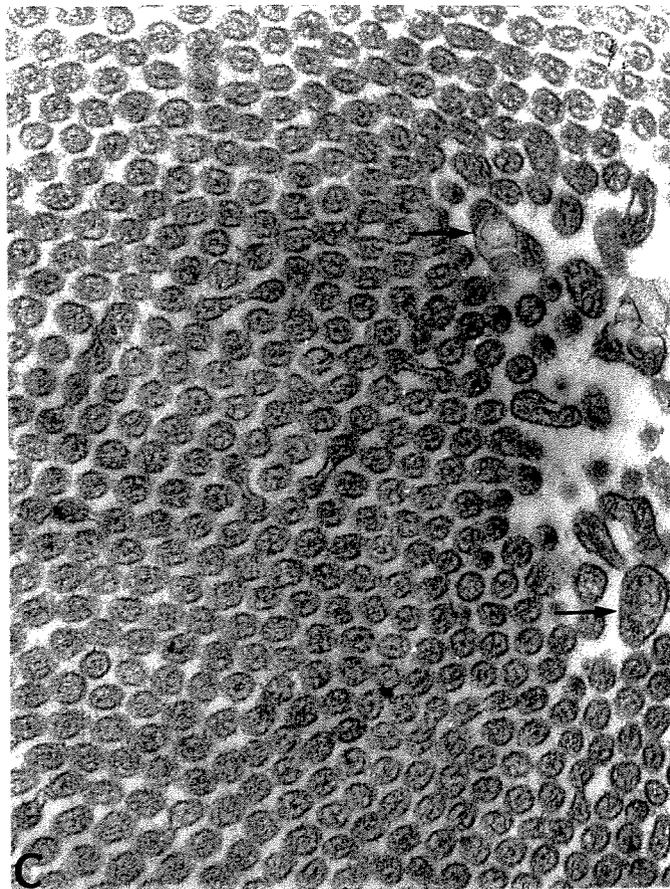
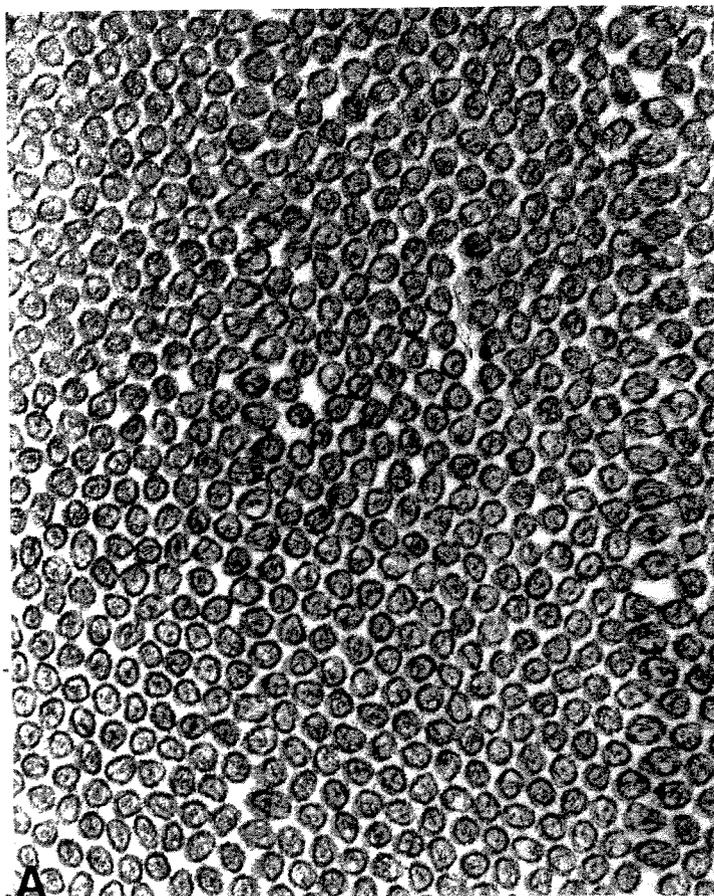


FIGURA 48 – CARACTERÍSTICAS DA BORDADURA EM ESCOVA.

- A** – GC: Detalhe mostrando as microvilosidades da bordadura em escova do túbulo proximal, cortadas transversalmente: cada $1 \mu\text{m}^2$ possui cerca de 72 microvilosidades (34.496x).
- B** – GE_{16h}: Observa-se redução do número de microvilosidades por μm^2 que passa a ser de 35 à 40. Observar que nesse campo há fusão de microvilosidades (setas) (34.496x).
- C** – GE_{5h}: Corte transversal das microvilosidades mostrando que precocemente há rarefação do seu número, e fusão com alteração do seu diâmetro e consequentemente do citoesqueleto axial (setas) (34.496x).
- D** – GE_{5h}: Corte longitudinal mostrando a fusão das microvilosidades após 5h do envenenamento (34.496x).



5. DISCUSSÃO

Os resultados funcionais renais obtidos pelo estudo em ratos acordados, não restritos, em gaiolas metabólicas individuais demonstraram que a dose de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni*, injetada endovenosamente, promoveu disfunções renais sugestivas de insuficiência renal aguda, 5h após a inoculação do veneno, quadro este que não foi modificado 16 e 48h após a inoculação.

A insuficiência renal aguda foi caracterizada pela queda na taxa de filtração glomerular, estimada pelo clearance de creatinina e pelo aumento da rejeição tubular de sódio. Estes resultados são compatíveis com as alterações severas glomerulares e tubulares, constatadas à microscopia de luz e confirmadas pela microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Através da avaliação da manipulação proximal e pós-proximal, determinada pelo clearance de lítio, observamos que a natriurese observada no GE_{5h} foi decorrente de um comprometimento funcional do néfron proximal. Esta disfunção foi acompanhada por alterações morfológicas severas neste segmento tubular, dentre as quais incluíam-se picnose nuclear, vacuolização citoplasmática, uma importante perda da integridade da bordadura em escova, além de extensas áreas de necrose tubular. Concomitantemente, todo o parênquima cortical apresentou aumento da acidofilia citoplasmática indicativa de sofrimento celular.

Oliver *et al.* (1951) verificaram que na necrose tubular aguda, proveniente de isquemia, ocorrem lesões que envolvem pequenos segmentos do túbulo permanecendo intacta a maior parte dos segmentos do néfron afetado. Estes autores descreveram que as lesões tubulares necróticas eram focais e envolviam partes dos segmentos proximais e distais do néfron, sendo que a alteração mais severa ocorria na porção reta do túbulo proximal.

Entretanto, regiões do túbulo contorcido proximal não envolvidas em necrose, podem demonstrar rarefação da bordadura em escova (Jones, 1982).

Na análise histopatológica dos segmentos pós-proximais do néfron, verificamos que a reabsorção compensatória de sódio por este segmento pode estar associada à proeminente dilatação dos túbulos distais e coletores o que provavelmente esteve relacionado ao aumento do aporte distal de sódio em consequência de uma rejeição aumentada deste íon pelo néfron proximal.

A observação de restos celulares na luz dos túbulos distais e coletores, além de perda celular e rompimento da lâmina basal tubular, certamente afetou, durante a evolução tóxica induzida pelo veneno de *B. moojeni*, a eficiência da compensação reabsortiva de sódio por estes segmentos tubulares.

