

Maria Elvira de Almeida

**Avaliação da desmopressina no tratamento do envenenamento botrópico
experimental em coelhos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Marília Martins Melo.

Co-orientador: Benito Soto Blanco.

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
2017**

A447a Almeida, Maria Elvira de, 1979-
Avaliação da desmopressina no tratamento do envenenamento botrópico experimental em coelhos / Maria Elvira de Almeida. – 2017.
62 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Co-orientador: Benito Soto Blanco
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

I. Coelho – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Envenenamento – Teses. 3. Veneno de Cobra – Teses. 4. Ofidismo – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Blanco, Benito Soto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

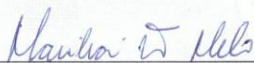
CDD – 636.932 208 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

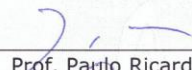
MARIA ELVIRA DE ALMEIDA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof.ª. Marília Martins Melo
Presidente - Orientador



Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso
Doutorado - UFMG

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado forças nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus pais, pela vida, pelos estudos, por me incentivarem a lutar pelos meus objetivos.

As minhas irmãs, que sempre acreditaram em mim e por estarem sempre ao meu lado.

A minha vó Dina e ao meu vô Dico (*in memoriam*), pelos ensinamentos de vida e por tornarem a minha vida mais doce.

A professora Marília, minha orientadora, pela confiança, pela paciência, pelos conselhos e pela oportunidade de realizar o meu sonho. Obrigada pelo exemplo de determinação e perseverança.

Ao professor Benito, meu coorientador, pela disposição, ensinamento e auxílio na estatística.

A todos do Laboratório de Toxicologia, em especial a Ana Flávia, Stephanie e Gabriela, e aos alunos de Iniciação Científica Antônio, Clara, Marina e Michele por todo o suporte e ajuda durante o experimento e principalmente pela amizade. Sem vocês seria impossível. Muito obrigada!

A Maria, pela amizade, cumplicidade e pelo suporte e ajuda durante o experimento.

A Karina, pela amizade, cumplicidade, pela disponibilidade e ensinamentos na análise histopatológica.

A Marina, pela amizade, pela compreensão, pelos ensinamentos e por tirar todas as minhas dúvidas de inglês.

Aos meus amigos, Luciana, Amanda, Senos e Harley, por estarem sempre presentes apesar da distância.

Ao Warley, por ter compartilhado parte do seu projeto.

A Clínica Veterinária MedVet, em especial ao Erick, Luiz e Sílvia, por terem contribuído com o meu crescimento profissional, por acreditarem em mim. Por todo o suporte ao longo desses quatro anos (e que venham muitos e muitos anos ao lado de vocês).

Ao Rock, por ter sido um cão vigilante e companheiro, por ter zelado pela minha segurança durante os meus plantões noturnos. Você faz muita falta!

A Mia, Leona, Mino e Tião, obrigada pelo suporte felino e canino.

Ao meu pai Rubens, obrigada por tudo! Por ter contribuído para eu chegar até aqui. Você sempre esteve ao meu lado quando precisei!

A minha Mamadia, por ser a melhor madrinha e tia que eu poderia ter. Você é muito importante na minha vida.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. DE LITERATURA	16
3.1. Acidente Ofídico	16
3.2. <i>Bothrops alternatus</i>	16
3.3. Veneno Botrópico	17
3.4. Manifestações Clínicas	19
3.4.1. Manifestações Clínicas Locais	19
3.4.2. Manifestações Clínicas Sistêmicas.....	20
3.4.2.1. Lesão Renal Aguda (IRA).....	20
3.4.2.2. Lesão Renal Aguda no Envenenamento Botrópico.....	22
3.5. Exames Laboratoriais	23
3.6. Alterações Anatomopatológicas	24
3.7. Tratamento	24
3.8. Desmopressina	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Animais	26
4.2. Preparo dos Animais	26
4.3. Veneno e Indução do Envenenamento.....	27
4.4. Grupos Experimentais e Tratamento	27
4.5. Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas	28
4.5.1. Avaliação Bioquímica	30
4.6. Avaliação Macroscópica e Histopatológica.....	30
4.7. Estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Alterações Clínicas	32
5.2. Análises Bioquímicas	32

5.2.1. Ureia e Creatinina.....	33
5.2.2. Proteína Total, Albumina e Globulinas	38
5.2.3. Fósforo.....	45
5.3. Alterações Macroscópicas e Histopatológicas.....	49
6. Conclusões	56
7. Considerações finais.....	56
8. Agradecimentos.....	56
9. Referências Bibliográficas.....	57
10. Anexos	63
10.1. Certificado do CEUA.....	63

LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Espécies de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> de importância no Brasil.	16
Quadro 2: Classificação de AKIN	21
Quadro 3: Critérios de estadiamento da IRA de acordo com a IRIS.	22
Quadro 4: Identificação dos grupos experimentais e seus tratamentos.	27
Quadro 5: Grupos experimentais, tratamentos e coleta de sangue.	29
Tabela 6: Valores médios e desvio padrão da concentração de ureia plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	33
Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da concentração de creatinina plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	36
Tabela 9: Valores médios e desvio padrão da concentração de proteína plasmática total (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.....	38
Tabela 10: Valores médios e desvio padrão da concentração de albumina (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	41
Tabela 11: Valores médios e desvio padrão da concentração de globulinas (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	43
Tabela 12: Valores médios e desvio padrão da concentração de fósforo (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Bothrops alternatus</i> (Fonte: Marília Martins Melo).....	17
Figura 2: Valores médios e desvio padrão da concentração de ureia plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h	34
Figura 3: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática da ureia (mg/dL) em coelhos antes (T0), e após (1h, 4h, 8h e 12h) o envenenamento experimental com peçonha de <i>B. alternatus</i> , tratados com desmopressina + soro antibotrópico (G6).	35
Figura 4: Valores médios e desvio padrão da concentração de creatinina plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.	37
Figura 7: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de proteína total (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> , grupo 3 (A), e tratados com desmopressina + soro antibotrópico, grupo 6 (B).....	39
Figura 8: Valores médios e desvio padrão da concentração de proteína plasmática total (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.....	40
Figura 9: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de albumina (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> , grupo 3 (A), e tratados com desmopressina, grupo 4 (B).	41
Figura 10: Valores médios e desvio padrão da concentração de albumina (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.	42
Figura 11: Valores médios e desvio padrão da concentração de globulinas (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.	44
Figura 12: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de globulinas (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> nos Grupos 3.	45
Figura 13: Valores médios e desvio padrão da concentração de fósforo (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro	

antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.	47
Figura 14: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica do fósforo (mg/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> (G3).....	48
Figura 16: Extensa lesão hemorrágica na região do tecido subcutâneo e nos músculos bíceps femoral, quadríceps e semitendíneo de coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i>	49
Figura 17: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> tratado com desmopressina e soro antibotrópico mostrando necrose tubular (seta). Coloração HE. Bars = 100µm.	51
Figura 18: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> tratado com soro antibotrópico mostrando necrose tubular (seta). Coloração HE. Bars = 200µm.	52
Figura 19: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> tratado com soro antibotrópico mostrando vacuolização (setas). Coloração HE. Bars = 100µm.	53
Figura 20: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de <i>B. alternatus</i> tratado com soro antibotrópico mostrando mineralização (setas). Coloração HE. Bars = 100µm.	54
Figura 21: Secção histológica de rim de coelho tratado com soro antibotrópico mostrando infiltrado linfocitoplasmocitário (seta). Coloração HE. Bars = 50µm.	55

Resumo

Os acidentes ofídicos são um sério problema de saúde pública em muitas regiões do mundo devido à alta morbidade e mortalidade. As serpentes do gênero *Bothrops* são as principais espécies envolvidas nos acidentes ofídicos no Brasil, sendo responsável por cerca de 90% dos casos de ofidismo. O envenenamento botrópico é caracterizado por efeitos locais e sistêmicos. Devido à alta toxicidade do veneno e ao atraso e/ou falta de tratamento com soro antibotrópico, pode haver complicações sistêmicas que predispõe o paciente ao óbito. A lesão renal aguda (IRA) é a complicação mais frequente no envenenamento botrópico, sendo considerada a principal causa de óbito nos pacientes que sobrevivem aos primeiros efeitos do veneno. Apesar da patogênese das alterações renais no envenenamento botrópico não ser bem definida, estudos experimentais sugerem uma patogênese multifatorial. Objetivou-se avaliar a eficácia dos tratamentos, soro antibotrópico e desmopressina, nas primeiras 12 horas do envenenamento botrópico com enfoque renal, utilizando o coelho como modelo experimental. Foram dosados creatinina, ureia, ácido úrico, proteína total e frações, glicose e os íons fósforo e sódio. O tecido renal foi analisado macro e microscopicamente. Os resultados dos exames bioquímicos e histopatológicos revelaram dano renal, mesmo com a instituição de um tratamento precoce.

Palavras chaves: ofidismo, *Bothrops alternatus*, lesão renal aguda.

Abstract

Snakebite accidents are a serious public health problem in many regions of the world due to high morbidity and mortality. *Bothrops* snakes are the major species involved in ophidian accidents in Brazil, being responsible for about 90% of the cases of snakebites. Bothropic envenomation is characterized by local and systemic effects. Due to the high toxicity of the venom and the delay and/or lack of treatment with anti-bothropic serum, there may be systemic complications that predispose the patient to death. Acute kidney injury (ARI) is the most frequent complication of bothropic envenomation and is considered the leading cause of death in patients who survive the first effects of the venom. Although the pathogenesis of renal alterations in bothropic envenomation is not well defined, experimental studies suggest a multifactorial pathogenesis. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the treatments - antiothropic serum and desmopressin - in the first 12 hours of bothropic envenomation with a renal approach, utilizing the rabbit as an experimental model. Creatinine, urea, uric acid, total protein and fractions, glucose and phosphorus and sodium ions were evaluated. Renal tissue was evaluated macro and microscopically. Evaluating the biochemical and histopathological changes it is possible to affirm that there was renal damage, even with the institution of an early treatment.

Keywords: ophidism, bothropic envenomation, acute kidney injury

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos são um sério problema de saúde pública em muitas regiões do mundo devido à alta morbidade e mortalidade (Albuquerque *et al.*, 2013). No Brasil, entre os anos de 2013 e 2015, o envenenamento causado pelas serpentes do gênero *Bothrops*, chamado de envenenamento botrópico, correspondeu a 87% dos acidentes ofídicos (SINAM, Brasil, 2016).

O envenenamento botrópico é caracterizado por efeitos locais (edema, halo hemorrágico e necrose) e sistêmicos (coagulopatias e alterações renais) (Gutiérrez *et al.*, 2009). As complicações sistêmicas geralmente ocorrem devido à alta toxicidade do veneno e ao atraso ou não administração do soro antiofídico, que certamente irão resultar em quadros graves com hemorragias generalizadas, choque e lesão renal aguda, predispondo ao óbito (Sgrignolli *et al.*, 2011).

As hemorragias procedem de diferentes ações, principalmente, causadas pelas enzimas serinoproteases e metaloproteases presentes no veneno botrópico, que levam ao consumo de fibrinogênio, inibição do fator de von Willebrand e lesão vascular. O choque é subsequente a queda acentuada da pressão arterial e hemorragias (Rabelo *et al.*, 2005). Estas são duas graves alterações, hemorragias e choque que favorecem à lesão renal aguda.

A lesão renal aguda (conhecida internacionalmente como IRA), uma das sequelas mais temidas do envenenamento botrópico (Mello *et al.*, 2010; Martines *et al.*, 2014), ainda possui sua patogênese obscura, tanto em seres humanos como em animais, mas provavelmente envolve uma ação direta de componentes do veneno nos túbulos renais (Castro *et al.*, 2004) e nas células epiteliais renais (Nascimento *et al.*, 2007). Além disso, relata-se uma ação indireta por meio de liberação de mediadores endógenos, tais como citocinas, peptídeos, óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico (Barbosa *et al.*, 2006), que levam a processos inflamatórios, queda de pressão arterial e alterações na cascata de coagulação, induzindo a coagulação intravascular disseminada (CID). A lesão histológica renal mais frequentemente encontrada na IRA, induzida pelo veneno, é a necrose tubular aguda (NTA) (Sgrignolli *et al.*, 2011).

O tratamento específico e precoce com o soro antiofídico é essencial e decisivo, sendo considerado um importante fator prognóstico positivo (Castro *et al.*, 2004; Sgrignolli *et al.*, 2011). Todavia, como na medicina veterinária, o soro antibotrópico deve ser adquirido comercialmente e ocorre atraso na administração do antídoto, faz com que o clínico veterinário utilize outros medicamentos, como a desmopressina, na tentativa de uma melhor recuperação dos animais.

O acetato de desmopressina é um análogo sintético da vasopressina (hormônio antidiurético). A vasopressina constitui o principal hormônio envolvido na regulação da osmolaridade dos fluidos corporais. O hormônio é liberado pela neuro-hipófise toda vez que a privação de água provoca um aumento da osmolaridade plasmática ou toda vez que o sistema cardiovascular é estimulado pela hipovolemia e/ou hipotensão. A vasopressina também promove a liberação de fatores de coagulação pelo endotélio vascular e aumenta a agregação plaquetária, desempenhando algum papel na hemostasia (Jackson, 2005).

Todavia, ainda não existem evidências científicas que demonstrem os possíveis efeitos benéficos da desmopressina como coadjuvante para tratamento de animais envenenados com peçonha botrópica, o que faz necessário a condução de estudos que investiguem o desfecho renal destes pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a eficácia do fármaco desmopressina como coadjuvante do tratamento clássico, (soro antibotrópico), nas primeiras 12 horas do envenenamento por *Bothrops alternatus*, com enfoque renal, utilizando o coelho como modelo experimental.

2.2. Objetivos Específicos

1. Analisar a função renal dosando creatinina, ureia, fósforo, proteína total, albumina e globulinas de coelhos experimentalmente envenenados com peçonha de *B. alternatus* e tratados com desmopressina e/ou soro antibotrópico.
2. Investigar macro e microscopicamente o tecido renal de coelhos experimentalmente envenenados com peçonha de *B. alternatus* e tratados com desmopressina e/ou soro antibotrópico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Acidente Ofídico

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte (87 a 90%) dos acidentes ofídicos no Brasil, devido a sua vasta distribuição geográfica e o comportamento agressivo que apresenta quando se sentem ameaçadas (Silva *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2013, Andrade Filho *et al.*, 2013; Brasil, 2016). Apesar de apresentarem hábitos noturnos, são animais ectotérmicos e vários processos biológicos são mais efetivos durante o dia devido as temperaturas mais quentes. Na região sudeste do Brasil a maior parte dos acidentes ocorrem no período de setembro a março (Sgrignolli *et al.*, 2011).

O gênero *Bothrops* compreende mais de 30 espécies e subespécies distribuídas desde o norte do México até a Argentina e em algumas ilhas do Caribe. De acordo com Melgarejo (2009), as espécies de maior importância no Brasil estão descritas na tabela 1.

Quadro 1: Espécies de serpentes do gênero *Bothrops* de importância no Brasil.

Espécie	Nome Popular
<i>Bothrops alternatus</i>	Urutu, Urutu-cruzeiro, Cruzeiroira
<i>Bothrops atrox</i>	Jararaca, Jararaca do Norte, Jararaca do Amazonas
<i>Bothrops cotiara</i>	Cotiara
<i>Bothrops erythromelas</i>	Jararaca da seca, Jararaca do sertão
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararaca, Jararaca preguiçosa
<i>Bothrops jararacuçu</i>	Jararacuçu
<i>Bothrops leucurus</i>	Jararaca
<i>Bothrops moojeni</i>	Caiçara
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Jararaca pintada, Jararaca do rabo branco

3.2. *Bothrops alternatus*

A espécie *Bothrops alternatus* é uma serpente terrestre, que possui o corpo robusto, cauda relativamente curta e pode atingir cerca de 170 cm de comprimento (Rocha e Furtado, 2005). Ocorre nas regiões Centro-Oeste, sudeste e Sul do Brasil e é também encontrada no Paraguai, Uruguai e Argentina. A espécie habita áreas pantanosas, regiões ribeirinhas e decíduas temperadas, sendo comum, também, em plantações de cana-de-açúcar (Campbel e Lamar, 1989). Essa espécie tem importância clínica nos acidentes ofídicos, embora a prevalência dos acidentes varie de acordo com a distribuição geográfica, dependendo da densidade populacional humana e ofídica (Cardoso *et al.*, 2010).

B. alternatus apresenta várias formas e um padrão complexo. A cor de fundo dorsal pode ser marrom, bronze ou oliváceo. O dorso da cabeça é marrom, variando de chocolate para quase preto

com uma variedade de marcas transversais e longitudinais indo de bronze para branco. Seu corpo, possui uma serie de 24 a 27 (ou mais) marcas marrons, variando de chocolate para preto, que cobre de cada lado, e estas se encontram ou se alteram no meio do dorso. Estas marcas são limitadas por uma margem de cor nata ou branca (Figura 1). A mancha maior, frequentemente, tem o formato de um “C” ou de um gancho de telefone (Campbel e Lamar, 1989).



