

Rodrigo Frezzatti

**TRATAMENTO URICOSTÁTICO, URICOSÚRICO E
ANTIOXIDANTE NA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA E NA
LETALIDADE INDUZIDAS PELO VENENO DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS EM CAMUNDONGOS**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan,
para obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

São Paulo

2012

Rodrigo Frezzatti

**TRATAMENTO URICOSTÁTICO, URICOSÚRICO E ANTIOXIDANTE
NA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA E NA LETALIDADE INDUZIDAS
PELO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* EM
CAMUNDONGOS.**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan,
para obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

Orientador: Dr. Paulo Flávio Silveira

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Frezzatti, Rodrigo

Tratamento uricostático, uricosúrico e antioxidante na insuficiência renal aguda e na letalidade induzidas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* em camundongos / Rodrigo Frezzatti; Orientador Paulo Flávio Silveira. -- São Paulo, 2012.

69 fls. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2012.

1. Insuficiência renal aguda. 2. Ácido úrico. 3. Serpente .4. *Crotalus*. 5. Estresse Oxidativo. I. Silveira, Paulo Flávio (orient.). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

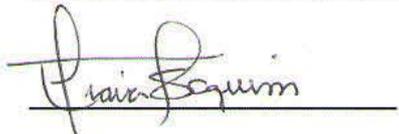
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: RODRIGO FREZZATTI

DATA DO EXAME: 12/06/2012

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Paulo Flávio Silveira (Presidente)		(X)	()
Dulce Elena Casarini		(X)	()
Eliana F. Lima Mauro		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADO (X)

REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):

Aos meus pais, familiares, amigos e todas as pessoas que confiaram, aconselharam, deram força, me formaram e fizeram de mim o que sou hoje.

O meu eterno agradecimento!

Agradecimentos

Ao meu orientador Paulo Flávio Silveira pelos ensinamentos, compreensão, paciência e total apoio na realização desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, Rafaela Fadoni Alpointi Vendrame, Mariana Trivillin Mendes, Eduardo Frare, Marlos Cortez, Márcio Matsubara e tantos outros que não caberiam aqui, obrigado pela força, companheirismo e ajuda ao decorrer desses anos, todos sabemos o quanto é duro chegar até aqui, compartilho isso com vocês meus amigos.

Aos meus pais, Vera Lúcia Pradella e Moacir Frezzatti, por todo esse tempo ao meu lado, sempre apoiando e me empurrando para frente, graças a tudo o que vocês fizeram por mim, hoje sou a pessoa que conhecem, não há palavras que demonstrem meu agradecimento.

À minha namorada Amanda Gasparini Duarte, por me conceber amor, carinho e calma nos momentos difíceis, não esquecerei como foi importante cada passo ao seu lado, cada gesto de carinho e amor, obrigado por tudo.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho, cada discussão, ajuda e conselho foi absorvido e de alguma forma aproveitado.

Este trabalho só foi possível graças aos financiamentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do auxílio à pesquisa nº 2009/00509-5, outorgado ao Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira, e da bolsa de mestrado que eu usufruí, proveniente do auxílio MCT/CNPq 70/2009, sob nº 554657/2010-4, outorgado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ao Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira.

Obrigado a todos, esse trabalho é meu, seu e nosso!

Nunca podemos esquecer de que um copo
vazio está cheio de ar.

Rodrigo Frezzatti

“Quem tem medo assimila toda forma de
expressão como protesto”

Fernando Anitelli

“Viver é ser outro. Nem sentir é possível se
hoje se sente como ontem se sentiu. Sentir
hoje o mesmo que ontem não é sentir, é
lembrar hoje o que se sentiu ontem, ser hoje
o cadáver vivo do que ontem foi à vida
perdida.”

Fernando Pessoa

Resumo

Frezzatti, Rodrigo. Tratamento uricostático, uricosúrico e antioxidante na insuficiência renal aguda e na letalidade induzidas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* em camundongos. 2012. 69 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma das complicações mais graves resultantes do envenenamento por *Crotalus durissus terrificus*. O presente estudo investiga os efeitos da n-acetil-L-cisteína (NAC), do alopurinol e do probenecid nos parâmetros clássicos da função renal, estresse oxidativo renal e, no caso da NAC, também sobre atividades aminopeptidásicas renais, em camundongos inoculados com veneno de *C. d. terrificus* (*vCdt*). O tratamento do envenenamento por *vCdt* com a NAC melhora o teor de proteína da fração de membrana do córtex renal e as atividades de aminopeptidase neutra solúvel no córtex e medula renais e de dipeptidil peptidase IV da fração de membrana do córtex renal. Além disso, a NAC melhora a uricemia e o desequilíbrio oxidativo renal, duas características marcantes do efeito nefrotóxico do *vCdt*. O aumento da uricemia e estresse oxidativo induzido por esse veneno também é amenizado por alopurinol e probenecid. Porém, dentre esses três agentes avaliados somente o alopurinol reduz significativamente a letalidade do *vCdt*. A eficácia do probenecid estaria comprometida porque este fármaco também produz hipercreatinemia, hipocreatinúria e piora a hipo-osmolalidade urinária nos camundongos envenenados. Por sua vez, a maior eficácia do alopurinol parece ser consequência de sua maior capacidade em diminuir os níveis intracelulares de ácido úrico e/ou por sua habilidade de bloquear oxidantes associados à xantina oxidase. Esses dados fornecem evidências consistentes da ligação entre ácido úrico, estresse oxidativo e a IRA induzida por veneno de *C. d. terrificus*, mostrando que esse envenenamento constitui um interessante modelo animal para o estudo da IRA associada à hiperuricemia e que o alopurinol merece ser avaliado clinicamente como uma abordagem complementar à soroterapia anti-veneno de serpente.

Palavras-chave: Toxinologia comparativa; Insuficiência renal aguda; Estresse Oxidativo; Ácido úrico; Serpente; *Crotalus*.

Abstract

Frezzatti, Rodrigo. Uricostatic, uricosuric and antioxidant treatments in acute renal failure and lethality induced by *Crotalus durissus terrificus* venom in mice. 2012. 69 p. Master thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

Acute renal failure (ARF) is one of the most serious complications of envenoming by *Crotalus durissus terrificus* bites. The present study investigates the effects of n-acetil-L-cisteína (NAC), allopurinol and probenecid on classical parameters of renal function and renal oxidative stress, as well as the effects of NAC on renal aminopeptidase activities, in the kidney of mice inoculated with *C. d. terrificus* venom (*vCdt*). The treatment of envenomed mice with NAC ameliorates the content of protein in the membrane-bound fraction of renal cortex and the activity levels of soluble neutral aminopeptidase in the renal cortex and medulla, and of dipeptidyl peptidase IV in the membrane-bound fraction of the renal cortex. In addition, NAC mitigates the uricemia and the renal oxidative imbalance, two marked features of the nephrotoxic effect of *vCdt*. Increased uricemia and oxidative stress induced by this venom are also ameliorated by allopurinol and probenecid. However, among these three agents under study only the allopurinol significantly reduces the lethality of *vCdt*. The effectiveness of probenecid would be compromised by hypercreatinemia, hypocreaturinuria and worsening of the urinary hypo-osmolality caused by this drug in envenomed mice. In turn, the highest effectiveness of allopurinol seems to be due to its high ability to decrease the intracellular levels of uric acid and/or to block xanthine oxidase-associated oxidants. Data provide consistent evidences linking uric acid, oxidative stress and ARF induced by *C. d. terrificus* venom, showing that this envenoming constitutes an attractive animal model suitable for studying the hyperuricemia and that the allopurinol deserves to be clinically evaluated as an approach complementary to anti-snake venom serotherapy.

Keywords: Comparative toxinology; Acute renal failure; Redox status; Uric acid; Snake; *Crotalus*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1.	Envenenamento ofídico e nefrotoxicidade	10
1.2.	N-acetil-L-cisteína (NAC) como antioxidante e nefroprotetora	14
1.3.	Alopurinol	16
1.4.	Probenecid	16
2.	OBJETIVOS	18
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1.	Preparação da solução de veneno	19
3.2.	Preparação do alopurinol	19
3.3.	Preparação do probenecid	19
3.4.	Preparação da NAC	20
3.5.	Animais, tratamentos e coleta de urina	20
3.6.	Letalidade	21
3.7.	Padronização dos controles	21
3.8.	Obtenção de rins e plasma, e medição do hematócrito	22
3.9.	Proteína total	22
3.10.	Osmolalidade, creatinina, ácido úrico e uréia	22
3.11.	Atividade creatina quinase (CK)	23
3.12.	Estresse oxidativo	23
3.13.	Preparação de frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) da medula e córtex renais	24
3.14.	Atividades aminopeptidásicas	25
3.15.	Histologia	26

3.16.	Análise dos dados.....	26
4.	RESULTADOS.....	27
4.1.	Letalidade.....	27
4.2.	Proteína e atividade aminopeptidásica das frações solúvel e de membrana do córtex e medula renais sob efeito do envenenamento e da NAC.....	29
4.3.	Parâmetros da função renal sob efeito do envenenamento e do alopurinol, probenecid e NAC.....	34
4.4.	Estresse oxidativo sob efeito do envenenamento e do alopurinol, probenecid e NAC.....	43
4.5.	Histologia.....	46
5.	DISCUSSÃO.....	48
5.1.	Agente antioxidante.....	48
5.2.	Agentes uricostáticos e uricosúricos.....	50
6.	CONCLUSÃO.....	56
7.	REFERÊNCIAS.....	58

Lista de abreviaturas

AKI = “Acute kidney injury”

AKIN = “Acute Kidney Injury Network”