O GE_{16h} apresentou maior eficiência reabsortiva de sódio se comparado ao GE_{5h}, embora a fração de excreção estivesse aumentada em relação ao GC. O néfron proximal excretou menos sódio se comparado ao GE_{5h} e o pós-proximal se manteve próximo aos padrões normais. Porém se compararmos a função pós-proximal neste grupo à apresentada pelo GE_{5h}, é possível verificar que houve perda da capacidade de compensação reabsortiva por estes segmentos. Este grupo apresentou aumento na fração de excreção de potássio.

Outra característica morfológica na necrose tubular aguda, proveniente de isquemia, é a presença de cilindros hialinos nos segmentos distais (Solez *et al.*, 1979). Estes são constituídos por glicoproteínas, entre outras substâncias, secretadas pelo ramo espesso ascendente da alça de Henle. Esta proteína, pela sua característica fortemente aniônica, pode agregar-se espontaneamente em decorrência das condições locais de fluxo lento e alta concentração iônica característica dos túbulos contorcidos distais. Estas glicoproteínas agregadas, juntamente com pigmentos resultantes da

degradação da hemoglobina e mioglobina, podem obstruir a luz tubular (Hoyer & Seiler, 1979) e contribuir para o quadro de necrose tubular aguda. Em nosso estudo encontramos cilindros formados a partir de restos celulares os quais poderiam contribuir, de maneira similar, para o quadro de necrose tubular aguda.

Por outro lado, no GE_{16h} a análise morfológica dos rins dos animais, apresentou uma grande quantidade de figuras mitóticas sugerindo regeneração epitelial. Apesar de uma melhor reabsorção de sódio nos néfrons proximal e pós-proximal, estes animais apresentaram regiões de intensa necrose tubular, as quais ocorreram em maior frequência na região córticomedular. Este resultado sugere que a intoxicação por veneno de *B. moojeni* provoca alterações mais intensas em néfrons de alto fluxo, podendo este fato, estar relacionada a um maior aporte de veneno a estas unidades funcionais.

Alterações histológicas típicas de regeneração, como mitoses, podem ser encontradas na mesma área de tecido que apresenta necrose (Lieberthal & Levinsky, 1992). Ainda nos rins dos ratos do GE_{16h}, de um modo geral, alterações no epitélio dos túbulos contorcidos proximais do parênquima cortical foram mais raramente encontradas. Os túbulos distais e coletores ainda apresentaram-se dilatados embora o aporte de sódio tenha diminuído. Alguns segmentos dos túbulos contorcidos distais apresentaram muitos restos celulares na luz e outros estavam rompidos e/ou com epitélio descontínuo. A preservação morfológica dos néfrons corticais podem explicar, pelo menos em parte, a preservação funcional encontrada.

Já o aumento na excreção de sódio e potássio observado no GE_{48h}, foi claramente devido à queda na função do néfron pós-proximal. Os resultados histológicos demonstraram que as células do epitélio dos túbulos contorcidos proximais já não apresentavam vacuolização e a bordadura em escova

recuperou parcialmente sua exuberância. Os segmentos pós-proximais apresentavam uma menor dilatação e raramente foram encontradas descontinuidades no epitélio destes túbulos. Pela grande quantidade de figuras mitóticas observadas no GE_{16h}, podemos supor um bom grau de regeneração do néfron pós-proximal e, neste caso, sugerir uma etapa de reestruturação do epitélio, fato este que também afetaria a função deste segmento. A recuperação morfológica proximal, associada à menor dilatação pós-proximal, sugere a recuperação funcional dos segmentos mais proximais do néfron.

Surpreendentemente, observamos pequena queda na filtração glomerular concomitante à elevação na excreção urinária de Na⁺ e K⁺, após administração de 0,2µg/g de veneno, sem que houvesse alterações morfológicas significativas na análise pela microscopia de luz. O estudo pelo clearance de lítio, mostrou tratar-se de uma disfunção predominantemente proximal. Mas como já verificado, as alterações funcionais renais nem sempre estão associadas às histopatológicas, mesmo porque alterações subcelulares seriam suficientes no sentido de acarretar distúrbios funcionais.

Segundo Solez *et al.* (1979) as alterações morfológicas encontradas na necrose tubular aguda, em humanos, parecem ser relativamente sutis comparadas à redução profunda na taxa de filtração glomerular observada nesta condição. Solez & Finckh (1984) explicam que uma só área de necrose tubular pode causar um refluxo substancial do filtrado glomerular, e um único “cast” pode obstruir um néfron inteiro. Assim a severidade da necrose tubular aguda, do ponto de vista funcional, pode estar correlacionada mais com o número de néfrons danificados e/ou obstruídos do que com uma massa total de tecido renal afetado. Os autores concluem que alterações morfológicas sutis, porém importantes, podem passar despercebidas também devido ao tamanho da amostra examinada.

No presente estudo, particularmente com relação aos estudos efetuados com microscopia eletrônica de transmissão, a falta de evidências inquestionáveis de alterações tubulares deve-se à condição focal da necrose tubular aguda, aliada ao fato de uma pequena quantidade de amostras terem sido analisadas.

As investigações em animais de experimentação referentes a danos renais provocados por venenos botrópicos, restringem-se àquelas causadas pelas espécies *B. asper*, *B. jararaca* e *B. insularis*. Em geral essas investigações têm sido feitas por grupos de pesquisadores da Costa Rica e Brasil.

Chaves *et al.* (1989), através de injeção i.m. da dose de aproximadamente 5µg/g do veneno de *B. asper*, estudaram as alterações locais e sistêmicas em camundongos. Após 1 e 3 horas eles observaram, apenas uma hiperplasia glomerular, sendo que não foram encontradas alterações tubulares. Após 24 horas, entretanto, demonstraram o aparecimento de lesões degenerativas vacuolares das células tubulares, com áreas hemorrágicas na região medular.

Rezende *et al.* (1989), em um estudo funcional e histopatológico das alterações provocadas pela dose de 14 µg/g de veneno bruto de *B. jararaca* e injetada i.p., observaram em rim de ratos, o estabelecimento de falência renal aguda. Esta foi caracterizada pelo decréscimo na taxa de filtração glomerular, no clearance osmolar e na excreção urinária de sódio associada a aumento da creatinina plasmática. O exame histopatológico mostrou glomérulos com leve proliferação da matriz mesangial e degeneração celular de túbulos, que apresentavam uma perda da bordadura em escova e vacuolização citoplasmática, não sendo encontrados sinais de necrose das células tubulares.

Burdmann *et al.* (1993), desenvolveram um modelo experimental para induzir insuficiência renal aguda em ratos utilizando-se de veneno bruto de *B. jararaca* injetado intravenosamente. Eles determinaram a dose de 0,4 µg/g através de comparações com a dose freqüentemente injetada por estas serpentes em acidentes com seres humanos. Dentre outros resultados, estes autores encontraram decréscimo na taxa de filtração glomerular e uma necrose celular em túbulos proximais e distais.

A maioria dos resultados encontrados nestes trabalhos, utilizando veneno botrópico, corroboram com aqueles encontrados no presente estudo. Em contraste a nossas observações, Rezende *et al.* (1989) verificaram uma queda na pressão arterial sistêmica e na excreção fracional de sódio nos animais tratados, sugerindo mecanismos pré-renais. Entretanto, assim como Burdmann *et al.* (1993), nós não encontramos modificações significativas na pressão arterial associadas às lesões renais.