Figura 1: *Bothrops alternatus* (Foto: Marilia Martins Melo).

3.3. Veneno Botrópico

Venenos de serpentes são uma mistura complexa de componentes que tem diversas ações nas vítimas. Muitos desses componentes são proteínas biologicamente ativas com a função de matar ou imobilizar a presa e também ajudar no processo de digestão (Queiroz *et al.*, 2008).

O veneno botrópico é composto por mais de 20 componentes diferentes, cuja funções e interações não foram inteiramente estudadas. Cerca de 90 a 95% do peso do veneno são constituídos de proteínas (enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas). A fração não proteica é composta de carboidratos, lipídios, metais, aminas biogênicas, aminoácidos livres e nucleotídeos (França e Málaque, 2009). A composição do veneno botrópico pode apresentar variações associadas com a origem geográfica, habitat, sazonalidade, alimento, idade e sexo (Queiroz *et al.*, 2008) e apresenta quatro atividades fisiopatológicas: proteolítica, coagulante/anticoagulante, vasculotóxica e nefrotóxica (Antunes *et al.*, 2010; Sgrignolli *et al.*, 2011; Blanco e Melo, 2014; Martines *et al.*, 2014). Essas atividades causam lesão no local da picada, que varia de uma resposta inflamatória à necrose tecidual grave e, manifestações sistêmicas, como distúrbios de coagulação que podem evoluir para manifestações hemorrágicas, hipotensão e IRA (Martines *et al.*, 2014).

A atividade das enzimas proteolíticas do veneno da *B. alternatus* tem um importante papel nos eventos patológicos causados no envenenamento causado pela espécie (Cardoso *et al.*, 2010). O veneno botrópico contém múltiplos componentes que induzem lesão tecidual e inflamação. O veneno da *B. alternatus* é uma rica fonte de citocinas que influencia em graves distúrbios

hemorrágicos, dano tecidual e resposta inflamatória (Teixeira *et al.*, 2009; Telles *et al.*, 2014; Mamede *et al.*, 2016).

Outra família importante de enzimas presentes no veneno botrópico são as serinoproteases, que afetam a hemostasia e agem em uma variedade de componentes da cascata de coagulação (Kamiguti *et al.*, 1996). A ação coagulante do veneno é devido a sua fração tipo trombina, que é capaz de ativar fatores de coagulação sanguínea, isolada ou simultaneamente, convertendo o fibrinogênio em fibrina. A fibrina formada é instável e é rapidamente degradada. O veneno também inativa o fator XIII, resultando no aumento do tempo de coagulação ou tornando o sangue incoagulável. Essa condição é similar a coagulação intravascular disseminada (CID), com formação de microcoágulos e comprometimento de vários órgãos (Ferreira Jr e Barravieira, 2004; Pinho e Burdmann, 2008).

As metaloproteases causam danos diretos nos microvasos, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma e células sanguíneas, levando à distúrbios vasculares, tais como edema e hemorragia (Markland Jr. e Swenson, 2013; Mamede *et al.*, 2016). As metaloproteases também são capazes de ativar células inflamatórias específicas e mediadores inflamatórios frequentemente associados com hiperalgesia (Mamede *et al.*, 2016). Costa *et al.* (2007) isolaram duas metaloproteases do veneno de *B. alternatus* das classes P-I e P-II, com massa molecular de 29000 e 36000 KDa, respectivamente, com atividade fibrinogenolítica, principalmente sobre a cadeia alfa do fibrinogênio, atuação discreta sobre a beta e ausente sobre a gama. A enzima da classe P-II possui maior atividade sobre o fibrinogênio que a P-I demonstrando maior atividade anticoagulante. As metaloproteases degradam o colágeno tipo IV presente na membrana basal do subendotélio evoluindo com a ruptura do endotélio vascular (Oliveira *et al.*, 2007; Bjarnason e Fox, 1994). Gutiérrez *et al.* (2016) relataram os dois principais mecanismos fisiopatológicos de hemorragia causados pelas metaloproteases. O primeiro, denominado *per rexis*, ocorre devido à lesão capilar na musculatura estriada esquelética e, o segundo, *per diapedesis*, ocorre em vênulas e em outros sistemas orgânicos pelo alargamento de junções intercelulares.

A atividade nefrotóxica do veneno botrópico é devido a ação direta do veneno sobre os túbulos renais e o endotélio vascular. A hipoperfusão renal ocasionada pelas alterações hemodinâmicas, a oclusão da microcirculação renal pelos microcoágulos e a deposição de hemoglobina devido a hemólise intravascular podem ocasionar isquemia renal, além de alterações morfológicas e funcionais. A insuficiência renal é uma das sequelas que pode comprometer o quadro clínico do paciente e até mesmo levar à óbito (Ferreira Jr. e Barravieira, 2004; Mello *et al.* 2010).

Todas as espécies de animais domésticos são afetadas pelo veneno botrópico, mas a sensibilidade varia entre elas. Os animais mais sensíveis são os equinos, ovinos, bovinos, caprinos, caninos, suínos e felinos (Ferreira Jr e Barravieira, 2004; Blanco e Melo, 2014). A gravidade do acidente depende da espécie da serpente, do volume do veneno inoculado, espécie e tamanho do animal inoculado, do tempo decorrido entre o acidente e o tratamento adequado e do local da picada (Ferreira Jr e Barravieira, 2004).

3.4. Manifestações Clínicas

A inoculação do veneno pode ocorrer por via subcutânea ou intramuscular (Sgrignolli *et al.*, 2011) e os sinais clínicos se instalam pouco tempo após a picada, sendo caracterizados por dor intensa e imediata, edema e hemorragia (Jácome *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007). A dor é uma das principais características no envenenamento botrópico sendo relatada vítimas humanas, quanto em animais (Fonteque *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003). O local da picada geralmente é único e às vezes não é possível visualizá-lo (Sgrignolli *et al.*, 2011).

O envenenamento botrópico apresenta um espectro de gravidade clínica que varia de casos leves, a casos moderados a graves, nos quais as alterações patológicas locais são acompanhadas por uma série de efeitos deletérios sistêmicos (Gutiérrez *et al.*, 2009).

De acordo com as manifestações clínicas, o acidente ofídico pode ser classificado em leve, moderado ou grave, o que é importante para guiar a conduta terapêutica a ser adotada. A gravidade dos acidentes é baseada em manifestações locais (dor, edema e equimose), manifestações sistêmicas (hemorragia, choque e anúria), tempo de coagulação e o tempo de administração do soro antiofídico (Albuquerque *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas dos acidentes com serpentes *Bothrops alternatus* são similares com as do gênero *Bothrops* (Cardoso *et al.*, 2010).

3.4.1. Manifestações Clínicas Locais

Os efeitos locais induzidos pelo veneno botrópico são resultantes de ações multifatoriais e sinérgicas das toxinas, que ainda são mal compreendidas (Mamede *et al.*, 2016). As manifestações locais são causadas pela ação proteolítica do veneno. As lesões resultam da atividade das proteases, esterases, hialuronidases e fosfolipases (PLA₂) liberadas por mediadores inflamatórios, ação das hemorraginas no endotélio vascular e da ação procoagulante do veneno (Braga *et al.*, 2008; Pinho e Burdmann, 2008).

O envenenamento botrópico é caracterizado por um proeminente dano local tecidual, decorrente de uma série de alterações patológicas no local da picada, que desenvolve rapidamente logo após o acidente e que frequentemente resulta em sequelas permanentes (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez e Rucavado, 2000).

Há uma rápida manifestação de dor, edema, hemorragia e mionecrose. Dor e edema local são manifestações clássicas no acidente botrópico (Otero-Patiño, 2009) que estão presentes em quase todos os casos, podendo haver equimoses, bolhas, necrose e formação de abscessos (Melo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009).

A dor é consequência de alterações na transdução de nociceptores, sendo modulada por mediadores inflamatórios. A hiperalgesia causada pelo veneno botrópico é induzida e mediada por prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária, além de aminas biogênicas e

metaloproteases. A bradicinina é a substância responsável pelo início do processo de hiperalgesia (Chacur, 2001; Oliveira *et al.*, 2007).

O edema local é um dos sinais clínicos mais destacados apresentados por animais picados por serpentes do gênero *Bothrops*. Sua ocorrência é multifatorial e se deve às ações dos diversos componentes da toxina. O veneno botrópico age sobre a vasculatura aumentando a permeabilidade dos vasos e por sua vez levando ao extravasamento de fluidos. As PLA₂ determinam a liberação de histamina pelos monócitos, e assim causam lesões em diversos tipos celulares, com a liberação do ácido araquidônico pelos fosfolipídios de membrana. Tais fenômenos potencializam o processo inflamatório de forma a diminuir a eficiência do soro antibotrópico, que se mostra pouco eficaz na reversão do quadro inflamatório (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Melo *et al.*, 2007).

A necrose se deve à ação de toxinas que agem direta e indiretamente nos tecidos, sendo responsável por perdas definitivas de função e até amputações (Ferreira Jr e Barraviera, 2004; Melo *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2011). Além disso, é comum a contaminação com bactérias, que podem ser provenientes da microbiota bucal das serpentes ou, introduzidas pelo contato da ferida com material contaminado, resultando em abscessos (Fonteque *et al.*, 2001; Sakate, 2008).

3.4.2. Manifestações Clínicas Sistêmicas

O veneno botrópico possui também ação hemorrágica e nefrotóxica, ocasionando manifestações clínicas sistêmicas (Santos *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas sistêmicas incluem hemorragia, coagulopatias, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar e falência renal aguda. A hemorragia, uma grave manifestação no envenenamento, é responsável pela hipovolemia, hipotensão, hipoperfusão renal e choque cardiovascular (Pinho e Burdmann, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2009).

Os pacientes podem apresentar prostração, inapetência, apatia, taquicardia, taquipneia e melena (Fonteque *et al.*, 2001; Ferreira Jr e Barravieira, 2005, Santos *et al.*, 2009). Já nos casos graves, os pacientes podem apresentar hipotensão, hipotermia, choque hipovolêmico, oligúria, anúria, sudorese e êmese. A recuperação é bastante lenta (Rabelo *et al.*, 2005; Sakate, 2008).

A IRA é uma complicação frequente no envenenamento botrópico sendo considerada a principal causa de óbito nos pacientes que sobrevivem aos primeiros efeitos do veneno (Antunes *et al.*, 2010; Sgrignolli *et al.*, 2011; Martines *et al.*, 2014).

3.4.2.1. Lesão Renal Aguda (IRA)

A lesão renal aguda é caracterizada por uma rápida perda da função dos néfrons, resultando em azotemia e/ou desequilíbrio de fluidos, eletrólitos e ácido-base. A diminuição da função renal que ocorre na lesão renal aguda é multifatorial e inclui diminuição da taxa de filtração glomerular e danos celulares (Ross, 2011; IRIS, 2013).

A IRA tem quatro estágios. O primeiro estágio é a fase de iniciação, que ocorre durante ou imediatamente após a lesão nos rins, quando os danos patológicos nos rins são iniciados. O segundo estágio, fase de extensão, durante o qual a isquemia, a hipóxia, a inflamação e lesão celular continuam levando a apoptose celular e/ou necrose. As alterações clínicas e laboratoriais podem não estarem evidentes nos dois primeiros estágios. O terceiro estágio, fase de manutenção, é caracterizado por azotemia e/ou uremia, e pode durar de dias a semanas. O quarto estágio é a fase de recuperação durante o qual há melhora da azotemia e recuperação dos túbulos renais. Nesta fase pode ocorrer poliúria acentuada como resultado de uma melhora parcial da função tubular renal e diurese osmótica devido a acúmulo de solutos. A função renal pode ser restabelecida ou o animal ficar com disfunção renal (Ross, 2011).

A classificação humana de AKIN (*Acute Kidney Injury Network*) conforme tabela 2, demonstra que o aumento do valor basal de creatinina tem uma grande importância na avaliação do paciente renal.

Quadro 2: Classificação de AKIN

Estadiamento	Creatinina sérica (CR)
I	Aumento na CR $\geq 0,3\text{mg/dL}$ ou aumento da CR de base ≥ 150 a 200%
II	Aumento da CR de base ≥ 200 a 300%
III	Aumento da CR de base acima de 300%

Adaptado de *Critical Care* (2007).

As causas de IRA são tradicionalmente classificadas em extra renal (pré-renal e pós-renal) e renal. Esta última pode ser causada por qualquer processo que interfira com as estruturas e/ou compartimentos do rim (tubular, glomerular, vasos). Identificar causas pré-renais (perfusão renal prejudicada) e pós-renais (obstrutivas) é particularmente importante pois são causas rapidamente reversíveis (Ross, 2011).

Lesão renal aguda

Pré-Renal

As duas principais causas de perfusão renal diminuída são depleção de volume e/ou hipotensão relativa. Isso pode resultar de hipotensão verdadeira ou sangramento, perdas cutâneas, gastrointestinais ou urinárias, ou por perda de volume efetivo na insuficiência cardíaca, choque ou cirrose. A lesão renal aguda pré-renal está associada com tempo de doença sendo geralmente breve. A não intervenção rápida poderá levar a dano isquêmico tubular e evolução para necrose tubular aguda (NTA) (*Critical Care*, 2007).

Renal

A causa mais frequente de IRA renal é a NTA, secundária à isquemia ou efeito de toxinas, responsável por cerca de 90% dos casos. Vários compostos podem causar queda abrupta da taxa de filtração glomerular, promovendo diretamente vasoconstrição renal com conseqüente redução do fluxo sanguíneo renal. Outros compostos promovem lesão tóxica direta, que é o caso do veneno botrópico, causando destruição celular (*Critical Care*, 2007).

Na medicina veterinária, a Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) foi criada para promover uma maior compreensão científica da doença renal em pequenos animais. Uma vez que a IRA se inicia como uma lesão renal leve que pode evoluir para um quadro de insuficiência renal grave, a IRIS recomenda que a IRA seja graduada para que a gravidade da doença possa ser caracterizada com precisão. O estadiamento da IRA para cães e gatos baseia-se na determinação da creatinina séria em jejum e em parâmetros clínicos, como o débito urinário. O estadiamento (Tabela 3) foi baseado em critérios utilizados na medicina. O estágio I (não apresenta azotemia), estágio II (IRA leve) e estágios III a V (IRA moderada a grave) (IRIS, 2013).

Quadro 3: Critérios de estadiamento da IRA de acordo com a IRIS.

Estadiamento IRA	Creatinina sanguínea
I	<1,6 mg/dL
II	1,7 – 2,5 mg/dL
III	2,6 – 5,0 mg/dL
IV	5,1 – 10,0 mg/dL
V	>10,0 mg/dL

Os rins são geralmente considerados como uma rota principal de eliminação de veneno do organismo e o acúmulo de veneno no tecido renal pode causar danos morfológicos e disfunção renal que poderia interferir com a eliminação do veneno (Mello *et al.*, 2010).

3.4.2.2. Lesão Renal Aguda no Envenenamento Botrópico

Devido a sua alta vascularidade, os rins são altamente susceptíveis a toxinas (Sitprija e Sitprija, 2012). O envenenamento botrópico pode causar IRA, numa incidência global que varia de 3 a 38% (Pinho e Burdmann, 2008).

A patogênese das alterações renais decorrentes do envenenamento botrópico não é bem definida. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar as lesões, incluindo um efeito nefrotóxico direto, causado pela atividade proteolítica do veneno, da CID e liberação de substâncias vasoativas (Barbosa *et al.*, 2002).

A IRA ocorre quase sempre nas primeiras 24 horas após o envenenamento botrópico sendo considerada a principal causa de óbito nos pacientes que sobrevivem aos primeiros efeitos do veneno (Otero-Patiño, 2009; Sgrignolli *et al.*, 2011). As lesões renais podem ser causadas por ações isoladas ou combinadas de mecanismos isquêmicos ou nefrotóxicos, desencadeadas pela ação do veneno no organismo (Albuquerque *et al.*, 2013). Estudos experimentais sugerem uma patogênese multifatorial que incluem os seguintes mecanismos: isquemia renal resultante de hipovolemia e hipoperfusão, microangiopatia trombótica devido ao depósito de fibrina nos capilares glomerulares e ação direta citotóxica do veneno nos túbulos renais (Gutiérrez *et al.*, 2009).

A etiopatogenia da lesão renal aguda associada com o envenenamento botrópico tem sido relacionada com alterações hemodinâmicas, mioglobínúria, hemoglobínúria, distúrbios de coagulação e nefrotoxicidade direta do veneno (Burdmann *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 2004; Pinho e Burdmann, 2008; Linardi *et al.* 2011).

