



Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO ENTRE A NEFROTOXICIDADE DA CROTOXINA NATIVA E A
IRRADIADA COM RAIOS GAMA DE ^{60}Co EM CAMUNDONGOS**

ANDRÉ MOREIRA ROCHA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Nanci do Nascimento

**São Paulo
2016**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO ENTRE A NEFROTOXICIDADE DA CROTOXINA NATIVA E A
IRRÁDIADA COM RAIOS GAMA DE ^{60}Co EM CAMUNDONGOS**

ANDRÉ MOREIRA ROCHA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:
Profa. Nanci do Nascimento

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

Dedico essa dissertação à minha família que torceu intensamente para que eu alcançasse este objetivo, e ao amigo Airton Lourenço Junior "*in memoriam*" por todas as suas contribuições aos estudos com venenos de animais.

Agradecimentos

À Deus pelas bênçãos e pela alegria de viver.

À Dra. Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela confiança e por acreditar na minha capacidade. Pelo incentivo e apoio, principalmente nas ocasiões em que mais encontrei obstáculos neste trabalho, pela amizade e momentos que além de amiga foi uma mãe quando longe de casa me encontrava. Obrigado por tudo Professora!

Ao ITPAC Porto Nacional e ao IPEN, por permitirem a realização das atividades relacionadas a este trabalho, e assim estimular a pesquisa em saúde na Região Norte do Brasil.

Aos amigos Thompson, Cleber, Gabriela, Raquel e Larissa, pelo companheirismo profissional, por me incentivarem na realização desta pesquisa, e por em momento algum me deixarem à deriva. Obrigado Gabriela por não medir esforços durante a ajuda na confecção dos cortes histológicos e ao Thompson pelas orientações à análise estatística!

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, por se sentar ao meu lado e através de seu imenso conhecimento me iluminar, e assim me orientar durante as análises histopatológicas.

Ao querido Dr. Patrick Jack Spencer, pelas discussões, sugestões e colaborações para a realização deste trabalho.

Ao Fernando Moreira e ao André Senna, pelo trabalho competente e dedicado que sempre realizaram favorecendo as atividades pertinentes a esta pesquisa.

A Tamara Mieco Fucase, pelo constante companheirismo e pelos ensinamentos que me permitiram realizar as análises das cromatografias.

Aos amigos do “Grupo Venenos”, por toda parceria frente à realização de ensaios no Centro de Biotecnologia do IPEN, em especial ao Podé, ao Johnny, ao Samuel, e a Marcela.

Ao Andrés, Andreia, Jaqueline e Camila, pela amizade que fizemos, e pela ajuda enquanto no Instituto de Medicina Tropical eu preparava alguns insumos para fixação de parte das amostras utilizadas neste estudo.

À Dra. Carla Pagliari, pela preparação imunohistoquímica das amostras verificadas neste trabalho.

Aos amigos do Biotério do IPEN, pelas orientações em relação ao manejo dos animais, em especial à Dra. Glaucie pelo auxílio durante a inoculação das soluções nos animais.

À Dra. Josefa Moreira do Nascimento Rocha, pelas orientações, pelos estímulos ao desenvolvimento profissional, pessoal e espiritual, pelos investimentos neste trabalho sem medir as rentabilidades, pelo colo, apoio e a prece, pelo impulso, o empurrão e o aplauso, e por ter me dado à vida. Obrigado Mãe!

Ao meu pai Raimundo Alves Rocha e ao meu padrinho João Moreira do Nascimento, por acreditarem no meu esforço e me apoiarem em todos os momentos que da ajuda dos dois precisei.

À minha sogra Valdeci Maria de Melo, pelo carinho e zelo a mim e aos meus filhos, principalmente quando estive ausente de casa para realização de atividades relacionadas a esta pesquisa.

Aos meus filhos, Miguel, João Guilherme e Emanuela, pelos seus francos olhares e belos sorrisos ao me receberem em casa a cada momento em que eu volto do trabalho.

Agradeço em especial à minha esposa Talitha Silva de Melo Rocha, por me amar, por me incentivar, por me alegrar, por me levantar as vezes que caí, por suportar os momentos em que não estava presente, por confiar em tudo e a todos que estavam envolvidos neste trabalho. Muito obrigado meu amor!

“Como é extraordinário
ninguém precisar esperar um
momento específico para
melhorar o mundo.”

Anne Frank

RESUMO

Comparação entre a nefrototoxicidade da crotoxina nativa e a irradiada com raios gama de ^{60}Co em camundongos.

ANDRÉ MOREIRA ROCHA

Os venenos das serpentes são compostos protéicos complexos com extensas atividades biológicas. Estas moléculas abrangem até 95% do peso seco do veneno, e compreendem enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas atóxicas. Dentre as complicações fisiológicas, a Insuficiência Renal Aguda - IRA é bem comum nos acidentes crotálicos, onde as concentrações renais do veneno se apresentam até 50% maiores do que na concentração plasmática. A fração tóxica responsável por essa complicação é a crotoxina. O veneno das serpentes, quando irradiado com raios gama de ^{60}Co , tem a sua toxicidade diminuída, entretanto, são mantidas as suas propriedades imunológicas. Nossa hipótese é que a utilização de veneno irradiado em substituição ao nativo pode reduzir a taxa de lesões renais em animais de grande porte durante a produção de soros antiofídicos, propiciando melhor qualidade de vida e bem estar desses animais. No presente estudo realizou-se o isolamento da crotoxina por técnicas cromatográficas, a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Parte da toxina isolada foi reservada e denominada crotoxina nativa (CTXN) enquanto que outra parte foi irradiada com 2 kGy de raios gama oriundos de uma fonte de ^{60}Co e denominada crotoxina irradiada (CTXI). Diferentes grupos de camundongos Balb/c receberam a toxina nativa ou irradiada e tiveram seus rins removidos em diferentes tempos pós-injeção da crotoxina. Realizou-se a nefrectomia dos animais e foi feito o preparo dos cortes histológicos em Hematoxilina-Eosina (HE) e cortes de imunohistoquímica com anticorpo policlonal de coelho anticrotoxina. As alterações histopatológicas encontradas nas amostras foram glomerulonefrite (GN), congestão capilar (CC) e necrose tubular aguda (NTA). Verificou-se que a GN teve maior ocorrência no grupo CTXN que no grupo CTXI. A NTA foi dominante no grupo CTXN em relação ao grupo CTXI. A CC foi predominante no grupo CTXI que no grupo CTXN. Entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa segundo o teste *t Student* de amostras independentes. O tratamento imunohistoquímico revelou que a concentração de antígeno marcado com o anticorpo é decrescente segundo os intervalos de tempo de eutanásia dos animais do grupo inoculado com CTXI, pois a crotoxina quando irradiada tem a sua excreção renal facilitada. Conclui-se que as alterações histopatológicas GN e a NTA foram significativamente menos frequentes em rins de animais inoculados com CTXI. Diferentemente da crotoxina nativa, a crotoxina irradiada é detectada pelo anticorpo anticrotoxina apenas nos tempos intermediários pós-inoculação e em baixa concentração, indicando que a radiação gama promoveu mudanças na forma de ligação da toxina ao tecido renal, facilitando sua eliminação e diminuindo, portanto, as chances de lesão. Esses resultados reforçam as evidências de que o uso de veneno irradiado no processo de imunização garante uma melhor qualidade de vida e bem estar aos animais soroprodutores.

Palavras-chave: Crotoxina, Raios Gama, Glomerulonefrite, Necrose Tubular Aguda.

ABSTRACT

Comparative nephrotoxicity of native or Co-60gamma rays irradiated crotoxin in mice

ANDRÉ MOREIRA ROCHA

Snake venoms are complex mixtures of proteins and peptides with a wide spectrum of physiological targets such as the blood coagulation and cardiovascular systems and the motor end plate among others. Acute renal failure is a common complication in accidents with the South American rattlesnake. The toxin involved in this pathology is crotoxin, a major component of the venom in terms of concentration and toxicity. Snake venoms, when irradiated with ^{60}Co gamma rays present a significant decrease in toxicity while the immunogenic properties of its components are preserved. The use of irradiated rattlesnake venom is an attractive alternative for antisera production since it might reduce the appearance of renal lesions improving the welfare and lifespan of animals employed for antivenom production. In the present work, we have isolated crotoxin from crude venom of *C. d. terrificus* and irradiates part of it with 2 kGy of gamma rays from ^{60}Co and compared the effects of native (CTXN) and irradiated (CTXI) crotoxin on the mice renal function. We conducted nephrectomy of animals and preparation of histological sections with hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemistry with polyclonal rabbit anticrotoxin for analysis in optical microscopy. Histopathological changes found in the samples were glomerulonephritis (GN), capillary congestion (CC) acute kidney tubular necrosis (NTA). Immunohistochemistry indicates that the concentration of bound antibody labelled antigen decreases in a time dependent manner. The GN ante NTA were significantly less frequent in kidneys of animals inoculated with irradiated toxin. The capillary congestion was evidenced in all animals treated with irradiated or native crotoxin. Concluding, ionizing radiation appears to mitigate the nephrotoxic effects of crotoxin and may represent an alternative for antivenin production, improving welfare for seroproducer animal.

Keywords: Biological toxins, Crotoxin, Gamma rays, Glomerulonephritis, Acute Tubular Necrosis)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Histórico do Ofidismo.....	15
2.2 Epidemiologia do Acidente Ofídico.....	15
2.3 Características da Serpente <i>Crotalus</i> e Manifestações Clínicas do Acidente	17
2.4 Soroterapia	20
2.5 Atenuação da Toxicidade de Venenos Animais	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Isolamento das Toxinas.....	26
4.1.1 Cromatografia de exclusão molecular	26
4.1.2 Cromatografia por troca iônica	26
4.2 Irradiação da Toxina	27
4.3 Obtenção das Amostras Renais	27
4.4 Preparação Histológica	28
4.4.1 Análise histológica e imunohistoquímica.....	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Isolamento da Crotoxina	32
6.2 Histologia Renal Comparativa	33
6.2.1 Análise das alterações histopatológicas	33
6.2.3 Análise imunohistoquímica.....	44
7. DISCUSSÃO.....	50
8. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE – Instrumento de Coleta de Dados.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Tipos de dentições e seu provável processo de especialização peçonhenta de serpentes.....	17
FIGURA 2 -	Corte histológico através do aparelho da glândula de veneno da serpente <i>Crotalus oreganus oreganus</i>	18
FIGURA 3 -	Cabeça da <i>Crotalus durissus</i>	18
FIGURA 4 -	<i>Crotalus durissus</i> , porção terminal da cauda com guizo.....	19
FIGURA 5 -	Cromatograma do veneno total da <i>C. d. terrificus</i> em coluna de exclusão molecular Superdex 75.....	32
FIGURA 6 -	Cromatografia da crotoxina em coluna de troca aniônica (Mono Q – 5 mL).....	33
FIGURA 7 -	Córtex renal de camundongo do grupo controle (HE – 400X)..	34
FIGURA 8 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X).....	35
FIGURA 9 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X).....	36
FIGURA 10 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X).....	37
FIGURA 11 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h e 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X).....	38
FIGURA 12 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X).....	39
FIGURA 13 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI),	40

	que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X).....	
FIGURA 14 -	Análise de média \pm desvio padrão da existência de alterações histopatológicas nas amostras renais dos grupos CTXN e CTXI.....	42
FIGURA 15 -	Resultados da análise morfológica realizada nas amostras renais dos grupos de animais CTXN e CTXI onde as alterações histopatológicas foram comparadas em relação aos intervalos de tempo de eutanásia dos animais (30 min., 1 h, 2 h, 4 h e 24 h) inoculados com crotoxina nativa ou irradiada.....	43
FIGURA 16 -	Córtex renal de camundongo do grupo controle (Imunohistoquímica - 400x).....	45
FIGURA 17 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação, demonstrando a ocorrência de marcação citoplasmática e nuclear da crotoxina (Imunohistoquímica – 400X).....	46
FIGURA 18 -	Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação, demonstrando a ocorrência de marcação citoplasmática e nuclear da crotoxina (Imunohistoquímica – 400X).....	47
FIGURA 19 -	Medula renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados no intervalo de 1 h após inoculação, demonstrando a ocorrência de marcação citoplasmática da crotoxina com o anticorpo anticrotoxina (Imunohistoquímica – 400X).....	49

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos acometem cerca de cinco milhões de pessoas no mundo, deixando 2,7 milhões seriamente feridos e levando 125 mil a óbito a cada ano (PAULA, 2010).

São listadas, no Brasil, 365 espécies de serpentes, congregadas em 75 gêneros e 10 famílias, e destas espécies aproximadamente 16% (59) são capazes de inocular venenos que levam o acidentado à intervenção médica, sendo caracterizadas como de importância médica (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

Anualmente, a proporção dos casos de acidentes ofídicos e as taxas de letalidade apontam que 90% são promovidos por serpentes do gênero *Bothrops* (letalidade de 0,3%), seguido do *Crotalus* (7,7% com 1,9% de letalidade), *Lachesis* (1,4% com 0,9 % de letalidade) e *Micrurus* (0,4% com 0,5% de letalidade) (COELHO et al., 2013).

A ocorrência deste tipo de acidente tem caráter multifatorial, estando relacionada, principalmente, aos fatores climáticos, épocas chuvosas e quentes do ano e ao aumento da atividade humana em áreas agrícolas, na zona rural. Prevaecem acidentes com trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 15 e 49 anos e os membros inferiores são os mais atingidos (MARTINS et al., 2012).

Os venenos das serpentes compreendem complexos protéicos com extensas atividades biológicas. Estas moléculas abrangem até 95% do peso seco do veneno representadas por enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas atóxicas. Complicações fisiológicas, hematológicas e neurotransmissoras no ser humano, são induzidas pelas peçonhas das serpentes (CUNHA; MARTINS, 2012).

Convulxina, Delta-toxina, Giroxina, Crotoxina e Crotamina são as principais toxinas do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* - a cascavel brasileira.

A crotoxina representa de 40 a 60% do peso seco e é constituída por duas subunidades chamadas crotapotina e fosfolipase A₂ e é a responsável pela maioria das ações fisiopatológicas do veneno da cascavel (LOURENÇO JÚNIOR, 2011).

Dentre as complicações fisiopatológicas a Insuficiência Renal Aguda (IRA) é bem comum nos acidentes crotálicos. O veneno deste gênero de serpente é eliminado predominantemente por via urinária, e a concentração do mesmo no parênquima renal se apresenta até 50% maior do que no plasma (SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009). A fração tóxica responsável pela IRA é a fosfolipase A₂ que promove a liberação de corticosteróides e respostas de fase aguda ao estímulo como histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetária, catecolaminas e endotelina que se envolvem como mediadores que iniciam o desenvolvimento das complicações teciduais (NORÕES, 2009).

A principal forma de tratamento do acidentado com serpentes é o uso de soros antiofídicos, um produto farmacêutico na forma de solução contendo anticorpos específicos, purificados a partir do plasma de equídeos hiperimunizados. Este soro é importantíssimo para a população, principalmente aquela que vive na zona rural (SILVA, 2008).

A produção de soro antiofídico é dependente da imunogenicidade de cada peçonha, ou seja, a estrutura molecular da substância inoculada irá induzir uma resposta no animal soro produtor devido ao reconhecimento do composto injetado, pelo sistema imunológico do equídeo (CLISSA; NASCIMENTO; ROGERO, 1999).

Na tentativa de diminuir os efeitos tóxicos dos venenos para os animais soroprodutores, a radiação gama tem se mostrado uma excelente ferramenta que associa a diminuição da toxicidade com manutenção ou até mesmo a melhoria das propriedades imunológicas, sem adicionar quaisquer substâncias ao veneno (NASCIMENTO et al., 1996; CLISSA; NASCIMENTO; ROGERO, 1999).

O ofidismo no Brasil ainda gera muitas morbidades e mortalidades de trabalhadores de zona rural, demandando a produção de grandes quantidades de soros antiofídicos, constituídos por anticorpos extraídos por purificação do plasma sanguíneo de cavalos submetidos a pequenas doses diárias do veneno das serpentes. Estes animais, utilizados para a produção de soros têm seu tempo de vida reduzido devido à severidade dos efeitos durante o processo de imunização, resultando, na maioria dos casos, em morte do animal por falência renal, sendo esta também a causa mais comum de morte nos acidentes ofídicos.