A partir da análise dos principais constituintes químicos de venenos botrópicos e de sua atividade biológica, podemos focalizar diferentes vias conduzindo em direção ao esclarecimento dos fatores etiopatogênicos das lesões observadas. Dentre estas, vários autores concordam que a ação proteolítica do veneno tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (Brusés *et al.*, 1993; Gutiérrez & Lomone, 1995), podendo desta forma estar, direta ou indiretamente, associada à nefrotoxicidade.

Gutiérrez & Lomonte (1995) demonstraram que algumas miotoxinas botrópicas comportam-se mais como citotoxinas, o que pode denotar uma atividade tóxica destas em outros tipos celulares não musculares. O mecanismo de ação destas citotoxinas, resulta em um proeminente aumento no influxo celular de cálcio que ocasiona, entre outras, alterações do citoesqueleto tão bem caracterizadas em estudos sobre a ação dos venenos

em células musculares (Gutiérrez *et al.*, 1990). Provavelmente, as alterações da bordadura luminal das células dos túbulos proximais, vistas à microscopia de luz e comprovadas pela microscopia eletrônica, poderiam ser provenientes destas alterações do citoesqueleto.

A extensa superfície de microvilosidades exibida por este epitélio proximal, é de vital importância estrutural e funcional, e estas são mantidas graças a elementos do citoesqueleto como os filamentos de actina. Estes também interagem diretamente com as junções intercelulares, desmossomos e proteínas transmembrana como a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Molitoris, 1991; Linshaw *et al.*, 1992; Paller, 1994). Desta forma, é pertinente relacionar as alterações na bordadura, a perda de células pelos túbulos renais, bem como o significativo decréscimo na capacidade reabsortiva tubular de sódio após o envenenamento como sinais desencadeados pelo mesmo agente etiopatogênico, ou seja, um distúrbio do citoesqueleto frente à ação citotóxica do veneno. Por ser o veneno de *B. moojeni* aquele com uma intensa ação proteolítica entre os venenos botrópicos (Brazil & Pestana, 1909), as alterações encontradas por nós deveriam ser mais severas quando comparadas àquelas encontradas após a utilização de venenos de outras espécies deste gênero.

Vários trabalhos têm demonstrado que situações de isquemia com conseqüente depleção de ATP, levam a uma série de alterações citoesqueléticas (Molitoris, 1991; Abbate *et al.*, 1994; Sogabe *et al.*, 1996; Nurko *et al.*, 1996; Doctor *et al.*, 1996). Desta forma, torna-se difícil distinguir se as alterações tubulares encontradas no presente trabalho são resultantes da ação proteolítica, coagulante e portanto isquêmica, ou soma de ambas.

Embora a ação hemorrágica do veneno botrópico seja mais intensa na região da picada, tem sido também descrita hemorragia renal (Rosenfeld,

1965; Ohsaka, 1979; Chaves *et al.*, 1989), e pudemos constatar em nosso trabalho que, em alguns locais, ocorreu dano no endotélio capilar peritubular, e na lâmina basal destes vasos e de túbulos contorcidos distais, o que resulta em um comprovado extravasamento de sangue. Em suporte à possível ação das hemorraginas nós constatamos a presença de hematúria severa 5 e 16 horas após a inoculação.

Nossos estudos, em concordância com trabalhos da literatura onde foram utilizados venenos botrópicos (Rezende *et al.*, 1989; Burdmann *et al.*, 1993), apresentaram queda na taxa de filtração glomerular. Burdmann *et al.* (1993), encontraram massivo depósito de fibrina glomerular associado ao decréscimo na taxa de filtração glomerular, imediatamente após a infusão de veneno.

Amaral *et al.* (1985), observaram em pacientes que sofreram acidente botrópico com conseqüentes complicações renais, trombos de fibrina nos capilares glomerulares. No exame histopatológico feito por nós, foram verificadas alterações estruturais severas nos glomérulos renais e, em alguns casos, áreas de necrose extensa. Foi observado o quadro de glomérulonefrite caracterizada por aparente hiper celularidade e lobulação do glomérulo e presença de infiltrado leucocitário no tufo de capilares glomerulares. Entretanto, esta aparente hiper celularidade parece estar associada à uma diapedese de neutrófilos para os capilares glomerulares e não à uma hiperplasia de células mesangiais, devido ao curto espaço de tempo entre a agressão e tal resultado. Além disso, pelo fato de não ter sido feito um estudo morfométrico, não podemos afirmar a ocorrência de aumento da celularidade glomerular. Observamos ainda, áreas de condensação da matriz mesangial com a presença de lesões hialinas nodulares.

Pelo fato do veneno de *B. moojeni* possuir forte ação coagulante devido à rápida destruição do fibrinogênio, nós esperávamos encontrar acúmulo de fibrina nos capilares glomerulares, o que explicaria, pelo menos em parte, as alterações glomerulares encontradas por nós. Entretanto, em nosso estudo, não encontramos um depósito significativo de fibrina nos capilares glomerulares após utilização de técnica histopatológica específica (Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory), nem tampouco através da microscopia eletrônica de transmissão.

As alterações glomerulares puderam ser observadas, com mais detalhes, pela microscopia eletrônica de transmissão e varredura, as quais revelaram alterações extremas na estrutura glomerular. Estas incluíram vacuolização citoplasmática podocitária, perda de pedicelos e conseqüentemente do diafragma e das fendas de filtração, transformação vilosa dos pedicelos além de mesangiólise ocasionando introjeção de células mesangiais para a luz capilar e formação de microaneurismas. Estes achados influíram nas alterações estruturais, tão bem observadas à microscopia eletrônica de varredura, já que a sustentação dos tufos capilares depende tanto do mesângio quanto do epitélio visceral. Além disso, tais disfunções dos podócitos leva a importantes alterações na permeabilidade e seletividade de filtração dos capilares glomerulares (Whiteside *et al.*, 1993).

Em glomerulonefrites humanas associadas com síndrome nefrótica têm sido encontradas alterações podocitárias como perda dos prolongamentos primários e secundários, vacuolização citoplasmática e perda da integridade normal do diafragma da fenda de filtração (Grishman & Churg, 1975; Yoshikawa *et al.*, 1986). Estas alterações podocitárias têm sido bem caracterizadas através da utilização de modelos experimentais utilizando a administração do aminonucleosídeo puromicina, um agente tóxico às células do epitélio visceral, que induz nefrose (Caulfield *et al.*, 1976; Whiteside *et*

al., 1993). Nossos achados são similares a estes podendo conferir ao veneno de *B. moojeni* uma ação tóxica para células do epitélio visceral.

No sentido de entender como o veneno poderia provocar tais alterações no epitélio visceral, devemos considerar que a maior parte da actina F glomerular está concentrada nos prolongamentos dos podócitos, os quais envolvem os capilares glomerulares, sendo que os feixes destes filamentos, densamente empacotados, estão associados à habilidade de manter ou gerar mudanças significativas na forma dos podócitos, além de serem responsáveis pela sustentação destes processos (Vasmont, 1984; Andrews, 1981). Conseqüentemente, alterações na agregação do citoesqueleto pedicelar acarretam diminuição de filamentos de actina que ancoram o epitélio podocitário à lâmina de filtração e que permitem a sustentação dos pedicelos (Whiteside *et al.*, 1993). Quanto à perda de pedicelos é importante ressaltar que, Arakawa (1970), Arakawa & Tokunaga (1972) e Carroll *et al.* (1973) demonstraram através da microscopia eletrônica de varredura, que esta perda é causada pela retração destes em direção ao corpo celular e não pela fusão de pedicelos adjacentes formando um “sincício” como proposto por Simon & Chatelanat (1969).