A maioria das informações disponíveis sobre os mecanismos da IRA decorrente do envenenamento botrópico vem de estudos experimentais (Burdmann *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2004). Estudos com o veneno de *B. moojeni* demonstraram lesão glomerular, degeneração tubular, hematúria e diminuição da taxa de filtração glomerular, com aumento da excreção de sódio na urina, sem alteração na pressão arterial sistêmica e sem depósito de fibrina nos capilares glomerulares (Boer-Lima *et al.*, 1999a). Barbosa *et al.*, (2002), estudando os efeitos tóxicos do veneno de *B. moojeni* sobre os rins de ratos, relataram que 10ug/ml produziram uma diminuição significativa da pressão de perfusão, além de diminuir, entre 90 a 120 minutos, o transporte tubular de sódio, potássio e cloro. Pesquisas com a administração intravenosa do veneno de *B. jararaca* revelaram a presença de prejuízos na filtração glomerular e no fluxo sanguíneo renal (Burdmann *et al.*, 1993). Também Boer-Lima *et al.* (2002b) e Castro *et al.* (2004) demonstraram o efeito direto do veneno botrópico nos rins, levando a lesão tubular e glomerular.

Vários fatores de riscos têm sido relacionados com a IRA induzida pelo veneno botrópico, como idade, tamanho da serpente, espécie, quantidade de veneno injetado, o intervalo de tempo entre a picada e a administração do soro antibotrópico e a via de administração do soro (Pinho e Burdmann, 2008).

O atraso na soroterapia é considerado um importante fator de risco para IRA, embora haja relatos na literatura de ocorrência desta lesão aguda mesmo, após a administração do soro antibotrópico em tempo hábil (Santos *et al.* 2009).

3.5. Exames Laboratoriais

As alterações hematológicas, encontradas nas diferentes espécies animais, são anemia, leucocitose com neutrofilia e trombocitopenia. Há também alterações no coagulograma, onde observa-se aumento no tempo de coagulação (TC), tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Há redução de proteínas totais e albumina. Pode também haver aumento dos níveis de ureia e creatinina, da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e creatinoquinase (CK) (Pinho e Burdmann, 2008; Linardi *et al.*, 2011).

3.6. Alterações Anatomopatológicas

As lesões histopatológicas envolvem congestão e hemorragias graves na maioria dos órgãos, necrose tubular renal aguda e às vezes glomerulonefrite aguda, nefrite intersticial, necrose cortical renal (Fonteque *et al.*, 2001; Pinho e Burdmann, 2008. Linardi *et al.*, 2011; Sitprija e Sitprija, 2012) e vasculite (Sitprija e Sitprija, 2012).

3.7. Tratamento

O tratamento preconizado no envenenamento botrópico é através da administração de soro antiofídico. No Brasil o soro antiofídico é produzido pelo Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil (Sgrinolli *et al.*, 2011).

O soro antibotrópico é produzido através da hiperimunização de cavalos com um *pool* de veneno de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacuçu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. O soro tem sua eficiência avaliada através da sua capacidade de inibir a ação letal do veneno em um modelo de referência determinado pela Organização Mundial de Saúde, que é a soro neutralização do veneno de *B. jararaca* em camundongo (Queiroz *et al.*, 2008).

O soro antibotrópico ou antibotrópico-crotálico é utilizado em uma dose que deve neutralizar, no mínimo, 100 mg do veneno botrópico, por via intravenosa, de preferência, lentamente (Ferreira Jr e Barraviera, 1004; Sakate, 2008).

O soro antibotrópico neutraliza a maioria dos efeitos sistêmicos, mas não é eficiente na reversão dos sintomas locais (Batterlino *et al.*, 2003). Não se sabe se o soro é eficiente ou não contra a possível toxicidade renal direta do veneno (Castro *et al.*, 2004).

A avaliação da eficácia da soroterapia deve ser feita por meio de testes para avaliação da coagulação sanguínea. É indicado uma nova administração do soro antibotrópico se o sangue permanecer incoagulável. Também é importante que seja instituído o tratamento de suporte (Blanco e Melo, 2014).

3.8. Desmopressina

A desmopressina é um análogo sintético da vasopressina (Jackson, 2005) sendo utilizada há quatro décadas para o tratamento de desordens sanguíneas congênitas. É também recomendada por inúmeras diretrizes para o tratamento de sangramento em pacientes com disfunção plaquetária ou de agentes antiplaquetários, mas não há nenhuma revisão sistemática dos riscos e benefícios da desmopressina no contexto de terapia antiplaquetária (Desborough *et al.*, 2016). Há vários estudos que demonstram que a desmopressina pode restaurar a hemostasia em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos com grande perda de sangue (Swieringa *et al.*, 2015). Atua aumentando a liberação do fator VIII e de von Willebrand e na formação de substâncias procoagulantes. E, nas plaquetas, promove adesão e aumento na concentração intracelular de cálcio/sódio (Gajdosik e Rossini, 2016; Desborough *et al.*, 2016). O uso da desmopressina

também está associado aos casos de hipotensão, hiponatremia e risco de tromboembolismo (Desborough *et al.*, 2016).

Com o advento da síntese de peptídeos de fase sólida, foram sintetizados muitos análogos da vasopressina com o propósito de aumentar a duração de ação e a seletividade para os subtipos de receptores de vasopressina (receptores de vasopressina V_1 versus V_2 , que medeiam as respostas pressoras e as antidiuréticas, respectivamente). A desmopressina, 1-desanino-8-D-arginina vasopressina (DDAVP), foi sintetizada em 1967. A desaminação na posição 1 aumenta a duração da ação e também aumenta a atividade antidiurética, sem aumentar a atividade vasopressora. A substituição da L-arginina por D-arginina reduz acentuadamente a atividade vasopressora, sem diminuir a atividade antidiurética. Por conseguinte, a relação antidiurética-vasopressora para a desmopressina é cerca de 3.000 vezes superior à da vasopressina. A vasopressina aumenta a reabsorção de água pelos túbulos renais, acarretando um incremento da osmolaridade urinária e diminuição do fluxo urinário (Jackson, 2005).

A desmopressina possui como mecanismo de ação a ativação de receptores V_2 do ADH nos túbulos renais, aumentando a absorção de água e a concentração sanguínea de fatores de coagulação, como o de von Willebrand e VIII, presentes no endotélio dos vasos. Apesar de possuir pouco efeito sobre a pressão arterial, poderia contribuir para aumentá-la (Jackson, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto experimental foi realizado após submissão e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 274/2015 (Anexo 1). Todos os animais utilizados foram conduzidos na experimentação atendendo aos princípios éticos, respeitando o bem-estar e minimizando o desconforto.

4.1. Animais

Foram utilizados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, adultos, machos com peso entre 2,1 a 4,1 kg, provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da EV-UFGM, no município de Igarapé (MG).

Durante todo o período do experimento, o manejo dos animais seguiu os requisitos do CEUA. Os animais foram mantidos no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal da EV-UFGM em gaiolas metálicas individuais (75 cm de comprimento x 30 cm de largura x 45 cm de altura). Água e ração comercial para coelhos foram oferecidas *ad libitum*, exceto no dia do experimento, em que os animais foram submetidos a 12 horas de jejum alimentar.

4.2. Preparo dos Animais

Após os animais serem contidos com auxílio de uma toalha, foi realizado a tricotomia da face dorsal das orelhas, em seguida foi realizado uma antisepsia com PVPI degermante¹ e álcool 70%² e posterior colocação do cateter para acesso venoso. Foram utilizados cateteres 22G³ que foram introduzidos na veia marginal esquerda, acoplados a um adaptador PRN⁴ e fixados com auxílio de esparadrapo e seringas de 20 mL⁵. A fim de evitar que houvesse coagulação sanguínea dentro do cateter e, conseqüentemente, sua inviabilização, foi administrado 0,5 mL de solução heparinizada⁶ a 0,1% em cada cateter.

¹ Iodopolividona 10% (solução com tensoativos) – Riodeine Dermo Suave Degermante, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto (SP), Brasil.

² Álcool etílico hidratado Tupi 70° INPM, Callamarys Indústria e Comércio de Cosméticos e Saneantes Ltda, Ibaté (SP), Brasil.

³ Catéter intravenoso BD Insyte™, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁴ BD PRN Adapter Luer-Lock, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Seringa BD Plastipak™, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁶ Solução realizada com heparina sódica Hemofol® 5000UI/ml, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil, e Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, São Paulo (SP), Brasil.

4.3. Veneno e Indução do Envenenamento

O veneno liofilizado e refrigerado de *B. alternatus* foi diluído em PBS/BSA 0,1%. A dose utilizada de 150 µg/ kg foi determinada a partir de um estudo piloto. Foi realizado tricotomia e antisepsia na região do músculo bíceps femoral e o veneno do inoculado por via intramuscular (IM)⁷.

4.4. Grupos Experimentais e Tratamento

Os animais de cada grupo foram identificados de 1 a 4 na face interna e externa das orelhas com caneta de tinta permanente e distribuídos aleatoriamente em seis grupos (G) experimentais (n=4): G1, G2, G3, G4, G5 e G6.

Os animais dos grupos G3, G4, G5 e G6 receberam 150 µg de veneno de *Bothrops alternatus* /kg p.v., por via intramuscular (IM). Os animais dos grupos G1 e G2 receberam soro fisiológico 0,9%⁸ (0,7 mL/animal), por via IM (Tabela 4).

Uma hora depois (T1) foi administrado, nos grupos G1 e G4, desmopressina⁹ na dose de 0,3 µg/kg por via endovenosa (EV). No grupo G3, foi administrado solução fisiológica 0,9%¹⁰ (0,7 mL/animal), por via IM. Nos grupos 5 foi administrado o soro antibotrópico (0,25 mL/animal) por EV. No grupo 6 foi aplicado desmopressina (0,3 µg/kg) e soro antibotrópico¹¹ (0,25 mL/animal) por via EV (Tabela 4).

Quadro 4: Identificação dos grupos experimentais e seus tratamentos.

Grupo	N	Tratamento
1	4	Solução fisiológica + Desmopressina
2	4	Solução fisiológica + Soro antibotrópico
3	4	Veneno + Solução fisiológica
4	4	Veneno + Desmopressina
5	4	Veneno + Soro antibotrópico
6	4	Veneno + Desmopressina + Soro antibotrópico

⁷ BD 1 mL Luer Lok™, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁸ Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Barueri (SP), Brasil.

⁹ DDAVP® - acetato de desmopressina 4,0 mcg/mL, Laboratórios Ferring, São Paulo (SP), Brasil.

¹⁰ Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Barueri (SP), Brasil.

¹¹ Soro Antibotrópico (pentavalente), FUNED, Belo Horizonte (MG), Brasil.

4.5. Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas

Foram coletadas amostras de sangue no tempo zero (T0), valores basais, e 1h após a instituição dos tratamentos (T1). As demais amostras de sangue foram coletadas com intervalo de 4 horas (T4, T8 e T12), conforme tabela 5.

Todos os animais foram eutanasiados no tempo 12 (T12), logo após a coleta de sangue, com sobredose de propofol¹² e cloreto de potássio¹³.

¹² Provive 1% - Propofol 10 mg/mL, Claris Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., Barueri (SP), Brasil.

¹³ Solução de Cloreto de Potássio 19,1%, Isofarma® Indústria Farmacêutica Ltda., Eusébio (CE), Brasil.

Quadro 5: Grupos experimentais, tratamentos e coleta de sangue

Grupo 1	
T0	Coleta de sangue + solução fisiológica (IM)
T1	Coleta de sangue + desmopressina (EV)
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia
Grupo 2	
T0	Coleta de sangue + solução fisiológica (IM)
T1	Coleta de sangue + soro antibotrópico
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia
Grupo 3	
T0	Coleta de sangue + veneno (IM)
T1	Coleta de sangue + solução fisiológica (IM)
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia
Grupo 4	
T0	Coleta de sangue + veneno (IM)
T1	Coleta de sangue + desmopressina (EV)
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia
Grupo 5	
T0	Coleta de sangue + veneno (IM)
T1	Coleta de sangue + soro antibotrópico (EV)
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia
Grupo 6	
T0	Coleta de sangue + veneno (IM)
T1	Coleta de sangue + desmopressina + soro antibotrópico (EV)
T4, T8	Coleta de sangue
T12	Coleta de sangue + eutanásia

Para a coleta de sangue o PRN foi desacoplado do cateter e realizado uma pressão na veia. Cerca de 0,5 mL de sangue foi desprezada por causa da solução heparinizada administrada anteriormente. E após cada coleta era realizado uma nova administração da solução heparinizada.

Foram coletados 2 mL de sangue que foi acondicionado em um tubo com anticoagulante EDTA¹⁴ a 10% para a realização dos exames bioquímicos. Após as amostras serem centrifugadas, o plasma foi acondicionado em microtubos tipo Eppendorfs¹⁵ que foram congelados a -20°C para posterior processamento das amostras. As amostras de plasma foram descongeladas somente no momento do processamento das mesmas.

4.5.1. Avaliação Bioquímica

A análise bioquímica consistiu na avaliação da concentração plasmática de proteína total, albumina, globulina, ureia, creatinina, e do íon fósforo em analisador bioquímico¹⁶ com auxílio de kits comerciais¹⁷. As amostras foram descongeladas 15 minutos antes de serem processadas.

4.6. Avaliação Macroscópica e Histopatológica

A necropsia foi realizada logo após a eutanásia dos animais, sendo avaliada a presença de alterações macroscópicas. Os fragmentos dos rins foram fixados em formalina 10% neutra e tamponada e processados pela técnica de rotina de inclusão de parafina. As secções histológicas de 4 µm foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina (HE) e as laminas foram avaliadas para análise histopatológica em microscópio de luz branca.

¹⁴ Mini Tubo EDTA.K2, Labor Import©, São Paulo, Brasil.

¹⁵ Microtubo para centrifugação - tipo Eppendorf, 1,5 mL, Global Plásticos, Porto Alegre (RS), Brasil.

¹⁶ Analisador Bioquímico Cobas Mira Plus®, Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Kits de Reagentes Bioquímicos Bioclin®, Bioclin/Quibasa, Ltda, Minas Gerais, Brasil.

4.7. Estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados estatisticamente com o auxílio do programa SAS for Windows v.8.0. As diferenças estatisticamente significante dos dados provenientes de mensurações repetidas foram determinadas utilizando a análise de regressão por modelo misto por meio do PROC MIXED do SAS, sendo cada animal determinado como uma unidade fixa e o tempo como variável (Wolfgang e Chang, 1996; Littell *et al.*, 1998). O nível de significância para todas as análises foi estabelecido para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Alterações Clínicas

Os animais do grupo 1 (desmopressina) não apresentaram alterações clínicas, todavia, os animais do grupo 2, que receberam soro antibotrópico, apresentaram prostração durante o período experimental.

Todos os animais que receberam administração do veneno botrópico, dos grupos G3 (veneno), G4 (veneno + desmopressina), G5 (veneno + soro antibotrópico) e G6 (veneno + desmopressina + soro antibotrópico) apresentaram prostração, dor no local da aplicação, aumento de frequência cardíaca e respiratória, visualizadas após a administração do veneno botrópico (até 1h). Estes resultados são semelhantes aos relatados por Melo *et al.* (2007), que observaram alterações clínicas em coelhos, inclusive presença de halo hemorrágico no local da administração do veneno, 15 minutos após a inoculação do veneno de *B. alternatus*. As alterações clínicas também se assemelham às relatadas em cães (Ferreira Jr e Barravieira, 2001, 2004), em ratos (Telles *et al.*, 2014).

5.2. Análises Bioquímicas

Os rins apresentam funções amplas e críticas para a manutenção da homeostase. Essas funções incluem a regulação de eletrólitos e equilíbrio ácido-base, regulação do equilíbrio hídrico, regulação da pressão arterial sistêmica, excreção de metabólitos, liberação de hormônios e componentes exógenos, produção de eritropoietina, síntese de vitamina D e gliconeogênese (Lunn, 2011). As alterações da função renal só serão detectadas quando mais de 75% dos néfrons estiverem afuncionais (Meuten, 2012; Freitas *et al.*, 2014). Reduções na taxa de filtração glomerular (TFG) são necessárias antes do aumento significativo (acima do intervalo de referência) da concentração de ureia ou creatinina. Quando a doença renal causa perda funcional dos néfrons, os néfrons remanescentes (menos afetados) suportam uma hipertrofia compensatória. Assim a TFG aumenta, mantendo os níveis de ureia e creatinina dentro dos limites de referência (Fettman e Rebar, 2007).

Os principais testes bioquímicos de função renal de incluem a determinação da ureia e creatinina séricas/plasmáticas. Fósforo, potássio e sódio séricos também são úteis no diagnóstico de doenças renais uma vez que são elementos excretados normalmente pela urina (Lopes e Veiga, 2008).

5.2.1. Ureia e Creatinina

A tabela 6 e figura 2 demonstram o valor médio e desvio padrão de ureia dos animais deste experimento.

Houve diferença significativa entre grupos em todos os tempos avaliados. Todavia deve ser ressaltado que todos os valores médios de ureia estão acima dos valores referência para o coelho, conforme Carpenter, (2010) entre 15 a 30 mg/dL, inclusive no tempo 0 (valores basais), sem significado clínico, já que a ureia pode ter origem nutricional.