No trabalho de Nascimento e colaboradores (1996), é relatado que a crotoxina, principal toxina do veneno da cascavel, quando irradiada com raios gama de ^{60}Co , tem a sua toxicidade diminuída sem perda das propriedades imunológicas. Especificamente, nos ensaios de biodistribuição, verificou-se que a crotoxina nativa se acumula nos rins na primeira hora pós-injeção da toxina nativa, enquanto que a distribuição da crotoxina irradiada demonstra que ela é apenas filtrada pelo rim, sem se fixar ao órgão.

Estes dados sugerem que a utilização de veneno irradiado, em substituição ao nativo, pode reduzir a taxa de lesões renais que levam à Insuficiência Renal Aguda (IRA). Isso é particularmente importante, pois a utilização de veneno irradiado promoveria aumento da sobrevivência e do bem-estar nos animais soroprodutores. Corroborando a legislação atual (CONCEA Lei nº 11.794, de 2008)

A avaliação dos tecidos renais de camundongos envenenados experimentalmente com veneno irradiado poderá demonstrar se há diminuição de lesão renal quando se administra crotoxina irradiada e fortalecer o seu uso na produção de soro, pois além de aumentar a sobrevivência ainda melhoraria o bem estar dos animais soroprodutores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico do Ofidismo

No Brasil, acidentes ofídicos já são relatados desde o período colonial na célebre carta datada de 31 de maio de 1560, escrita em São Vicente pelo jesuíta espanhol José de Anchieta e dirigida a seu superior Padre Diego Laynes em Roma, onde estão descritos os acidentes causados por serpentes venenosas de diversos gêneros no Brasil, como a jararaca, a cascavel e a coral (BOCHNER, 2003).

A primeira abordagem técnico-científica dos acidentes com ofídios no Brasil foi com os trabalhos de Vital Brazil Mineiro da Campanha em 1901. Ao provar a necessidade de se produzir antivenenos específicos a partir de venenos das serpentes regionais, Vital Brazil deu início a um programa de vigilância por meio da emissão do *Boletim para observações de acidentes ofídicos* (FRANÇA et al., 2009).

Esse boletim foi o primeiro de muitos outros modelos de ficha para a notificação desses tipos de acidentes. Até hoje, a maioria das avaliações epidemiológicas se baseia nas mesmas variáveis já apontadas por Vital Brazil, como: sexo e idade da vítima, mês de ocorrência do acidente, local da picada, gênero da serpente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento e evolução (BOCHNER & STRUCHINER, 2003).

2.2 Epidemiologia do Acidente Ofídico

Acidentes por ofídios no mundo acometem quase cinco milhões de pessoas, deixando 2,7 milhões seriamente feridas e levando 125 mil a óbito a cada ano (PAULA, 2010).

No Brasil, ocorrem aproximadamente 30 mil acidentes ofídicos por ano, com menos de 200 casos de envenenamento fatais, apresentando uma taxa de letalidade de 0,44% (BERNARDE, 2011).

A distribuição dos acidentes ofídicos não se encontra geograficamente localizada, havendo registro de casos em todos os Estados brasileiros. Em 2008, o coeficiente médio de acidentes no país foi de 13,8 acidentes/100 mil habitantes, onde a Região Norte apresentou a maior ocorrência (52 acidentes/100 mil hab.), enquanto na região Nordeste foi identificada a terceira maior ocorrência (13 acidentes/100 mil hab.) e no Sudeste, a menor do país (8 acidentes/100 mil hab.). Dos países da América do Sul, o Brasil é o que apresenta o maior número de casos por ano (SARAIVA et al., 2012).

Em comparação à região Norte (52 casos/100 mil hab.) e à média do país (13,8 casos/100 mil hab.), o estado do Tocantins apresentou a maior ocorrência de acidentes com ofídios (75 casos/100 mil hab.) em 2004. O número de óbitos registrados foi um pouco acima da média nacional, seis óbitos (letalidade de 0,68%). Já em 2007, no estado do Tocantins foi registrada a segunda maior incidência de acidentes ofídicos (54 casos/100 mil hab.) no país e letalidade de 0,7%, quase o dobro da média nacional (0,4%) (PAULA, 2010).

Anualmente, a proporção dos casos e as respectivas taxas de letalidade apontam que 90% são acidentes botrópicos (letalidade de 0,31%), seguido de crotálicos 7,7% (1,87% de letalidade), laquéticos 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos 0,4% (0,52% de letalidade) (COELHO et al., 2013).

Apesar da baixa letalidade do gênero botrópico em relação aos gêneros crotálicos e laquéticos, a frequência de sequelas relacionadas às complicações locais são mais altas no gênero botrópico (10%), associada a fatores de risco como o uso de torniquete nas picadas em dedos de mãos e pés e retardo na soroterapia (PAULA, 2010).

A ocorrência desse tipo de acidente tem caráter multifatorial, estando relacionado principalmente a fatores climáticos, em épocas chuvosas e quentes do ano, e ao aumento da atividade humana em áreas agrícolas, nas zonas rurais. Prevaecem acidentes com trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 15 e 49 anos, e os membros inferiores são os mais atingidos (MARTINS et al., 2012).

2.3 Características da Serpente *Crotalus* e Manifestações Clínicas do Acidente

O aparelho venenífero das serpentes consiste em glândulas exócrinas (FIG. 1 – gv e FIG. 2) modificadas que produzem substâncias tóxicas, o veneno. Na literatura são caracterizados quatro estágios evolutivos do aparelho venenífero das serpentes, que representam a complexidade das adaptações morfológicas envolvendo as glândulas especializadas e dentição, entre estas a dentição solenóglifa (FIG. 1 – D) apresenta um único dente funcional em cada maxila que é extremamente grande, agudo e oco, e permanece paralelo ao crânio quando em repouso, mas gira 90° em ângulo protudente, no momento do ataque, para injetar o veneno. Exemplos: *Bothrops atrox*, *Bothriopsis bilineata*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus* (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002; BERNARDE et al., 2012).

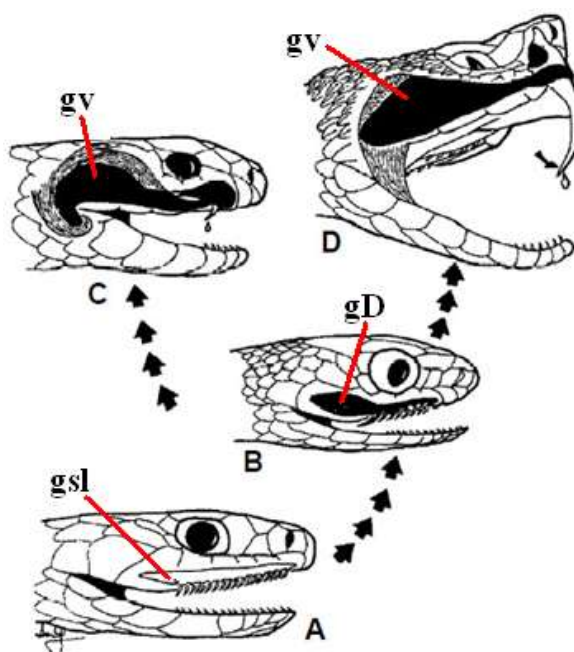


Figura 1: Tipos de dentições e seu provável processo de especialização peçonhenta de serpentes (A) dentição áglifa; (B) opistóglifa; (C) proteróglifa; (D) solenóglifa. gsl – glândula supralabial, gD – glândula de Duvernoy, gv – glândula venenosa. Fonte adaptada: MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002.

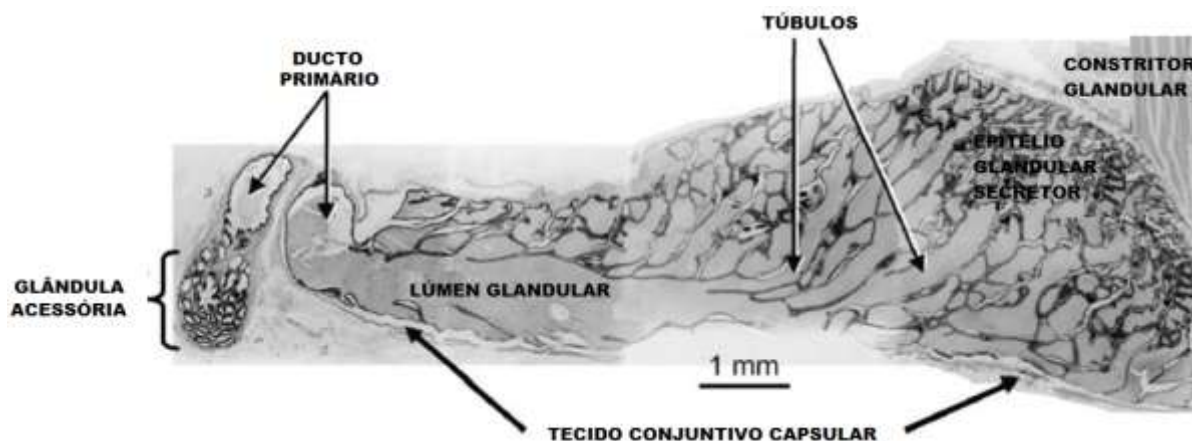


Figura 2 – Corte histológico do aparelho da glândula de veneno da serpente *Crotalus oreganus oreganus*. O veneno é produzido pelo epitélio secretor e armazenado dentro dos túbulos da glândula principal e de seu lúmen, além do ducto primário (Hematoxilina-Eosina). Fonte adaptada: MACKESSY& BAXTER, 2006.

Outra característica das serpentes peçonhentas de interesse médico no Brasil é a presença de fosseta loreal (FIG. 3), um órgão termo receptor localizado entre o olho e a narina que auxilia na captura da presa, este órgão está presente nas serpentes venenosas do Brasil: gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, com exceção das serpentes do gênero *Micrurus* que embora venenosas, não apresentam fosseta loreal (HINRICHSEN, 2009).



Figura 3: Cabeça da *Crotalus durissus*, destaque (ponta da seta) fosseta loreal. Fonte adaptada: ROCHA, 2015.

As serpentes do gênero crotálico distribuem-se geograficamente desde os cerrados do Brasil central, regiões áridas e semiáridas do Nordeste e áreas

abertas do Sul, Sudeste e Norte. No Brasil, a única espécie representante é a *Crotalus durissus* (BRASIL, 2009). Esta é dividida em cinco subespécies distribuídas nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional (*C. durissus terrificus*), regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo (*C. durissus collineatus*), áreas da caatinga do nordeste (*C. durissus cascavella*), região norte do país (*C. durissus ruruima*) e na Ilha de Marajó (*C. durissus marajoensis*) (PINHO; PEREIRA, 2001).

As cascavéis possuem hábitos noturnos e pouca hostilidade. Sua principal característica anatômica é a presença de guizo ou chocalho na porção final de sua cauda, que facilita sua identificação (FIG. 4), além de características comuns às serpentes peçonhentas como cabeça triangular, olhos pequenos e arredondados com pupila em fenda e de dentição inoculadora do tipo solenóglifa (CUNHA; MARTINS, 2012).



Figura 4– *Crotalus durissus*, porção terminal da cauda com guizo (ponta da seta).
Fonte adaptada: MARTINS, 2015.

O veneno deste gênero de serpentes possui atividade neurotóxica causando alteração neurológica. Geralmente, de maneira precoce, evidenciam-se face miastênica com ptose palpebral e confusão mental (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

A principal fração neurotóxica é a crotóxina, uma neurotoxina de ação pré-sináptica que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina tanto no sistema nervoso central quanto periférico. A inibição do neurotransmissor

causa o bloqueio neuromuscular do qual decorrem as paralisias motoras apresentadas pelos pacientes (FOCACACCIA et al., 2009).

Dentre as atividades sistêmicas do veneno, citamos a miotoxicidade, que é caracterizada por lesões do tipo rabdomiólise ocorrendo liberação de mioglobina para o sangue e urina (mioglobinúria) (FOCACACCIA et al., 2009).

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação grave e potencialmente recuperável dos envenenamentos botrópico e crotálico. Pode decorrer de alterações estruturais do tipo glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e necrose cortical (AMARAL et al., 1986).

Nestes pacientes, o sangue periférico pode se apresentar incoagulável pelo consumo do fibrinogênio, cujos valores séricos baixos, ao lado das alterações do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada, confirmam a existência da atividade anticoagulante (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

2.4 Soroterapia

Soroterapia antiveneno consiste na utilização de soro hiperimune heterólogo concentrado em imunoglobulinas que neutralizem venenos inoculados durante acidentes por animal peçonhento. É capaz de reverter, com bastante eficácia, os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito (BERNARDE, 2011).

A produção do soro hiperimune inicia-se com a inoculação em cavalos de antígenos específicos preparados com os venenos de serpentes. Os animais passam por acompanhamento médico-veterinário para garantir o seu bem estar e a máxima qualidade dos soros antiofídicos produzidos. O plasma obtido pelas sangrias dos cavalos é submetido a uma sequência de processos físicos e químicos para a purificação das imunoglobulinas (INSTITUTO BUTANTAN, 2015a).

No Brasil, são produzidos soros antiofídicos para neutralizar os venenos dos principais gêneros de serpentes causadoras de acidentes: antielapídico (*Micrurus sp.*; *Leptomicrurus sp.*), antilaquético (*Lachesis sp.*), anticrotálico (*Crotalus sp.*), antibotrópico (*Bothrops sp.*), antibotrópico-laquético (*Bothrops sp.* e *Lachesis sp.*) e o antibotrópico-crotálico (*Bothrops sp.* e *Crotalus sp.*) (INSTITUTO BUTANTAN, 2015).

A soroterapia antiveneno consiste na utilização de soro concentrado de imunoglobulinas para neutralizar venenos inoculados após acidente por animal peçonhento, capaz de reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito (BERNARDE, 2011).

A soroterapia apresenta algumas desvantagens, como: uma série de efeitos colaterais (incluindo reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate aos efeitos locais do veneno (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido e a evolução para complicações raras), e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro líquido (não liofilizado) e com o prazo de validade (CARDOSO et al., 2009).

Produzir soro antiveneno para um gênero depende da mistura de peçonhas de vários indivíduos da mesma espécie, e ainda da mistura de peçonhas de espécies diferentes. O soro anticrotálico (SAC) é constituído por vários indivíduos da espécie *Crotalus durissus terrificus* (LOURENÇO JÚNIOR, 2011; SILVA, 2008).

A produção de soro antiofídico é dependente da imunogenicidade de cada peçonha, ou seja, a estrutura molecular da substância inoculada deve induzir uma resposta imunológica no animal hospedeiro se o seu sistema reconhecer o composto injetado (CLISSA; NASCIMENTO; ROGERO, 1999).

As etapas para produção do soro antiveneno se dividem desde a aquisição do veneno das serpentes, até o processo farmacêutico para constituição da especialidade farmacêutica. Sucintamente estas etapas são: extração do veneno,

liofilização, mistura dos venenos de diferentes indivíduos da espécie *Crotalus durissus terrificus*, diluição e hiperimunização de cavalos, realização de sangria a fim de obter uma amostra de sangue, aferição do teor de imunoglobulinas produzidas em resposta às administrações. Ao alcançar a quantidade ideal de anticorpos, é retirado de um equino de 500 kg aproximadamente 15 litros de sangue divididos em etapas com intervalos de 48h. Realiza-se então a plasmaferese permitindo a devolução das hemácias do animal, a purificação e concentração do plasma, purificação e concentração por ultrafiltração molecular, submissão a filtração clarificante e esterilizante, estocagem entre 2 e 8 °C para realização de testes de controle de qualidade, diluição para alcançar o título desejado, adição de conservante fenol e adição de NaCl para isotonização (LUCAS, 2009).

O tratamento ao paciente ofendido pela serpente *Crotalus durissus terrificus* consiste no uso precoce do soro anticrotálico por via endovenosa. A dose é baseada na classificação de gravidade do quadro clínico inicial da vítima. Pode-se usar o soro antibotrópico-crotálico na ausência do soro específico:

- Leve: fácies miastênica/visão turva ausente ou tardia; mialgia ausente ou tardia; urina vermelha ou marrom ausente (5 ampolas);
- Moderado: fácies miastênica/visão turva discreta ou evidente; mialgia discreta; urina vermelha ou marrom ausente ou pouco evidente (10 ampolas);
- Grave: fácies miastênica/visão turva evidente; mialgia intensa; urina vermelha ou marrom presente (20 ampolas). (FOCACCIA et al., 2009; BRASIL,2009).