Andrews (1981) relatou que o tratamento *in vitro* de glomérulos com citocalasina-B (uma droga que inibe a contração dos filamentos de actina), induziu mudanças na forma dos processos pedicelares e considerou que estas mudanças podem alterar o número de fendas de filtração abertas, o que poderia ser avaliado pelo efluxo de soluto através dos capilares. Ele considerou ainda a possibilidade destas alterações levarem a mudanças no coeficiente de ultrafiltração e conseqüentemente na taxa de filtração glomerular. Desta forma, aqui devemos considerar também o mecanismo de ação das citotoxinas, sugerido por Gutiérrez & Lomonte (1995) e, neste caso,

considerar também que o glomérulo é a primeira estrutura do néfron a entrar em contato com o veneno.

Além disso, devemos salientar que a superfície das células endoteliais e epiteliais podocitárias retêm heparan sulfato (Stow *et al.*, 1985; Farquhar *et al.*, 1985) presente nas lâminas raras externas da lâmina basal, e que os pedicelos são cobertos com sialoproteínas as quais, juntamente com o heparan sulfato, contribuem com a carga aniônica (Kerjaschki *et al.*, 1984). Se este mecanismo de ação envolve interações eletrostáticas entre sítios catiônicos das toxinas e grupos carregados negativamente esta negatividade, teoricamente, facilitaria a interação de tais toxinas com a membrana celular dos podócitos, o que poderia acarretar aumento do cálcio intracelular e conseqüentes alterações citoesqueléticas. Tomando os resultados acima, podemos relacionar as alterações nos pedicelos, bem demonstradas neste trabalho através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, com alterações citoesqueléticas observadas e provocadas pelo veneno de *B. moojeni*, às quais foram similares às induzidas pela citocalasina-B (Andrews, 1981).

Porém, se as citotoxinas presentes nos venenos botrópicos forem tão efetivas, no sentido de provocar um aumento na concentração de cálcio intracelular e alterações nos filamentos de actina e na sustentação glomerular, devemos considerar também a presença destes filamentos limitando as fenestrações existentes nas células endoteliais dos capilares glomerulares (Vasmant *et al.*, 1984). Como já citado, estas também retêm heparan sulfato na superfície, o que confere uma negatividade à região facilitando a interação das toxinas e podendo conseqüentemente acarretar modificações na estrutura destas fenestrações e permeabilidade seletiva.

Além deste mecanismo, sugerido por nós, de alterações citoesqueléticas induzidas pelo veneno, podemos considerar outro mecanismo que isolado ou

somado a este, explicaria o desprendimento dos pedicelos da lâmina de filtração glomerular. Baramova *et al.* (1989) demonstraram a habilidade de hemorraginas crotálicas em degradar proteoliticamente, *in vitro*, componentes da lâmina basal e da matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, entactina, nidogênio e gelatinas.

Ohsaka *et al.* (1973) estudaram a ação *in vitro* de frações hemorrágicas do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* sobre membrana basal glomerular isolada e demonstraram que proteínas (ou peptídeos) bem como carboidratos da membrana basal foram liberados por todas as frações sugerindo que os princípios hemorrágicos deste veneno podem ser enzimas proteolíticas com especificidade altamente seletiva, incluindo collagenases de tipos desconhecidos.

Considerando-se que a lâmina de filtração glomerular é formada pela união das lâminas basais do endotélio capilar e do epitélio visceral, e que o endotélio destes capilares é fenestrado, facilitando assim, o contato entre as hemorraginas e os tais constituintes da lâmina de filtração, principalmente colágeno tipo IV e laminina, é plausível supor que possam existir alterações na estrutura desta lâmina.

Na figura 49 podemos observar o arranjo das moléculas que constituem a lâmina de filtração glomerular. Observe que a laminina interage com moléculas da matriz extracelular como o colágeno tipo IV, a entactina e o proteoglicano heparan sulfato. Ela também se liga, através dos seus receptores de integrinas e de outras moléculas, à membrana celular do pedicelo promovendo assim a adesão deste à lâmina rara externa. Se considerarmos que o veneno de *B. moojeni* tenha capacidade de digerir alguns destes componentes, como já verificado em outras espécies, acarretaria alterações na ligação da laminina com as integrinas dos pedicelos impossibilitando a

ancoragem destes. Além disso, a membrana basal glomerular contém uma variedade de sítios aniônicos (>80%) devido à presença do proteoglicano heparan sulfato (Rennke *et al.*, 1975; Caulfield & Farquhar, 1976; Kanwar & Farquhar, 1979a,b). Se o veneno interferir na carga aniônica, ou seja, se ele diminuir a concentração de heparan sulfato e/ou ácido siálico na lâmina basal glomerular, poderá levar ao comprometimento da barreira eletrostática e desenvolvimento de proteinúria, pela não barragem de proteínas carregadas negativamente. Por outro lado, se afetar a lâmina densa central constituída de colágeno tipo IV, a “barreira física” comprometida levará também à perda da seletividade de filtração.

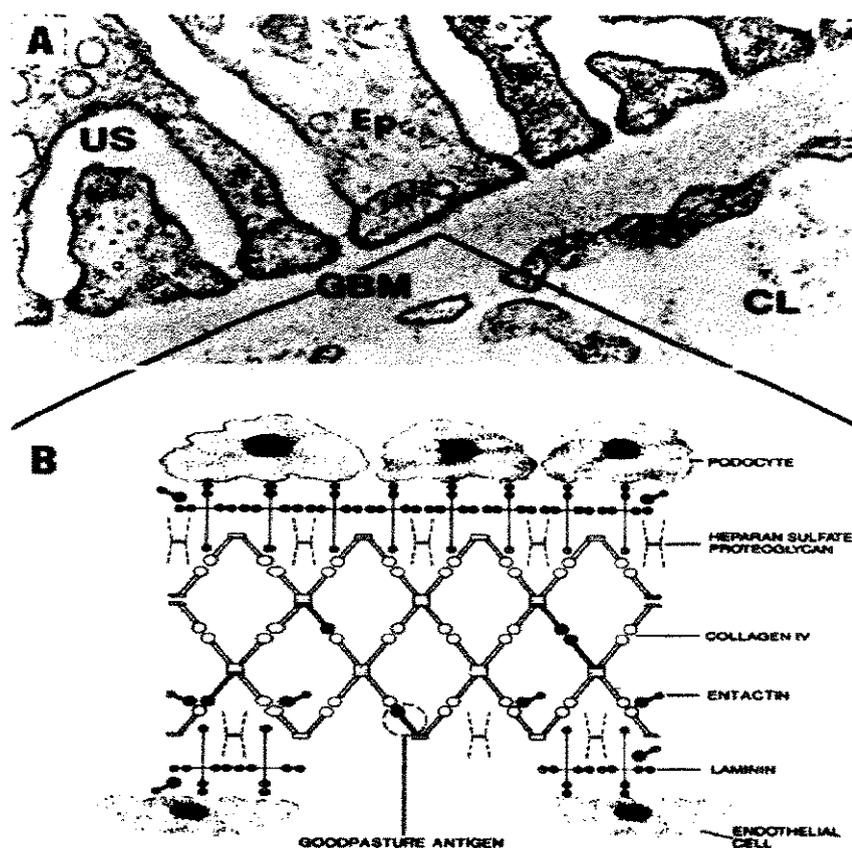


Figura 49- A: Eletromicrografia da parede de um capilar glomerular. GBM: membrana basal glomerular, EP: células epiteliais, En: células endoteliais, US: espaço urinário e CL: lúmen capilar. B: Esquema mostrando o arranjo das moléculas na lâmina basal glomerular (Por Hudson *et al.*, 1991, *apud*, Haraldson & Hassell, 1995).