Tabela 6: Valores médios e desvio padrão da concentração de ureia plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Tempo Grupo	0h	1h	4h	8h	12h
1	37,89±7,67C	40,07±4,23C	46,65±3,36B	44,87±4,48B	43,85±1,73C
2	50,44±14,29A	52,68±30,05A	47,72±24,02AB	51,27±17,17A	52,12±11,12A
3	46,33±2,20A	46,30±2,62B	52,36±13,83A	49,40±9,76AB	56,58±13,92A
4	35,81±6,02C	39,44±7,88C	43,03±10,65C	45,00±15,61B	49,23±17,77B
5	40,29±8,68B	37,93±5,92C	40,25±6,69D	41,78±6,82C	43,41±10,34C
6	42,25±7,15Bb	43,63±8,82BCab	46,57±6,97Aa	46,12±8,47Ba	40,03±12,93Cab

Os dados foram analisados pelo teste de Regressão ($p < 0,05$). O tratamento afetou o resultado ($P < 0,0001$).

A ureia é produzida no fígado através da arginase (ciclo da ureia) e é o principal produto final do catabolismo proteico. A maior parte da ureia produzida pelo organismo é excretada na urina por meio de filtração glomerular. Portanto, a diminuição da TFG ocasiona um aumento de ureia. A ureia é influenciada pela taxa de produção hepática e pela taxa de excreção renal e extra renal. A concentração da ureia é afetada por fatores extra renais, como ingestão elevada de proteínas e jejum prolongado (Fettman e Rebar, 2007).

Quando se comparam os grupos no T12, pode-se observar que, os grupos G2 (soro antibotrópico) e G3 (veneno) apresentaram valores significativamente maiores quando comparados aos demais grupos. Quando se comparam os tempos, apenas o G6 (veneno + desmopressina + soro antibotrópico) apresentou aumento dos níveis plasmáticos de ureia 4 e 8 horas após (Tabela 6).

Caldas *et al.* (2008) associaram o aumento dos níveis de ureia ao estresse em um envenenamento experimental por *B. alternatus* em bovinos. Oliveira *et al.* (2010), ao avaliarem o perfil hematológico de bovinos experimentalmente envenenados com peçonha de *B. alternatus*, observaram aumento dos níveis de ureia 24 e 28 horas, indicando uremia associada ao envenenamento botrópico.

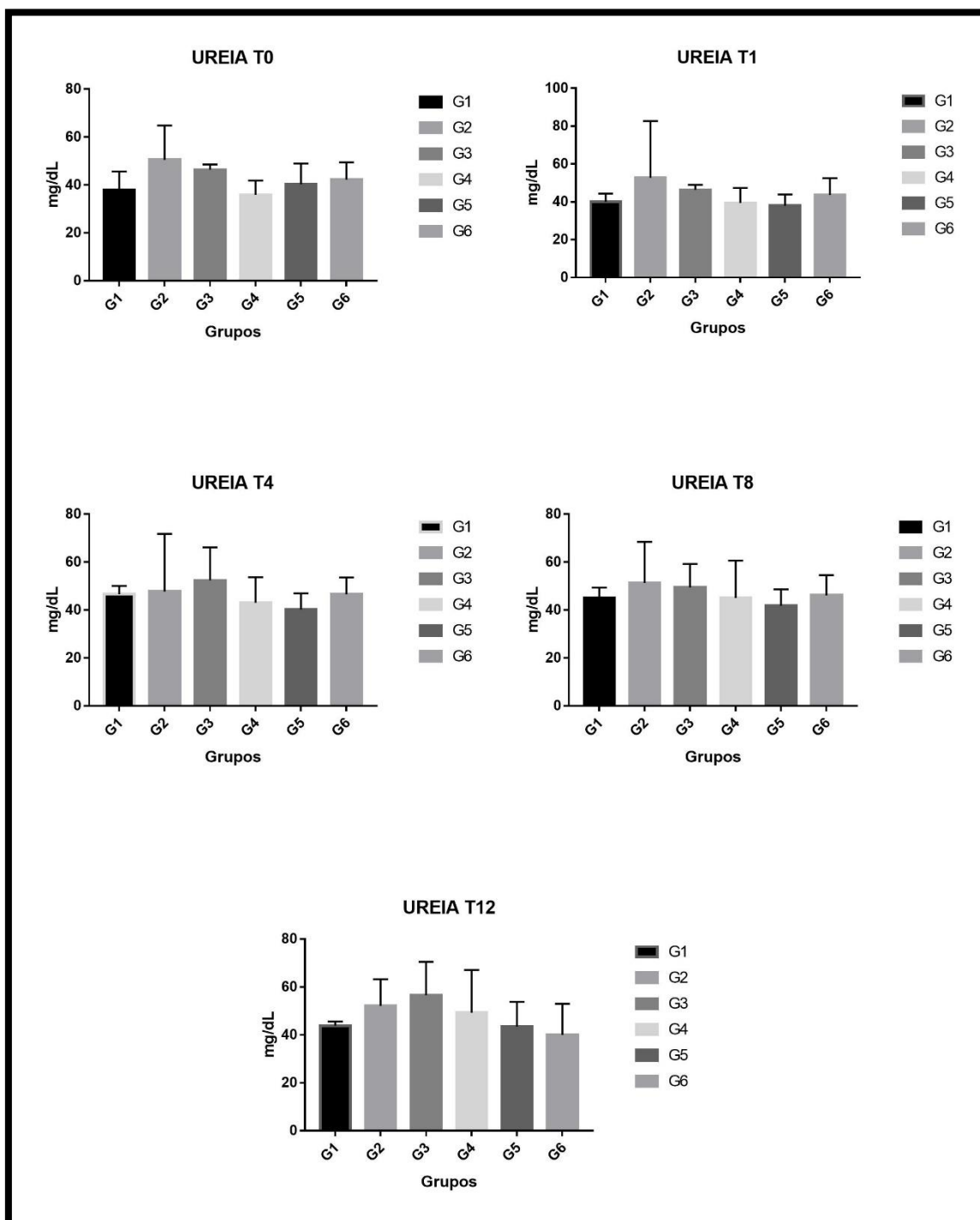


Figura 2: Valores médios e desvio padrão da concentração de ureia plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Todavia, foi observado nos animais do G6 (veneno + desmopressina + soro antibotrópico) um aumento da concentração plasmática de ureia nos tempos 1h ($p<0,05$), 4h ($p<0,01$) e 8h ($p<0,01$) horas quando comparado com o T0h (valores basais), conforme visualizado na Figura 3. Postula-se que este aumento seja decorrente do complexo imuno-anticorpo formado, associado à ação tóxica do veneno botrópico, mais a ação da desmopressina. A desmopressina é contra-indicada em pacientes com insuficiência renal moderada à grave. A vasopressina aumenta a reabsorção de água pelos túbulos renais, acarretando um aumento da osmolaridade urinária e diminuição do fluxo urinário, fato não desejável no envenenamento botrópico. Salienta-se que a concentração plasmática máxima é atingida 1 a 1h30 e a meia vida de eliminação é em torno de 2 a 3h. Entretanto, a distribuição da desmopressina não está totalmente elucidada.

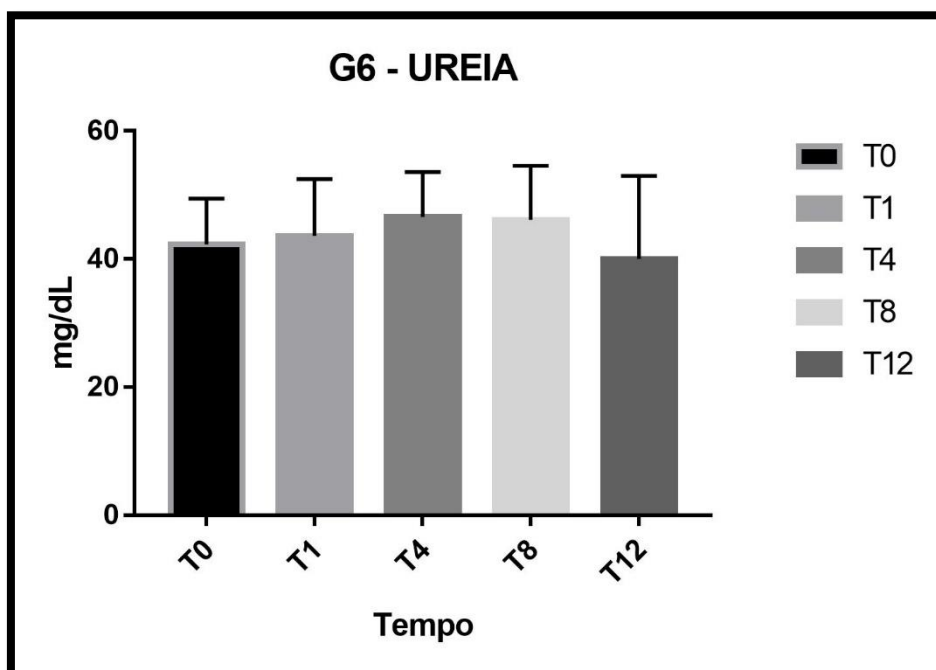


Figura 3: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática da ureia (mg/dL) em coelhos antes (T0), e após (1h, 4h, 8h e 12h) o envenenamento experimental com peçonha de *B. alternatus*, tratados com desmopressina + soro antibotrópico (G6).

Os valores médios e desvio padrão de creatinina estão apresentados na tabela 7 e figura 4.

Tabela 7: Valores médios e desvio padrão da concentração de creatinina plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Tempo \ Grupo	0h	1h	4h	8h	12h
1	0,92±0,15	1,02±0,09	0,99±0,08	1,02±0,14	0,98±0,02
2	1,48±0,16	1,38±0,27	1,50±0,18	1,42±0,15	1,39±0,33
3	1,05±0,11	1,04±0,13	1,09±0,14	1,19±0,20	1,27±0,20
4	1,00±0,15	0,93±0,12	1,03±0,24	0,94±0,27	1,08±0,15
5	1,31±0,24	1,18±0,17	1,37±0,14	1,36±0,14	1,34±0,15
6	0,75±0,42	1,01±0,22	1,11±0,23	1,12±0,21	1,03±0,20

Os dados foram analisados pelo teste de regressão. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos.

De acordo com a classificação de AKIN (Tabela 2), os animais não apresentaram IRA, pois, para o estadiamento I (grau mais leve), deve ocorrer aumento na creatinina $\geq 0,3\text{mg/dL}$ ou aumento dos valores basais de creatinina ≥ 150 a 200%. O maior aumento percentual de creatinina foi observado nos animais do G6, de 37,33%, bem abaixo para o grau I. Também deve ser ressaltado que todos os valores estão dentro dos limites de normalidade para o coelho que é de 0,8 a 2,5 mg/dL (Carpenter, 2010). De forma semelhante, quando se utiliza a tabela da IRIS (Tabela 3), os animais também não apresentam IRA, pois o maior valor médio de creatinina encontrado neste experimento foi, de 1,5mg/dL.

A creatinina é formada por meio do metabolismo da creatina e fosfocreatina muscular. A produção diária de creatinina é relativamente constante, não sendo influenciada por fatores extra renais. A creatinina é totalmente excretada pelos glomérulos, não havendo reabsorção tubular. Por isso, pode ser usada como índice de filtração glomerular. Por ser facilmente eliminada, a elevação ocorre mais tardiamente na insuficiência renal, quando comparado com a ureia (Fettman e Rebar, 2007; Lopes e Veiga, 2008).

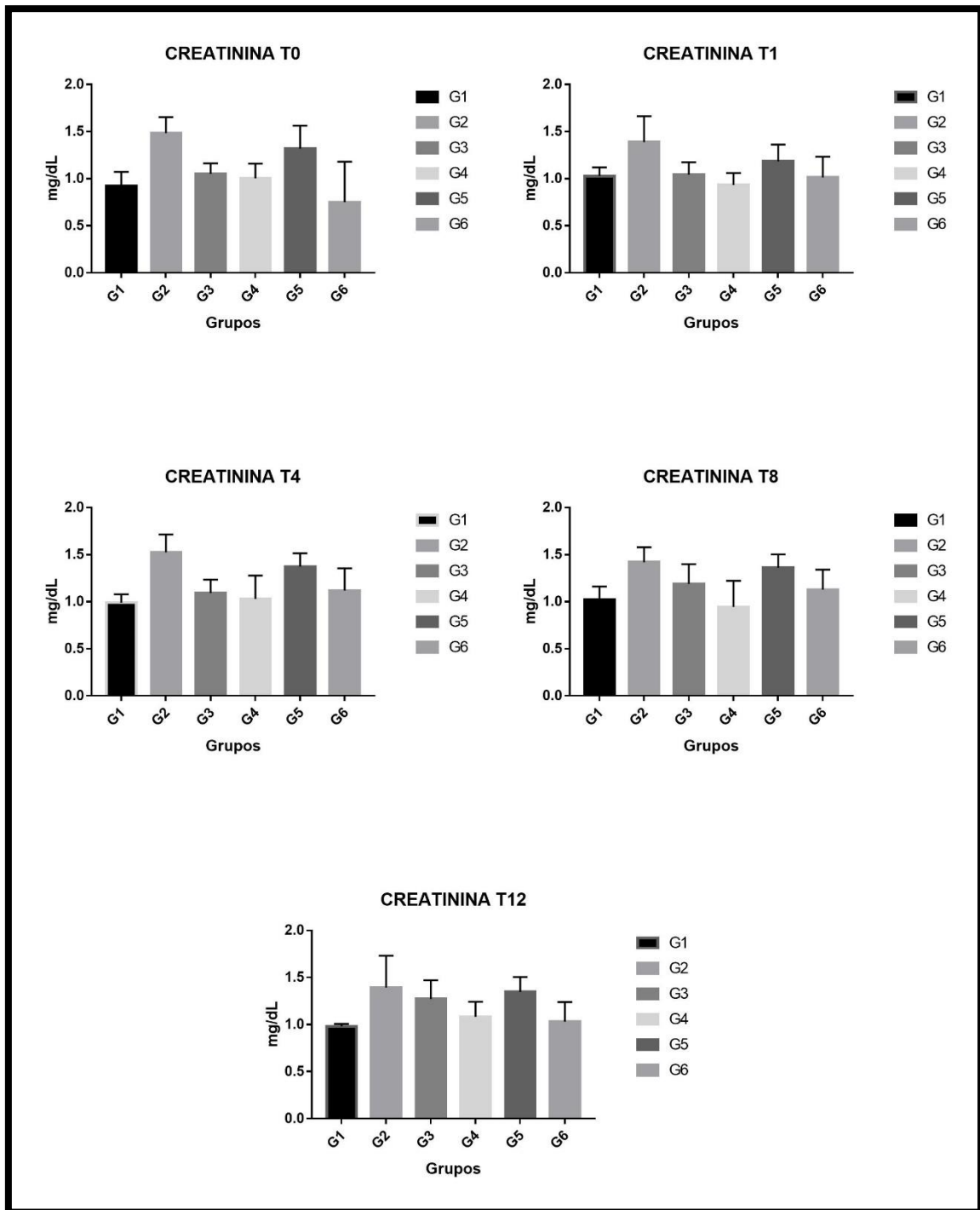


Figura 4: Valores médios e desvio padrão da concentração de creatinina plasmática (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.

Os resultados desta pesquisa se assemelham aos de Melo *et al.* (2005), que pesquisando diferentes tratamentos para a antagonização dos efeitos locais causados pela peçonha de *B. alternatus* em coelhos, também não observaram aumento de creatinina e ureia, sete dias após o envenenamento. Todavia, deve ser ressaltado que Melo e colaboradores, utilizaram uma dose muito baixa (1,25µg) e administrada por via intradérmica. Contudo, diferem dos de White (2005) e Gonçalves *et al.* (2008), que relataram aumento da concentração sérica de ureia e creatinina nos envenenamentos botrópicos. Ressalta-se que, nesta pesquisa, os animais foram avaliados somente nas primeiras 12 horas. Sousa *et al.* (2011) também reportaram aumento da concentração sérica de ureia e creatinina no envenenamento botrópico em equinos.

Outro fato importante é que as concentrações séricas da ureia e creatinina só aumentam quando mais de 75% dos néfrons estão afuncionais, o que caracteriza a ureia e creatinina como biomarcadores tardios. Castro *et al.* (2004) demonstraram que o soro antibotrópico tem uma ótima proteção renal quando é administrado simultaneamente com o veneno. Baseado nos valores plasmáticos de ureia e creatinina plasmática, nas primeiras 12 horas do envenenamento por *B. alternatus*, postula-se que não houve IRA nos animais.