2.5 Atenuação da Toxicidade de Venenos Animais

Na tentativa de diminuir os efeitos tóxicos de venenos já foram utilizados muitos procedimentos químicos e físicos, como o uso de agentes quelantes, formalina, glutaraldeído, iodo, tanino, formaldeído, carboximetil, celulose, calor, fotooxidação na presença de azul de metileno, radiação X e ultravioleta. Entretanto a maior parte destes métodos não foi eficaz em manter a imunogenicidade dos compostos dos venenos (NASCIMENTO et al., 1996).

Uma diversidade de pesquisas tem sido realizada com toxinas de animais, no sentido de se obter um produto com atividade menos tóxica e que mantenha suas propriedades farmacológicas e imunogênicas originais. Dentre os métodos de atenuação citados anteriormente, a radiação gama produzida por Cobalto-60 (^{60}Co) vem demonstrando excelentes resultados na atenuação da toxicidade dos venenos de serpentes, sem alterar as suas propriedades biológicas, e sem formar uma substância nova, o que é extremamente útil para a redução da toxicidade destes venenos (CARDI; NASCIMENTO; ANDRADE JÚNIOR, 1998; FERREIRA JÚNIOR et al., 2006).

A radiação gama é uma radiação eletromagnética caracterizada por altíssima energia associada à ausência de massa. Possui elevado poder de penetração e assim promove ionizações e excitações nos meios onde se propaga. Atravessa qualquer tipo de matéria e remove elétrons da camada eletrônica periférica dos átomos, que resulta na formação de cátions e ânions. A radiação gama pode ainda excitar os elétrons das camadas externas atômicas, e estes absorvem energia suficiente para atingir seu estado energético mais alto, emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (ROGERO; NASCIMENTO, 1995).

Na água, principal componente dos materiais biológicos, a radiação ionizante promove a sua radiólise, gerando um radical hidroxila (OH^{\bullet}) (CHAPMAN, 1973), que junto com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são capazes de produzir danos às moléculas (GREENSTOCK, 1981).

Proteínas em seu estado seco ou em solução, quando irradiadas por este tipo de radiação eletromagnética, passam por alterações químicas, físico-químicas e estruturais significativas. Assim, com essas mudanças, ocorrem diminuição e inativação de algumas atividades biológicas das proteínas, como as atividades tóxicas, enzimáticas e/ou imunológicas (CLISSA; NASCIMENTO; ROGERO, 1999).

Sendo assim, as mudanças no material biológico, podem ocorrer por efeito direto da radiação, onde a ionização é produzida na própria molécula. Ou pode ocorrer efeito indireto, em que as alterações nas moléculas do material são induzidas pelos produtos formados a partir da radiólise da água, quando este material é irradiado em solução.

A partir destas informações, entendemos que seria importante aprofundar um pouco mais os estudos sobre destoxicação de venenos, focando principalmente na ação das toxinas sobre os rins, órgãos sempre muito afetados por ocasião dos acidentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar a nefrotoxicidade da crotoxina nativa com a submetida aos efeitos dos raios gama de ^{60}Co .

3.2 Específicos

- Pesquisar a presença da crotoxina nativa ou irradiada no tecido renal;
- Identificar se a irradiação da toxina modifica o padrão de lesão renal.

4. METODOLOGIA

O veneno de *C. d. terrificus* utilizado para os experimentos realizados neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP, situado na cidade de Botucatu.

Os animais utilizados na pesquisa eram do Biotério do IPEN.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IPEN/SP) - protocolo nº 129/13.

4.1 Isolamento das Toxinas

4.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

A crotoxina foi inicialmente isolada, a partir do veneno total de *C. d. terrificus*, por meio de exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex G-75 (1,6 x 70 cm). Em cada cromatografia, cerca de 80 mg do veneno total liofilizado foram dissolvidas em 1,0 mL de tampão formiato de amônio 100 mM, pH 3,0. A seguir, a solução foi centrifugada a 14000 g por 5 minutos em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi aplicado à coluna de gel filtração, já ambientada em mesmo tampão, com fluxo de 0,5 mL/min. As frações foram coletadas (1,0 mL por tubo) com o auxílio de um coletor automático do próprio sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Toda a eluição foi acompanhada pela leitura da absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro. As frações de interesse foram separadas em recipiente adequado e posteriormente liofilizadas.

4.1.2 Cromatografia por troca iônica

A fração correspondente à crotoxina obtida na primeira etapa de purificação, após liofilização, foi solubilizada em 3,0 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2 (tampão A) e aplicada em uma coluna de troca aniônica do tipo Mono Q, previamente estabilizada em mesmo tampão, conectada a um sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). A crotoxina adsorvida a coluna

foi eluída pela passagem de um gradiente linear de NaCl, de 0 a 1 M, em tampão idêntico ao A, exceto pela adição do sal. A absorvância foi verificada automaticamente em 280 nm. As frações correspondentes à crotoxina foram coletadas e dialisadas contra água em membrana apropriada (limite máximo de 12 000 Da – SIGMA-ALDRICH®) e de forma exaustiva. Em seguida a crotoxina foi liofilizada e mantida em *freezer* – 20 °C.

4.2 Irradiação da Toxina

A crotoxina, isolada do veneno de *C. d. terrificus*, foi solubilizada em solução salina 150 mM de forma a obter-se a concentração de 2 mg/mL. Em seguida o volume total foi dividido em alíquotas de 1 mL cada.

Parte da amostra de crotoxina, na concentração de 2mg/mL, foi irradiada com a dose de 2 kGy utilizando raios gama provenientes de uma fonte de ⁶⁰Co Gammacell 220 (*Atomic Energy Canada LTDA*) com taxa de dose de 1,031 kGy/h, à temperatura ambiente e na presença de oxigênio atmosférico.

4.3 Obtenção das Amostras Renais

Camundongos Balb/c fêmeas (n = 33) com peso médio 22,7 ± 2,2 g, criados e mantidos no Biotério do IPEN, receberam dose de 100 µL de solução contendo uma DL₅₀ de 0,06µg/g de crotoxina irradiada ou nativa (NASCIMENTO et al., 1996). Os animais foram divididos em dez grupos de três animais e cada grupo foi eutanasiado em intervalos de tempo diferentes (30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 24h) além do grupo controle que recebeu o mesmo volume de solução salina.

O procedimento de eutanásia dos animais ocorreu por administração intraperitoneal de superdosagem de ketamina e xilazina. Confirmando-se a morte dos animais, os mesmos foram submetidos à nefrectomia.

A nefrectomia ocorreu em mesa cirúrgica onde os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal e fixados através de fita adesiva, sendo, em seguida, submetidos à tricotomia abdominal manual com lâmina. Realizou-se a

laparotomia mediana trans-umbilical, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade peritoneal. As alças intestinais foram deslocadas medialmente, expondo cada um dos rins sucessivamente.

Utilizando pinça e tesoura, foi realizada a dissecação cuidadosa de cada rim, liberando todas as aderências e a gordura perirenal, evitando assim a ocorrência de lesões iatrogênicas. A ressecção de cada rim foi realizada imediatamente e logo abaixo dos vasos renais, utilizando-se bisturi com lâmina.

Em seguida cada par de rins foram cuidadosamente colocados em superfície de parafina à temperatura ambiente, e cada rim foi seccionado transversalmente obtendo-se de cada um 3 partes de tamanhos aproximados, e então estas secções foram posicionadas em cassetes histológicos portando identificação do grupo de animais e tempo de inoculação, e assim fixados em solução de Formol em tampão fosfato (PBS) 10% situado em frascos devidamente identificados, que foram fechados e armazenados para posterior preparação histológica de rotina. O processo foi realizado utilizando equipamentos de proteção individual (EPI) como: óculos de proteção, máscara cirúrgica cobrindo a boca e nariz, luva de látex, jaleco de manga longa e touca cobriu todos os cabelos. A eutanásia, a laparotomia e a secção renal, ocorreu em local apropriado no Biotério do IPEN em que o ambiente era silencioso e longe de outros animais. Os animais do grupo controle receberam o mesmo tratamento.

4.4 Preparação Histológica

As secções renais fixadas em formol (PBS) 10% foram emblocados em parafina utilizando procedimento laboratorial de rotina do Laboratório de Pesquisas do ITPAC Porto Nacional, onde os rins passaram por lavagem em álcool 70° GL para desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série com xilol, seguida de inclusão em parafina a 60°C em estufa.

Os blocos foram submetidos à microtomia com espessura de corte em 5 µm, seguidos de coloração dos cortes em Hematoxilina-Eosina (HE) e fixação permanente da lamínula utilizando meio Permount® (FISHER SCIENTIFIC).

Cada lâmina histológica obtida foi identificada de acordo com os grupos de animais para análise em microscopia de luz.

Posteriormente, os blocos de parafina contendo as secções renais dos camundongos do grupo controle (GC), grupo de camundongos inoculados com crotoxina nativa (CTXN) e grupo de camundongos inoculados com crotoxina irradiada (CTXI), foram enviados ao Laboratório de Patologia de Moléstia Infecciosas da USP, onde foi realizada a preparação imunohistoquímica pelo método de imunoensaio clássico, utilizando soro anticrotoxina produzido pelo Centro de Biotecnologia do IPEN. Foi realizada a microtomia dos blocos de parafina, e logo após a pesca dos cortes, empregou-se a desparafinização, que compreendeu uma sequencia de procedimentos: banho de xilol e acetona, a hidratação em banhos hidro-alcoólicos de diferentes concentrações, a lavagem em água corrente e em PBS, banho em anticorpo policlonal de coelho anticrotoxina, a lavagem, e por último a contra coloração e montagem da lâmina.

4.4.1 Análise histológica e imunohistoquímica

Foram confeccionados 11 cortes histológicos corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e 11 cortes histológicos de imunohistoquímica a partir dos rins dos três grupos de camundongos: o grupo controle e os que foram inoculados com crotoxina nativa ou irradiada. Cada corte histológico produzido continha 18 secções transversais dos rins dos animais testados.

As secções renais presentes nos cortes histológicos foram analisadas em microscópio óptico (BIOVAL, Mod. L1000) na objetiva de 40X. Nas amostras renais dos cortes corados por HE, efetuou-se uma avaliação qualitativa da região cortical dos rins para identificação de possíveis alterações nas estruturas glomerulares, tubulares e intersticiais que quando presentes foram compiladas em instrumento de coleta de dados (APÊNDICE). Nos cortes de imunohistoquímica foi analisado o padrão da marcação de cor marrom que é associada aos complexos antígeno-anticorpo formados entre a crotoxina e o soro anticrotoxina.

Foram realizadas fotomicrografias dos cortes histológicos utilizando câmera digital (OPTCAM®) acoplada ao sistema.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados qualitativos que compreendiam a existência de alterações histopatológicas em cada secção renal corada por HE foi compilado em software adequado à análise estatística. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, baseados na presença de alterações histopatológicas encontradas em cada amostra renal dos grupos de camundongos inoculados com crotoxina nativa (CTXN) ou com crotoxina irradiada (CTXI). Foi realizada comparação dos dados utilizando-se o teste *t* de *Student*, e considerados significativos quando a probabilidade de igualdade (p) era $< 0,05$. Para análise estatística e confecção de gráficos afim de facilitar a interpretação observacional do estudo foi utilizado o *Software Graph Prisma® v.5.01*.

6. RESULTADOS

Os resultados aqui expostos são referentes ao fracionamento do veneno total da *C. d. terrificus* para obtenção da proteína de interesse – crotoxina –; ao estudo comparativo de nefrotoxicidade de camundongos que foram inoculados com crotoxina nativa ou irradiada e ainda à avaliação imunohistoquímica.

6.1 Isolamento da Crotoxina

Na FIG.5 é apresentado o perfil cromatográfico da primeira etapa de fracionamento (exclusão molecular) do veneno total da *C. d. terrificus*. O pico 1 representa a fração correspondente à convulxina; o pico 2, a fração correspondente à delta-toxina, o pico 3 é a fração da giroxina, no pico 4 elui a crotoxina e no pico 5, a crotamina. Este 4º pico é o de interesse neste trabalho.

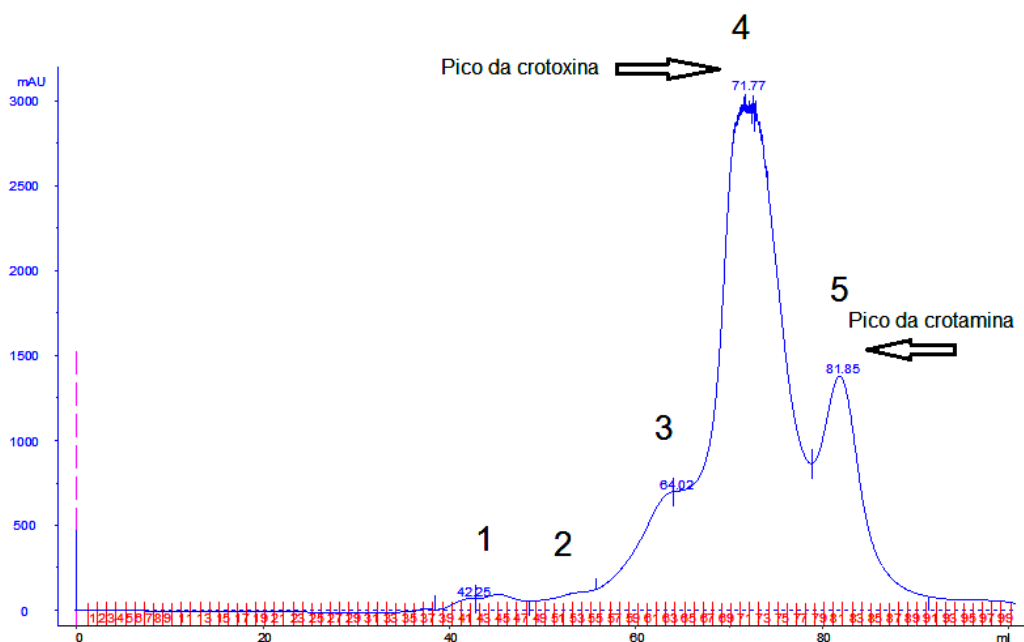


Figura 5: Cromatograma do veneno total da *C. d. terrificus* em coluna de exclusão molecular Superdex 75. O tampão utilizado para a eluição dos picos foi o formiato de amônio, 50 mM, pH 3,0. Os picos indicados correspondem à convulxina (pico 1), delta-toxina (pico 2), giroxina (pico 3), crotoxina (pico 4) e crotamina (pico 5).

As frações referentes à área do pico 4 (FIG.5) provenientes da purificação em exclusão molecular foram reunidos e liofilizados para repurificação da crotoxina em coluna de troca aniônica.

Na FIG.6 é apresentada a cromatografia da crotoxina, em coluna de troca aniônica – Mono Q. Para a eluição da fração de interesse foi utilizado um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M.