No presente trabalho, as observações à microscopia eletrônica não deixaram dúvida quanto às alterações ultraestruturais induzidas pelo veneno na estrutura trilaminar da lâmina basal da barreira de filtração, e portanto nos locais de barreiras física e eletrostática.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado à lâmina basal que envolve os epitélios dos vários segmentos tubulares do néfron, onde um desequilíbrio entre os componentes colagênicos, as glicoproteínas não colagênicas e os proteoglicanos pode induzir distúrbios bioquímicos e estruturais que comprometerão a eficiência da função do néfron.

Recentemente, Willinger *et al.* (1995) estudaram a nefrotoxicidade direta do veneno de *V. russelli* através de perfusão artificial de rim isolado. As alterações morfológicas encontradas por eles foram caracterizadas por destruição desta barreira iônica de filtração glomerular e lise de paredes vasculares, além de vários graus de injúria epitelial em todos os segmentos tubulares.

Por outro lado Uiker & Kriz (1995) verificaram que o veneno de Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) provoca mesangiólise. Eles atribuíram estas alterações à alta atividade proteolítica deste veneno.

Estas alterações poderiam, *per se*, ter ocasionado as desestruturações glomerulares observadas por nós, porém, o veneno e/ou seus metabólitos podem ainda, ter um efeito tóxico direto sobre o mesângio causando mesangiólise. Para entender estas alterações devemos considerar o fato de que a matriz mesangial é composta por uma complexa mistura de várias classes de moléculas, as quais incluem colágenos tipo IV, V e VI, sendo o tipo IV o mais abundante juntamente com as glicoproteínas como laminina e fibronectina. A maioria dos sítios aniônicos da matriz mesangial é provida pelo proteoglicano heparan sulfato, em maior quantidade, e pelo

proteoglicano condroitin sulfato, em menor quantidade (Kanwar *et al.*, 1983a, b; Sraer *et al.*, 1993). Se o veneno de *B. moojeni* possuir atividades que causem degradação de componentes da matriz extracelular, semelhantes às observadas em outras espécies, poderia levar à desestruturação do mesângio, o que explicaria a mesangiólise verificada neste trabalho e o comprometimento da sustentação dos capilares.

Por outro lado estas células, consideradas macrofágicas tanto pelo seu aspecto dendrítico como pela atividade fagocítica, teriam papel na limpeza da lâmina basal pela captura de material que eventualmente se acumule no local durante o processo debilitado pelo veneno, da filtração glomerular. É possível que a migração das células mesangiais para a luz capilar tenha relação com mecanismos de defesa desencadeados pela agressão tóxica do veneno.

Nossas observações dos efeitos do veneno bruto de *B. moojeni* na porção tubular do néfron serão futuramente melhor avaliadas, após um estudo mais abrangente. De qualquer forma verificamos que secções de túbulos proximais, distais e de alça de Henle que apresentavam integridade morfológica podiam ser encontradas próximas às secções de seus congêneres com alterações na bordadura em escova, nas mitocôndrias ou no sistema endossômico lisossômico. As alterações constatadas na população mitocondrial, sabidamente engajada no transporte ativo no néfron proximal e distal, caracterizaram-se pela aquisição de forma globosa indicativa de alterações da permeabilidade da membrana externa e homeostase da matriz mitocondrial, em detrimento da forma pleomórfica característica destas organelas no rim. Além disso, cristólise ou ruptura das cristas, agregação focal das cristas ou alteração da sua estrutura lamelar para túbulo-vesicular ou vesicular e o aumento na eletrondensidade da matriz, em conjunto, são indícios de prejuízo funcional. Outro fato interessante foi o aumento da

anomalias essas respaldadas pela queda na filtração glomerular. Desta forma, nossos resultados sugerem que uma ação nefrotóxica direta do veneno como fator patogênico é bastante plausível. Estudos subsequentes envolvendo abordagem mais específica são necessários para dar suporte a esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

- Os efeitos da administração endovenosa de 0,2 µg/g após 5h e de 0,4µg/g após 5, 16 e 48h da inoculação do veneno bruto de *Bothrops moojeni*, provocou alterações funcionais corroboradas, no caso da segunda dose, por alterações morfológicas compatíveis ao quadro de IRA.
- A comparação dos efeitos fisiológicos induzidos pelas doses de 0,2 µg/g e 0,4µg/g demonstrou que após 5h, a dose de 0,2 µg/g foi suficiente para provocar efeitos similares àqueles observados com o dobro desta dose, no que diz respeito à função tubular. Já a função glomerular demonstrou queda significativa na taxa de filtração com a dose de 0,4µg/g, o que não foi observado com a metade desta dose. Estes resultados permitem concluir que, dentro destas condições experimentais, os túbulos proximais são os elementos do nefron mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos do veneno.
- A observação dos efeitos funcionais provocados pela dose de 0,4µg/g demonstrou que a excreção aumentada de Na⁺ e K⁺ é predominantemente decorrente de distúrbios envolvendo o nefron proximal nas primeiras 5h, porém após 48h a perda desses íons na urina é predominantemente decorrente de distúrbios nas porções pós-proximais do nefron.
- A injeção i.v. de 0,4µg/g do veneno bruto de *B. moojeni* não produziu alterações na pressão arterial média dos ratos às 5, 16 e 48 h após o envenenamento, indicando que dentro destas condições experimentais o veneno não tem capacidade de induzir distúrbios na hemodinâmica.

- As figuras mitóticas sugestivas de regeneração, encontradas 16h após a inoculação i.v. da dose de 0,4µg/g, corroboram os resultados de melhora na reabsorção proximal e pós-proximal de Na⁺.
- Foram observadas alterações severas morfológicas e ultraestruturais nos elementos envolvidos na filtração glomerular, os quais repercutiram na taxa de filtração glomerular.
- Considerando que todos os distúrbios funcionais tem seu ponto de origem ao nível molecular, podemos supor que as alterações ultraestruturais que acometeram os componentes da barreira de filtração em particular, dos glomérulos em geral e dos túbulos do nefron, refletem provavelmente alterações moleculares induzidas pelo veneno, cujos sítios de ação seriam os elementos da matriz extracelular e as membranas celulares, repercutindo em alterações dos elementos do citoesqueleto. Estudos subseqüentes, por nós delineados, avançarão no sentido de prover sustentação científica à esta hipótese.