AP = Aminopeptidase

APA = Aminopeptidase ácida

APB = Aminopeptidase básica

APN = Aminopeptidase neutra

BB = Borda em escova

BC = Cápsula de Bowman

BSA = Albumina do soro bovino

CK = Creatina quinase

DM = Mácula densa

DPPIV = Dipeptidil peptidase IV

DT = Túbulo distal

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FM = Fração de membrana

FS = Fração solúvel

G = Glomérulos

GMPc = Guanosina monofosfato cíclico

GSH = Glutathiona reduzida

GSSG = Glutathiona oxidada

i.m = Via intramuscular

i.p = Via intraperitoneal

IRA = Insuficiência renal aguda

MDA = Malondialdeído

NAC = N-acetil-L-cisteína

NO = Óxido nítrico

OPT = o-fitaldealdeído

p.o = Via oral

PBEDTA = Tampão fosfato 0,1 M, com 0,005 M EDTA, pH 8,0

PBS = Solução salina fosfato tamponada estéril

PLA₂ = Fosfolipase A₂

RAS = Sistema renina-angiotensina

RIFLE = “Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease”

TBA = Ácido tiobarbitúrico

$vCdt$ = Veneno de *C. d. terrificus*

1. Introdução

1.1. Envenenamento ofídico e nefrotoxicidade

Há cerca de 2.900 espécies atualmente conhecidas de serpentes (classe *Reptilia*, ordem *Squamata*, subordem *Ophidia*), distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (FRANCO, 2009). O gênero *Crotalus* pertence à família *Viperidae*. As representantes desta família são terrestres, robustas e pouco ágeis, com cabeça em formato triangular, aparelho inoculador do tipo solenóglifo (KOCHVA, 1987) e com uma característica marcante, a presença de um guizo na extremidade da cauda. Este gênero está representado no Brasil por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, com uma ampla distribuição geográfica, e subdividida em cinco subespécies: *C. d. terrificus*, nas áreas abertas do Mato Grosso do Sul, Rondônia, Amazonas e Pará; *C. d. collilineatus*, nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Distrito Federal e Goiás; *C. d. cascavella*, nas áreas da caatinga do nordeste; *C. d. ruruima*, na região norte do país, nas savanas de Roraima; *C. d. marajoensis*, na Ilha de Marajó, no Pará (MELGAREJO, 2009; PINHO; PEREIRA, 2001).

O veneno de *Crotalus* é uma mistura complexa de polipeptídeos (NUNES et al., 2007), enzimas dos tipos fosfolipase (MOREIRA et al., 2008; FAURE, et al., 2000), fosfodiesterase (MORI et al., 1987) e nucleotidase (SALES; SANTORO, 2008), além de purinas (AIRD, 2005) e outros compostos (BRAUD et al., 2000), apresentando principalmente efeitos neurotóxico e miotóxico em mamíferos. Os efeitos neurotóxico e miotóxico são produzidos principalmente pela ação da crotóxina, componente majoritário desse veneno (KATTAH et al., 2002; SAMPAIO et al., 2006; SAMPAIO et al., 2010). A crotóxina é uma neurotoxina pré-sináptica que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação da acetilcolina, causando o bloqueio da transmissão neuromuscular (SOARES et al., 2001) A crotóxina possui uma variedade de outras ações importantes, tais como analgésica, imunoregulatória, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (SAMPALIO et al., 2010). Esta molécula é composta por um complexo heterodimérico formado por uma fosfolipase A₂ (PLA₂) básica, a qual dá a característica tóxica a esse componente, e por um polipeptídeo não enzimático com propriedades ácidas, chamado crotapotina, a qual potencializa a toxicidade da PLA₂ por atuar em proteínas do tipo chaperone (SAMPALIO et al., 2010). Outro componente do veneno, também miotóxico e neurotóxico, é a crotamina, um peptídeo básico de 42

aminoácidos e três pontes dissulfeto cujo efeito mais proeminente em ratos é a paralisia dos membros posteriores, agindo em canais de sódio voltagem-dependentes (RIZZI et al., 2007). Há outras atividades atribuídas à crotamina, tais como o aumento da liberação basal de acetilcolina e dopamina e o aumento da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (OGUIURA et al., 2005). O veneno de *Crotalus durissus terrificus* também contém duas importantes neurotoxinas já caracterizadas experimentalmente, giroxina e convulxina. A convulxina é uma glicoproteína de 72 kDa que ativa as plaquetas através de um mecanismo cálcio-dependente, envolvendo a estimulação da fosfolipase C, levando à produção de segundos mensageiros, e também, estimulando efetores, como a proteína cinase C ou canais de cálcio de membrana (FAILI et al., 1994). A giroxina age sobre o sistema nervoso central provocando uma lesão labiríntica, além de outros efeitos indiretos relacionados com a sua atividade enzimática (SEKI et al., 1980; CAMILLO et al., 2001).

O envenenamento causado por picada de serpentes é reconhecido como um dos principais problemas negligenciados de saúde pública em comunidades pobres que vivem nas zonas rurais de diversos países. Por conta de uma grave falta de informação, não é conhecido o real número de picadas por serpentes no mundo, mas a Organização Mundial da Saúde estima que, anualmente, há cerca de 2.500.000 acidentes envolvendo serpentes peçonhentas, com cerca de 125.000 mortes em todo o mundo. De 1990 a 1993, o Ministério da Saúde do Brasil informou cerca de 81.611 acidentes ofídicos no país, com uma média de 20.000 casos por ano, sendo que em 2011 este número estava reduzido para 27.000 (PINHO et al., 2000; KASTURIRATNE et al., 2008; CRUZ et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). As picadas por serpentes do gênero *Crotalus* são responsáveis por 7,7% destes acidentes, e são os acidentes relacionados com este gênero que causam a maior mortalidade (cerca de 2%) entre aqueles registrados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CRUZ et al., 2009). Dentre as espécies de *Crotalus*, a *Crotalus durissus terrificus* é a que causa o maior número de acidentes no Brasil (CRUZ et al., 2009).

Por ser bem vascularizado, o rim é um órgão muito vulnerável à toxicidade dos venenos (SITPRIJA, 2006). A complicação mais grave da picada de *Crotalus*, juntamente com a insuficiência respiratória aguda, é a insuficiência renal aguda (IRA) (NEEDHAN, 2005), ou lesão, ou injúria renal aguda (mantendo a mesma sigla), termo mais consonante com a designação em inglês, “acute kidney injury” (AKI), adotada mais recentemente para categorizar um dos dois tipos mais gerais de insuficiência renal (o outro é a insuficiência renal crônica). Estudos prospectivos de 100 casos de picadas de *C. d. terrificus*, seguidas de

internação com óbito, em Goiás, Brasil, revelou uma alta prevalência de IRA (29%) nas primeiras 72 horas após a picada, com uma letalidade de 10% (PINHO et al., 2005).

A IRA é uma condição que pode decorrer de diferentes situações patológicas, resultando na perda súbita da função renal. A detecção precoce é fundamental para iniciar o tratamento, podendo reduzir a lesão renal. Processos extra e intra-renais estão envolvidos na IRA, causando o declínio da função renal (CHOUDHURY, 2010). Os processos intra-renais são os mais devastadores. Destes processos, os mais frequentes são lesão isquêmica por hipoperfusão renal, sepse, hemorragia, e lesões nefrotóxicas por toxinas tubulares. A letalidade associada à lesão renal aguda é cerca de 10 vezes maior que em indivíduos normais (CHOUDHURY, 2010). A IRA tem sido detectada com mais frequência em países em desenvolvimento, onde doenças transmissíveis, como malária, cólera, leptospirose, enterocolite e dengue, bem como a exposição a venenos animais, são também mais frequentes. Os pacientes que sobrevivem a um episódio de IRA podem ou não ter uma recuperação completa da função renal (OKUSA et al., 2009). Há mais de 35 definições diferentes na literatura para a IRA, o que dificulta a sistematização de seu estudo e o desenvolvimento de tratamentos. Muitas drogas têm sido usadas para o tratamento e prevenção da IRA, como diuréticos, manitol, dopamina, peptídeo natriurético atrial e a n-acetil-L-cisteína (NAC) (UCHINO, 2006). Até 2004, não havia critérios padronizados para o diagnóstico de IRA. Naquele ano, o grupo AKIN (Acute Kidney Injury Network) desenvolveu o sistema chamado de RIFLE (risco, lesão, falha, perda e estágio final da doença renal) através de um consenso entre especialistas de todo o mundo, com o objetivo de padronizar a definição de IRA para fins clínicos e de pesquisa. Este sistema pressupõe que há três graus de gravidade de IRA, definidos com base nas alterações da creatinina sérica ou na produção de urina, além de critérios definidos pela duração da perda da função renal (HOSTE; KELLUM, 2006; SRISAWAT; KELLUM, 2011). Em 2007, a AKIN propôs algumas modificações nos critérios do sistema RIFLE, a fim de aumentar a sensibilidade do diagnóstico (HOSTE; KELLUM, 2006; SRISAWAT; KELLUM, 2011). No entanto, os meios para definir IRA ainda assim são deficientes, cada vez mais dependentes do desenvolvimento de marcadores e menos reconhecíveis por provas funcionais e medidas diretas de lesões nos rins, embora a expectativa é de que brevemente estarão disponíveis biomarcadores mais precisos para fins de diagnóstico da IRA (HOSTE; KELLUM, 2006; SRISAWAT; KELLUM, 2011).