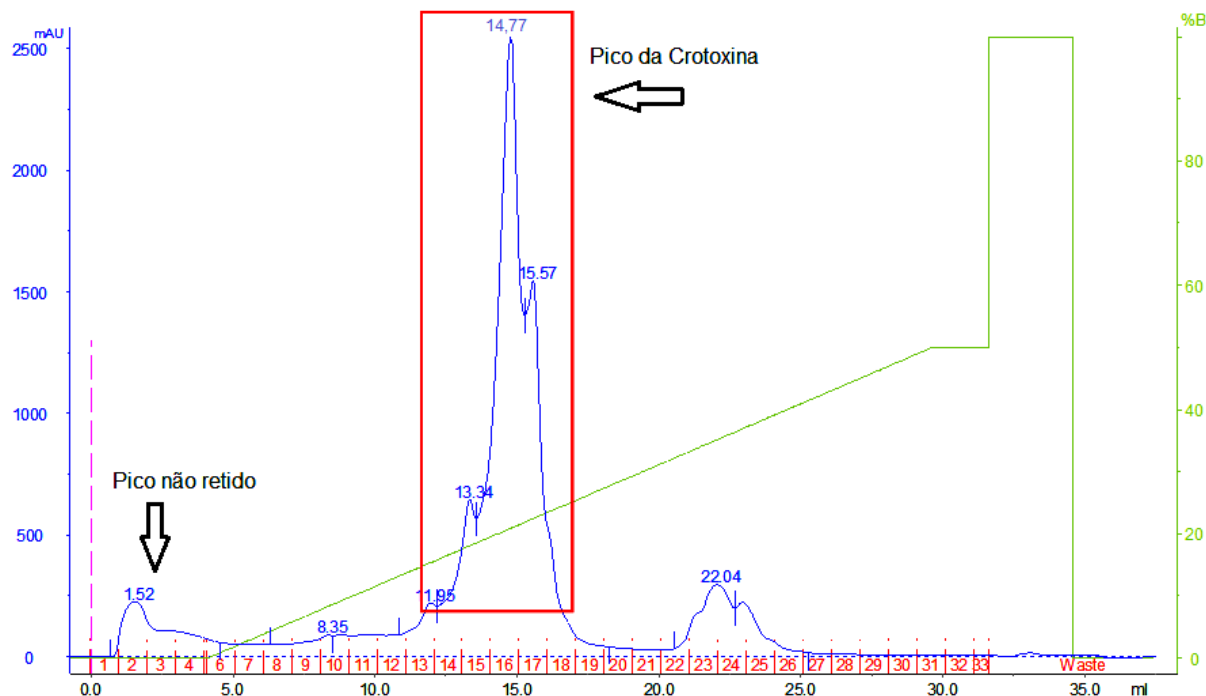


Figura 6: Cromatografia da crotoxina em coluna de troca aniônica (Mono Q – 5 mL). O gradiente linear de NaCl, representado pela linha verde, variou de 0 a 1 M.

As frações referentes ao pico da crotoxina (FIG.6) da cromatografia de troca aniônica, foram reunidas e liofilizadas, sendo esta denominada de crotoxina nativa.

6.2 Histologia Renal Comparativa

6.2.1 Análise das alterações histopatológicas

Foram analisadas 198 amostras das quais, 18 corresponderam às secções dos rins dos camundongos do grupo controle, 90 secções renais dos camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) e 90 secções renais dos camundongos que receberam crotoxina irradiada (CTXI).

Em todas as amostras foram investigadas alterações histopatológicas compatíveis com aquelas descritas na literatura relacionadas aos casos de nefrotoxicidade promovidas por acidentes com serpentes do gênero *Crotalus*.

Não foi encontrada qualquer alteração histopatológica nas amostras do grupo controle (FIG.7).

Como pode ser observado na FIG.7, a amostra do córtex renal do camundongo controle encontra-se sem alterações estruturais importantes para a produção de ultra-filtrado, ou seja, o glomérulo renal, túbulo contorcido proximal e túbulo contorcido distal – se apresentam com características histológicas comuns na análise à microscopia óptica: glomérulo renal com alças capilares e núcleos de células mesangiais normais, presença de espaço de Bowman, túbulos encontram-se com os epitélios íntegros, e no caso do túbulo contorcido proximal, a borda em escova encontra-se evidente à análise luminal.

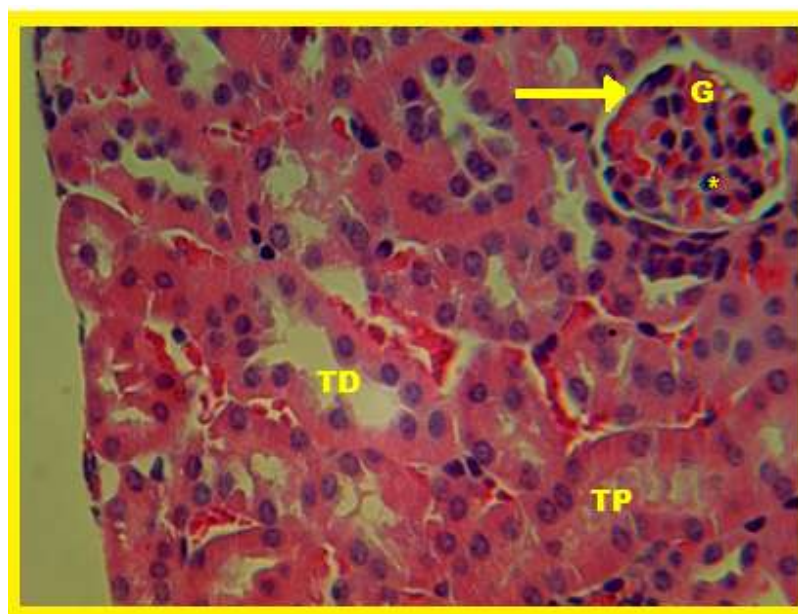


Figura 7 – Córtex renal de camundongo do grupo controle (HE – 400X). G – Glomérulo Renal; TP – Túbulo Contorcido Proximal; TD – Túbulo Contorcido Distal; Seta - Espaço de Bowman; * - Célula Mesangial. Notar que os aspectos morfológicos das estruturas renais encontram-se normais.

Nas amostras dos grupos CTXI e CTXN analisadas foram registradas a ocorrência de glomerulonefrite (FIG.8, FIG.9), congestão capilar (FIG.10, FIG.11) e necrose tubular aguda (FIG.12, FIG.13).

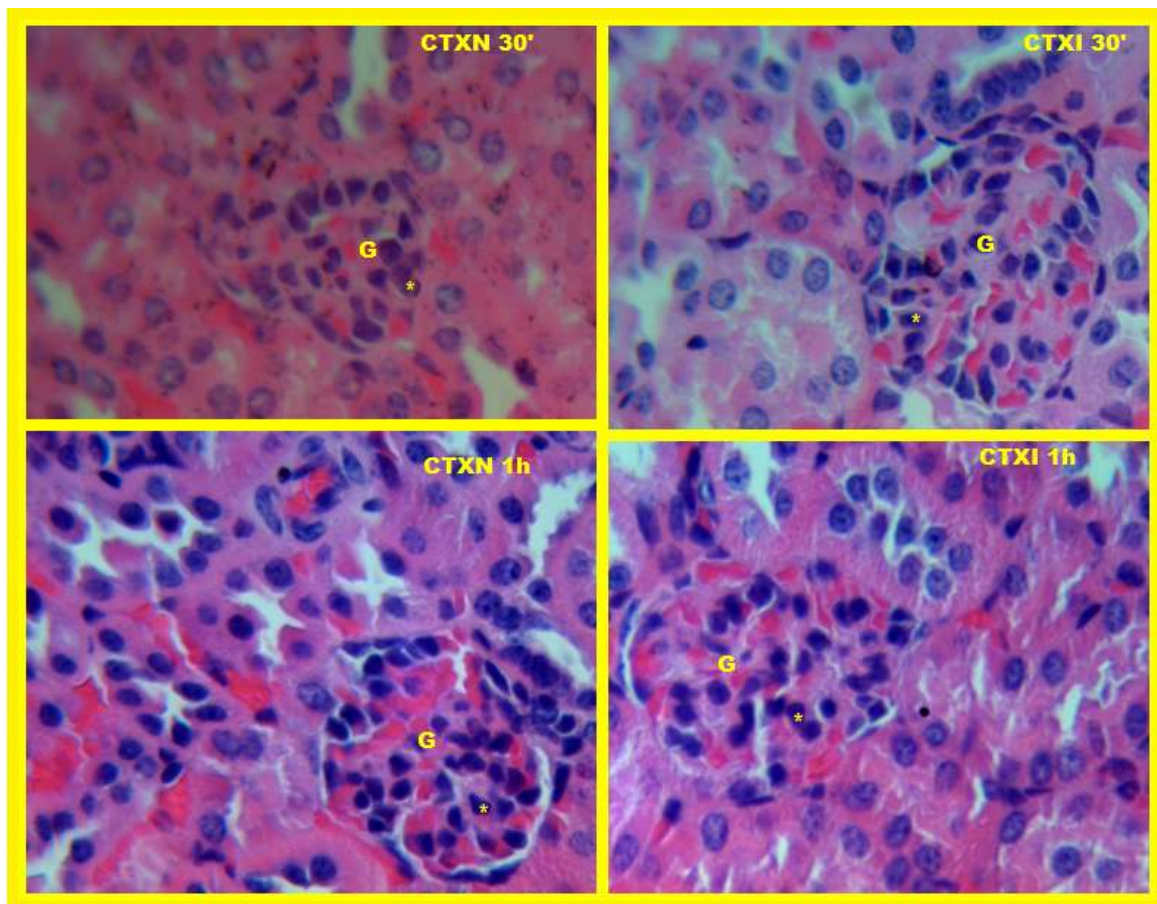


Figura 8 – Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X). G – Glomérulo Renal; * - Células mesangiais. Notar a presença de glomerulonefrite.

Na FIG.8 observa-se micrografia do córtex renal de animais do grupo inoculado com crotoxina nativa (CTXN) ou com crotoxina irradiada (CTXI) eutanasiados aos 30 min. e 1 h após a inoculação do veneno, respectivamente.

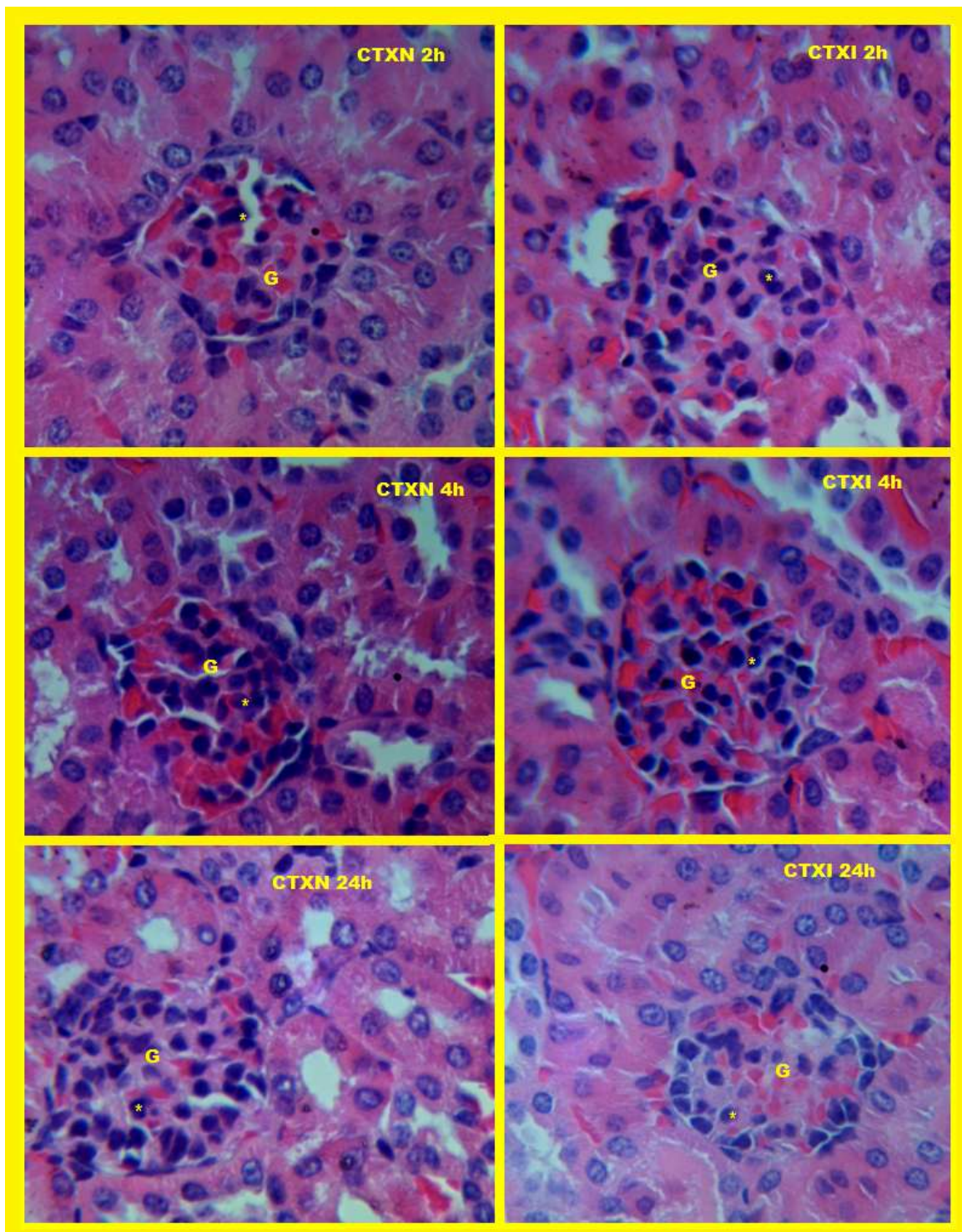


Figura 9- CórTEX renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X). G – Glomérulo Renal. Notar a presença de glomerulonefrite.

Na FIG.9 nota-se a micrografia do córtex renal de animais do grupo inoculado com crotoxina nativa (CTXN) ou com crotoxina irradiada (CTXI) eutanasiados às 2 h, 4 h e 24 h após inoculação do veneno, respectivamente. Os glomerulos renais (G) destas amostras apresentam glomerulonefrite (GN), pois

encontram-se maiores e apresentam maior concentração celular quando comparados ao grupo controle. Observa-se ainda que o espaço de Bowman encontra-se comprimido pelo maior volume dos tufo capilares glomerulares e pela hiperplasia principalmente às custas das células mesangiais (*) e espessamento da parede dos capilares glomerulares.

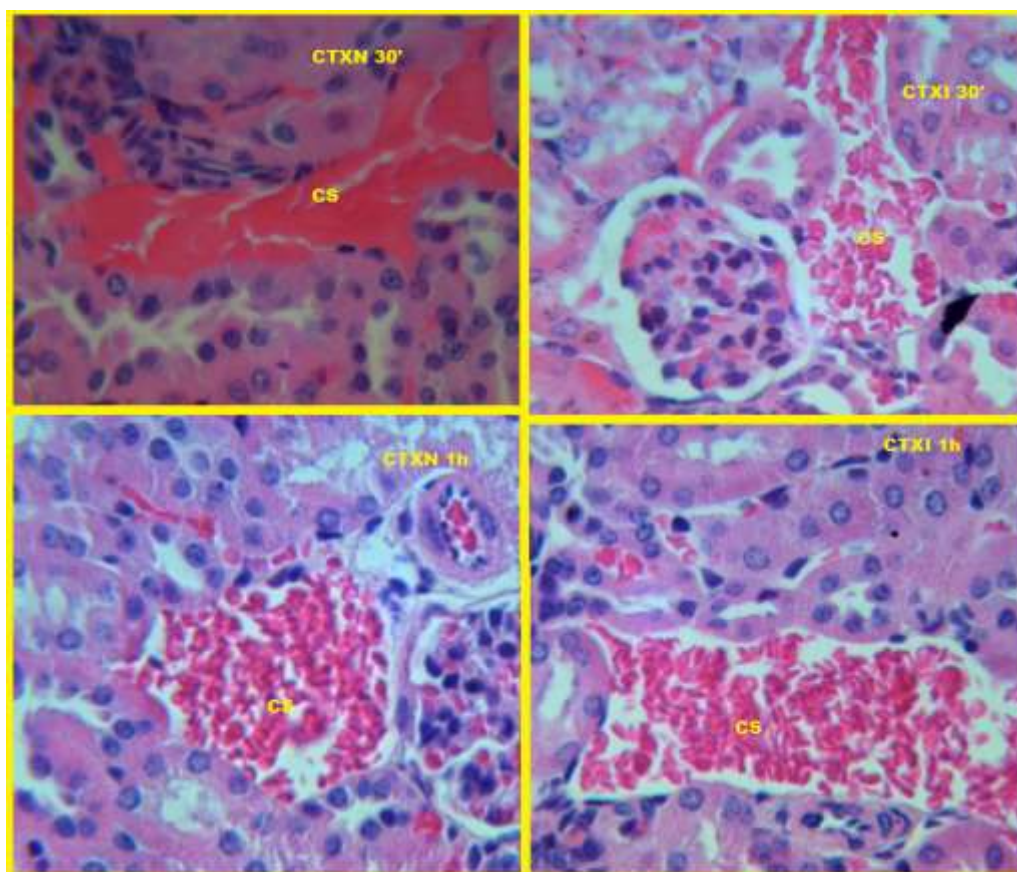


Figura 10– Córteix renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X). CS – Capilar Sanguíneo. Notar a presença de congestão capilar.