5.2.2. Proteína Total, Albumina e Globulinas

Tabela 8: Valores médios e desvio padrão da concentração de proteína plasmática total (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Tempo \ Grupo	0h	1h	4h	8h	12h
1	6,12±0,53	5,78±0,41BC	5,77±0,26	5,82±0,13	5,91±0,12
2	5,51±0,37	5,29±1,16AB	5,47±0,28	5,67±0,39	5,51±0,40
3	6,49±0,61a	5,70±0,42BCab	5,38±0,45b	5,32±0,28b	5,89±1,01ab
4	5,90±0,58	5,55±0,25BC	5,41±0,59	5,22±0,62	5,50±0,42
5	5,31±0,87	5,04±0,79AB	5,43±0,72	5,41±0,57	5,12±0,13
6	6,78±1,01a	6,41±0,94C	6,25±0,90	6,09±1,08	5,60±0,35b

Letras maiúsculas diferentes entre grupos (colunas) revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) e letras minúsculas diferentes revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre tempos (linhas).

Pode-se observar que somente houve alteração dos níveis de PPT entre grupos, 1h após (Tab.9). Mas, quando se comparam os tempos, os níveis de PPT, nos grupos 3 (T4 e T8) e 6 (T12) apresentaram alterações ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando comparados aos valores basais (Figura 7).

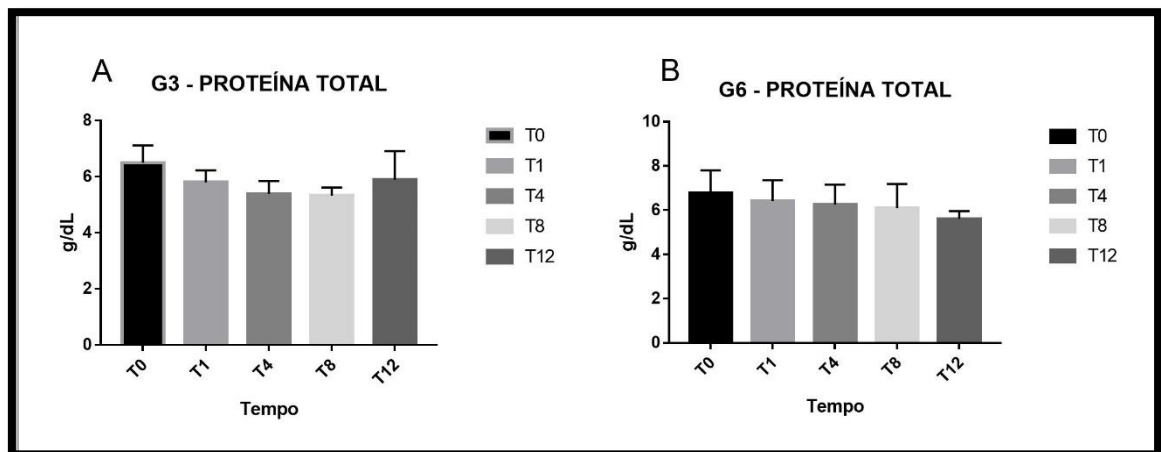


Figura 5: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de proteína total (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de *B. alternatus*, grupo 3 (A), e tratados com desmopressina + soro antibotrópico, grupo 6 (B).

Ressalta-se que todos os animais de todos os grupos apresentaram valores de proteína total dentro dos limites de referência para coelhos, de 5,0 a 8,5 g/dL (Campbell, 2007).

Caldas *et al.* (2008) observaram diminuição dos níveis séricos de proteínas totais no envenenamento experimental por *B. alternatus* em bovinos. A diminuição de PPT está relacionada com intensas hemorragias provocadas pelo envenenamento botrópico, que pode ser explicado pela ação da enzima tipo trombina, presente no veneno, que consome parte do fibrinogênio circulante e outros fatores de coagulação. Fato esse, observado no G3 (veneno), que também apresentou uma diminuição gradativa ($P > 0,05$) de PPT até o T8 (Figura 8). Também é esperado que haja uma diminuição de PPT nas doenças renais, curiosamente observado no G5 (veneno + soro antibotrópico) no tempo final (T12), grupo que apresentou o menor valor médio ($5,12 \pm 0,13$ g/dL). Sabe-se da eficácia do soro antibotrópico na antagonização do veneno, mas também é conhecida a ocorrência de sobrecarga renal frente aos complexos antígeno-anticorpo que são formados, além dos anticorpos heterólogos (equino) que podem causar a doença do soro. Seria possível postular neste curto intervalo (12h) o início de uma IRA? Outros resultados vindos de marcadores iônicos, tais como P, Na^+ e K^+ poderiam corroborar essa hipótese. E, obviamente, o estudo histológico dos rins que será discutido mais adiante.

As principais proteínas plasmáticas são a albumina, as globulinas e o fibrinogênio, que estão envolvidas em múltiplas funções: manutenção da pressão osmótica e da viscosidade do sangue, transporte de nutrientes, metabolitos e produtos de excreção, regulação do pH sanguíneo e participação da coagulação sanguínea. São sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal e com a funcionalidade hepática (González, 2008; Whalan, 2015). A concentração de proteína total pode estar aumentada na desidratação por hemoconcentração. E pode estar diminuída em falhas hepáticas, transtornos intestinais e renais, hemorragia ou devido a deficiência nutricional (González, 2008; Whalan, 2015).

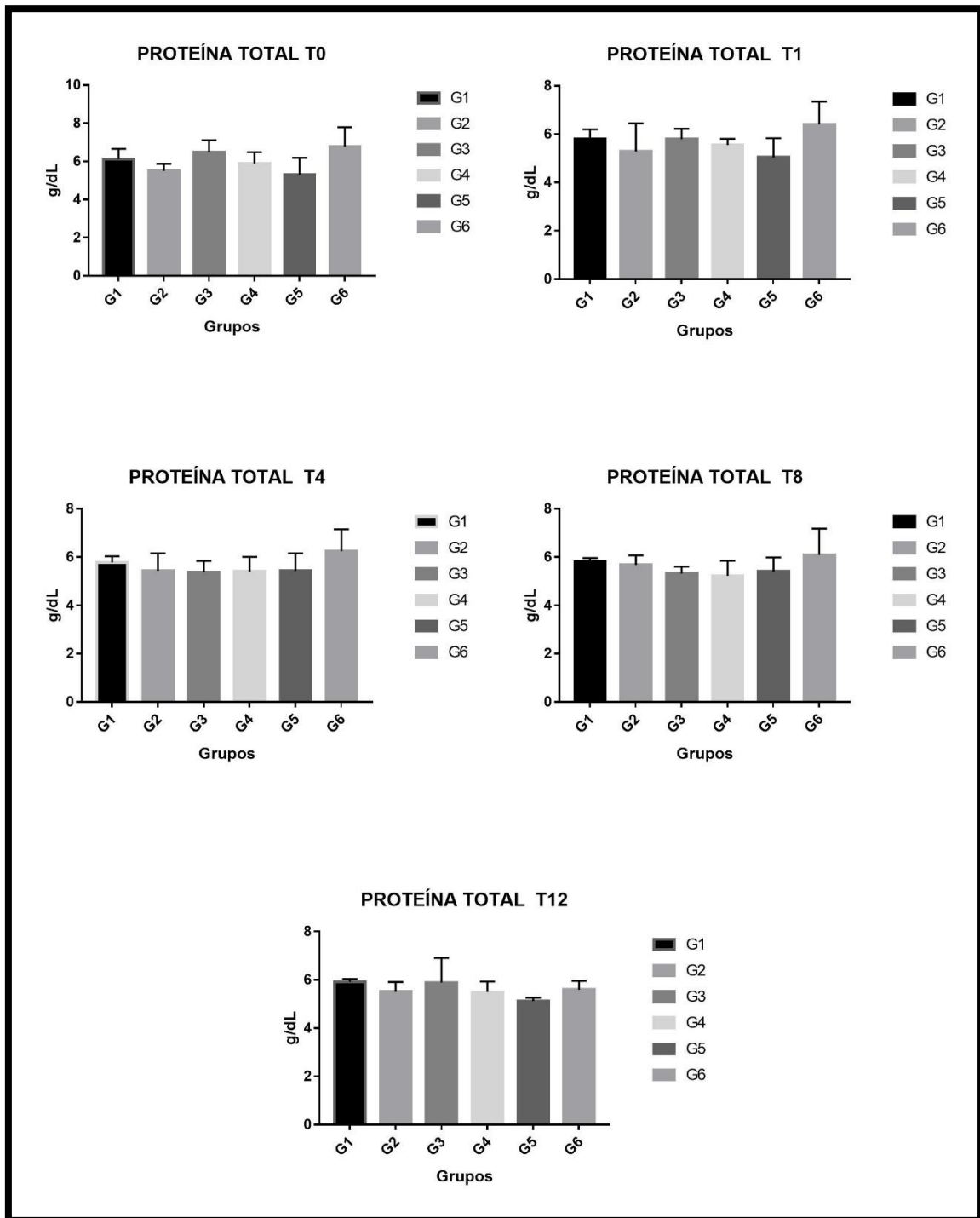


Figura 6: Valores médios e desvio padrão da concentração de proteína plasmática total (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.

Os valores de albumina plasmática dos animais deste experimento encontram-se na tabela 10.

Tabela 9: Valores médios e desvio padrão da concentração de albumina (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Tempo \ Grupo	0h	1h	4h	8h	12h
1	4,23±0,36	4,31±0,11A	4,12±0,19	4,05±0,10	4,08±0,27
2	4,05±0,13	3,81±0,75	3,96±0,24	4,05±0,34	3,90±0,35
3	4,46±0,45a	4,13±0,31 ab	3,92±0,39b	3,87±0,33b	3,92±0,58b
4	4,35±0,21a	3,88±0,58ab	3,85±0,33ab	3,65±0,36b	3,70±0,24b
5	3,64±0,58	3,49±0,56B	3,72±0,43	3,64±0,28	3,52±0,21
6	4,21±0,23	3,96±0,40	4,08±0,27	3,87±0,24	3,79±0,21

Letras maiúsculas diferentes entre grupos (colunas) revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) e letras minúsculas diferentes revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre tempos (linhas).

Observa-se que nos animais do G3 (veneno), 4h após, houve diminuição significativa da concentração de albumina. E, nos animais do G4 (veneno + desmopressina), 8 e 12h após (Figura 9).

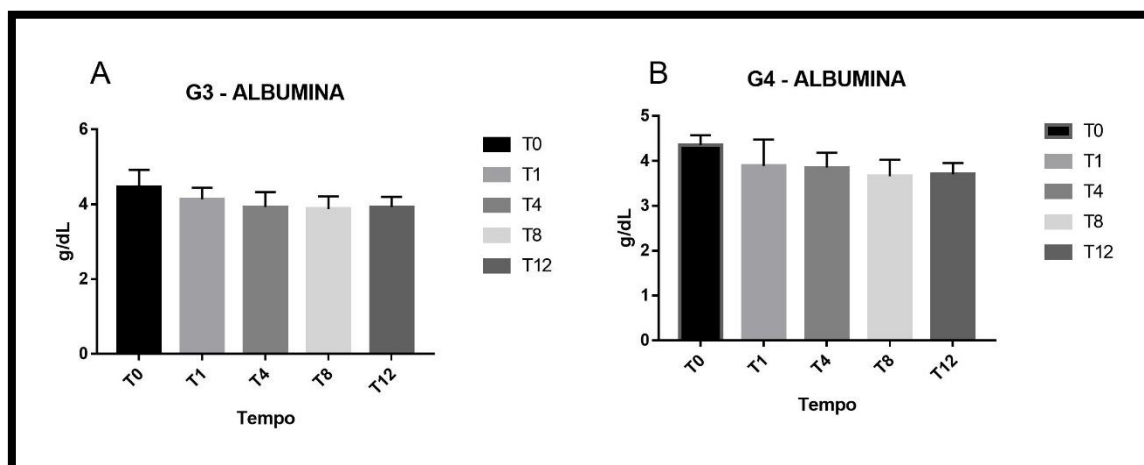


Figura 7: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de albumina (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de *B. alternatus*, grupo 3 (A), e tratados com desmopressina, grupo 4 (B).

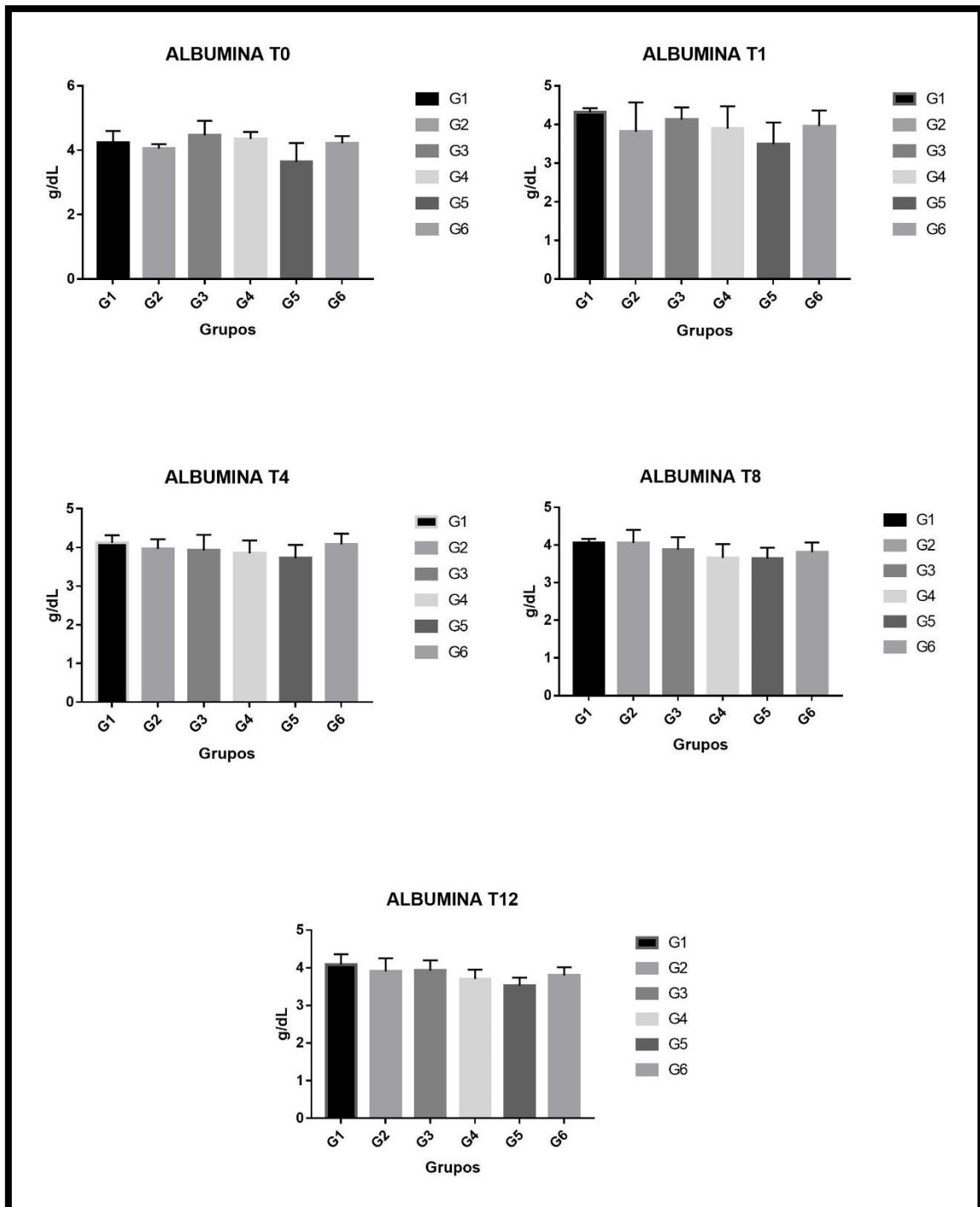


Figura 8: Valores médios e desvio padrão da concentração de albumina (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.

Em relação a albumina, houve alteração dos níveis plasmáticos entre grupos (G1 e G5) no T1h e entre tempos, nos grupos (G3 e G4) (Tab. 10 e Fig. 10). Os valores de referência de albumina para o coelho variam de 2,4 a 4,5 g/dL (Carpenter, 2010). A albumina é a principal fração proteica que se perde nos rins em casos de glomerulonefrites e doenças glomerulares primárias, levando a hipoalbuminemia (González e Silva, 2008). Apesar de ter ocorrido diminuição de albumina, não foi observada hipoalbuminemia. E, os resultados desta pesquisa diferem dos apresentados por Caldas *et al.* (2008) que relataram uma diminuição significativa da concentração de albumina no envenenamento botrópico.

A concentração de globulinas é obtida pela diferença de concentração entre as proteínas totais e a albumina e são indicadores de processo inflamatórios. Os valores médios das globulinas podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 10: Valores médios e desvio padrão da concentração de globulinas (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Tempo \ Grupo	0h	1h	4h	8h	12h
1	1,89±0,87	1,47±0,32	1,65±0,25	1,76±0,23	1,83±0,15
2	1,45±0,29	1,47±0,52	1,50±0,25	1,62±0,25	1,60±0,15
3	2,03±0,37a	1,66±0,37b	1,45±0,32b	1,44±0,32b	1,96±1,04ab
4	1,55±0,48	1,66±0,43	1,56±0,30	1,56±0,29	1,79±0,22
5	1,67±0,33	1,55±0,32	1,70±0,40	1,76±0,38	1,59±0,09
6	2,57±1,06	2,45±0,85	2,17±0,89	2,22±0,93	1,80±0,17

Letras maiúsculas diferentes entre grupos (colunas) revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) e letras minúsculas diferentes revelam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre tempos (linhas).