No caso do veneno de *C. d. terrificus* (*vCdt*) sabe-se que a IRA decorre de efeitos nefrotóxicos indiretos ou diretos. A nefrotoxicidade indireta é atribuída à miotoxicidade sistêmica, gerando rabdomiólise, uma síndrome clínico-laboratorial resultante da lesão na musculatura esquelética, liberando mioglobina e conteúdo celular no plasma (MAGALHÃES et al., 1986; ALEGRE et al., 2010). Doses subletais de veneno de *C. d. terrificus* causam rabdomiólise associada com a diminuição da taxa de filtração glomerular, sendo fortemente relacionada com a IRA (PINHO et al., 2005). A ocorrência de rabdomiólise é sinalizada pela detecção de mioglobina no soro (PINHO et al., 2000) e na urina (PINHO et al., 2000), com aumento dos níveis séricos de creatina quinase (CK), geralmente entre 4 e 8 horas após o envenenamento, podendo atingir valores extremamente elevados (100.000 UI/L) (PINHO et al., 2000). Quanto ao efeito nefrotóxico direto (na ausência de sinais de miotoxicidade) em camundongos, sabe-se que há alterações de enzimas da classe das aminopeptidases e duas características marcantes: a surpreendente incidência de 100% de hiperuricemia contra 60% de incidência de hipercreatininemia e a existência de estresse oxidativo renal (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010). Embora a hiperuricemia também tenha sido observada em humanos picados por *C. d. terrificus* (MAGALHÃES et al., 1986) e outras espécies de serpentes (KANJANABUCH; SITPRIJA, 2008), este parâmetro não tem recebido atenção como um fator relevante na etiologia da IRA, principalmente porque de acordo com as recomendações da AKIN os principais parâmetros alterados que identificam a IRA seriam os valores absolutos de creatinina sérica, uréia plasmática e volume urinário (PINHO et al., 2005; CERDÁ et al., 2008; DAVENPORT et al., 2008; MEHTA et al., 2007).

O produto final do metabolismo hepático das purinas é o ácido úrico. Os rins eliminam dois terços da carga de ácido úrico. Menos de 5% do ácido úrico é filtrado pelos glomérulos, enquanto cerca de 95% é secretada pelos túbulos proximais (RIEGERSPERGER et al., 2011). Sabe-se que em muitas situações a IRA está associada a um aumento do ácido úrico plasmático, como resultado tanto do aumento na geração, como na diminuição da excreção (EJAZ et al., 2007). A hiperuricemia maior que o valor máximo da faixa normal (FEIG et al., 2008; SANCHEZ-LOZADA et al., 2008) conduz à IRA principalmente pela deposição intrarenal de cristais de urato (STAVRIC et al., 1969; BRADLEY; CASKEY, 1994), mas ratos com uricemia quase três vezes superior ao valor mínimo da faixa normal (hiperuricemia leve) (FEIG et al., 2008; SANCHEZ-LOZADA et al., 2008), como a causada em camundongos pelo *vCdt* (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010), desenvolvem também hipertensão arterial sistêmica, doença renal intersticial, arteriopatía aferente, aumento da

expressão de renina (MAZZALI et al., 2002; KHOSLA et al., 2005) e hipertrofia glomerular (NAKAGAWA et al., 2003). Experimentalmente, o aumento da uricemia em ratos pode induzir estas disfunções por mecanismos independentes da deposição de cristais, tais como a estimulação do sistema renina-angiotensina (RAS) (YU et al., 2010), inibição da óxido nítrico (NO) sintase (MAZZALI et al., 2001), estimulação da arginase (ZHARIKOV et al., 2008) ou aumento de proteína C-reativa (KANG et al., 2005a) e da reação direta do ácido úrico com NO para formar 6-aminouracil (GERSCH et al., 2008). Também, foi relatado que a hiperuricemia leve em ratos podem induzir estresse oxidativo no rim (SANCHEZ-LOZADA et al., 2008), no endotélio (YU et al., 2010) e em células musculares lisas vasculares (CORYY et al., 2008), bem como em adipócitos (SAUTIN et al., 2007). No entanto, paradoxalmente, o ácido úrico tem sido considerado como um potente antioxidante circulante que reage com o ânion superóxido, peroxinitrito, radicais quelatos à base de ferro (BECKER, 1993) e previne a inativação oxidativa da superóxido dismutase extracelular (HINK et al., 2002). Há relatos de que altos níveis plasmáticos (AMES et al., 1981) ou a infusão de ácido úrico (WARING et al., 2001) em humanos aumentam a atividade antioxidante no plasma.

De qualquer modo, na IRA, em especial na IRA induzida por *vCdt*, parece bastante sugestiva a relação entre estresse oxidativo e teor de ácido úrico. A controvérsia em relação aos efeitos do ácido úrico no equilíbrio redox e sobre o envolvimento do ácido úrico e do estresse oxidativo na IRA induzida em camundongos pelo *vCdt* são fortes motivações para usar esse envenenamento como um modelo experimental para o estudo da IRA. Além disto, e principalmente, ainda que estudos clínicos demonstrem que o soro antiveneno é altamente eficaz na neutralização de toxinas responsáveis pelos efeitos do *vCdt*, persiste no Brasil uma incidência de letalidade em 5% dos pacientes envenenados por *Crotalus* tratados com a soroterapia e em 72% dos pacientes envenenados sem tratamento soroterápico (PINHO, 2000).

1.2. NAC como antioxidante e nefroprotetora

A NAC é um antioxidante tiol para o qual há poucos relatos de efeitos colaterais (MILLEA, 2009). Classicamente conhecida como mucolítica, a NAC é usada especialmente em pacientes com problemas respiratórios (FOK, 2009) e como profilática contra nefropatias induzidas por contraste radiográfico (ELLIS; COHAN, 2009). A NAC é capaz de eliminar uma grande variedade de espécies reativas do oxigênio (EROs) e aumentar os níveis

intracelulares de glutathione (BRIGUORI et al., 2011; NITESCU et al., 2006; PALLER; FERRIS, 1984; THIELEMANN; ROSENBLUT, 1990). Em condições patológicas, as EROs são produzidas em quantidades excessivas, induzindo peroxidação lipídica, inativação de enzimas antioxidantes, quebra de DNA, ativação de leucócitos, danos em células endoteliais e produção de citocinas, fatores esses que contribuem para danos teciduais (KIM et al., 2010). O efeito nefroprotetor da NAC tem sido evidenciado em modelo animal de danos renais causados por isquemia (NITESCU et al., 2006) e modelo de anóxia renal *in vitro* (PALLER; FERRIS, 1984), permitindo hipotetizar que também possa ocorrer na disfunção renal causada por *vCdt*.

Dentre os antioxidantes tióis, a NAC é reconhecida como uma das menos tóxicas. Sua toxicidade letal é comparável com a da glutathione, e a toxicidade comportamental (atividade locomotora) é praticamente nula (MILLEA, 2009). Por isso, a possibilidade de seu uso em diferentes doenças tem sido intensamente avaliada (ANDRADE et al., 2004; ERDOGAN et al., 2006; MILLEA, 2009; NITESCU et al., 2006; PALLER; FERRIS, 1984). A NAC vem sendo utilizada como profilaxia da obstrução pulmonar crônica, influenza, fibrose pulmonar idiopática e síndrome do ovário policístico, entre outras. Nestes casos, seu efeito terapêutico é atribuído à sua potente ação antioxidante (MILLEA, 2009). Além disso, seu uso preventivo também tem sido preconizado clinicamente em disfunções de causas isquêmica e/ou tóxica (ANDRADE et al., 2004). Embora seu efeito nefroprotetor tenha sido consistentemente evidenciado (ELLIS; COHAN, 2009; ERDOGAN et al., 2006; MILLEA 2009; NITESCU et al., 2006; PALLER; FERRIS, 1984), a extensão, mecanismos e eventuais efeitos colaterais da NAC não estão completamente elucidados. Atualmente, sabe-se que o aumento dos níveis intracelulares de glutathione protege *in vitro* os túbulos proximais renais da anóxia (PALLER; FERRIS, 1984). Sabe-se, também, que o grupo tiol da NAC combina-se com o NO, formando S-nitrosotiol, uma forma mais estável de NO e um potente ativador da guanilato-ciclase solúvel, a qual aumenta a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), o que significa que a NAC ajuda a preservar as várias funções da NO e estimula a via analgésica intracelular arginina/NO/GMPc da qual, por exemplo, depende o efeito antinociceptivo periférico dos opióides (CRAVEN; DE RUBERTIS, 1978; VAN GILST et al., 1991) .

1.3. Alopurinol

A principal propriedade do alopurinol é diminuir a concentração de ácido úrico e uratos relativamente insolúveis em tecidos, plasma e urina. O alopurinol bloqueia a formação de ácido úrico, reduzindo sua síntese por inibição competitiva da xantina oxidase (DAY et al., 2007). O alopurinol é rapidamente e extensivamente metabolizado, formando oxipurinol, e sua eficácia hipouricêmica é devida em grande parte a este metabólito (DAY et al., 2007). O alopurinol é aprovado pela Food and Drug Administration (EUA) para uso em dose de até 800 mg / dia e está disponível comercialmente como um medicamento genérico de baixo custo (CHAO; TERKELTAUB, 2009). Apesar de seu efeito hipouricêmico altamente confiável, entre 2-8% dos usuários do alopurinol podem ter reações adversas, desde o tipo cutâneo até uma rara síndrome, denominada de Stevens-Johnson, cuja incidência anual é de 1-2 casos por milhão (MOCKENHAUPT, 2011) e que implica numa hipersensibilidade a este medicamento que pode causar a morte em até 27% dos casos (RYU et al., 2012).

1.4. Probenecid

A excreção urinária é a principal via de eliminação de uma grande variedade de xenobióticos e compostos intrínsecos. Os mecanismos que contribuem para esta excreção estão intimamente relacionados com os sistemas renais de transporte de ânions orgânicos (VAN AUBEL et al., 2000). Estes sistemas têm um papel central na eliminação de um grande número de drogas, substâncias tóxicas e seus metabolitos (SHIN et al., 2011). Assim é que o probenecid foi inicialmente aplicado com o objetivo de inibir a excreção tubular de penicilina, aumentando a concentração plasmática do antibiótico (BEYER et al., 1950; SHIN et al., 2011), e posteriormente descobriu-se que promove a excreção renal de urato, inibindo a sua reabsorção tubular (CHOHAN; BECKER, 2009; ROBBINS et al., 2012). Esta indução da excreção de ácido úrico na urina, sem influência em sua formação (GEORGE et al., 2006), ocorre pela inibição do transportador de ânions orgânicos, bloqueando a entrada de ácido úrico nas células, principalmente no túbulo proximal renal (KANG et al., 2005b; PRINCE et al., 2006; ROBBINS et al., 2012).