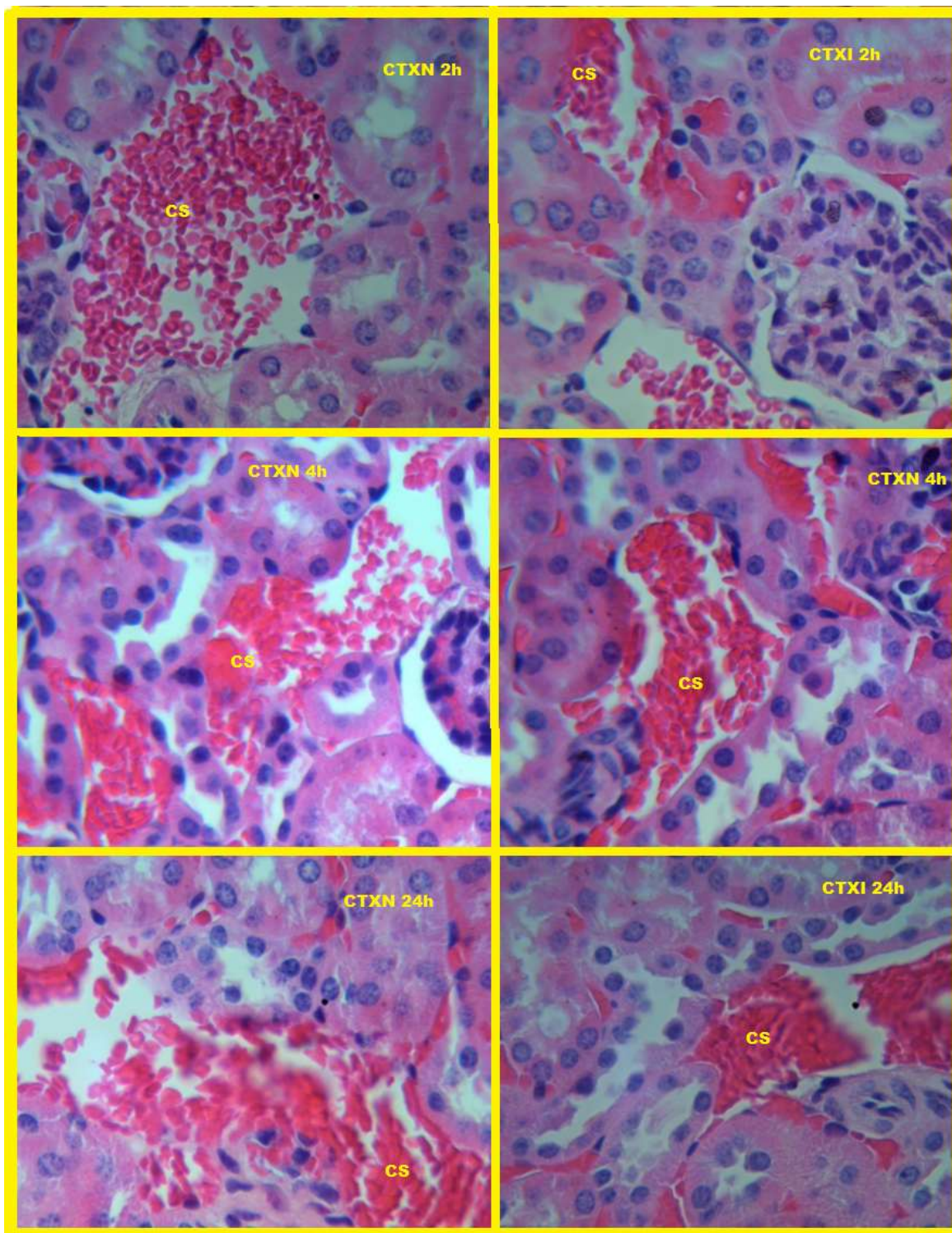


Figura 11- Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h e 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X). CS – Capilar Sanguíneo. Notar a presença de congestão capilar.

Visualiza-se nas FIG.10 e FIG.11 capilares sanguíneos dilatados com presença de grande quantidade de hemácias nas micrografias do córtex renal das amostras dos animais inoculados com crotoxina nativa ou irradiada. Esta dilatação capilar em que os mesmos apresentam grande quantidade de hemácias indicam um aumento local do volume de sangue, evento característico de hiperemia devido a congestão do leito capilar (CC) que está intimamente ligado ao desenvolvimento de edema.

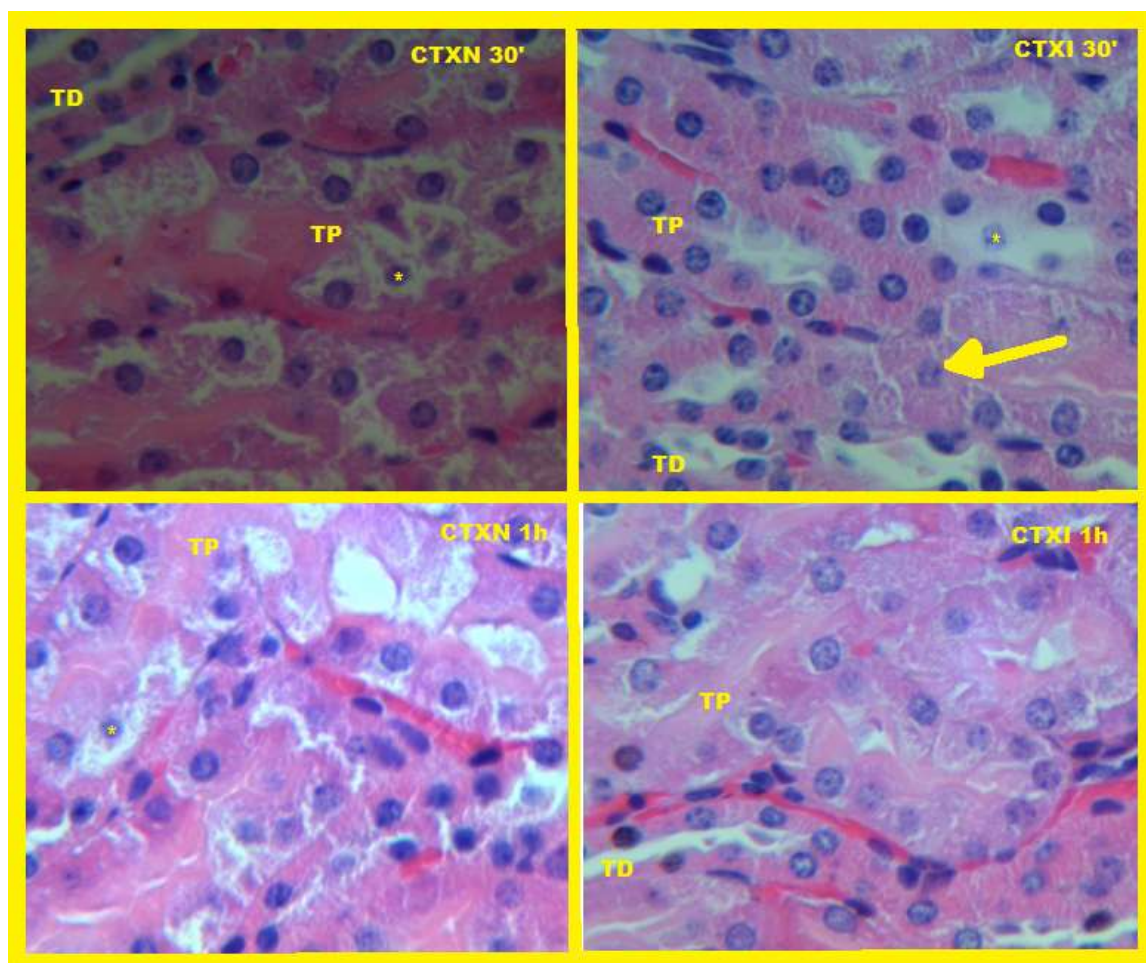


Figura 12– Córtex renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (HE – 400X). TD - Túbulo Contorcido Distal; TP – Túbulo Contorcido Proximal. Notar a presença de necrose tubular aguda nos túbulos contorcidos proximais.

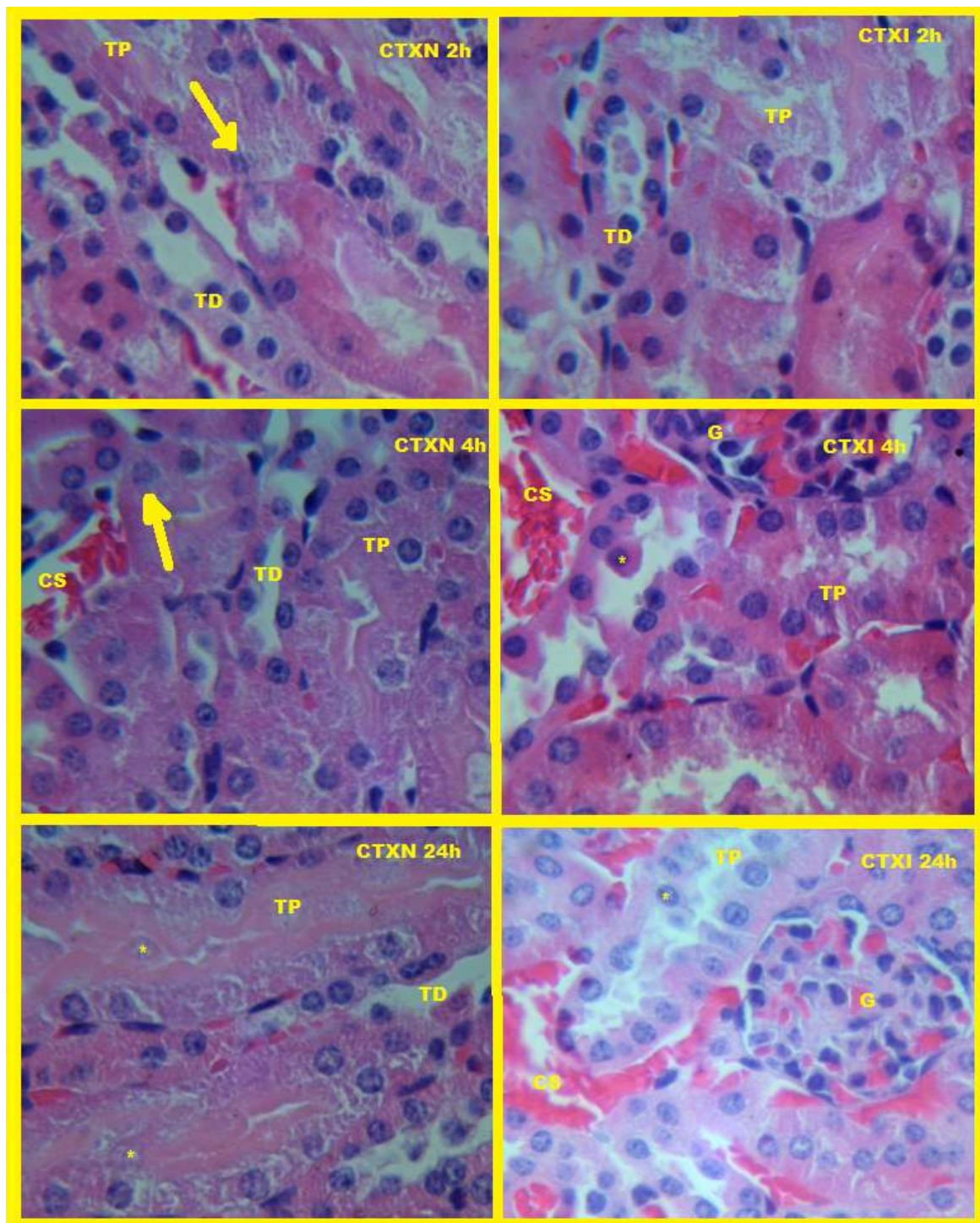


Figura 13– CórteX renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação (HE – 400X). TD - Túbulo Contorcido Distal; TP – Túbulo Contorcido Proximal; G – Glomérulo Renal; CS – Capilar Sanguíneo. Notar a presença de necrose tubular aguda nos túbulos contorcidos proximais.

Observa-se nas FIG.12 e FIG.13 micrografias dos córtex das amostras dos grupos de animais que foram inoculados com crotoxina nativa ou irradiada e eutanasiados 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, e 24 h após a inoculação, nestas são identificáveis lesões epiteliais nos túbulos contorcidos proximais características de

necrose tubular aguda (NTA) como necrose de células tubulares, que descamam para a luz (*) e presença de núcleos celulares picnóticos (seta).

A análise quantitativa dos cortes histológicos dos diferentes grupos: controle - 18 amostras renais de 3 animais, crotoxina nativa (CTXN) - 18 amostras renais de 3 animais por cada intervalo de tempo de: 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 24 h e crotoxina irradiada (CTXI) - 18 amostras renais de 3 animais por cada intervalo de tempo de: 30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, foi feita pela comparação dos dados dicotomizados. A ausência ou presença das alterações histológicas foram descritas em média \pm desvio padrão (FIG.14) a partir da análise qualitativa das amostras histológicas dos rins tanto dos grupos de animais que receberam crotoxina nativa quanto dos que receberam a crotoxina irradiada. As amostras do grupo controle não revelaram alterações histopatológicas nos rins destes animais.

Foram também comparados os dados em relação à frequência de alterações histopatológicas por cada intervalo de tempo (FIG.13) nos diferentes grupos CTXN e CTXI.

As alterações histopatológicas reveladas e avaliadas quantitativamente são a glomerulonefrite (GN), congestão capilar (CC) e a necrose tubular aguda (NTA).

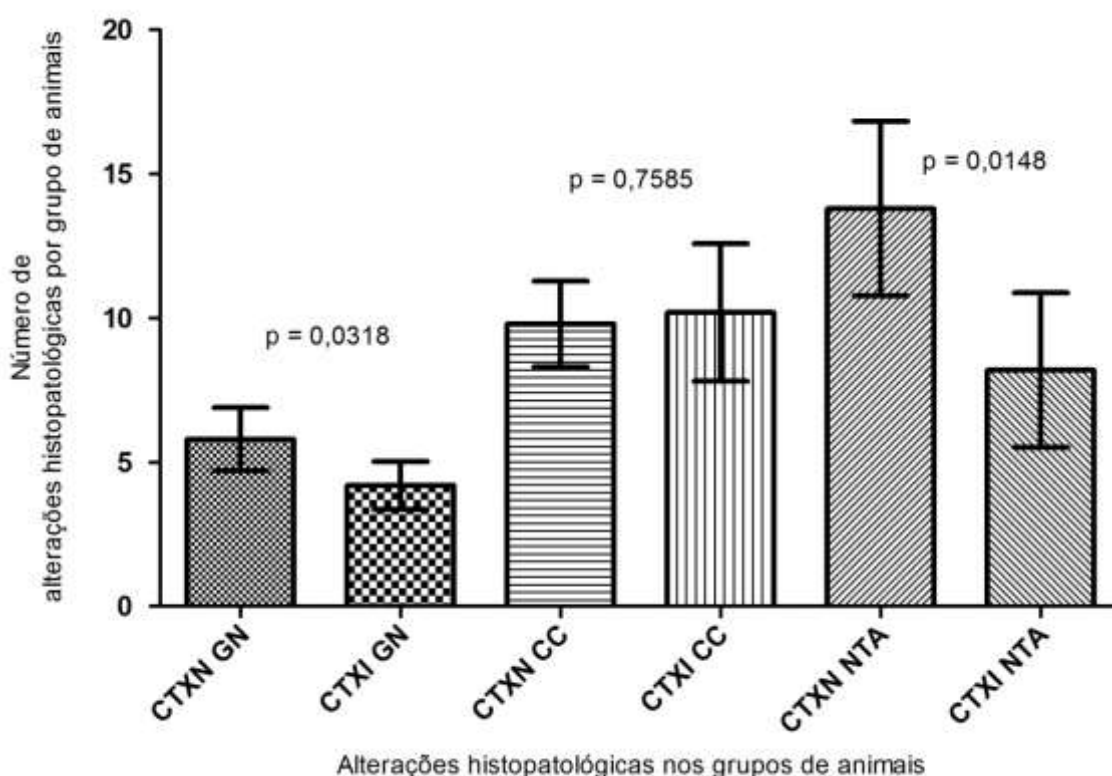


Figura 14—Análise de média \pm desvio padrão da existência de alterações histopatológicas nas amostras renais dos grupos CTXN e CTXI. Teste *t Student* para cada alteração histopatológica em relação aos grupos CTXN e CTXI:

CTXN GN – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram glomerulonefrite;

CTXI GN – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram glomerulonefrite;

CTXN CC – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram congestão capilar;

CTXI CC – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram congestão capilar;

CTXN NTA – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram necrose tubular aguda;

CTXI NTA – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram necrose tubular aguda.