7. ABSTRACT

ABSTRACT

Accidents by snakebites are a common event in tropical countries and it is an important public health problem in Brazil. After envenoming by bothropic and crotalic accidents may include acute renal failure, being it considered the main cause of death. Interposed between the internal and external milieu and responsible for the organism haemostasy, the kidneys and the epithelia constituting the several nephrons constituents, respond to a number of systemic injuries including ophidic envenoming. This study was designed to investigate morphological and functional renal disturbances induced by *Bothrops moojeni* snake crude venom. After 5, 16 and 48h of endovenous administration of 0.4 μ g/g and 5h after 0.2 μ g/g of the venom, the renal function was assessed by the creatinine and lithium clearance and morphological studies by light microscopy and transmission and scanning electron microscopies. The physiological and morphological findings after *B. moojeni* venom in the present study showed an early renal tubule disturbance including acute renal proximal and post-proximal tubular impairment to sodium handling. Additionally, there was a significant impairment in the glomerular filtration rate (GFR) associated with severe morphological disturbances of the renal glomerulus. The functional and morphological findings were observed despite of unchanged mean arterial blood pressure. The decrease of GFR was not related to presence of fibrin deposits into the glomerular capillary loops. In conclusion our results suggest a precocious nephrotoxic action of *B. moojeni* venom, inducing morphological and functional significative changes in the rat kidney.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBATE, M.; BONVENTRE, J.V. & BROWN, D. - The microtubule network of renal epithelial cells in disrupted by ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.*, **267**: F971-F978, 1994.
- AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A., GODOY, P. & MIRANDA, D. - Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* **23**: 877-885, 1985.
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A ; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G. & CASTRO, J.R.S. - Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **28**: 220-227, 1986.
- ANDREWS, P.M. - Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int.* **20**: 549-562, 1981.
- ANDREWS, P.M. & BATES, S.B. - Filamentous actin bundles in the kidney. *Anat. Record* **210**: 1-9, 1984.
- ARAKAWA, M. - A scanning electron microscopy of the glomerulus of normal and nephrotic rats. *Lab. Invest.* **23**: 489-496, 1970.
- ARAKAWA, M. & TOKUNAGA, J. - A scanning electron microscope study of the glomerulus. Further consideration of the mechanism of the fusion of podocyte terminal processes in nephrotic rats. *Lab. Invest.* **27**: 366-373, 1972.
- ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YANAMOTO T.; KAJI, K. & HAYASHI, H.- Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **190**: 148-153, 1993.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A P.; ASPERTI, M.C.A. & MANDELBAUM, F.R. - Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* **23**: 691-706, 1985.
- AUNG-KHIN, M. - Histological and ultrastructural changes of the kidneys in renal failure after viper envenomation. *Toxicon* **16**: 71-75, 1978.
- 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.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A. & LAURE, C.J. - Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* **23**: 631-636, 1985.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. - Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Archs. Biochem. Biophys.* **275**: 63-71, 1989.
- BARNES, J. L.; HEVEY, K. A.; HASTINGS, R.R. & BOCANEGRA, R.A. - Mesangial cell migration precedes proliferation in Habu snake venom-induced glomerular injury. *Lab. Invest.* **70**: 460-467, 1994.

- BARNES, J.L. - Amelioration of Habu venom-induced glomerular lesions: potential role for platelet secretory proteins. **J. Lab. Clin. Med.** **114**: 200-206, 1989.
- BARRAVIERA, B. & PEREIRA, P.C.M. - Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: (BARRAVIERA, B. ed.) **Venenos animais: uma visão integrada**. Ed. Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, 1994. p.261-280.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. **Manual de práticas para histologia normal e patológica**. EDART-EDUSP, SP. 1976. P. 329
- BRAZIL, V. & PESTANA, B.R. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophídico. **Revta. Med. S Paulo.** **19**: 375-382, 1909.
- BRAZIL, V. & VELLARD, J. Action coagulante et anticoagulante des venins. **Ann. Institut. Pasteur** **42**: 403, 1928.
- BROD, J. & SIROTA, J.H. - The renal clearance of endogenous creatinine in man. **J. Clin. Invest.** **27**: 645-651, 1948.
- BRUSÉS, J.L.; CAPASO, J.; KATZ, E. & PILAR, G. Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. **J. Neurochem.** **60**: 1030-1042, 1993.
- BURDMANN, E.A.; WORONIK, V.; PRADO, E.B.A.; ABDULKADER, R.C.; SALDANHA, L.B.; BARRETO, O.C.O. & MARCONDES, M. - Snakebite - induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg** **48**: 82-88, 1993.
- CARDOSO, J. L. C. - Bothropic accidents. (*Abstract*). **Mem. Inst. Butantan** **52** (suppl.), 1990, pp.43.
- CARROLL, N.; CROCK, G.W.; FUNDER, C.C.; GREEN, C.R.; HAM, K.N. & TANGE, J.D. - Scanning electron microscopy of aminonucleoside nephrosis. **J. Pathol.** **111**: 37-42, 1973.
- CATTELL, V. & RADFIELD, J.W.B. - Focal mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat caused by Habu snake venom. **Am. J. Pathol.** **87**: 511-523, 1977.
- CAULFIELD, J.P. & FARQUHAR, M.G. - Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes. Their possible role in filtration and attachment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **73**: 1646-1650, 1976.
- CAULFIELD, J.P.; REID, J.J. & FARQUHAR, M.G.- Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. **Lab. Inv.** **34**: 43-59, 1976.
- CHAN, S.H.; & HIGGINS, E., Jr. - Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria. **Can. J. Biochem.** **56**: 111-116, 1978.
- CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. - Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (TERCIOPELO) venom in mice. **Toxicon** **10**: 1085-1093, 1989.

- CHUGH, K.S.; AIKAT, B.K.; SHARMA, B.K.; RASH, S.C.; MATHEW, M.T. & DAS, K.C. - Acute renal failure following snake bite. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 692-697, 1975.
- COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. & KUMAR, V. - **Robbins pathologic basis of disease.** 5 th ed. W. B. SANDERS company, USA, 1994, pp. 1-34.
- COUDRIER, E.; KERJASCHKI, D. & LOUWARD, D.- Cytoskeletal organization and submembranous interactions in intestinal and renal brush borders. *Kidney. Int.* **34**: 309-320, 1988.
- CRUZ -HÖFLING, M. A.; COGO, J. C. & RODRIGUES-SIMIONI, L. Vascular changes induced by *Bothrops insularis* venom. Abstract. **V Congresso Iberoamericano de Biologia Celular.** Málaga, Espanha, 1992, pp. 166.
- D'ABREU, A.C.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J.C. & CRUZ-HÖFLING M.A - The nephrotoxic action of the crude *Bothrops insulares* venom and of PLA₂-containing a fraction. (*Abstract*). **5th Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins.** Frederick, Maryland, 1995. pp.140.
- DA SILVA, O.A.; LÓPEZ, M. & GODOY, P. - Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **28**: 401-407, 1979.
- DATE, A. & SHASTRY, J.C.M. - Renal ultrastructure in cortical necrosis following Russell's viper envenomation. *J. Trop. Med. Hyg.* **84**: 3-8, 1981.
- DATE, A. & SHASTRY, J.C.M. - Renal ultrastructure in acute tubular necrosis following Russell's viper envenomation. *J. Pathol.* **137**: 225-241, 1982.
- DOCTOR, R.B.; ZHELEV, D.V. & MANDEL, L.J. Loss of plasma membrane structural support in ATP- depleted renal epithelia. *Am. J. Physiol.* **271**: C439-C449, 1996.
- EAGLE, H. T. The coagulation of blood by snake venoms and its physiological significance. *J. exp. Med.* **65**: 613, 1937.
- FURTADO, M.F.D.; COLLETO, G.M.D.D. & DIAS DA SILVA, W. - Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos.1. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan* **53**: 149-159, 1991.
- GARCIA, E. W.; GONTIJO, J.A.R. & FIGUEIREDO, J.F. - Clearance de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudados em gaiolas metabólicas. *J. Bras. Nefrol.* **13**: 89-94, 1991.
- GLENNEY, J.R.J.; KAULFUS, P. & WEBER, K. - F actin assembly modulated by villin: Ca⁺⁺-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell.* **24**: 471-480, 1981.
- GOIN, C.J. & GOIN, O.B.- **Introduction to herpetology.** Ed. W.H. Freeman and company. 2ª. ed. San Francisco, 1971. pp. 353