O probenecid é um fármaco insolúvel em água que, quando administrado por via oral, é quase completamente absorvido pela corrente sanguínea, através do trato intestinal, onde se liga a proteínas do plasma (CUNNINGHAM et al., 1981). Os metabolitos do probenecid têm

menor afinidade às proteínas do plasma, são menos solúveis em lipídeos, e são rapidamente excretados pelo rim (GUTMAN et al., 2012). A dose máxima de probenecid sem efeitos colaterais significativos é de 3 g em adultos, em geral administrada em uma dose oral diária única de 2 g (aproximadamente de 25 mg / kg de massa corporal). O probenecid tem uma meia-vida sérica de cerca de 4-6 horas, e é metabolizado pelo fígado por meio da oxidação de suas cadeias laterais (GUTMAN et al., 2012; ROBBINS et al., 2012).

O probenecid tem pouca ou nenhuma toxicidade hemopoiética, renal, ou hepática (BOGER; STRICKLAND, 1955; GUTMAN et al., 2012). Um efeito colateral comumente observado é o desenvolvimento de pedras de urato nos rins, pois devido à inibição da reabsorção de ácido úrico nos túbulos, seu conteúdo no fluido urinário aumenta. Como o ácido úrico e os correspondentes sais de urato têm uma solubilidade baixa em água, pode ocorrer formação de precipitados destes sais (GUTMAN et al., 2012).

2. Objetivos

- Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo e do ácido úrico no desenvolvimento da IRA induzida por *vCdt*;
- Evidenciar potenciais agentes farmacológicos complementares à soroterapia para o tratamento do envenenamento por picada de serpentes do gênero *Crotalus*.

Para isso, foram analisados os efeitos de droga antioxidante (NAC) sobre aminopeptidases potencialmente marcadoras da função renal e da NAC e de drogas uricostática (alopurinol) e uricosúrica (probenecid) sobre hematócrito, proteína, osmolalidade, creatinina, ácido úrico e uréia (no plasma e na urina), proteína em fração solúvel (FS) e de membrana (FM) do córtex e medula renais e estresse oxidativo (relação glutationa oxidada [GSSG] / reduzida [GSH] e teor de malondialdeído [MDA]) no córtex e medula renais de camundongos inoculados com *vCdt*, comparativamente a controles sadios.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação da suspensão de veneno

1,0 mg de veneno liofilizado (fornecido pelo Instituto Butantan, lote do ano de 2001) foi suspenso em 1,0 mL de solução salina fosfato tamponada estéril (PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19,3 g / L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,9 g / L de NaCl , 8,77 g / L, pH 7,4), sob leve agitação por 10 min, a 4°C e, em seguida, centrifugado a 10.192 x g por 20 min a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec, Brasil). O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi alíquotado e estocado a -20°C por um tempo máximo de uma semana e administrado por via intraperitoneal (i.p), para promoção de efeito renal predominantemente direto (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010), e por via intramuscular (no músculo gastrocnêmio) (i.m), para promoção de efeito renal preconizado como predominantemente indireto. A tentativa de confirmação desta predominância foi avaliada por medida de creatina quinase no plasma. A dose utilizada (80% DL50 i.p) foi de 1,024 µg de veneno / 20 g de massa corporal em volumes máximos de 0,2 mL para i.p e de 50 µL para i.m (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010).

O mesmo lote de veneno foi usado ao longo de todo este estudo.

3.2. Preparação do alopurinol

O alopurinol (4-hidroxipirazolo [3,4-d] pirimidina) (Sigma, EUA) foi dissolvido em NaOH 1M para uma concentração de 50 mg / mL e posteriormente diluído (1:5) em PBS imediatamente antes da administração por via oral, por gavagem (p.o), na dose de 2 mg / 20 g de massa corporal em um volume máximo de 0,2 mL (AHMAD et al., 2008).

3.3. Preparação do probenecid

O probenecid (ácido 4-[dipropilsulfamoil] benzóico) (Sigma, EUA) foi dissolvido em NaOH 1M para uma concentração de 600 mg / mL e posteriormente diluído (1:5) em PBS antes da administração p.o na dose de 24 mg / 20 g de massa corporal em um volume máximo de 0,2 mL (YAMADA et al., 1999).

3.4. Preparação da NAC

A NAC (Sigma) foi dissolvida em PBS para uma concentração de 30 mg / mL, no momento do uso, e administrada p.o na dose de 6 mg / 20 g massa corporal (WHITEHOUSE et al., 1985), num volume máximo de 0,2 mL.

3.5. Animais, tratamentos e coleta de urina

Camundongos Swiss machos, pesando 18-20 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto Butantan, foram mantidos em gaiolas de polietileno, com no máximo 10 animais por caixa (medidas internas de comprimento x largura x altura = 56 x 35 x 19 cm) com alimento e água *ad libitum*, em uma estante ventilada com temperatura controlada de 25°C, umidade relativa de 65,3 ± 0,9% e fotoperíodo de 12 horas: 12 horas, claro: escuro (início do período claro às 06:00 am). Os animais e protocolos utilizados neste estudo estão de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan sob o número 717/10.

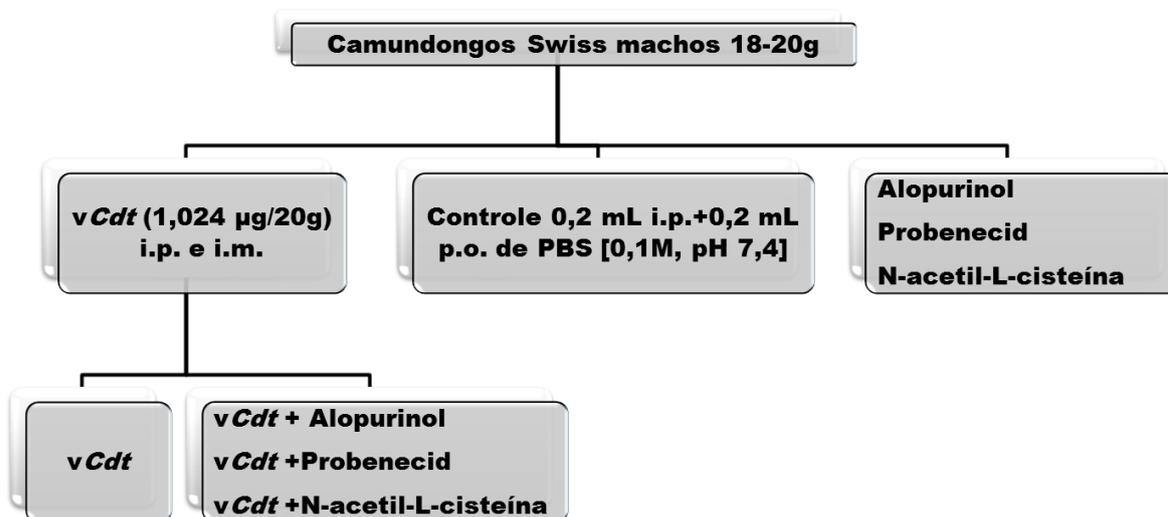


Figura 1 – Esquema sumário do protocolo de tratamento dos animais.

Os animais foram divididos em doze grupos, que receberam: (1) PBS 0,2 mL, i.p (controle i.p), (2) 0,2 mL de PBS, p.o (controle p.o); (3) 0,2 mL de PBS i.p, e após 2 h, 0,2 mL PBS, p.o (controle i.p+p.o); (4) 50 µL de PBS por 20 g de massa corporal, i.m (controle

i.m); (5) 6 mg de n-acetil-L-cisteína em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (NAC); (6) 2 mg de alopurinol em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (NL); (7) 24 mg de probenecid em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (PB); (8) 1,024 µg de *vCdt* em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, i.p (80%DL50) (*vCdt* i.p); (9) 1,024 µg de *vCdt* em 50 µL de PBS por 20 g de massa corporal, i.m (*vCdt* i.m); (10) 1,024 µg de *vCdt* em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, i.p (80%DL50) e, após 2 h, 6 mg n-acetil-L-cisteína em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (*vCdt*+NAC); (11) 1,024 µg de *vCdt* em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, i.p (80%DL50) e, após 2 horas, 2 mg de alopurinol em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (*vCdt*+NL); (12) 1,024 µg de *vCdt* em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, i.p (80%DL50) e, após 2 h, 24 mg de probenecid em 0,2 mL de PBS por 20 g de massa corporal, p.o (*vCdt*+PB). Imediatamente após os tratamentos, cada grupo foi colocado em gaiolas metabólicas apropriadas para a coleta de urina, a qual foi realizada durante as 24 horas subseqüentes à injeção do veneno ou PBS ou somente drogas. O *pool* de urina coletado foi centrifugado a 2564 x g, por 5 min, a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec, Brasil); o sobrenadante foi armazenado a -80° C para os procedimentos seguintes e o *pellet* foi descartado. Os animais foram anestesiados para coleta de sangue e rins, imediatamente após a coleta de urina.

3.6. Letalidade

A letalidade foi avaliada 24 horas após a administração de veneno, PBS ou somente das drogas.

3.7. Padronização dos controles

Considerando que os controles avaliados (i.p, p.o e i.p+p.o) apresentaram valores semelhantes de mortalidade, creatinina, ácido úrico e uréia, selecionou-se como referência para a análise comparativa com os grupos tratados, o grupo controle que recebeu o veículo (PBS) pelas vias i.p e p.o (grupo i.p+p.o), já que neste grupo as vias de administração de veneno e drogas utilizadas no estudo foram simuladas simultaneamente.

3.8. Obtenção de rins e plasma, e medição do hematócrito

Os animais, sob anestesia com xilazina (Calmiun, Agener União, Brasil), 0,1% e cetamina (Cetamin, Syntec, Brasil) 1% (i.p, 0,2 mL/20 g de massa corporal), tiveram o sangue coletado com uma pipeta Pasteur com heparina, após corte no plexo axilar direito. Então, a cavidade torácica foi aberta para realização da perfusão cardíaca com PBS 50 mM, durante um período de 5 min, com um fluxo de 8-10 mL / min.