Houve uma diminuição significativa das globulinas nos animais do G3 (veneno) (Figuras 11 e 12). Na doença nefrótica pode haver um aumento ou diminuição das globulinas (Whalan, 2015). O valor de referência das globulinas varia de 1,9 a 3,5 g/dL (Carpenter, 2010).

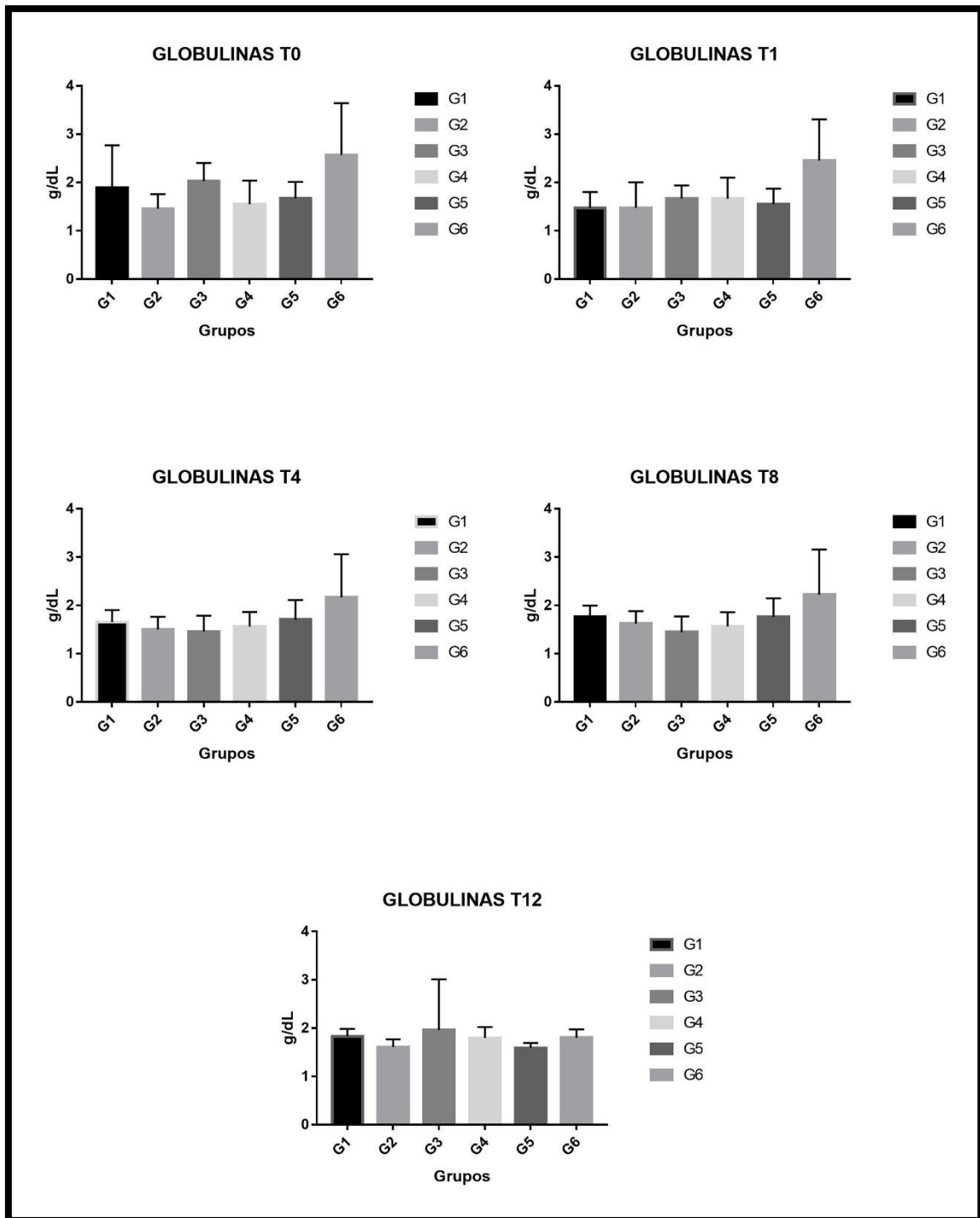


Figura 9: Valores médios e desvio padrão da concentração de globulinas (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.

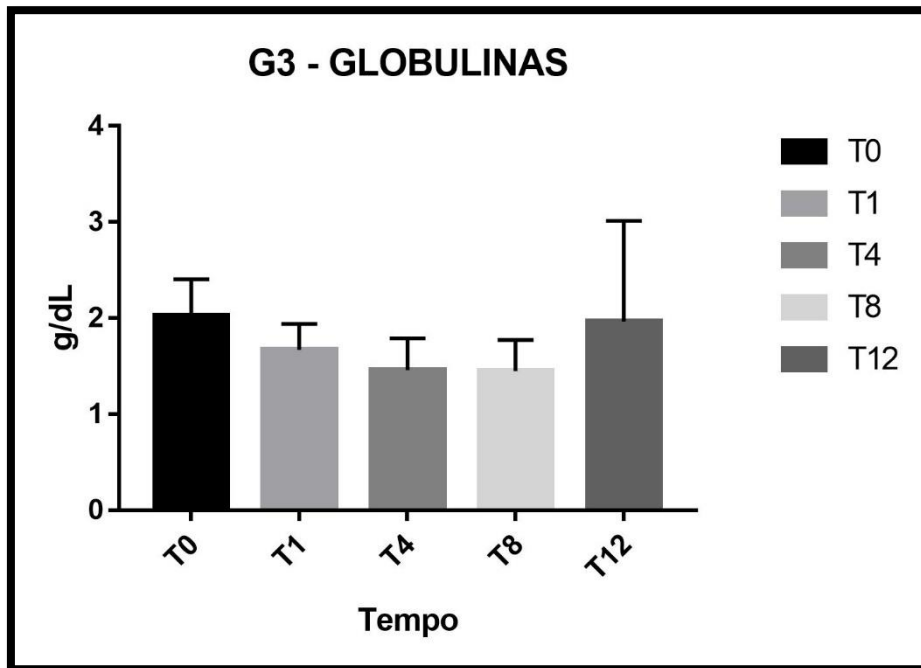


Figura 10: Valores médios e desvio padrão da concentração plasmática de globulinas (g/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* nos Grupos 3.

5.2.3. Fósforo

O fósforo desempenha um importante papel na estrutura e função celular (DiBartola e Willard, 2012) e é um indicado sanguíneo de funcionamento renal. Na doença renal generalizada há uma redução na velocidade de filtração e perda na capacidade de excreção do fósforo, levando à hiperfosfatemia (González e Silva, 2008). É esperado que na IRA oligúrica haja aumento dos níveis de fósforo (Pinho e Pereira, 2001).

Não houve aumento na concentração plasmática do fósforo nos grupos estudados e/ou tempo, conforme observado na Tabela 12. O valor de referência de fósforo para coelhos varia entre 2,3 e 6,9 mg/dL (Carpenter, 2010).

Tabela 11: Valores médios e desvio padrão da concentração de fósforo (mg/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h

Grupo \ Tempo	0h	1h	4h	8h	12h
1	5,09±0,42	4,97±0,41	4,66±0,45	5,45±2,01	4,99±0,06
2	3,50±0,82	3,31±0,94	3,51±0,94	3,65±1,19	2,94±0,54
3	6,48±1,10a	5,60±0,30b	5,43±0,10b	5,88±0,71 ab	5,42±0,90b
4	4,97±0,58	4,81±0,72	5,01±0,37	5,37±0,61	5,79±0,65
5	2,73±0,65	2,56±0,80	2,65±0,11	2,71±0,46	2,56±0,33
6	4,06±0,52	3,86±0,21	4,21±0,66	4,62±0,67	4,85±0,62

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os de Sousa *et al.* (2011) que avaliaram as alterações clínicas e patológicas do envenenamento botrópico experimental em equinos e, não observaram aumento dos níveis de fósforo.

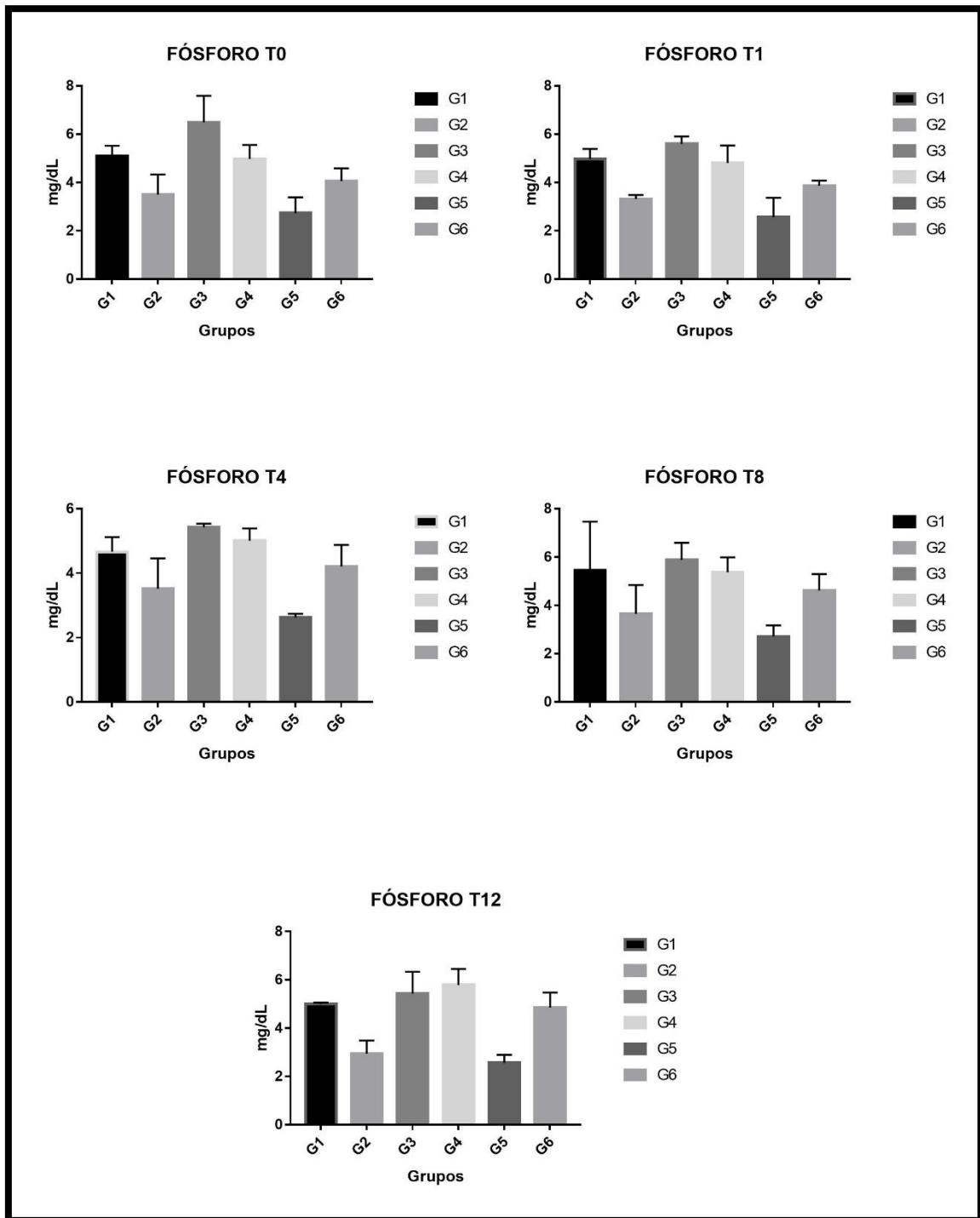


Figura 11: Valores médios e desvio padrão da concentração de fósforo (g/dL) de coelhos sem indução de envenenamento botrópico, tratados com desmopressina (G1) e soro antibotrópico (G2) e após indução de envenenamento botrópico sem tratamento (G3) e tratados com desmopressina (G4), soro antibotrópico (G5) e desmopressina + soro antibotrópico (G6) nos tempos 0h, 1h, 4h, 8h e 12h.

Nos animais do G3 observou-se diminuição da concentração sérica do fósforo nos tempos 4 e 12h quando comparados com o tempo 0 (figura 14).

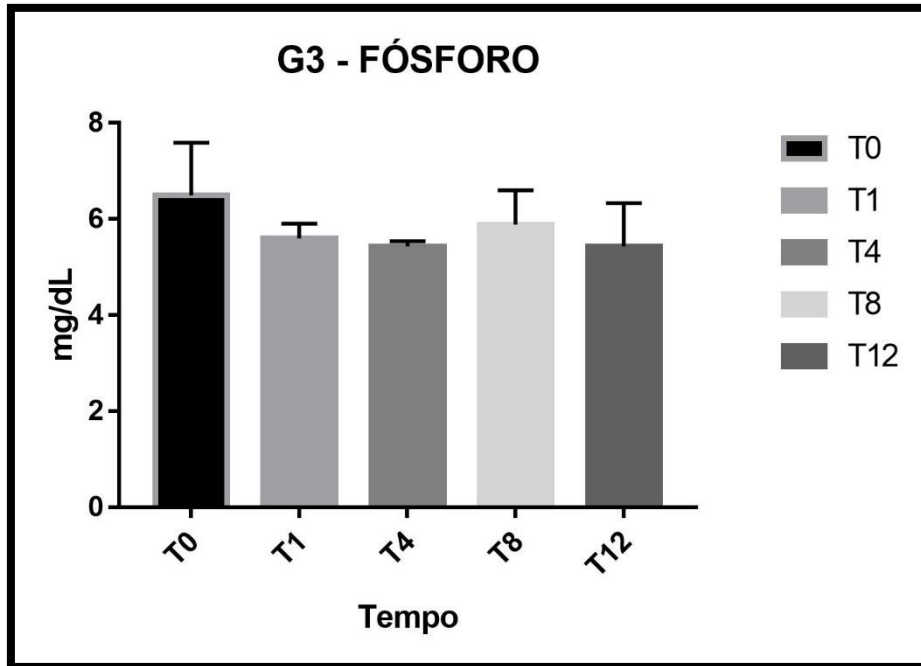


Figura 12: Valores médios e desvio padrão da concentração sérica do fósforo (mg/dL) em coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* (G3).

5.3. Alterações Macroscópicas e Histopatológicas

À macroscopia dos animais dos grupos que não receberam veneno (grupos 1 e 2) não foram observadas alterações.

Nos animais dos grupos que receberam veneno (grupos 3, 4, 5 e 6), no local da inoculação do veneno foram observados edema no membro posterior esquerdo e extensa lesão hemorrágica atingindo o tecido subcutâneo e nos músculos bíceps femoral, quadríceps e semitendíneo (Figura 16). Já os rins apresentavam-se congestionados na base da pelve renal. Essas alterações são compatíveis com o envenenamento botrópico.

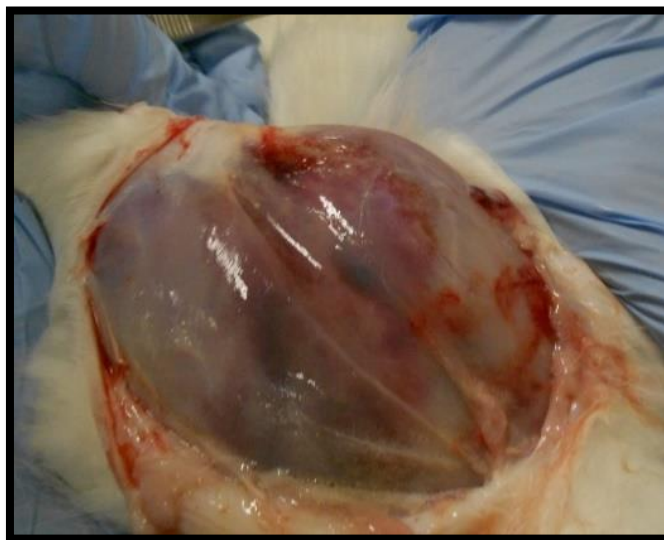


Figura 13: Extensa lesão hemorrágica na região do tecido subcutâneo e nos músculos bíceps femoral, quadríceps e semitendíneo de coelhos envenenados experimentalmente com peçonha de *B. alternatus*.

Na avaliação histopatológica dos rins dos animais do G1 (desmopressina) observou-se a presença de infiltrado inflamatório com fibrose. Nos animais do G4 (veneno + desmopressina) foram visualizados raros heterófilos.