Conforme verificado na FIG.14, no grupo CTXN a alteração histopatológica predominante foi a necrose tubular aguda ($13,8 \pm 3,0$), seguida de congestão capilar ($9,8 \pm 1,5$) e glomerulonefrite ($5,8 \pm 1,1$).

O grupo CTXI apresentou predomínio de congestão capilar ($10,2 \pm 2,4$) seguido de necrose tubular aguda ($8,2 \pm 2,7$) e glomerulonefrite ($4,2 \pm 0,8$).

Quando se avalia comparativamente cada alteração histopatológica (glomerulonefrite - GN, congestão capilar - CC e necrose tubular aguda - NTA) entre os grupos CTXN e CTXI, pode-se verificar que:

A GN teve maior ocorrência no grupo CTXN ($5,8 \pm 1,1$) quando comparada ao grupo CTXI ($4,2 \pm 0,8$). Essa diferença é estatisticamente significativa segundo o teste *t Student* de amostras independentes ($p = 0,0318 < 0,05$).

A NTA foi dominante no grupo CTXN ($13,8 \pm 3,0$) em relação ao grupo CTXI ($8,2 \pm 2,7$). Essa diferença é estatisticamente significativa segundo o teste *t Student* de amostras independentes ($p = 0,0148 < 0,05$).

A CC foi semelhante no grupo CTXI ($10,2 \pm 2,4$) quando comparada ao grupo CTXN ($9,8 \pm 1,5$). Não houve diferença estatística significativa segundo o teste *t Student* de amostras independentes ($p = 0,7585 > 0,05$).

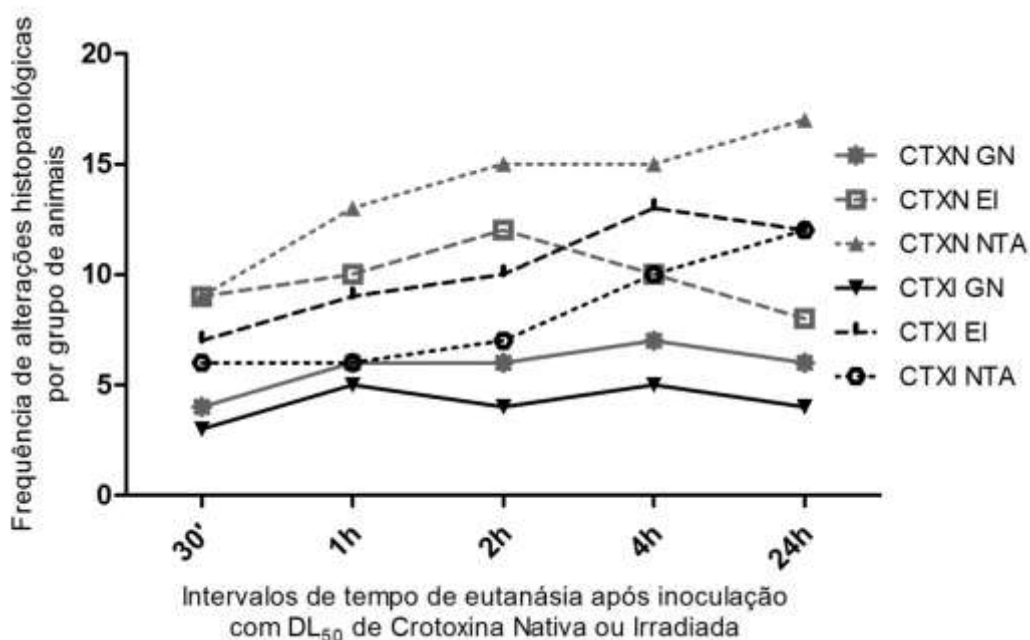


Figura 15– Resultados da análise morfológica realizada nas amostras renais dos grupos de animais CTXN e CTXI onde as alterações histopatológicas foram comparadas em relação aos intervalos de tempo de eutanásia dos animais (30 min., 1 h, 2 h, 4 h e 24 h) inoculados com crotoxina nativa ou irradiada.

CTXN GN – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram glomerulonefrite;

CTXI GN – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram glomerulonefrite;

CTXN CC – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram congestão capilar;

CTXI CC – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram congestão capilar;

CTXN NTA – análise estatística das amostras com crotoxina nativa que revelaram necrose tubular aguda;

CTXI NTA – análise estatística das amostras com crotoxina irradiada que revelaram necrose tubular aguda.

A análise do número de alterações histopatológicas nas amostras histológicas do grupo de animais inoculados com crotoxina nativa (CTXN) e do grupo inoculado com crotoxina irradiada (CTXI) pelos intervalos de tempos de eutanásia - 30 min., 1h, 2h, 4h, 24h – (FIG.15) mostrou que:

A glomerulonefrite aos 30 min. apresentou-se baixa tanto para o grupo CTXN (GN = 4) quanto para o grupo CTXI (GN = 3), e para o último intervalo de tempo de eutanásia - 24h, apresentou evolução das lesões no grupo CTXN (GN = 6) e discreta evolução no grupo CTXI (GN = 4).

A congestão capilar destacou-se aos 30 min. no grupo CTXN (CC = 9) e no grupo CTXI (CC = 7), e às 24h ocorreu uma menor evidencia de congestão capilar para o grupo CTXN (CC = 8) em relação ao grupo CTXI (CC = 12).

A necrose tubular aguda (NTA) foi sempre a que se destacou em relação às demais alterações histopatológicas em todos os intervalos de tempo de eutanásia. Apresentou-se sempre mais frequente no grupo CTXN (30 min. = 9; 1 h = 13; 2 e 4 h = 15; 24 h = 17) que no grupo CTXI (30 min. e 1 h = 6; 2 h = 7; 4 h = 10; 24 h = 12).

6.2.3 Análise imunohistoquímica

Foi realizada análise qualitativa da marcação com anticorpo policlonal anticrotoxina, produzida em coelho, nos cortes histológicos a fim de demonstrar a presença da crotoxina nos diferentes intervalos de tempo de inoculação.

Na FIG. 16 é apresentado o resultado obtido do ensaio de imunohistoquímica do grupo controle que recebeu apenas salina. Neste grupo, não foi observada a pigmentação marrom escura, indicando a ausência da crotoxina no tecido.

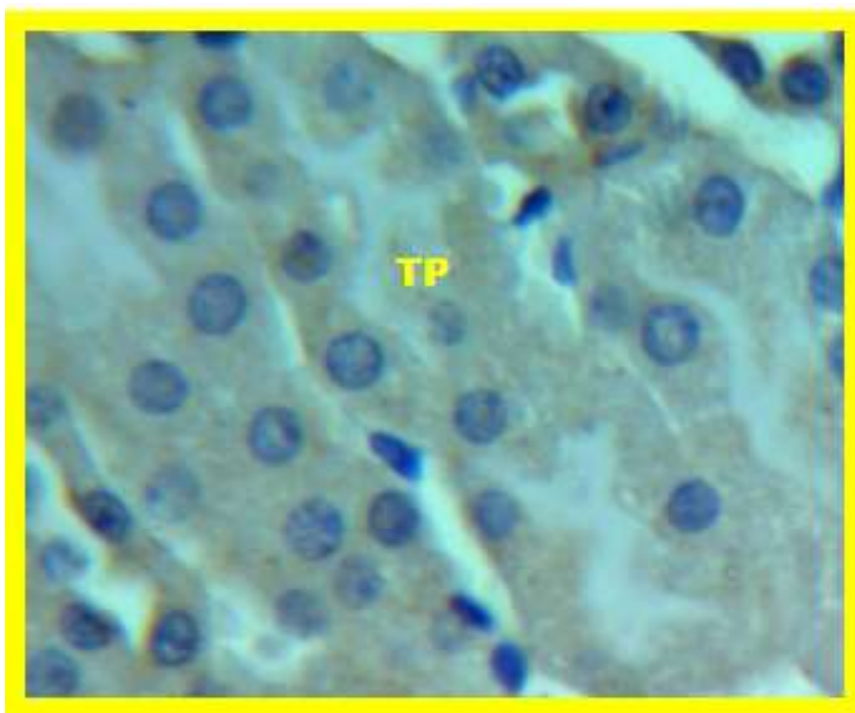


Figura 16– CórteX renal de camundongo do grupo controle (Imunohistoquímica - 400x). TP – Túbulo contorcido proximal.

Nas FIG.17 e FIG.18, observa-se pigmentação de cor marrom-escura no epitélio de revestimento de alguns túbulos proximais (*), indicando que o anticorpo anticrotoxina se ligou ao tecido, comprovando a presença da toxina no local.

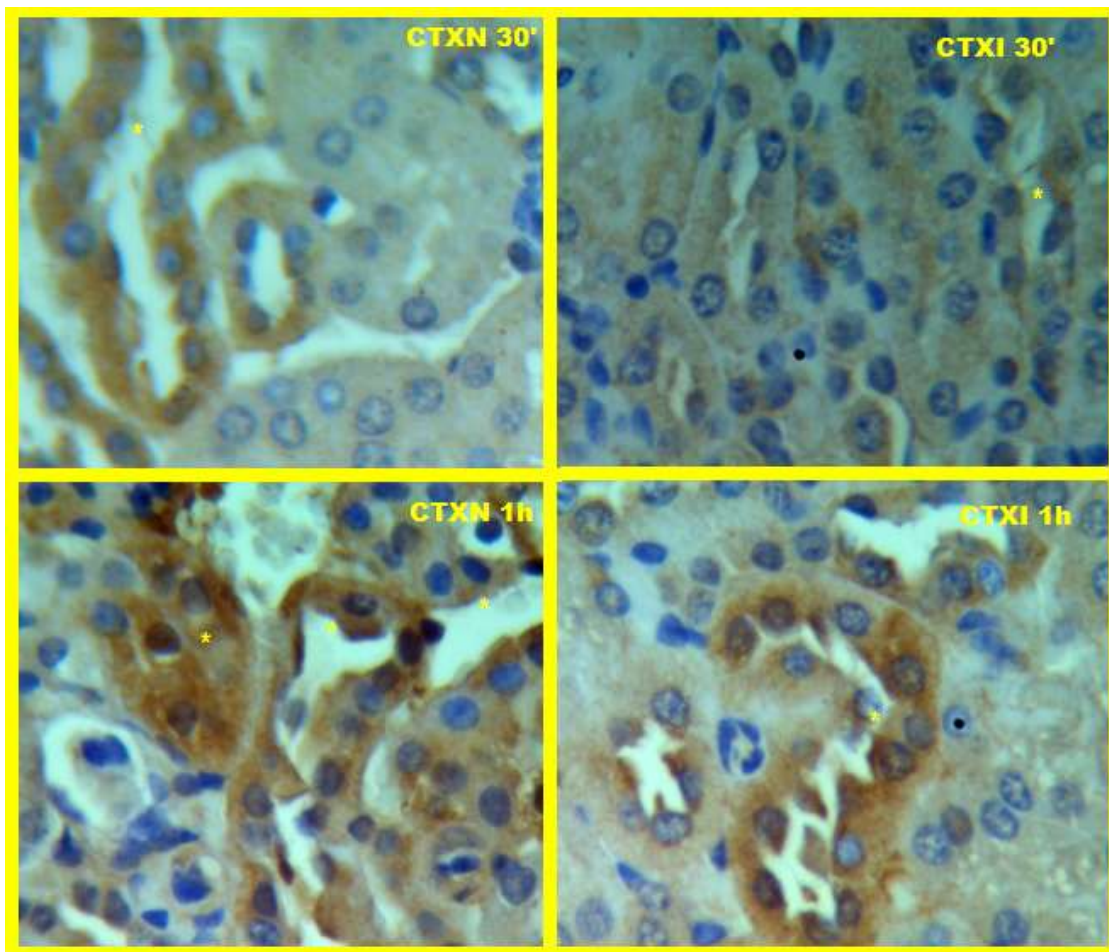


Figura 17– Córte renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), eutanasiados em intervalos de 30 min. e 1 h após inoculação (Imunohistoquímica – 400X).

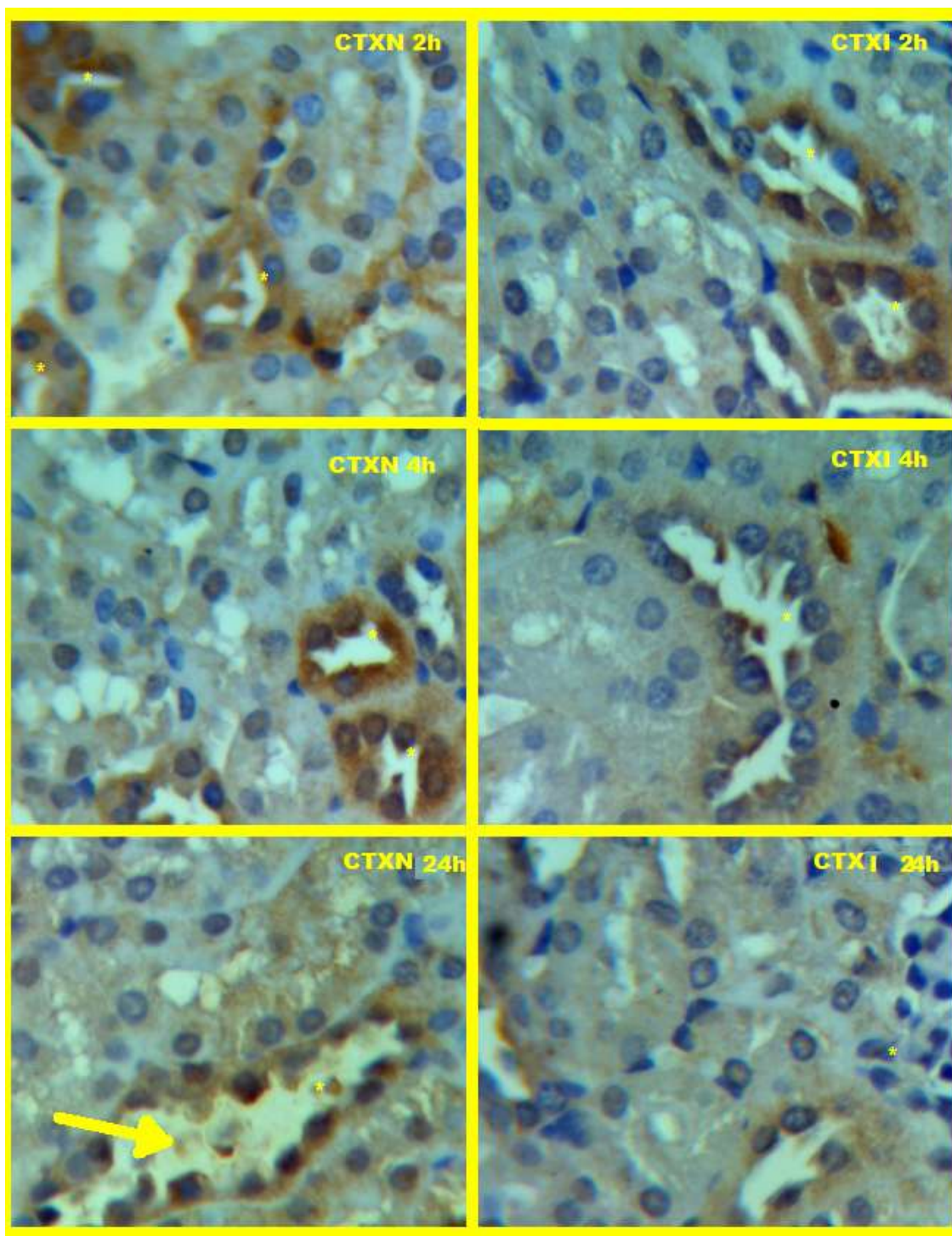


Figura 18- CórteX renal dos grupos de camundongos que receberam crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados em intervalos de 2 h, 4 h e 24 h após inoculação (Imunohistoquímica – 400X).