Imediatamente após a perfusão, os rins foram retirados, congelados em gelo seco e armazenados por um período máximo de 10 dias, a -80° C, até a utilização nos procedimentos seguintes.

A medição do hematócrito foi feita em duplicatas de amostras individuais, em microtubos capilares de hematócrito, centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, em centrífuga de microhematócrito (centrífuga H240 modelo HT, Brasil), em temperatura ambiente.

Para a obtenção de plasma, o sangue foi centrifugado individualmente em 5232 x g por 5 min, a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec).

3.9. Proteína total

A proteína total foi medida fotometricamente (Bio-Tek Power Wave espectrofotômetro XR), a 630 nm, em triplicatas de amostras de plasma (diluídos 500 vezes) e *pool* de urina (diluída 75 vezes), pelo método de Bradford (1976), usando reagente Bio-Rad (Hercules, EUA). O teor de proteína foi extrapolado por comparação com uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma) no mesmo diluente.

3.10. Osmolalidade, creatinina, ácido úrico e uréia

As medições foram realizadas conforme descrito por Marinho et al. (2006). Resumidamente, a osmolalidade foi determinada em triplicatas de 10 µL de plasma individual e *pool* de urina com um osmômetro crioscópico (Osmette II Fisher). A creatinina foi quantificada por fotometria, a 500 nm, em triplicatas de 20 µL de plasma individual e *pool* de urina, com o kit creatinine Fast (Laborlab, Brasil). O ácido úrico foi quantificado por fotometria, a 505 nm, em triplicatas de 5,4 µL de plasma individual e *pool* de urina, com kit Ácido Úrico UOD-PAD (Laborlab, Brasil). A uréia foi quantificada por fotometria, a 340 nm,

em triplicatas de 3 μ L de plasma individual e *pool* de urina, com kit Uréia UOD-PAD (Laborlab, Brasil).

3.11. Atividade creatina quinase (CK)

A atividade de CK foi medida por fotometria (Bio-Tek Wave Power XR espectrofotômetro), a 340 nm, em triplicatas de 5,8 mL de amostras individuais de plasma (diluído 5 vezes) com 290 mL de solução reativa, usando o kit cinética CK-NAC (Laborlab, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade de CK foi expressa como unidade de CK / L (U / L), que é a quantidade de enzima necessária para fosforilar 1 nmol de creatina / min, a 37°C.

3.12. Estresse oxidativo

Foi avaliado no córtex e na medula de rins dissecados e armazenados a -80°C, por meio da medida dos teores de GSSG e GSH, como descrito por Yamasaki et al. (2008). Para isto, o córtex e a medula foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo 0,005 M EDTA (PBEDTA) acrescido de 5,26% HPO_3 (0,1 g de tecido / 1,5 mL PBEDTA e 0,4 mL de HPO_3 25%), a 800 rpm por 3 min com homogeneizador (Tecnal, modelo Te-099, Brasil). Estes homogeneizados foram ultracentrifugados (Hitachi modelo HIMAC CP60E, Japão) a 100.000 x g por 30 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado imediatamente, conforme descrito abaixo. Todas as etapas foram realizadas a 4° C.

O GSH foi avaliado da seguinte forma: 100 μ L do sobrenadante foi diluído em PBEDTA (1:10) e homogeneizado por inversão dos tubos. Assim, 100 μ L desta solução foi misturada com 170 μ L de PBEDTA e 30 μ L de o-fitaldealdeído (OPT) (OPT 0.003 g / 60 μ L de etanol PA), e incubados por 15 min a 25° C. Então, a leitura foi realizada. Valores do branco para GSH foram obtidos pela leitura de 270 μ L de PBEDTA mais 30 μ L de OPT. O GSSG foi avaliado da seguinte forma: 56,7 μ L do sobrenadante foi incubado com 22,7 μ L de n-etilmaleimida 0,1 M (Sigma) por 30 min a 25° C. Após esta incubação, 300 μ L de NaOH 0,1 M foi adicionado em 50 μ L da última mistura, que foi homogeneizada por inversão dos tubos. Assim, 100 μ L do homogenato foi incubado por 15 min a 25° C com 170 μ L de NaOH 0,1 M e 30 μ L OPT e, após, a leitura foi realizada. Os valores do branco para GSSG foram obtidos. As medidas fluorimétricas de GSH e GSSG foram estimadas em 460/40 nm de

emissão e 360/40 nm de excitação. Os valores de fluorescência foram convertidos para $\mu\text{g} / \text{mL}$, em comparação com uma curva padrão.

O MDA foi medido com base no método descrito por Selmanoglu et al. (2011). A solução de reação foi preparada com 90 μL de SDS 8,1%, 675 μL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5 ajustado com NaOH), e 675 μL de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%. 90 μL de tecido homogeneizado (10% [0,1 g / mL] preparado em 1,15% de KCl), homogeneizado por 3 min a 11000 rpm (homogeneizador Polytron PT-MR 2100), foi adicionado a esta solução e, em seguida, o volume foi completado até 1,8 mL com água destilada. Esta mistura foi mantida em um banho seco a 98°C por cerca de 1 hora, e subsequentemente centrifugada a 2500 X g durante 10 min a 4°C (microcentrífuga CT-14000R, Cientec). O sobrenadante foi medido a 532 nm. O ensaio utilizado quantifica o MDA, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA (Figura 2), produzindo um composto de cor avermelhada, medido espectrofotometricamente. A formação do composto TBA-MDA é possivelmente iniciada pelo ataque nucleofílico, envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguido de desidratação e reação similar subsequente do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA. A quantificação de MDA é feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA. O padrão utilizado foi o 1,1,3,3-tetraetoxipropano que, incubado com TBA nas condições supramencionadas, sofre hidrólise, resultando na liberação do MDA (OSAWA et al., 2005).

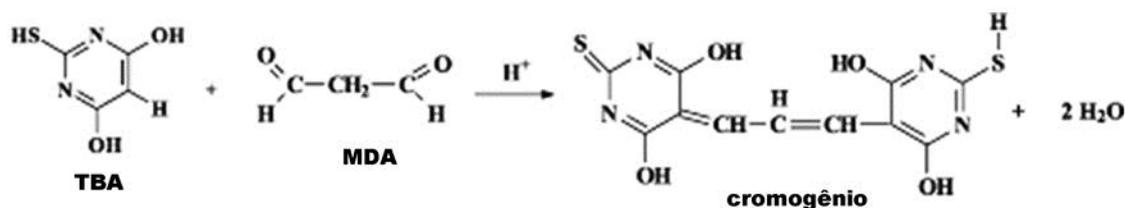


Figura 2 – Reação entre TBA e MDA (OSAWA et al., 2005).

3.13. Preparação de FS e FM da medula e córtex renais

A medula e o córtex foram separados por dissecação e submetidos à homogeneização em 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,4, (0,005 g de tecido / mL), por 3 min a 800 rpm (homogeneizador Tecnal TE 099) e, em seguida, ultracentrifugados a 100.000 X g, por 35

min (ultracentrífuga Hitachi model HIMAC CP60E). Os sobrenadantes obtidos, correspondentes a FS, foram utilizados para medir as atividades enzimáticas e o teor proteico. Os pellets resultantes foram lavados três vezes com o mesmo tampão, para garantir a retirada de toda FS, homogeneizados por 3 min a 800 rpm, em tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4 acrescido de Triton X-100 (0,1%) e, em seguida, ultracentrifugados a 100.000 X g, por 35 min. Os sobrenadantes obtidos, correspondentes a FM, foram utilizados para determinar as atividades enzimáticas e o teor proteico. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. A eficiência deste processo de fracionamento renal foi aferida em investigações prévias pela medida comparativa de desidrogenase láctica em FS e FM (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010).

3.14. Atividades aminopeptidásicas

As atividades de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) foram mensuradas em amostras individuais de FS e FM da medula e córtex renal, com base na quantidade de 4-metoxi- β -naftilamina (Sigma) (para DPPIV) ou β -naftilamina (Sigma) (para as demais AP) liberada pela atividade enzimática das amostras incubadas a 37°C, por 30 min, em microplacas de 96 poços (Corning Inc., EUA), com solução de substratos diluídos a 0,125mM para APA e APN, ou 0,2mM para DPPIV, ou 0,5mM para APB, em seus respectivos tampões 0,05M contendo 0,1 mg / mL de BSA. A quantidade de β -naftilamina ou 4-metoxi- β -naftilamina foi estimada fluorimetricamente, utilizando o leitor de microplaca (Bio-Tek FL600FA) no comprimento de onda de emissão de 460/40 nm e comprimento de onda de excitação de 360/40 nm. As atividades foram expressas como picomoles de substrato hidrolisado/min/mg proteína.

A atividade APA foi medida utilizando 100 μ L de FS ou FM, incubado com 200 μ L de L-ácido aspártico α (β -naftilamida) (Sigma) em tampão Tris-HCl, pH 7,4 com 1mM MnCl₂.

A atividade APB foi medida utilizando 20 μ L de FS ou FM (diluído 5 vezes), incubado com 280 μ L de L-arginina- β -naftilamida (Sigma) em tampão fosfato, pH 6,5 com NaCl 150mM e puromicina 0,02mM (Sigma).

A atividade APN foi medida utilizando 20 μ L de FS ou FM (diluído 5 vezes), incubado com 280 μ L de L-alanina- β -naftilamida em tampão fosfato, pH 7,4 com DL-ditiotreitol 1mM (Sigma).

A atividade DPPIV foi medida utilizando 20 µL de FS (diluído 20 vezes) ou FM (diluído 50 vezes), incubado com 280 µL de H-Gly-Pro-4-metoxi-β-naftilamida (Península, EUA) em tampão Tris-HCl, pH 8,3.