Linard *et al.* (2011), avaliaram as alterações histológicas e função renal de ratos causadas pelo veneno de *B. alternatus*, e relataram que o parênquima renal apresentava alterações nos corpúsculos renais, como lobulação dos tufo capilares, dilatação da cápsula de Bowman e presença de microaneurismas.

As alterações histopatológicas renais em pacientes com IRA decorrente do envenenamento botrópico incluem necrose tubular e necrose cortical dos rins, o que demonstra a alta toxicidade do veneno (Jorge *et al.*, 2017). As células tubulares epiteliais são os principais alvo da IRA induzida por veneno no acidente ofídico (Sitprija e Sitprija, 2012).

Existem várias evidências que demonstram que o veneno botrópico pode causar toxicidade renal direta. O veneno botrópico induz toxicidade tubular que pode ser explicada por alguns distúrbios renais descritos no envenenamento botrópico como o aumento da diurese, que pode ser independente dos efeitos sistêmicos e glomerulares (Castro *et al.*, 2004).

Nos animais do G6 (veneno + desmopressina + soro antibotrópico) observou-se necrose tubular discreta, lesão que é compatível com as lesões relatadas nos casos de envenenamento botrópico (Figura 17). O tratamento instituído nos animais do G6 não foi eficaz no controle das alterações renais causadas pelo envenenamento botrópico.

Apesar de o soro antibotrópico neutralizar a maioria dos efeitos sistêmicos, não se sabe ao certo se o mesmo consegue neutralizar a toxicidade renal direta do veneno (Castro *et al.*, 2004). Uma hipótese seria que a associação desmopressina com o soro antibotrópico levem a necrose tubular aguda (NTA). Isto merece atenção especial, já que a NTA apresenta alta letalidade.

Apesar de os tratamentos terem sido instituídos dentro de 1 hora após o envenenamento botrópico observou-se alterações renais em todos os grupos que receberam o veneno.

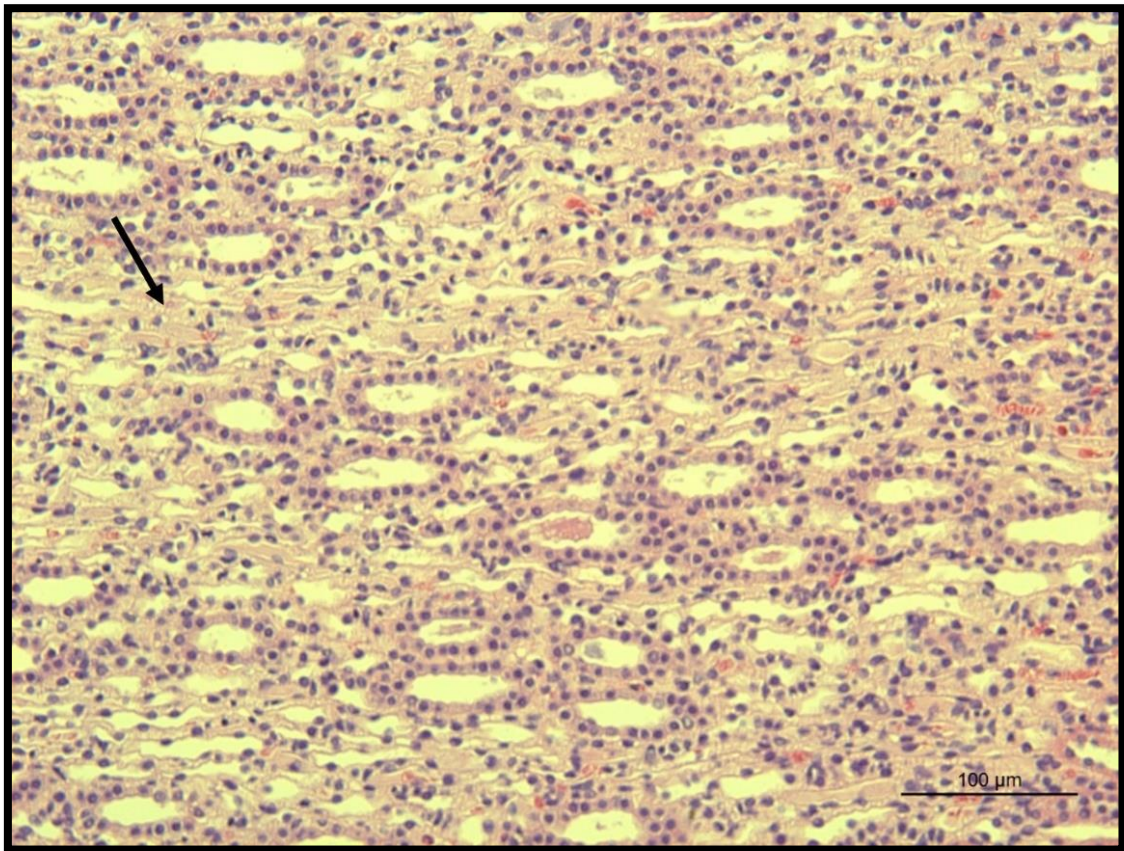


Figura 14: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* tratado com desmopressina e soro antibotrópico mostrando necrose tubular (seta). Coloração HE. Bars = 100μm.

As alterações histopatológicas encontradas nos rins dos animais dos grupos G3 (veneno) e G5 (veneno + soro antibotrópico), estão de acordo com as descritas por Boer-Lima *et al.* (1999a; 2002b), Ferreira Jr. e Barraviera (2004), Pinho e Burdmann (2008) e Linardi *et al.* (2011). Observou-se à microscopia óptica NTA (Figura 18), vacuolização (Figura 19), degeneração e necrose tubular, hemorragia, mineralização (Figura 20) na região cortical.

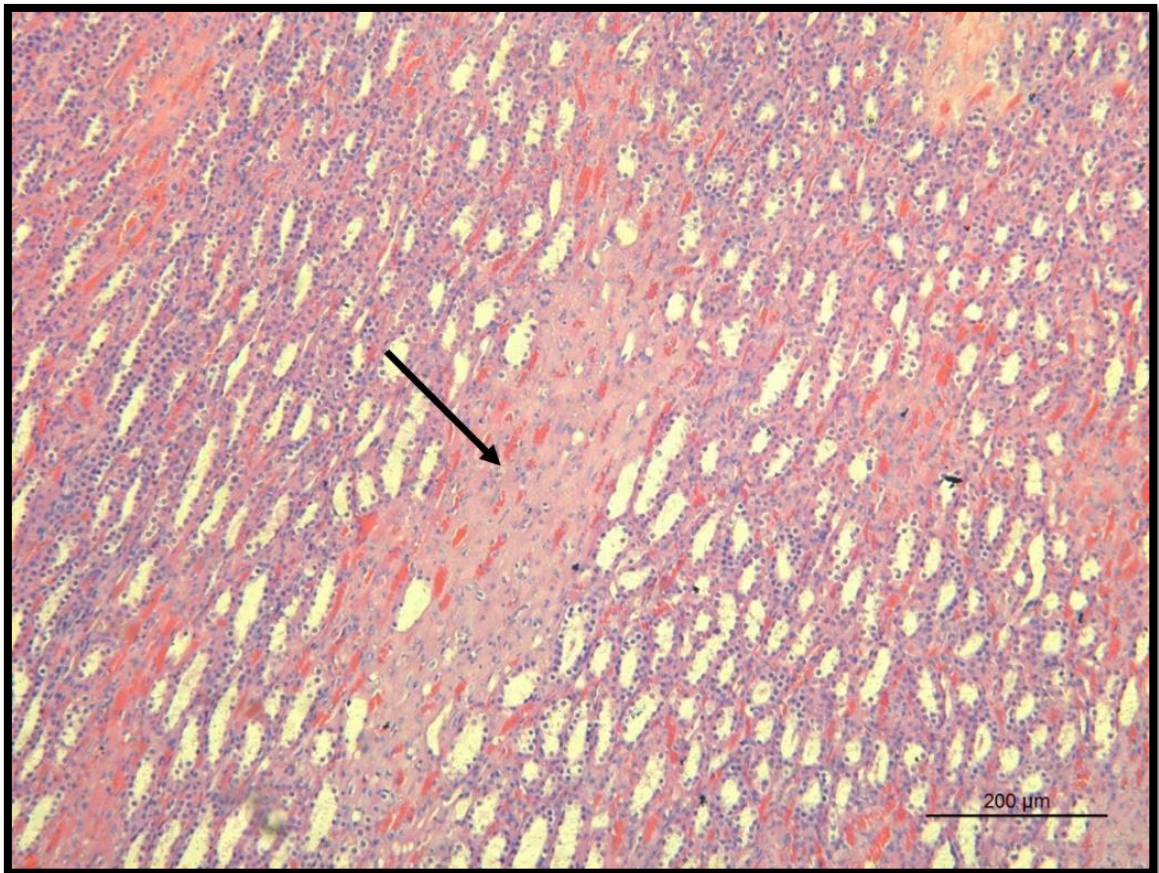


Figura 15: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* tratado com soro antitoxotrópico mostrando necrose tubular (seta). Coloração HE. Bars = 200 μ m.

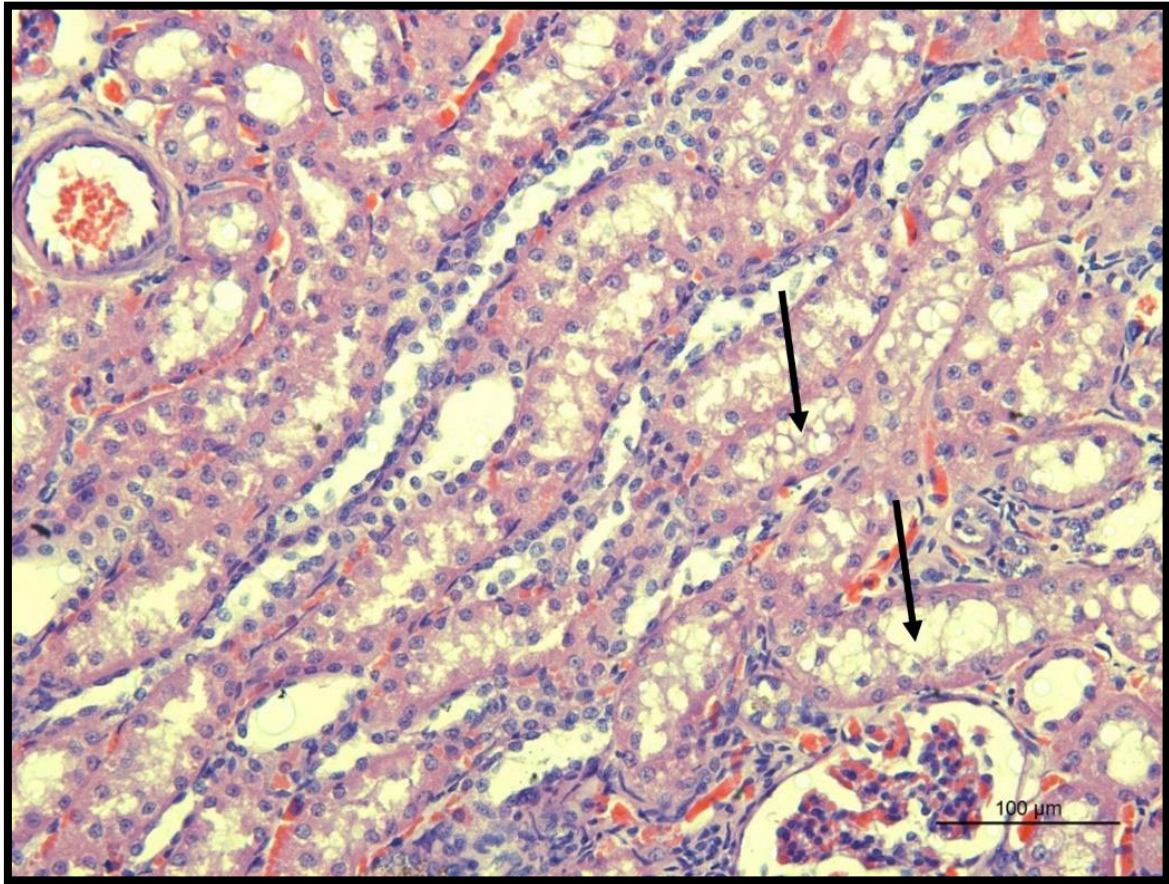


Figura 16: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* tratado com soro antiofídico mostrando vacuolização (setas). Coloração HE. Bars = 100µm.

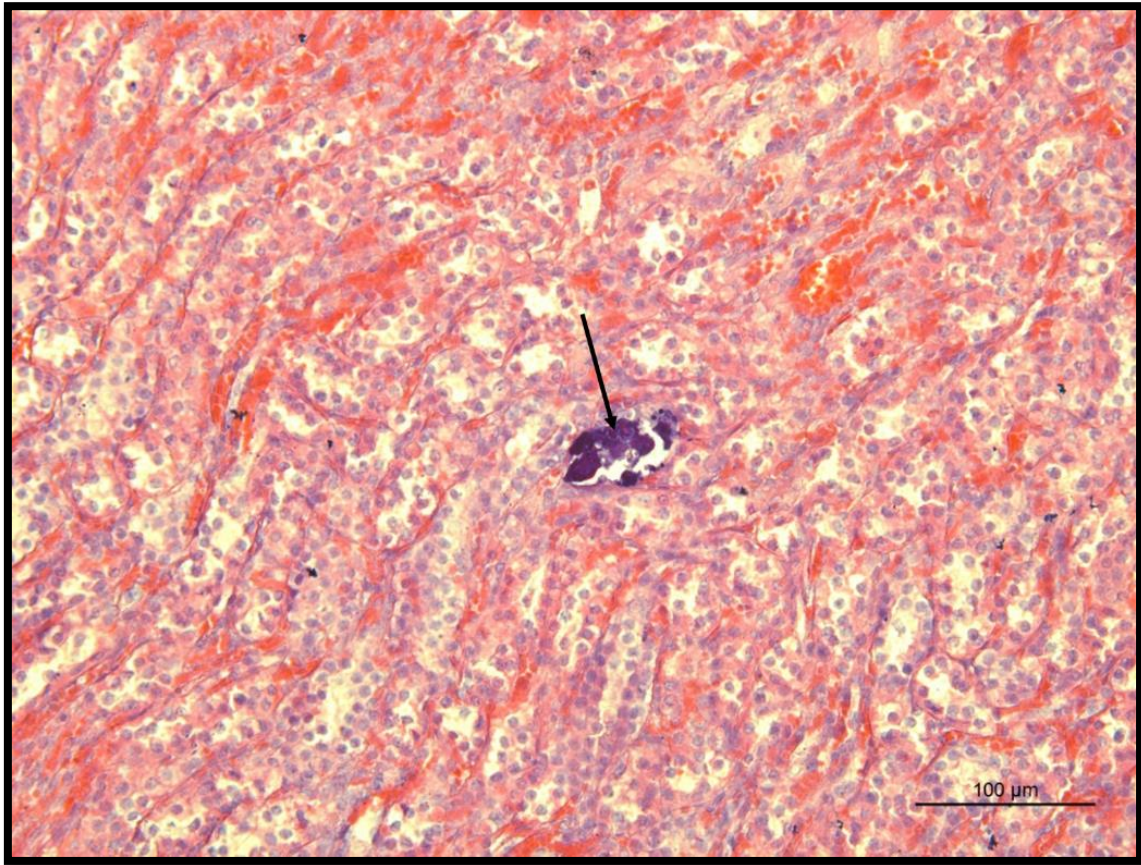


Figura 17: Secção histológica de rim de coelho envenenado experimentalmente com peçonha de *B. alternatus* tratado com soro antitoxínico mostrando mineralização (setas). Coloração HE. Bars = 100μm.

Foram observadas alterações histopatológicas renais nos animais do G2, que receberam soro antibotrópico, como infiltrado linfohistioplasmocitário (Figura 21), dilatação, vacuolização e necrose tubular, hemorragia e hiperemia acentuadas.