- GRISHMAN, E. & CHURG, J. - Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes. **Kidney Int.** 7: 111-122, 1975.
- GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. - Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-1424, 1995.
- HOGUE, A.R. - Preliminary account on neotropical *Crotalidae* (serpentes *Viperidae*). **Mem. Inst. Butantan** 32: 109-208, 1965.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S.A.R.W. L. - Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan** 36: 109-208, 1972.
- HOYER, J. R. & SEILER, M. W. - Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. **Kidney Int.** 16: 279-285, 1979.
- HUDSON, B.G.; GUNWAR, S.; WISDOM, B.J.; Jr, HUDSON, M.D. & NOELKEN, M.E. In **Nephrology** (ed. M. Hatano). Springer Verlag. Tokyo, 1991. pp.852-6. *Apud* (HARALSON, M.A. & HASSELL, J.R. eds.) **Extracellular matrix – A practical approach**. Oxford University Press. New York, 1995. p.100.
- IAINA, A. & SCHWARTZ, D. Renal tubular cellular and molecular events in acute renal failure, *Nephron*, 68: 413-418, 1994.
- JONES, D. B. Ultrastructure of human acute renal failure. **Lab. Invest.** 46: 254-264, 1982.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A.; DA SILVA, M.L.R.; KUSANO, E.J.U. & MENDONÇA, J. S. - Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: A prospective study. **Toxicon** 32: 743-748, 1994.
- JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. – Acidentes por animais peçonhentos. In: (AMATO NETO, V. & BALDY, J. L. S., eds.) **Doenças transmissíveis**, 3º ed., São Paulo, Sarvier, 1989.p. 133-141.
- KAISER, E. & MICHL, H. - Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: **Venomous animals and their venoms**. Eds. Wolfgang Bücherl and Eleanor E. Buckley. Vol. 2. New York, Academic Press, 1971. p. 307-318.
- KAMIGUTI, A.S. & CARDOSO, J.L.C. - Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon** 27: 955-963, 1989.
- KAMIGUTI, A.S.;CARDOSO, J.L.C.;THEAKSTON, R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.; HUTTON, R.A.; RUGMAN, F.P.; WARRELL, D.A. & HAY, C.R.M. - Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon** 29: 961-972, 1991.
- KANWAR, Y. S. & FARQUHAR, M.G. -Anionic sites in the glomerular basement membrane. *In vivo* and *in vitro* localization to the laminae rarae by cationic probes. **J. Cell. Biol.** 81: 137-153, 1979a.
- KANWAR, Y. S. & FARQUHAR, M.G. - Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 1303-1307, 1979b.

- KANWAR, Y.S.; JAKUBOUSKI, M.L. & ROSENZWEIG, L.J. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix. **Eur. J. Cell. Biol.** **31**: 290-295, 1983a.
- KANWAR, Y.S.; JAKUBOUSKI, M.L. & ROSENZWEIG, L.J. Distribution of de novo synthesized sulfated glycosaminoglycans in the glomerular basement membrane and mesangial matrix. **Lab. Invest.** **49**: 216-225, 1983b.
- KERJASCHKI, D.; SHARKLEY, D.J. & FARQUHAR, M.G. Identification and characterization of podocajyxin – the major sialoglycoprotein of the renal glomerular epithelial cell. **J. Cell. Biol.** **98**: 1591-1596, 1984.
- KINI, R.M. & EVANS, H.J. - A model to explain the pharmacological effects of snake venoms phospholipases A₂. **Toxicon** **27**: 613-635, 1989.
- KOCHVA, E. - The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** **25**: 65-106, 1987.
- KOOMANS H.A., BOER, W.H. & MEES, E.J.D.- Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. **Kidney Int.** **36**: 2-12, 1989.
- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. **Biochem. J.** **119**:129-138, 1970.
- LINSHAW, M.A.; FOGEL, C.A.; DOWNEY, G.P.; KOO, E.W.Y. & GOTLIEB, A.L. Role of cytoskeleton in volume regulation of rabbit proximal tubule in dilute medium. **Am. J. Physiol.** **262**: F144-F150, 1992.
- MASON, J.; BECK, F.; DORGE, A.; RICK, R & THURAU, K.- Intracellular electrolyte composition of renal tubule following renal ischemia. **Kidney Int.** **20**: 61-70, 1981.
- MC MANUS, J.F.A. The histochemical demonstration of mucins after periodic acid. **Nature.** **158**: 202-207, 1946.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciê. Cult.** **30**: 665-676, 1978.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular.** Edgard Blücher-Funcamp. 1980, pp. 71.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, SP., 1980, pp.277.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília, D.F., 1997. (No prelo).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cartilha de ofidismo Cobral**, 2ª ed. pp.32, 1991.
- MOLITORIS, B. A.; HOILLEN, C.A.; DAHL, R.H.; AHNEN, D. J.; WILSON, P.D. & KIM, J. - Characterization of ischemia induced loss of epithelial polarity. **J. Membr. Biol.** **106**: 233-242, 1988.

- MOLITORIS, B.A. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. **Am. J. Physiol.** **260**: F769-F778, 1991.
- MOOSEKER, M.S. - Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. **Annu. Ver. Cell. Biol.** **1**: 269-293, 1985.
- NURKO, S.; SOGABE, K.; DAVIS, J. A.; ROESER, N.F.; DEFRAIN, M.; CHIEN, A.; HINSHAW, D.; ATHEY, B.; MEIXNER, W.; VENKATACHALAM, M.A. & WEINBERG, J.M. Contribution of actin cytoskeletal alterations to ATP depletion and calcium-induced proximal tubule cell injury. **Am. J. Physiol.** **270**: F39-F52, 1996.
- OHSAKA, A.; JUST, M. & HABERMANN, E.- Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. **Bioch. Biophys. Acta** **323**: 415-428, 1973.
- OLIVER, J.; MAC DOWELL, M.; TRACY, A. – The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. **J. Clin. Invest.** **30**:1307-1439, 1951.
- ORAM, S.; ROSS, G.; PELL. L. & WINTELER, J. - Renal cortical calcification after snake bite. **Br. Med. J.** **1**: 1647-1648, 1963.
- OWNBY, C. L. – Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: (SHIER, W. T. & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990, p. 602-654.
- PALLER, M.S. Lateral mobility of Na, K-ATPase and membrane lipids in renal cells. Importance of cytoskeletal integrity. **J. Membr. Biol.** **142**: 127-135, 1994.
- PÉREZ, O.A.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, M.S.; TEIBLER, P. & RUIZ, R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos organos de ratones. **APPTLA** **46**: 97-102, 1996.
- PONRAJ, D. & GOPALAKRISHNAKONE, P. - Morphological changes induced by a generalized myotoxin (myoglobinuria-inducing toxin) from the venom of *Pseudechis australis* (King Brown snake) in skeletal muscle and kidney of mice. **Toxicon** **33**: 1453- 1467, 1995.
- PONRAJ, D. & GOPALAKRISHNAKONE, P.- Renal lesions in rhabdomyolysis caused by *Pseudechis australis* snake myotoxin. **Kidney Int.** **51**: 1956-1969, 1997.
- RATCLIFFE, P. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LEDINGHAM, J. G. G. & WARRELL, D.A.- Direct nephrotoxicity of Russell's viper venom demonstrated in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **40**: 312-319, 1989.
- REICHL, A.P.; SERRANO, S.M.T.; ASSAKURA, M.T. & MANDELBAUM, F.- Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the snake *B. moojeni* (caissaca). **Mem. Inst. Butantan** **51**: 225-237, 1989.
- RENNKE, H.G.; COTRAN, R.S. & VENKATACHALAM, M.A.- Role of molecular charge in glomerular permeability. Trace studies with cationized ferritins. **J. Cell. Biol.** **67**: 638-646, 1975.

- REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S.; BAMBIRRA, E.A.; LACHATT, J.J. & COIMBRA, T.M. - Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **22**: 407- 416, 1989.
- RIBEIRO, L.A.- **Estudo epidemiológico de acidentes por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, atendidos no Hospital Vital Brazil, 1988.** Tese de Mestrado- Universidade de São Paulo - São Paulo, 1991.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: (BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E.E. eds.) **Venomous animals and their venoms.** Vol 2. New York, Academic Press, 1971. pp.345-384.
- ROSENFELD, G. Moléstias por venenos animais. **Pinheiros Terap.** **17**: 3-15, 1965.
- ROSSI, C. S. & LEHNINGER, A. L.- Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.** **239**: 3971-3980, 1964.
- RUSSELL, F.E. - The clinical problem of crotalid snake venom poisoning. In: (LEE, C. ed.) **Handbook of experimental pharmacology.** vol 52, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York, 1979. pp. 979-995.
- SANGUANRUNGSIRIKUL, S.; CHOMDEJ, B.; SUWANPRASERT, K. & WATTANAVAHA, P. - Acute effect of Russell's viper (*Vipera Russellii siamensis*) venom on renal hemodynamics and autoregulation of blood flow in dogs. **Toxicon** **27**: 1199-1207, 1989.
- SANTO-NETO, H. -**Aspectos morfológicos das alterações musculares produzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e seus componentes: Estudos com microscopia óptica e eletrônica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1987. pp.121.
- SCHATZMAN, H.J. - ATP-dependent Ca-extrusion from human red cells. **Experimentia** **22**: 364-365, 1966.
- SEBEN, A.; NEO, F. A.; NASCIMENTO, C. L. A.; BRANDÃO, R. A. & DUAR, B. A. **Cartilha de ofidismo. Cobras do Distrito Federal e Entorno.** Ed. Universidade de Brasília, 1996.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO - **Acidentes por Animais Peçonhentos. Identificação, Diagnóstico e Tratamento. Manual de Vigilância Epidemiológica .** 1993 . pp. 61.
- SEEDAT, Y. K.; REDDY, J. & EDINGTON, D.A. - Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. **Nephron** **13**: 455-463, 1974.
- SHASTRY, J.C.M.; DATE, A.; CARMAN, R.H.& JOHNY, K.V. - Renal failure following snake bite. A clinicopathological study of nineteen patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **26**: 1032-1038, 1977.

- SIMON, G.T. & CHATELANAT, F.- Ultrastructure of the normal and pathological glomerulus. In (Rouiller C. Muller A.F. edit.) **The Kidney**. Vol 1. New York, Academic Press, 1969. p. 262.
- SITPRIJA, V.; BENYAJATI, C.; & BONPUCKAVIG, V. - Further observations of renal insufficiency in snakebite. **Nephron** **13** : 369-403,1974.
- SITPRIJA, V. & BOONPUCKNAVIG, V. - Snake venoms and nephrotoxicity. In: (LEE,C. edit.) **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 52. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York, 1979. pp. 997-1018.
- SITPRIJA, V.; SUVANPHA, R.; POCHANUGOOL, C.; CHUSIL, S. & TUNGSANGA, K. - Acute interstitial nephritis in snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31** : 408-410,1982.
- SNOWDOWNE, K.W. & BORLE, A. B. - Effects of low extracellular sodium on cytosolic ionized calcium: Na⁺ Ca⁺⁺ exchange as a major influx pathway in kidney cells. **J. Biol. Chem.** **260**: 14998-15007, 1985.
- SOE-SOE; THAN-THAN & KHIN-EI-HAN. - The nephrotoxic action of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon** **28** : 461-467, 1990.
- SOGABE, K.; ROESER, N.F.; DAVIS, J.A.; NURKO, S.; VENKATACHALAM, M.A. & WEINBERG, J.M. Calcium dependence of integrity of the actin cytoskeleton of proximal tubule cell microvilli. **Am. J. Physiol.** **271**: F292-F303, 1996.
- SOLEZ, K.; MOREL – MAROGER, L. & SRAER, J. D. The morphology of “acute tubular necrosis” in man: Analysis of 57 renal biopsies and a comparison with glycerol model. **Medicine** **58**: 362-376, 1979.
- SOLEZ, K. & FINCKL, E. S. Is there a correlation between morphologic and functional changes in human acute renal failure? The data of Finkh, Jeremy and Whyte reexamined twenty years later. In: (SOLEZ, K. & WHELTON, A. eds) **Acute renal failure**. Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 3-12.
- SRAER, J.D.; ADIDA, C.; PERALDI, M.N.; RONDEAU, E. & KANFER, A. - Species specific properties of the glomerular mesangium. **J. Am. Soc. Nephrol.** **3**: 1342-1350, 1993.
- STOW, J.L.; SAWADA, H. & FARQUHAR, M.G. - Basement membrane heparan sulfate proteoglycans are concentrated in the laminae rarae and in podocytes of the rat renal glomerulus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**: 3296-3300, 1985.
- THAN-THAN; NICHOLAS FRANCIS; TIN-NU-SWE; MYINT-LWIN; TUN-PE; SOE-SOE; MAUNG-MAUNG-OO; PHILLIPS, R.E. & WARRELL, D.- Contribution of focal haemorrhage and microvascular fibrin deposition to fatal envenoming by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma. **Acta Tropica** **46**: 23-38,1989.
- THOMSEN, K. Lithium clearance. - A new method for determining proximal and distal tubular reabsorption of sodium and water. **Nephron** **37**: 217-223, 1984.

- UIKER, S. & KRIZ, W.- Structural analysis of the formation of glomerular microaneurysms in the Habu venom model. *Virchows Archiv.* **426**: 281-293, 1995.
- VASMANT, D.; MAURICE, M.& FELDMANN, G. - Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat. Record* **210**: 17-24, 1984.
- WALSH, T.P.; WEBER, A.; DAVIS, K.; BONDER, E. & MOOSEKER, M.S.- Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization. *Biochem. J.* **23**: 6099-6102, 1984.
- WHITESIDE, C. I.; CAMERON, R. MUNK, S. & LEVY, J. - Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosi. *Am. J. Pathol.* **142**: 1641-1653, 1993.
- WILLINGER, C.C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRAUNTHALER, G. & PFALLER, W. In vitro nephotoxicity of Russell's viper venom. *Kidney Int.* **47**: 518-528, 1995.
- YOSHIKAWA, V.; ITO, H.; AKAMATSU, R.; HAZIKANO, H.; OKADA, S. & MATSUO, T.- Glomerular podocyte vacuolization in focal segmental glomerulosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **110**: 394-398, 1986.
- YOUNES, M. & SIEGERS, C.P.- Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 2001-2003, 1984.

De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas
Referências Bibliográficas: NB 66/78 (BIREME)