3.15. Histologia

Os rins foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em NaOH 0,1 M e tetraborato de sódio 0,1 M e submetidos aos processamentos histológicos de rotina. As secções sagitais de 10 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina para exame sob microscopia de campo claro.

3.16. Análise dos dados

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M) e foram analisados utilizando os programas computacionais InStat™ e GraphPad Prism™. A análise de regressão foi realizada para calcular as curvas-padrão de proteína, naftilamina, NADH, GSG/GSSG e 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Foram utilizados o teste t de Student, para comparação de duas médias, e a análise de variância (ANOVA), seguida, quando foram detectadas diferenças, pelo teste de Newman-Keuls, para comparar mais de dois valores. Os dados de letalidade foram analisados pelo teste de Fisher. Em todos os cálculos foi fixado o nível de significância mínimo de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Letalidade

Grupos de animais injetados com volume de 50 μ L de veículo (n=4) e de *vCdt* (n=4) i.m (na mesma dose de 80% da DL50 pela via i.p) apresentaram sobrevida de 100% e foram constituídos exclusivamente para medida da atividade CK, a qual por sua vez foi utilizada como estimativa da ausência ou ocorrência de miólise, comparativamente aos animais injetados com *vCdt* i.p. A Tabela 1 mostra que a letalidade de 80% da DL50 do *vCdt* pela via i.p (43%) foi próxima do teoricamente esperado (40%) e não diferiu estatisticamente do grupo *vCdt* tratado com a NAC (33%) e com o probenecid (25%). Não houve mortalidade em todos os grupos controles e naqueles só tratados com NAC, alopurinol ou probenecid. Porém, houve uma redução estatisticamente significativa de cerca de 58% (de 43% para 18%) da letalidade no grupo *vCdt* tratado com alopurinol.

Tabela 1 - Avaliação da letalidade 24 horas após a administração intraperitoneal (i.p) e/ou por via oral (p.o) do veículo (controle i.p, controle p.o, controle i.p+p.o), n-acetil-L-cisteína (p.o) (NAC), alopurinol (p.o) (NL), probenecid (p.o) (PB) e veneno de *Crotalus durissus terrificus* (i.p) (*vCdt*) seguido de NAC (p.o) (*vCdt*+NAC), NL (p.o) (*vCdt*+NL) ou PB (p.o) (*vCdt*+PB), após 2 horas.

.Tratamentos	Números de camundongos	Letalidade (%)
Controle i.p	5	0
Controle p.o	6	0
Controle i.p+p.o	5	0
NAC	6	0
NL	9	0
PB	10	0
<i>VCdt</i>	40	40*
<i>vCdt</i>+NAC	18	33*
<i>vCdt</i>+NL	40	18
<i>vCdt</i>+PB	36	25*

Teste exato de Fisher bicaudal (controle i.p, controle p.o e controle i.p+p.o foram agrupados, n=16, para compor um único grupo controle para a aplicação do teste): *vCdt* p<0,003; *vCdt*+NAC p<0,020 e *vCdt*+PB p<0,044; *vCdt*+NAC p=0,772; *vCdt*+PB p=0,223.

4.2. Proteína e atividade aminopeptidásica de FS e FM do córtex e medula renais sob efeito do envenenamento e da NAC

Na Tabela 2 observa-se que o *vCdt* aumentou o teor proteico na FS do córtex renal, enquanto os demais tratamentos não causaram alterações. *vCdt* e NAC, isoladamente ou em associação, não afetaram a atividade APB. O envenenamento aumentou a atividade APN na FS do córtex renal, e a NAC, embora sem efeito isoladamente, restaurou esta atividade, ao nível dos controles.

A Tabela 3 mostra que o *vCdt* aumentou o teor proteico da FM do córtex renal, o qual foi reduzido pela NAC a níveis ainda mais baixos que os do controle. A atividade APA foi diminuída pelo *vCdt*. A atividade APN da FM do córtex renal não foi afetada pelo *vCdt* ou pela NAC isoladamente, mas a associação de *vCdt* e NAC promoveu um aumento desta atividade. A NAC aumentou e o *vCdt* diminuiu a atividade DPPIV na FM do córtex renal. A NAC elevou a atividade DPPIV em animais envenenados a níveis superiores aos dos controles.

A Tabela 4 mostra que o *vCdt* ou NAC não alteraram o teor proteico da FS da medula renal. O *vCdt* aumentou a atividade APN na FS da medula renal. A administração de NAC resultou numa diminuição da atividade APN dos envenenados ao nível dos controles.

A Tabela 5 mostra que quando a NAC foi administrada nos animais envenenados por *vCdt*, o teor proteico da FM da medula renal decaiu. O *vCdt* diminuiu a atividade APA na FM da medula renal. O *vCdt* aumentou a atividade APN na FM da medula renal. A NAC, embora sem efeito isoladamente, restaurou esta atividade ao nível dos controles nos animais envenenados. A NAC, isoladamente ou em associação com o veneno, aumentou a atividade DPPIV na FM da medula renal, ainda que este veneno isoladamente não tenha apresentado efeito sobre essa atividade enzimática nesta fração.

Tabela 2 - Proteína e atividades de aminopeptidase básica (APB), neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) da fração solúvel do córtex renal de camundongos administrados com PBS oral (p.o) e intraperitoneal (i.p) (controle), ou veneno de *C. d. terrificus* (i.p) (*vCdt*) e tratados ou não com n-acetil-L-cisteína (p.o) (NAC), após 2 horas.

Grupos	Proteína (mg/mL)	Atividades aminopeptidásicas (UP/mg proteína)		
		APB	APN	DPPIV
Controle	4,2±0,3 (12) ^a	16537±6059 (12)	12959±1286 (12) ^a	4393±446 (6)
NAC	4,6±0,2 (8) ^a	13811±1727 (8)	13407±2274 (8) ^a	6164±1536 (8)
<i>vCdt</i>	7,7±0,3(6) ^b	9582±842 (6)	22645±1476 (6) ^b	1418±194 (6)
<i>vCdt</i> +NAC	4,2±0,1 (5) ^a	9648±1206 (5)	13811±1098 (6) ^a	7094±2142 (6)
ANOVA	p<0,0001	p=0,6902	p=0,0017	p=0,0490

Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

UP = picomoles de substrato hidrolisado/min.

Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs NAC vs *vCdt* vs *vCdt*+NAC (letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa).

Tabela 3 - Proteína e atividades de aminopeptidase ácida (APA), neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) da fração de membrana solubilizada do córtex renal de camundongos administrados com PBS oral (p.o) e intraperitoneal (i.p) (controle), ou veneno de *C. d. terrificus* (i.p) (*vCdt*) e tratados ou não com n-acetil-L-cisteína (p.o) (NAC), após 2 horas.

Grupos	Proteína (mg/mL)	Atividades aminopeptidásicas (UP/mg proteína)		
		APA	APN	DPPIV
Controle	2,8±0,1 (12) ^a	1123±167 (12) ^a	50243±4435 (12) ^a	32428±6024 (12) ^a
NAC	1,5±0,08 (8) ^b	808±71 (6) ^a	39956±8446 (8) ^a	137176±19145 (7) ^b
<i>vCdt</i>	7,9±0,2 (6) ^c	175±15 (6) ^b	42982±2595 (6) ^a	7141±683 (6) ^a
<i>vCdt</i> +NAC	1,5±0,1 (5) ^b	0 (6) ^b	69861±5055 (6) ^b	89575±6175 (6) ^c
ANOVA	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0131	p<0,0001

Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

UP = picomoles de substrato hidrolisado/min.

Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs NAC vs *vCdt* vs *vCdt*+NAC (letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa).

Tabela 4 - Proteína e atividades de aminopeptidase básica (APB), neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) da fração solúvel da medula renal de camundongos administrados com PBS oral (p.o) e intraperitoneal (i.p) (controle), ou veneno de *C. d. terrificus* (i.p) (*vCdt*) e tratados ou não com n-acetil-L-cisteína (p.o) (NAC), após 2 horas.

Grupos	Proteína (mg/mL)	Atividades aminopeptidásicas (UP/mg proteína)		
		APB	APN	DPPIV
Controle	3,4±0,3 (12)	38289±12695 (12)	13302±1871 (12) ^a	1408±184 (6) ^a
NAC	3,9±0,3 (8)	19333±1769 (8)	20037±2870 (8) ^a	7806±2558 (6) ^b
<i>vCdt</i>	3,4±0,1 (6)	21904±1978 (6)	45637±2416 (6) ^b	2341±217 (6) ^a
<i>vCdt</i> +NAC	3,8±0,1 (5)	13684±1795 (6)	16541±1964 (6) ^a	5828±644 (6) ^{ab}
<i>ANOVA</i>	p=0,4805	p=0,2725	p<0,0001	p=0,0089

Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

UP = picomoles de substrato hidrolisado/min.

Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs NAC vs *vCdt* vs *vCdt*+NAC (letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa).

Tabela 5 - Proteína e atividades de aminopeptidase ácida (APA), neutra (APN) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) da fração de membrana solubilizada da medula renal de camundongos administrados com PBS oral (p.o) e intraperitoneal (i.p) (controle), ou veneno de *C. d. terrificus* (i.p) (*vCdt*) e tratados ou não com n-acetil-L-cisteína (p.o) (NAC), após 2 horas.

Grupos	Proteína (mg/mL)	Atividades aminopeptidásicas (UP/mg proteína)		
		APA	APN	DPPIV
Controle	2,7±0,1 (12) ^a	1191±185 (12) ^a	55130±6125 (12) ^a	37325±4969 (12) ^a
NAC	1,2±0,3 (8) ^b	1014±139 (7) ^a	60884±10992 (7) ^a	155991±28523 (8) ^b
<i>vCdt</i>	3,6±0,7 (6) ^a	388±38 (6) ^b	99795±11575 (6) ^b	11160±2653 (6) ^a
<i>vCdt</i> +NAC	1,2±0,1 (5) ^b	0 (6) ^b	76325±4203 (6) ^a	72513±10578 (5) ^a
ANOVA	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0047	p<0,0001

Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

UP = picomoles de substrato hidrolisado/min.

Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs NAC vs *vCdt* vs *vCdt*+NAC (letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa).

4.3. Parâmetros da função renal sob efeito do envenenamento e do alopurinol, probenecid e NAC

As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, que o hematócrito e a osmolalidade plasmática não diferiram entre os grupos analisados. A Figura 3 mostra que, relativamente ao controle (animais sadios não envenenados e sem tratamento), a osmolalidade urinária foi diminuída pelo *vCdt*. O alopurinol e o probenecid isoladamente causaram um aumento da osmolalidade urinária nos animais sadios, mas apenas o tratamento de animais envenenados com alopurinol restaurou este parâmetro para os níveis do grupo controle. A NAC, isoladamente, promoveu hiperosmolalidade urinária nos animais sadios e, paradoxalmente, agravou a hipo-osmolalidade urinária causada pelo *vCdt*.

A Figura 5 mostra que o alopurinol ou o *vCdt* isoladamente, ou a associação do *vCdt* com o probenecid causaram hipercreatininemia, em comparação com o controle (i.p+p.o), mas os animais envenenados tratados com alopurinol tiveram uma melhora na creatinemia. A associação do *vCdt* com o probenecid causou hipocreatinúria. O *vCdt* e a NAC, isoladamente, ou a associação do *vCdt* com a NAC produziram hipercreatinemia

A Figura 6 mostra que o aumento da uricemia induzida por *vCdt* foi normalizado pelo alopurinol e pelo probenecid. Em relação ao controle, o ácido úrico urinário foi diminuído pelo *vCdt*. O conteúdo urinário de ácido úrico nos animais envenenados foi normalizado somente pelo tratamento com o probenecid. A hiperuricemia produzida pelo *vCdt* também foi totalmente revertida pela NAC. Nenhuma das drogas afetou significativamente o teor de ácido úrico urinário nos animais sadios.

Na Figura 7, observa-se que, comparado com o controle, o alopurinol isoladamente causou hipouremia em animais sadios. Analisando os parâmetros urinários, a uréia não foi afetada pelos tratamentos uricostático e uricosúrico nos animais sadios e envenenados. A NAC isoladamente produziu hipouremia nos animais sadios e envenenados. A NAC, isoladamente ou associada ao *vCdt*, reduziu ligeiramente o teor de uréia urinária.

A Figura 8 mostra que o *vCdt* diminuiu os níveis de proteína plasmática. O alopurinol associado com o *vCdt* aumentou a proteinemia. O alopurinol isoladamente causou hiperproteinúria em animais sadios. A NAC aumentou os níveis de proteína urinária, isoladamente ou em associação com o *vCdt*.

A Figura 9 mostra que independente das vias pelas quais foi administrada (i.p ou i.m), a dose utilizada de *vCdt* não promoveu alteração dos níveis de CK plasmática, comparativamente aos respectivos controles.

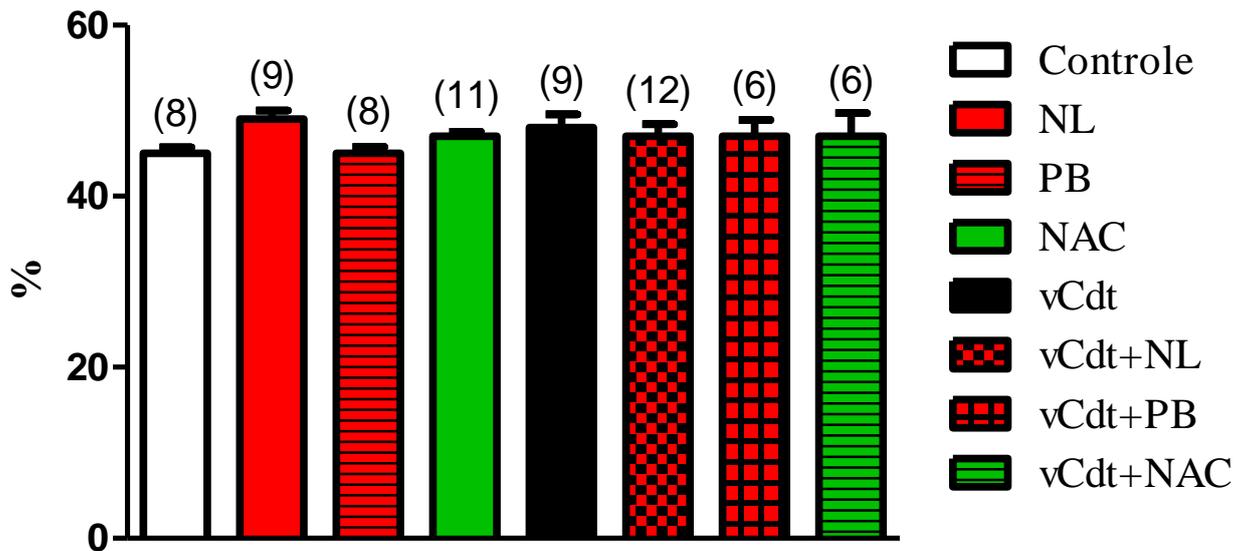


Figura 3 - Hematócrito de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (*vCdt*) seguido de NL p.o (*vCdt*+NL), PB p.o (*vCdt*+PB) ou NAC p.o (*vCdt*+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs *vCdt* vs *vCdt*+NL vs *vCdt*+PB. ANOVA: $p=0,1807$.

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs *vCdt* vs *vCdt*+NAC. ANOVA: $p=0,4706$.

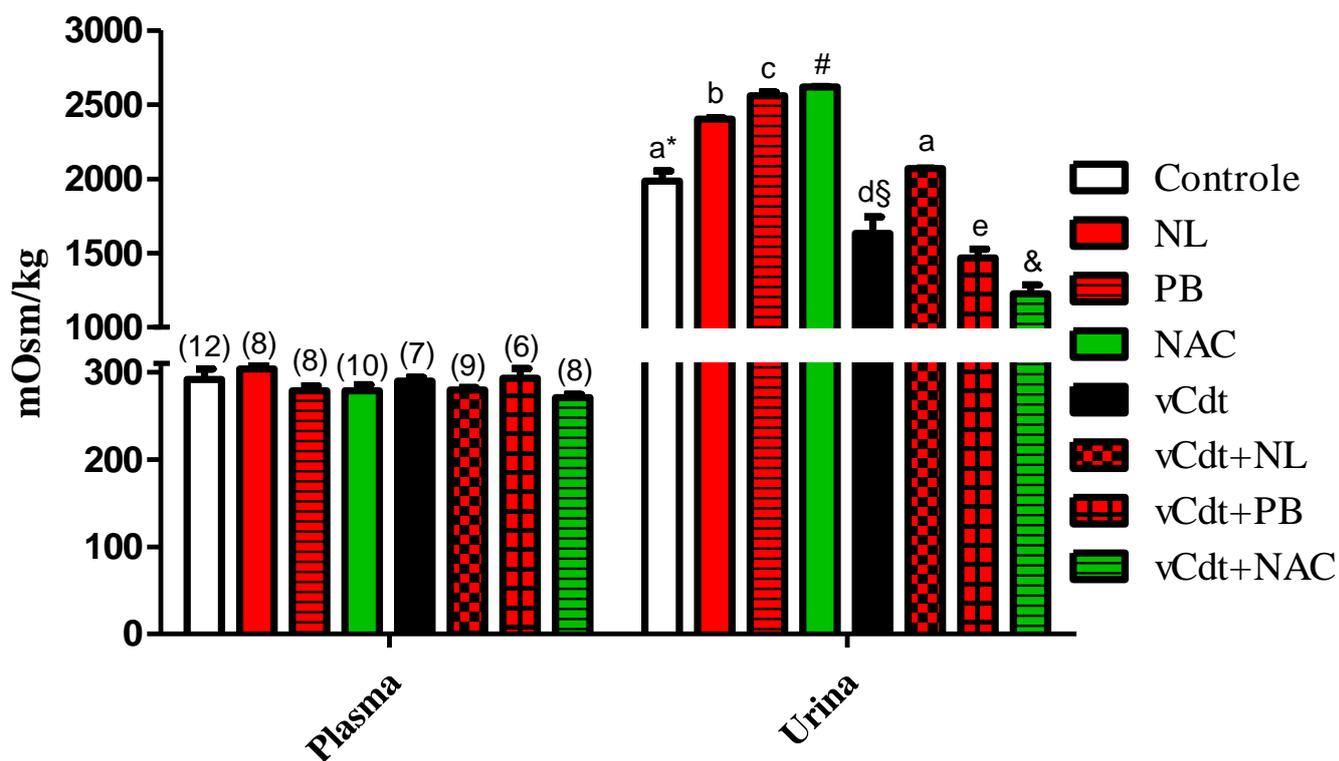


Figura 4 - Osmolalidade do plasma e urina de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses (parâmetros do plasma) e triplicatas de *pool* de animais: 16 (controle), 9 (NL), 10 (PB), 11 (NAC), 12 (vCdt), 22 (vCdt + NL), 12 (vCdt + PB) e 8 (vCdt + NAC) (parâmetros da urina).