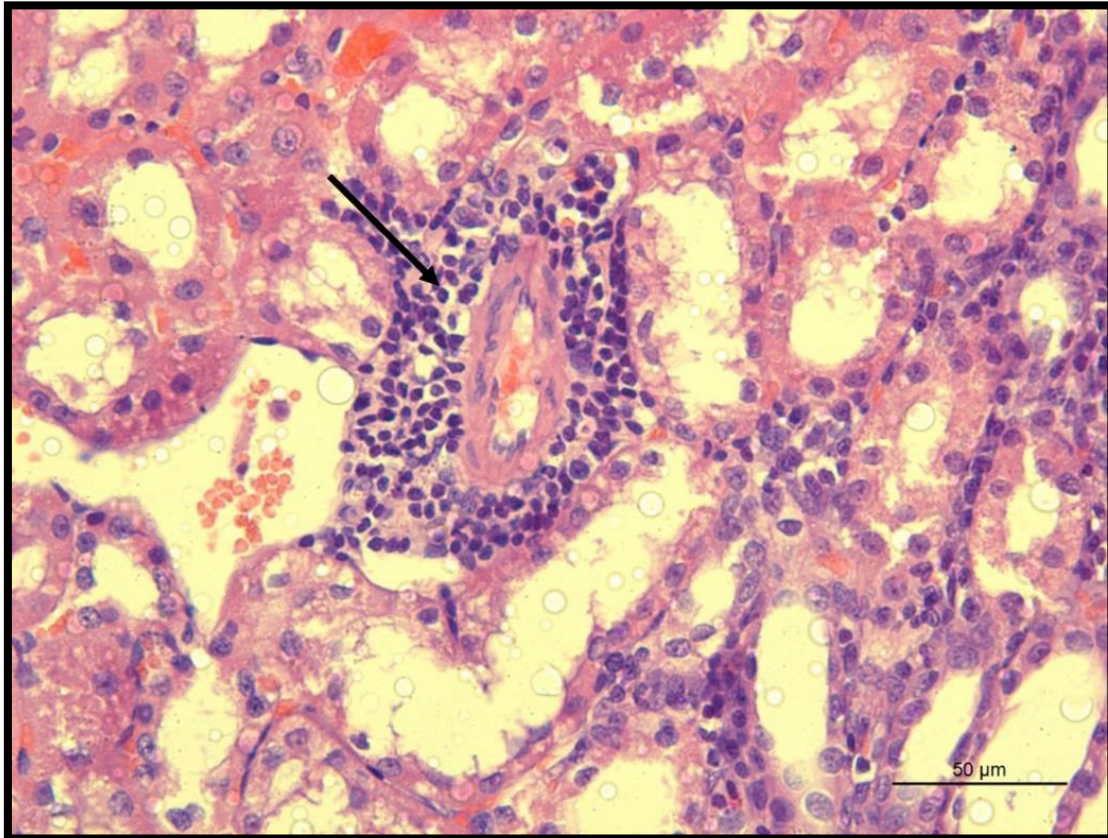


Figura 18: Secção histológica de rim de coelho tratado com soro antibotrópico mostrando infiltrado linfohistioplasmocitário (seta). Coloração HE. Bars = 50µm.

As lesões renais induzidas no envenenamento botrópico são devidas as alterações sistêmicas e hemodinâmicas e ao efeito tóxico direto do veneno. Observou-se que o tratamento com a desmopressina não se mostrou eficiente como tratamento complementar nos envenenamentos botrópicos. O soro antibotrópico, tratamento de escolha nos acidentes botrópicos, mesmo quando administrado precocemente, não neutraliza a toxicidade renal direta do veneno. E, as alterações histopatológicas vistas no G2 (grupo que recebeu somente o soro antibotrópico) provavelmente, são decorrentes dos anticorpos heterólogos (equino).

6. Conclusões

1. A desmopressina altera os valores sanguíneos de ureia, creatinina, ácido úrico, glicose, proteína total, albumina e globulinas de coelhos experimentalmente envenenados com peçonha de *B. alternatus*, especialmente quando associada ao soro antibotrópico.
2. O tecido renal de coelhos experimentalmente envenenados com peçonha de *B. alternatus* e tratados com desmopressina e/ou soro antibotrópico apresentam infiltrado inflamatório com fibrose, necrose tubular, vacuolização, degeneração, hemorragia e mineralização.
3. Fica evidente, que não se deve utilizar desmopressina como tratamento auxiliar do envenenamento botrópico.

7. Considerações finais

Uma vez que ureia e creatinina são considerados marcadores renais tardios, os biomarcadores renais precoces são importantes para avaliação da função renal e permitem a implementação de um tratamento de suporte adequado na tentativa de reduzir os óbitos decorrentes da IRA induzida por veneno botrópico.

8. Agradecimentos

Agradecemos aos diretores da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Dr. Claudio Fonseca de Freitas (Divisão de Produção Animal) e Dr. Maurício Abreu Santos (Divisão de Produção de Biológicos) pela doação do soro antibotrópico utilizado neste experimento.

9. Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; JACINTO, C.N.; SILVA JUNIOR, G.B. *et al.* Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical and treatment. *Revista do Instituto de Medicina tropical*, v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
- ANDRADE FILHO, A. *et al.* *Toxicologia na Prática Clínica*. 2ª ed., Belo Horizonte: Folium, 2013. 675p.
- ANTUNES, T.C.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C. *et al.* Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, v. 56, p. 1443-1458, 2010.
- BARBOSA, P.S.F.; HAVTA, A.; FACÓ, P.E.G. *et al.* Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, v. 40, p. 1427-1435, 2002.
- BARBOSA, P.S.F.; MARTINS, A.M.C.; ALVES, R.S. *et al.* The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. *Toxicon*, v. 47, p. 831-837, 2006.
- BARONE, J.M.; ALPONTI, R. F.; FREZZATTI, R. *et al.* Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatment on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. *Toxicon*, v. 57, p. 148-156, 2011.
- BARTTELINO, C.; PIAZZA, R.; SILVA, A.M. *et al.* Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, v. 41, p. 583-593, 2003.
- BRAGA, M.D.M.; MARTINS, A.M.C.; MENEZES, D.B. *et al.* Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*, v. 51, p. 181-190, 2008.
- BLANCO, B.S.; MELO, M.M. Acidente botrópico. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n. 75, p. 13-24, 2014.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.*, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.; CRUZ-HOFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, p.698-706, 1999.a
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.; CRUZ-HOFLING, M.A. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 67, p. 217-222, 2002.b
- BURDMANN, E.A.; WORONIK, V.; PRADO, E.B. *et al.* Snakebites-induced acute renal failure: an experimental model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48, p. 82-88, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Datasus*. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 27 nov. 16.

- CALDAS, S.A.; TOKARNIA, C.H.; FRANÇA, T.N. *et al.* Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento experimental por *Bothrops alternatus* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras*, v. 28, n. 6, p. 303 – 312, 2008.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. *The Venomous Reptiles of Latin America*. 6^a ed., London: Comstock, 1989. 425 p.
- CAMPBELL, T.W. *Chemical Chemistry of Mammals: Laboratory Animals and Miscellaneous Species*. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. (Ed). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Willey-Blackwell, 2012. p. 225-237.
- CARDOSO, K.C.; SILVA, M.J.; COSTA, G.G.L. *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics*, v. 11, p. 1-22, 2010.
- CARPENTER, J.W. (Ed). *Formulário de Animais Exóticos*. 3^a ed., São Paulo: Editora MedVet, 2010, 578p.
- CASTRO, I; BURDMANN, E.A.; SEGURO, A.C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon*, v. 43, p. 833–839, 2004.
- CHACUR, M. *Mediação química da hiperalgesia induzida pelos venenos de serpentes Bothrops jararaca e Bothrops asper e por uma miotoxina com atividade de fosfolipase A₂ isolada do veneno de Bothrops asper*. 2000. 106 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- COSTA, J.O. PETRI, C.B.; HAMAGUCHI, A. *et al.* Purification and functional characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*, v. 13, n. 3. p. 640-654, 2007.
- CRITICAL CARE. *Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. v.11, n.2, p.1-23, R31, 2007.
- DESBOROUGH, M.J.R.; OAKLAND, K.A.; LANDONI, G. *et al.* Desmopressin for treatment of platelet dysfunction and reversal of antiplatelet agents: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016.
- DIBARTOLA, S.P. Disorders of Sodium and Water: Hyponatremia and Hyponatremia. In: DIBARTOLA, S.P. *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. Elsevier Saunders, 2012, p. 45-79.
- DIBARTOLA, S.P.; MORAIS, H.A. Disorders of Potassium: Hypokalemia and Hyperkalemia In: DIBARTOLA, S.P. *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. Elsevier Saunders, 2012, p. 92-119.
- DIBARTOLA, S.P.; WILLARD, M.D. Disorders of Phosphorus: Hypophosphatemia and Hyperphosphatemia. In: DIBARTOLA, S.P. *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*. Elsevier Saunders, 2012, p. 195-211.

EJAZ, A.A.; MU, W.; KANG, D.H. *et al.* Could uric acid have a role in acute renal failure? *Clin. J. Am. Soc. Nephrolog.*, v. 2, p. 16 – 21, 2007.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. *Animais peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica*, 2 ed. São Paulo: Savier, 2009, p. 81-95.

FERREIRA Jr., R.S.; BARRAVIEIRA, B. Tissue necrosis after canine Bothropic envenoming: a case report. *J. Venom. Anim. Toxins*, n. 7, p. 302-312, 2001.

FERREIRA JR, R.S.; BARRAVIEIRA, B. Management of venomous snakebites in dogs and cats in Brazil. *J. Venom. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, v. 10, n. 2, p. 112-132, 2004.

FETTMAN, M.J., REBAR, A. Avaliação Laboratorial da Função Renal. In.: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.283-287.

FONTEQUE, J.H.; BARROS FILHO, L.R.; SAKATE, M. Acidentes botrópicos de interesse em animais domésticos. *Rev. Educo. Contin. CRMV-SP*, v. 4, p. 102-111, 2001.

FREITAS, G.C.; VEADO, J.C.C.; CARREGARO, A.B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 411-426, 2014.

GAJDOSIK, D.A.; ROSSINI, J.M. The use of desmopressin (DDAVP) after a nontraumatic intracerebral hemorrhage. *J. Emerg. Nurs*, v. 42, n. 6, p. 541-543, 2016.

GLIOZZI, M.; MALARA, N.; MUSCOLI, S.; MOLLACE, V. The treatment of hyperuricemia. *Int. J. Cardiol.*, v. 13, p. 23 – 27, 2016.

GONÇALVES, D. A.P.; SILVA, E.V.C.M.; GRAÇA, F.A. *et al.* *In vivo* effects of *Bothrops jararaca* venom on metabolic profile and n muscle protein metabolismo in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n. 5, p. 771-778, 2005.

GONZÁLEZ, F.H.D. Bioquímica Clínica. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. (Ed) *Patologia clínica veterinária: texto introdutório*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, p. 140-196.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 976-987, 2009.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Grading of acute kidney injury. Disponível em: < <http://www.iris-kidney.com/guidelines/grading.html>>. Acesso em: 15 jan. 17.

- JACKSON, E. K. Vasopressin and others agents affecting the renal conservation of water. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Ed). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill e-Books, 2005. p. 771-788.
- JÁCOME, D.O.; MELO, M.M.; BARBOSA, M.M.S.; HENEINE, L.G.D. Kinetics of venom, antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. *Vet. Human Toxicol.*, v. 44, n. 6, p. 334-338, 2002.
- JORGE, R.J.B; JORGE, A.R.C.; MENEZES, R.R.P.P.B. et al. Differences between renal effects of venom from two *Bothrops jararaca* populations from southeastern and Southern Brazil. *Toxicon*, v. 125, p. 84-90, 2017.
- KAMIGUTI, A.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G. et al. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v.34, n.6, p.627-642, 1996.
- LINARDI, A.; SILVA, T.A.A.R.; MIYABARA, E.H. et al. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Bioph. Acta*, v. 1810, p. 895-906, 2011.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Ani. Sci.*, v.76, n.4, p.12-16, 1998.
- LOPES, S.T.A.; VEIGA, A. Urinálise. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. (Ed) *Patologia clínica veterinária: texto introdutório*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, p. 107-139.
- LUNA, K.P.O.; SILVA, M.B.; PEREIRA, V.R.A. Clinical and immunological aspects of envenomations by *Bothrops* snakes. *J. Venon. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v.17, n.2, p. 130-141, 2011.
- LUNN, K.F. The kidney in critically ill small animals. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 41, p. 727-744, 2011.
- MAIUOLO, J; OPPEDISANO, F.; GRATTERI, S. et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int. J. Cardiol.*, v. 213, p. 8-14, 2016.
- MAMEDE, C.C.N.; SOUSA, B.B.; PEREIRA, D.F.C. et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*, v. 117, p. 37-45, 2016.
- MARKLAND JR, F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v.62, p. 3-18, 2013.
- MARTINES, M.S., MENDES, M.M., SHIMIZU, M.H. et al. Effects of *Schizolobium parahyba* extract on experimental *Bothrops* venom-induced acute kidney injury. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. 1-6, 2014.
- MAZZALI, M. Uric acid and transplantation. *Seminars in Nephrology*, v. 25, n. 1, p. 50 -55, 2005.

- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. (Ed). *Animais peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica*, 2 ed. São Paulo: Savier, 2009, p. 42-70.
- MELO, M.M.; HABERMEHL, G.G.; OLIVEIRA, N.J.F. *et al.* Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinallis* extracts and ar-turmerone. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 1, p. 7-17, 2005.
- MELO, M.M.; LUCIA, M.; HABERMEHL, G.G. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. *Rev. Bras. Farmacog.*, v. 17, n.1, p. 29-34, 2007.
- MELLO, S. M.; LINARDI, A.; RENNÓ, A.L. *et al.* Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. *Toxicon*, v. 55, p. 470-480, 2010.
- MEUTEN, D. Laboratory evaluation and interpretation of the urinary system. In: THRALL, M.A.; WEISER G.; ALISSON, R.W.; CAMPBELL, T.W. (Ed). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Willey-Blackwell, 2012. p. 323-377.
- NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR., G.C.; NOWILL, A.E., *et al.* Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. *Biochem. Cell Biol.*, v. 85, p. 591-605, 2007.
- OLIVEIRA, N.J.F.; MELO, M.M.; RIBEIRO, E.L. *et al.* Perfil clínico e imunológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno bruto e iodado de *Bothrops alternatus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 569-576, 2007.
- OLIVEIRA, N.J.F.; RIBEIRO, E.L.; LÚCIA, M.; MELO, M.M. Perfil hematológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno de *Bothrops alternatus*. *R. Bras. Cie. Vet*, n. 17, n. 1, p. 38-45, 2010.
- OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops* bites. *Toxicon*, v. 54, p. 998-1011, 2009.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev Ass Med Brasil*, v. 47, n.1, p. 24-29, 2001.
- PINHO, F.M.O.; YU, L.; BURDMANN, E.A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. *Seminar in Nephrology*, v. 28, n. 4, p. 354-362, 2008.
- QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, v. 52, p. 842-851, 2008.
- RABELO, R.C.; MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; LUCIA, M. Avaliação das pressões venosa e arterial em cães submetidos a diferentes tipos de hipotensão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 6, p. 741-748, 2005.
- ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, *Viperidae*). *Rev.Bras. Zoologia*, n. 22, v. 2, p. 383-393, 2005.

- SANTOS, M.F.L.; FARANI, M.C.; ROCHA, P.N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops sp.* and *Crotalus sp.*: revisão e análise crítica da literatura. *J. Bras. Nefrologia*, v.31, n.2, p. 132–138, 2009.
- SANTOS, M.M.B.; MELO, M.M.; JÁCOME, D.O. *et al.* Avaliação clínica de cães tratados com flunixinina meglumine, *Curcuma longa* e soro antibotrópico após envenenamento botrópico experimental. *Acta Sci. Vet.*, v. 31, n.1, p. 31-38, 2003.
- SAKATE, M. Zootoxinas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J. (Ed). *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. Barueri: Manole, 2008. p. 209-251.
- SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*, v. 41, p. 251 – 255, 2003.
- SITPRIJA, V; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins, *Toxicon*, v. 60, p. 943–953, 2012.
- SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. *Nephron. Clin. Pract*, v. 119, p. 131-137, 2011.
- SOUSA, M.C.; TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F. *et al.* Aspectos clínico-patológicos do envenenamento botrópico experimental em equinos. *Pesq. Vet. Bras*, v. 31, n. 9, p. 773-780, 2011.
- SOUZA, C.A.T.; KAYANO, A.M.; SETÚBAL, S.S. *et al.* Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. *J. Venom. Res.*, v. 3, p. 28-34, 2012.
- SWIERINGA, F.; LANCÉ, M.D.; FUCHS, B. *et al.* Desmopressin treatment improves platelet function under flow in patients with postoperative bleeding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 13, p. 1503-1513, 2015.
- TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V. *et al.* Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, v. 54, p. 988-997, 2009. WOLFINGER, R.; CHANG, M. *Comparing the SAS® GLM and MIXED procedures for repeated measures*. Cary: SAS Institute Inc., 11p. 1996.
- TELLES, T.C.; MICHEL, A.F.R.M.; LÚCIA, M. *et al.* Evaluation of rat plasma proteins after bothropic venom inoculation and treatment with mesenchymal stem cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 1, p. 29-36, 2014.
- WHALAN, J. E. *Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals*. Switzerland: Springer, 2015. 151 p.
- WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, v. 42, p. 951-967, 2005.

10. Anexos

10.1. Certificado do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 274 / 2015, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS E SORO ANTIOFÍDICO NA PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS NO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL BOTRÓPICO”, que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 29/09/2015. Este certificado expira se em 29/09/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 274 / 2015, related to the Project entitled “Assessment of drug association and antivenom in the snake disorders hemostatics prevention in the experimental poisoning bothropic”, under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 29/09/2015. This certificates expires in 29/09/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador (a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 29/09/2015.
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br