Ainda na FIG. 18, cabe ressaltar a evidência de necrose tubular aguda (seta) no córtex renal de camundongos após 24 h da administração de crotoxina nativa.

Ao considerar as micrografias renais segundo o tempo de eutanásia, percebe-se que:

No intervalo de 30', somente a amostra do grupo crotoxina nativa (CTXN) revelou o pigmento de cor marrom-escuro nas células de alguns túbulos proximais;

No intervalo de 1 h, a amostra do grupo CTXN apresentou mais túbulos marcados que o grupo crotoxina irradiada (CTXI);

No intervalo de 2h observa-se pigmentação tanto nas amostras do grupo que recebeu CTXN quanto naquele que recebeu CTXI;

No intervalo de 4h, túbulos do grupo CTXN se apresentaram corados fortemente pelo marcador, enquanto que a amostra do grupo CTXI revelou fraca marcação em túbulo proximal;

No intervalo de 24h, a marcação continua evidente no grupo CTXN, enquanto que no grupo CTXI ela está ausente.

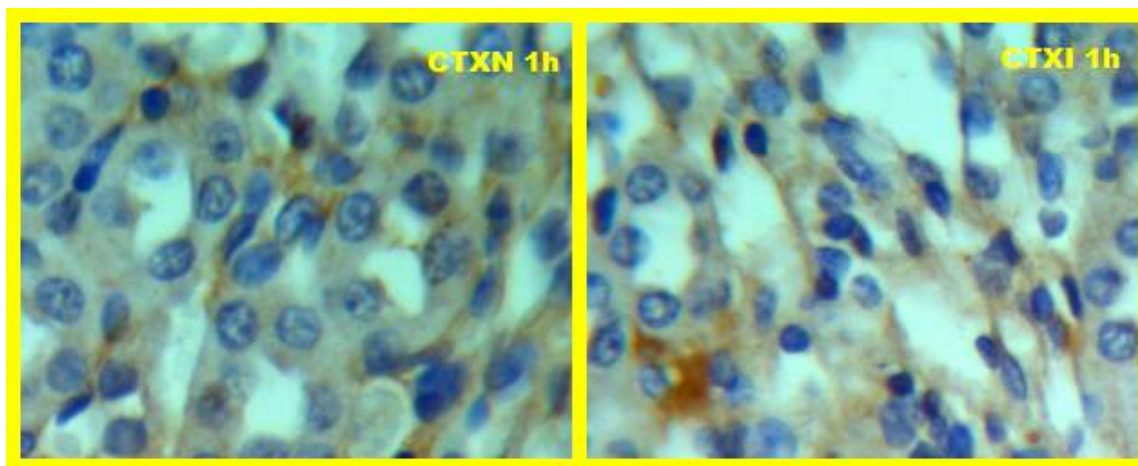


Figura 19–Medula renal dos grupos de camundongos que receberam inoculação de crotoxina nativa (CTXN) ou irradiada (CTXI), que foram eutanasiados no intervalo de 1 h após inoculação, demonstrando a ocorrência de marcação citoplasmática da crotoxina com o anticorpo anticrotoxina (Imunohistoquímica – 400X).

Na FIG.19 visualiza-se a medula renal das amostras dos camundongos do grupo CTXN e CTXI eutanasiados no intervalo de 1h após a inoculação da crotoxina. Existe também a presença de crotoxina das células tubulares da medula renal, a marcação marrom-escura caracteriza a ligação entre a crotoxina e o soro anticrotoxina.

7. DISCUSSÃO

Pesquisas toxicológicas e farmacológicas de peçonhas de serpentes são temas de estudos relevantes devido aos inúmeros casos de ofidismo que ocorrem no Brasil. A fisiopatologia dos envenenamentos por serpentes envolve uma série de eventos complexos que dependem da ação combinada dos componentes dos venenos (CHANDRASHEKARA et al., 2009).

Existe uma grande variedade de manifestações clínicas resultantes da lesão renal promovida pelo acidente ofídico. Os sintomas podem variar de locais a sistêmicos e as manifestações podem compreender desde uma proteinúria leve à falha renal aguda. As alterações patológicas renais incluem mesangiólise, glomerulonefrite, vasculite, necrose tubular, nefrite intersticial e necrose cortical. As alterações hemodinâmicas induzidas por citocinas e mediadores vasoativos que levam à isquemia renal são importantes na patogênese da Insuficiência Renal Aguda (IRA). A nefrotoxicidade direta que pode ser induzida pelo veneno ocorre principalmente por ação de metaloproteases e da fosfolipase A₂ (SITPRIJA, 2006).

O acidente crotálico causa intensa mialgia acompanhada de discreto edema muscular. Ocorre lesão das fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) que causa a liberação gradual de mioglobina que é excretada pela urina (mioglobinúria), evidenciada por alterações na cor da urina (tonalidade avermelhada à marrom – “urina cor de coca-cola) (CASTRO, 2006; FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009).

A associação entre rabdomiólise e IRA está bem estabelecida na literatura e dentre os mecanismos propostos para explicá-la, encontramos a obstrução tubular por cilindros de mioglobina e a lesão tóxica direta nos túbulos. Outros fatores como desidratação, hipotensão arterial, acidose metabólica e choque, podem estar associados à rabdomiólise e contribuem para a instalação da lesão renal (FERNANDES et al., 2008).

O comprometimento renal pode variar, entretanto envolve todas as estruturas, apresentando geralmente necrose tubular, provocada por isquemia e/ou ação nefrotóxica direta e glomerulonefrite (PEREIRA, 2009)

A biodistribuição da toxina pode ser modificada quando o veneno da serpente é submetido a procedimentos de destoxicação, o qual é realizado por alterações químicas ou físicas das toxinas. Já se sabe que a irradiação de toxinas com raios gama que resulta em mudanças estruturais e conseqüentemente diminuem as atividades enzimáticas de proteínas tóxicas sem, entretanto, comprometer os epítomos imunogênicos (OLIVEIRA et al., 2015).

Para analisar se a radiação poderia modificar o dano renal produzido pela crotoxina, este estudo teve como meta comparar a histologia de rins de grupos de camundongos inoculados com crotoxina nativa (CTXN) e de camundongos inoculados com crotoxina irradiada (CTXI) com raios gama de ^{60}Co .

A crotoxina é um componente protéico que corresponde a 60% do peso seco do veneno das cascavéis. É composta de um polipeptídio não-tóxico e não-enzimático ácido - crotapotina e de uma fosfolipase A_2 básica (PLA_2), fracamente tóxica. Entretanto o componente crotapotina atua aumentando os efeitos neurotóxicos letais da fosfolipase A_2 e diminuindo a sua atividade catalítica. Enquanto a crotapotina modula a resposta inflamatória inibindo a proliferação de linfócitos T, a fosfolipase A_2 aumenta a permeabilidade vascular levando inclusive à ativação dos mastócitos (SAMPAIO et al., 2005).

O primeiro passo para realizar a pesquisa foi o isolamento da proteína de interesse partindo do veneno total da cascavel. A técnica cromatográfica de exclusão molecular do veneno total permitiu separar a área do cromatograma onde eluiu a crotoxina. Porém, a separação observada no perfil cromatográfico deixa evidente que a crotoxina apresentava contaminantes como a giroxina e a crotamina (FIG. 5).

A realização de mais uma etapa cromatográfica (FIG. 6) mostrou-se relevante no isolamento da proteína uma vez que, após a troca iônica, a crotoxina apresentou grau de pureza próximo a 97%.

Ao ser irradiada com raios gama de ^{60}Co a crotoxina sofre quebras, contudo os fragmentos se reorganizam em agregados de maior massa molecular, que parecem contribuir para a diminuição da cito toxicidade (NASCIMENTO et al., 1996).

Estudos experimentais já demonstraram que a exposição renal às toxinas presentes em envenenamento por serpentes induzem a glomerulonefrite focal onde a proliferação das células mesangiais corresponde ao evento mais comum e estas são nitidamente reconhecidas no efeito da hiperplasticidade como reação à cicatrização (SITPRIJA, 2006). Na observação da micrografia do córtex renal (FIG. 08, FIG. 09) dos animais inoculados com crotoxina tanto nativa (CTXN) quanto irradiada (CTXI), foram reconhecidos os tufo capilares glomerulares e a hiperplasticidade das células mesangiais, caracterizando este tipo de inflamação.

Trabalhos realizados sobre glomerulonefrite experimental (GN) demonstraram que o processo de reparação de danos no capilar glomerular pode ser comprometido pela proliferação mesangial e esta hiperplasticidade induziria o desenvolvimento de esclerose glomerular com conseqüente disfunção renal (SHIMIZU et al., 2004). Entretanto, nas análises deste experimento, identificou-se que a hiperplasticidade foi mais expressiva nas amostras dos animais tratados com crotoxina nativa (FIG, 08 e Fig. 09), indicando que a regeneração glomerular ficaria menos comprometida nos animais tratados com crotoxina irradiada, onde a glomerulonefrite esteve significativamente ($4,2\pm 0,8$; $p=0,03$) em menor frequência (Fig. 14 e Fig. 15).

Histologicamente a necrose tubular aguda é caracterizada pela presença de túbulos dilatados, necrose celular, edema intersticial e infiltração de células inflamatórias (PEREIRA, 2009).

A necrose tubular aguda é a lesão renal mais característica no acidente crotálico. As lesões renais podem ser produzidas pela atuação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos (FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009; MORAIS et al., 2015).

Os componentes do veneno contribuem para a lise das células musculares lisas do leito vascular e promovem diferentes graus de lesão epitelial em todos os segmentos tubulares (KOHLI; SAKHUJA, 2003). É relatado que a crotoxina afeta o funcionamento dos canais de sódio sensíveis à tensão, induzindo o influxo de sódio que resulta na despolarização e consequente contração muscular. Entretanto este mecanismo induz a necrose celular caracterizada por extensa vacuolização e comprometimento do citoesqueleto (CESARE, 2006). As lesões identificadas no epitélio tubular renal (FIG.12 e FIG.13) condizem com o padrão patológico identificado previamente para os tecidos epiteliais descritos.

As alterações da integridade tubular e aquelas observadas na organização da borda em escova das células dos túbulos contorcidos proximais, detectadas neste trabalho coincidem com as descrições de LINARDI et al. (2011), que analisando amostras renais tratadas com veneno de *B. alternatus*, descreveu-as como o comprometimento do citoesqueleto, promovido por alterações conformacionais na molécula de actina-F tanto da cápsula de Bowman quanto da borda em escova das células tubulares.

A nefrotoxicidade do veneno crotálico pode culminar com ações nefrotóxicas diretas ao parênquima e interstício que ficaram expostos às ações da crotoxina dimérica (LOURENÇO JÚNIOR, 2011).

A crotapotina age de forma sinérgica à fosfolipase A_2 e atua ainda como carreador da fosfolipase A_2 evitando sua ligação a sítios não específicos, potencializando desta forma a sua toxicidade (PEREIRA, 2009).

A fosfolipase A_2 possui diversas atividades biológicas, como indução de motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante,

antitumor, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, podendo ainda, apresentar efeitos convulsivantes, hipotensivos e pró-inflamatórios. Essa enzima é capaz ainda de atuar sobre diversos substratos, levando à lesão tecidual por meio da ativação ou liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, derivados do ácido araquidônico, ativação do sistema complemento e de cininas (SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009; MELLO, 2011).

A fosfolipase A_2 também é responsável pela hemólise desenvolvida perante os envenenamentos, a qual se dá pela hidrólise direta dos fosfolipídios da membrana dos glóbulos vermelhos ou indiretamente, com a produção da lisolecitina fortemente hemolítica da lecitina de plasma (KOHLI; SAKHUJA, 2003). Esta enzima é a responsável pela maioria das ações fisiopatológicas do veneno da cascavel (LOURENÇO JÚNIOR, 2011). Dentre os mais importantes efeitos farmacológicos, sabe-se que ela interage com as membranas celulares pela combinação dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos básicos com o C-terminal da proteína (SITPRIJA, 2006). A cascata de eventos envolvidos nesta interação hidrofóbica resulta em perturbações eletrostáticas que desestabilizam a membrana resultando no comprometimento da permeabilidade e consequente necrose celular (BARROS, 2015). Este padrão de lesão renal foi identificado em todos os tratamentos propostos neste trabalho e as FIG.12 e FIG.13 destacam as lesões epiteliais nos túbulos contorcidos proximais, condizentes com necrose tubular aguda (NTA).

Neste estudo, a necrose identificada no grupo de animais que recebeu a crotoxina irradiada ($8,2 \pm 2,7$) apresentou-se sempre em menor frequência que aquela promovida pela toxina nativa ($13,8 \pm 3,0$). Esta ocorrência indica que as interações hidrofóbicas da fosfolipase A_2 provavelmente foram reduzidas com o efeito da radiação gama.

Os danos vasculares desenvolvidos após o envenenamento são causados, em parte, pela ação das metaloproteinases de veneno que degradam proteínas da membrana basal em torno da parede do vaso, provocando a perda de sua integridade (KOHLI; SAKHUJA, 2003).

As amostras analisadas revelaram a congestão capilar, que é um indicador de aumento local do volume sanguíneo tecidual. A congestão é um processo passivo, resultante de um retorno venoso insuficiente, que pode levar a um acúmulo de hemoglobina desoxigenada nos tecidos afetados. A Congestão do leito capilar está intimamente relacionada com o desenvolvimento de edema, de forma que estes processos patológicos estão quase sempre associados. A congestão prolongada pode causar degeneração e morte de células parenquimatosas e ainda a ruptura dos capilares locais podendo também levar a pequenos focos de hemorragia (BURITY et al., 2015).

Esse tipo de lesão vascular foi descrita como arterite segmentar necrotizante, ocorrendo principalmente nas artérias interlobulares. A lesão muitas vezes não é identificada se for observada a partir de biópsia renal com tromboflebite superficial. Entretanto, foi verificado este mesmo tipo de lesão em segmentos da veia arqueada e seus afluentes. Sua patogênese tem sido sugerida como uma deposição de proteínas C3 do complemento sobre a parede das arteríolas aferentes e eferentes, a qual pode ocorrer também em pacientes não acidentados. Entretanto, perante a ação da toxina, a deposição de C3 coincide com a agregação de IgM formando complexos que comprometem a estabilidade do leito vascular (SITPRIJA, 2006). As FIG. 10 e FIG.11 registram a dilatação dos capilares sanguíneos, apresentando grande quantidade de hemácias preenchendo a luz dos mesmos, caracterizando a congestão do leito capilar (CC) que está intimamente ligada às fases que subdividem a patogênese da insuficiência renal aguda (IRA) - Iniciação, manutenção, recuperação e extensão, cujas temporalidades são de suma importância (DEVARAJAN, 2006).

Neste trabalho verificou-se que a congestão capilar ocorreu tanto na presença da crotoxina nativa quanto da irradiada e evoluiu conforme o tempo de exposição (FIG. 14 e Fig. 15). Estas observações sugerem que as propriedades antigênicas da crotoxina irradiada não são perdidas e perante a frequência mais elevada nos grupos tratados (CTXI), pelo contrário, revelam-se mais acentuadas.

Ainda neste contexto, vale acrescentar que logo após exposição inicial ao insulto isquêmico, a função renal se reduz e a depleção de ATP intracelular se

torna intensa o suficiente para promover a lesão sub-letal ao epitélio tubular. E dentre os mecanismos reparadores, foi identificado que a reperfusão cortical sinaliza uma reação positiva dos mecanismos da regeneração renal (DEVARAJAN, 2006). Portanto, o fato da congestão capilar ser persistente nas amostras de animais que foram tratados com crotoxina irradiada pode representar um fator positivo dos mecanismos regenerativos da lesão renal provocada neste experimento.

É descrito que a formação do complexo antígeno-anticorpo desenvolvido pelo envenenamento por serpentes assume a maior responsabilidade pelas lesões vasculares. Muitos componentes do veneno têm massas moleculares entre 20 e 150 kdaltons e quando ligados a um fragmento Fab com uma massa molecular de 50 kdaltons, o complexo se torna grande o suficiente para impedir a sua excreção renal (DART et al., 2001).

A análise renal realizada na imunohistoquímica, em que as amostras foram marcadas com anticorpo policlonal anticrotoxina, mostrou que os animais que receberam a crotoxina nativa ou irradiada demonstraram a absorção tubular da crotoxina, entretanto é verificado que ao longo do tratamento, as partículas marcadas desaparecem mais precocemente nos animais tratados com a crotoxina irradiada (Fig. 17, FIG.18).

Para esta análise são previstas duas hipóteses, a primeira refere-se à probabilidade da crotoxina irradiada ser eliminada mais precocemente devido a sua alteração na conformação da cadeia molecular deixando a crotoxina mais hidrofílica, impedido assim sua reabsorção pelos túbulos; ou por outro lado, é provável que a interação antígeno-anticorpo tenha se tornado mais instável por efeito da alteração molecular, fazendo com que as partículas marcadas se desprendessem mais rapidamente da molécula, reduzindo assim a sua identificação nas amostras contendo a crotoxina irradiada, tendo em vista que OLIVEIRA et al. (2015) trabalhando com crotamina reconheceram que a irradiação resulta em alterações conformacionais significativas e aparentemente homogêneas resultando na redução da estabilidade estrutural.

A análise imunohistoquímica realizada para estas amostras são similares àquelas apresentadas por MELLO et al., (2010), que trabalhando com o gênero *Bothrops*, afirmaram ter detectado absorção do veneno tanto nos tecidos perivasculares quanto nos endotélios. Identificaram também nos glomérulos, cápsula de Bowman e túbulos distais e proximais no córtex renal, assim como no epitélio de alças de Henle e ductos coletores. Entretanto entra em contradição sobre a penetração das partículas marcadas, pois os autores, diferentemente deste trabalho, não detectaram infiltrado nuclear nas amostras observadas (FIG.19).

Vale ressaltar que MELLO et al., (2010) confirmaram, por imunohistoquímica, a presença de veneno no tecido renal, com maior intensidade nas primeiras 24 h após a administração do veneno seguido por uma diminuição progressiva que prevaleceu por até 7 dias. Neste trabalho, foi claramente identificável que a crotoxina irradiada diminuiu expressivamente já nas primeiras 24 pós-tratamento (FIG. 18, FIG 19).

A evolução da lesão renal culmina com a perda da função renal em função da esclerose tanto glomerular quanto intersticial. Com a perda significativa da arquitetura renal, os néfrons residuais sofrem de hipertensão intraglomerular, resultando na hiperatividade do sistema renina-angiotensina aldosterona que exacerba a função das unidades filtrantes remanescentes, resultando, entretanto ao agravamento intersticial (FLAQUER; ROMAGNANI; CRUZADO, 2010). Portanto, as estratégias tecnologicamente mais apreciadas têm sido aquelas que desenvolvem mecanismos capazes de minimizar o dano renal a fim de condicionar a sua regeneração de forma modulada e gradativa, já que os fatores de crescimento das células progenitoras renais (RPC) com atividade sobre as células epiteliais da cápsula de Bowman parietal (PEC) (LASAGNI et al., 2015) se encarregam naturalmente deste processo.

Assim, entendemos que a irradiação de venenos consiste em um refinamento no processo de imunização de animais soroprodutores corroborado pelos nossos achados que indicam a diminuição do dano renal no animal envenenado experimentalmente com o veneno irradiado com raios gama de Co-

60. Diferentemente da crotoxina nativa, a crotoxina irradiada é detectada pelo anticorpo anticrotoxina apenas nos tempos intermediários pós inoculação e em baixa concentração, indicando que a radiação gama promoveu mudanças na forma de ligação da toxina ao tecido renal, facilitando sua eliminação e diminuindo, portanto, as chances de lesão.

Esses resultados reforçam as evidências de que o uso de veneno irradiado no processo de imunização garante uma melhor qualidade de vida e bem estar aos animais soroprodutores, estando em total consonância com o sistema legal que regula a experimentação animal (CONCEA), podendo se estender a outros procedimentos que exigem a aplicabilidade biotecnológica de toxinas.

8. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu a visualização, por microscopia óptica, das diferenças histopatológicas promovidas pela crotoxina nativa ou crotoxina irradiada com raios gama de ^{60}Co .

A radiação ionizante não impediu a ocorrência de glomerulonefrite, congestão capilar e necrose tubular aguda.

A glomerulonefrite e a necrose tubular aguda foram significativamente menos frequentes em rins de animais inoculados com veneno irradiado.

Não houve diferença significativa de frequência de congestão capilar entre os animais inoculados com crotoxina nativa ou irradiada, contudo a congestão capilar aparece tardiamente nos animais que receberam crotoxina irradiada.

A imunohistoquímica mostrou que a crotoxina irradiada é eliminada mais precocemente que a nativa.

A crotoxina irradiada minimiza o grau de comprometimento renal, implicando em aumento da sobrevivência e/ou bem estar do animal soroprodutor.

REFERÊNCIAS

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. de São Paulo** v.28. p. 220-227, 1986.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.36, p.480-489, abr./dez. 2003.

BARROS, G. A. C., PEREIRA, A. V., BARROS, L. C., JR, A. L., CALVI, S. A., SANTOS, L. D., ... FERREIRA, R. S. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 21, 48. 2015.

BERNADE, P. S.; ALBUQUERQUE, S.; BARROS, T. O; TURCI, L. C. B. Snakes of Rondônia State, Brazil. **Biota Neotrop.** vol.12(3). 2012. Disponível em: <<http://www.bioneotropica.org.br/v12n3/en/abstract?inventory+bn004>> Acesso em: 10 mar. 2015.

BERNARDE, P. S. Mudanças na Classificação de Serpentes Peçonhentas Brasileiras e suas implicações na Literatura Médica. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 81, n. 1, p. 55-63, jan./jun. 2011. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.com.br/PoisonSnakesBrazil.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p. 17-16, jan./fev. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BURITY, C. H. F.; AZEVEDO, R. A.; CARDOZO, S. V.; GAMA, V. P.; LYRA, M. F. S. **Morfologia Microscópica – Principais patologias**. Atlas de Morfologia Comparada Digital: Abordagem Normal e Patológica. Disponível em: <<http://www2.unigranrio.br/atlas-morfologia-comparada/interna7.html>> Acesso em: 22 nov. 2015.

CARDI, B. A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE JUNIOR, H. F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int J Radiat Biol**. 1998;73(5):557-64.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR. V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 481-485.

CASARE, M. S. Study of gamma-radiation effects on crotoxin and crotoxinase. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** [0236-5731] vol. 269 iss. 3 p. 571-577. 2006.

CHAITIDIS, P.; SCHEWE, T.; SUTHERLAND, M.; KUHN, H.; NIGAM, S. 15-Lipoxygenation of phospholipids may precede the sn-2 cleavage by phospholipases A2: reaction specificities of secretory and cytosolic phospholipases A2 towards native and 15-lipoxygenated arachidonoyl phospholipids. **FEBS Lett**. Sep 4;434(3):437-41.1998.

CHANDRASHEKARA, K. T.; NAGARAJU, S.; USHA NONDIN, S.; BASAVIAH, K. K. Neutralization of local and systemic toxicity of *Daboia russeli* venom by *Morus Alba* plant leaf extract. **Phytotherapy research**, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2735/epdf>> Acesso em: 20 nov. 2015.

CHAPMAN, J. D. Radiation chemical studies with nitrofurazone as related to its mechanism of radiosensitization.. **Radiat Res.** v.53(2), p.190-203, 1973.

CLISSA, P. B.; NASCIMENTO, N. DO; ROGERO, J. R. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. **Toxicon** 37 1131-1141. 1999.

COELHO, R. D. F; TAVARES, A. P. G; WALKER, F. M; URIAS, I. C; SOUZA, K.; MENEZES, L. M. N.; RAMOS, L. F. B.; BRITO, M. de S.; REIS, P. M. G; EVANGELISTA, S. K. C; RIBEIRO, L.B. Reconhecimento, prevenção e procedimentos em caso de acidentes ofídicos, capacitando moradores de comunidades rurais através de ações de extensão universitária. **Extramuros-Revista de Extensão da Univasf**, Petrolina-PE, v. 1, n. 2, p. 12-21, ago./dez. 2013.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A.. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**, vol. 02, n. 02. 2012. ISSN 2237-3462.

DART R. C, SEIFERT S. A, BOYER L. V, et al. A Randomized Multicenter Trial of Crotalinae Polyvalent Immune Fab (Ovine) Antivenom for the Treatment for Crotaline Snakebite in the United States. **Arch Intern Med.** 161(16):2030-2036. 2001.

DEVARAJAN, D. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. Nephrology and Hypertension, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati School of Medicine, Cincinnati, Ohio. **J Am SocNephrol.** 17: 1503–1520, 2006.

FERNANDES, T. A.; AGUAI, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento Crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, volume 2, n. 2, Abr-Jun 2008.

FERREIRA JUNIOR, R. S.; NASCIMENTO N.; COUTO, R.; ALVES J. B.; MEIRA D. A.; BARRAVIERA, B. Laboratory evaluation of young ovines inoculated with natural or ⁶⁰Co-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom during hyperimmunization process. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**. 12(4):620-31. 2006.

FLAQUERA, M.; ROMAGNANIB, P.; CRUZADO, J. M. Growth factors and renal regeneration. **Nefrologia** (English Version). 30:385-93. 2010

FOCACCIA, R.; DIAMENT, D.; FERREIRA, M. S.; SICILIANO, R. F. V. **Tratado de infectologia** 4ª ed. rev. e atual. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

FRANÇA, F. O. DE S.; MEDEIROS, C. R.; MÁLAQUE, C. M. S.; DUARTE, M. R.; TAVASSI, A. M. C.; ZANNIN, M.; MORAES, R. H. P.; BENVENUTTI, L. B.; MARQUES, M. M. A.; CUPO, P.; SYLVIA, E. H.; JUNIOR, V. H.; CARDOSO, J. L. C.B. Acidentes por Animais Peçonhentos. In: ARRUDA, M. A. et al. Ed(s). **Clínica Médica**. Barueri, SP: Manole, 2009. p.553 – 576.

GREENSTOCK, C. L. Redox processes in radiation biology and cancer. **Radiat Res**. v.86(2), p.196-211, 1981.

HINRICHSEN, S. L.; MAHON, F.; GALLINDO, M.; TÁVORA, M. E. G. Acidentes por Animais Peçonhentos. In: HINRICHSEN, S.L. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.820-827. 2009.

INSTITUTO BUTANTAN. Acidentes por Animais Peçonhentos [S.l]. Disponível em:<http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/aula03_peconhentos.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2015.

INSTITUTO BUTANTAN. Acidentes por Animais peçonhentos. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 10 mar. 2015(a).

KOHLI, H. S.; SAKHUJA, V. Snake Bites and Acute Renal Failure. **Saudi J Kidney Dis Transpl.**14:165-76. 2003.

LASAGNI, L.; ANGELOTTI, M. L.; RONCONI, E.; LOMBARDI, D.; NARDI, S.; PEIRED, A.; BECHERUCCI, F.; MAZZINGHI, B.; SISTI, A.; ROMOLI, S.; BURGER, A.; SCHAEFER, B.; BUCCOLIERO, A.; LAZZERI, E.; ROMAGNANI, P.; Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced. **Stem Cell Reports.** Volume 5, Issue 2, p248–263, 11. 2015.

LINARDI, A.; ROCHA E SILVA, T. A.; MIYABARA, E. H.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; CARDOSO, K. C.; BOER, P. A.; MORISCOT, A. S.; GONTIJO, J. A.; JOAZEIRO, P. P.; COLLARES-BUZATO, C. B.; HYSLOP, S. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta** 1810(9):895–906. 2011.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T. K. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.** 79 (Supl. 1): 7-20. 2009.

LOURENÇO JÚNIOR, A.. **Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da Região de Botucatu – São Paulo: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

LUCAS, E. P. R. **Estudo Interlaboratorial para o Estabelecimento do Veneno Botrópico e do Soro Antibotrópico de Referência Nacional.** INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology.** Elsevier. 2006.

MARTINS, B. F.; CAMPOS, A. P. S.; SELEGHIM, R.; BALLANI, T. S. L.; TAVARES E. O.; OLIVEIRA M. L. F. Acidentes por serpente (*Bothrops spp.* e *Crotallus spp.*) em crianças: relato de dois casos. **Revista Rede de Enfermagem do Nordeste**, Maringá – PR, p. 693-703, 2012.

MARTINS, R. **Cascavel – *Crotalus durissus terrificus*, detalhe do guizo (Chocalho) – Tocantins – Cerrado – 2013.** Disponível em: <<http://www.renatofotografo.com/galeria/exibebanco.php?pagina=50&album=tudo>> Acesso em: 20 nov. 2015.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p. ISBN: 978-85-7541-386-9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7476/9788575413869>> Acesso em: 28 fev. 2015.

MELLO, C. P.. **Estudo in vitro da nefrotoxicidade do veneno total e fração fosfolipase A₂ da serpente *Bothrops insularis* (AMARAL, 1921).** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2011.

MELLO, S. M.; LINARDI, A.; RENNO, A. L.; TARSITANO, C. A.; PEREIRA, E. M.; HYSLOP, S. Renal kinetics of *bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, 55, pp. 470–480. 2010.

MORAIS, L. A.; COSTA, R. S.; GOMES, U. A.; ANDRADE, C. H. V.; PAIVA, S. P. Alterações renais no envenenamento crotálico experimental (*Crotalus durissus terrificus*): estado funcional e anatomopatológico. **Grupo Editorial Moreira Jr.** Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=22_11> Acesso em: 28 fev. 2015.

MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H. G.; DIAS DA SILVA, W.; ROGERO, J. R. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. **Toxicon**. 1990; 28(6):617-8.

NASCIMENTO, N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada: aspectos bioquímicos e farmacológicos**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear, São Paulo, 1991.

NASCIMENTO, N.; SEEBART, C. S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, II, **Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects**. *Toxicon*, **34**(1):123-131, 1996.

NORÕES, T. B. S. **Efeitos renais promovidos pelo veneno de serpente *Bothrops atrox* e a produção de óxido nítrico**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE. 2009.

OLIVEIRA, K. C.; SPENCER, P. J.; FERREIRA, R. S.; NASCIMENTO, N. New insights into the structural characteristics of irradiated crotoxin. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Vol.21. 2015.

OTERO-PATINO, R.; CARDOSO, J. L.; HIGASHI, H. G.; NUNEZ, V.; DIAZ, A.; TORO M.F.; GARCIA, M. E.; SIERRA, A.; GARCIA, L. F.; MORENO, A. M.; MEDINA, M. C.; CASTANEDA, N.; SILVA-DIAZ, J. F.; MURCIA, M.; CARDENA, S.Y.; DIAS DA SILVA, W. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research. **Am.J.Trop.Med.Hyg**, 58:183-189, 1998.

PAULA, R. C. M. F. **Perfil Epidemiológico dos casos de Acidentes Ofídicos atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Araguaína – TO (Triênio 2007-2009)**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PEREIRA, T. P. **Estudo dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e crotoxina**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Depto. De Farmácia, Fortaleza, 2009.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v47n1/a26v47n1.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

ROCHA, A. M. ***Crotalus durissus terrificus* no Serpentário do Instituto Butantan**. 2015. 1 foto: color.; 1600 x 1195 pixels.

ROGERO, J. Z.; NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. **J Venom Anim Toxins**. 1995;1(1):7-10.

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**. 45 (5):671–6. 2005.

SANTOS, M. F. L.; FARANI, M. C.; ROCHA, P. N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp.: revisão e análise crítica da literatura. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**.2009.

SARAIVA, M.G.; OLIVEIRA, D. S.; FILHO, G.M.C.F.; COUTINHO, L.A.S. A.; GUERREIRO, J.V. Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado da Paraíba, Brasil, 2005 a 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.21, n.3, p.449-456, jul./set. 2012.

SHIMIZU, A.; MASUDA, Y.; MORI, T.; KITAMURA, H.; ISHIZAKI, M.; SUGISAKI, Y.; FUKUDA, Y. Vascular Endothelial Growth Factor¹⁶⁵ Resolves Glomerular Inflammation and Accelerates Glomerular Capillary Repair in Rat Anti–Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis. **JASN** 15: 2655-2665. 2005

SILVA, F. S. Q. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade.** Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy (Review Article). **Nephrology**, 11: 442–448. 2006.