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Plasma ($p=0,3577$) e Urina ($p<0.0001$). Student-Newman-Keuls, $p<0,01$ (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Plasma ($p=0,3419$) e Urina ($p=0,0007$). Student-Newman-Keuls, $p<0,05$ (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

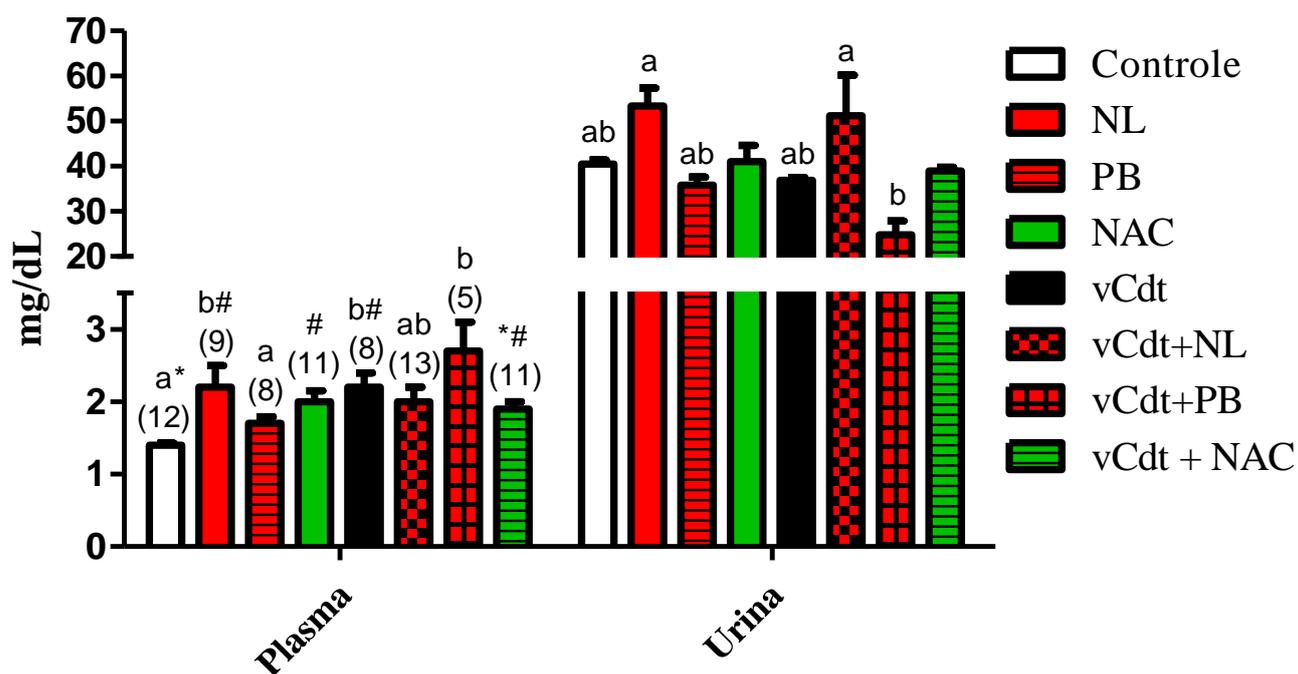


Figura 5 - Creatinina do plasma e urina de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses (parâmetros do plasma) e triplicatas de pool de animais: 16 (controle), 9 (NL), 10 (PB), 11 (NAC), 12 (vCdt), 22 (vCdt + NL), 12 (vCdt + PB) e 8 (vCdt + NAC) (parâmetros da urina).

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Plasma ($p=0,0057$) e Urina ($p<0,0009$). Student-Newman-Keuls, Plasma ($p<0,05$) e Urina ($p<0,01$) (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Plasma ($p=0,0001$) e urina ($p=0,5083$). Student-Newman-Keuls, $p<0,05$ (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

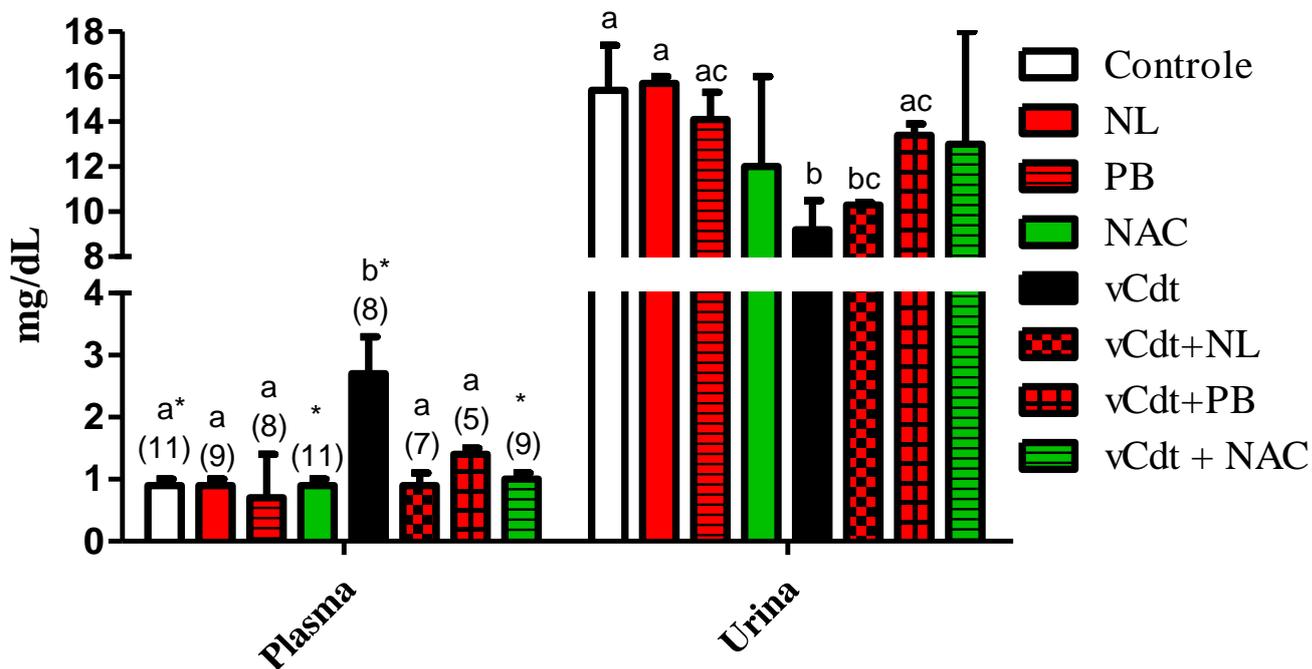


Figura 6 - Ácido úrico do plasma e urina de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses (parâmetros do plasma) e triplicatas de *pool* de animais: 16 (controle), 9 (NL), 10 (PB), 11 (NAC), 12 (vCdt), 22 (vCdt + NL), 12 (vCdt + PB) e 8 (vCdt + NAC) (parâmetros da urina).

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Plasma ($p < 0,0001$) e Urina ($p = 0,0044$). Student-Newman-Keuls: Plasma ($p < 0,01$) e Urina ($p < 0,05$) (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Plasma ($p < 0,0001$) e Urina ($p = 0,6669$). Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

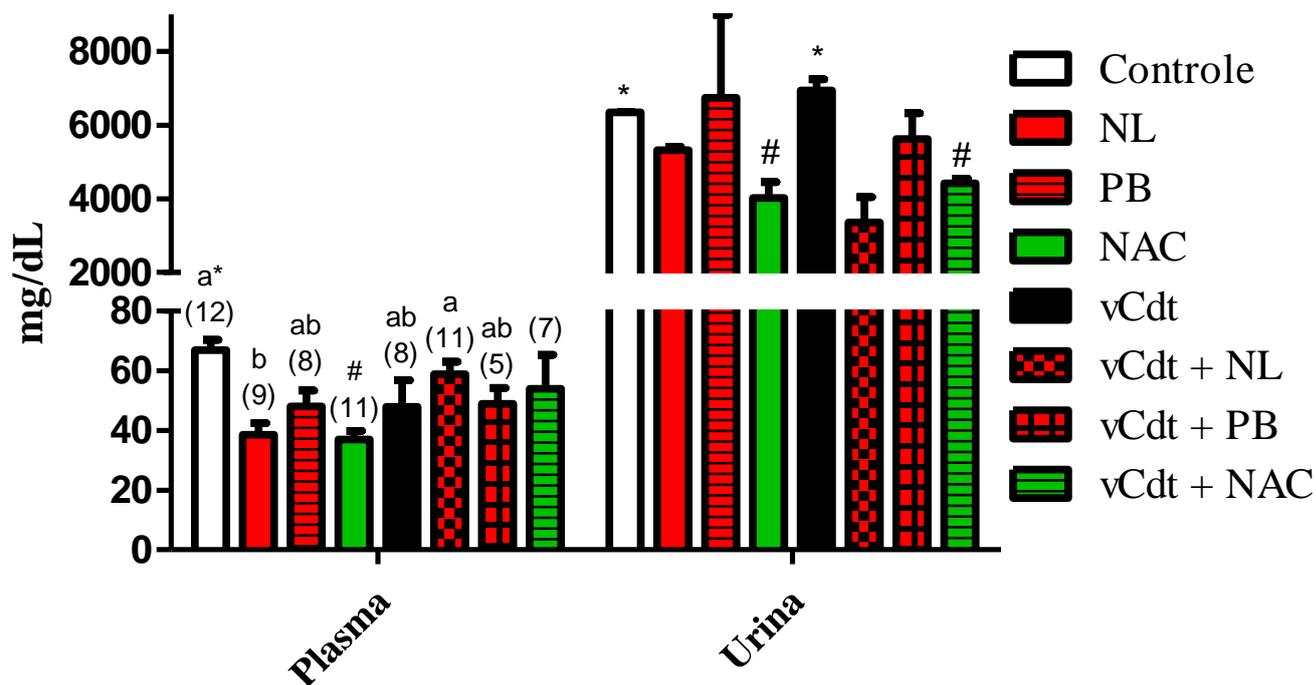


Figura 7 - Uréia do plasma e urina de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses (parâmetros do plasma) e triplicatas de pool de animais: 16 (controle), 9 (NL), 10 (PB), 11 (NAC), 12 (vCdt), 22 (vCdt + NL), 12 (vCdt + PB) e 8 (vCdt + NAC) (parâmetros da urina).

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Plasma (p=0,0029) e Urina (p=0,0615). Student-Newman-Keuls: p<0,05 (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Plasma (p=0,0064) e Urina (p=0,0045). Student-Newman-Keuls: p<0,05 (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

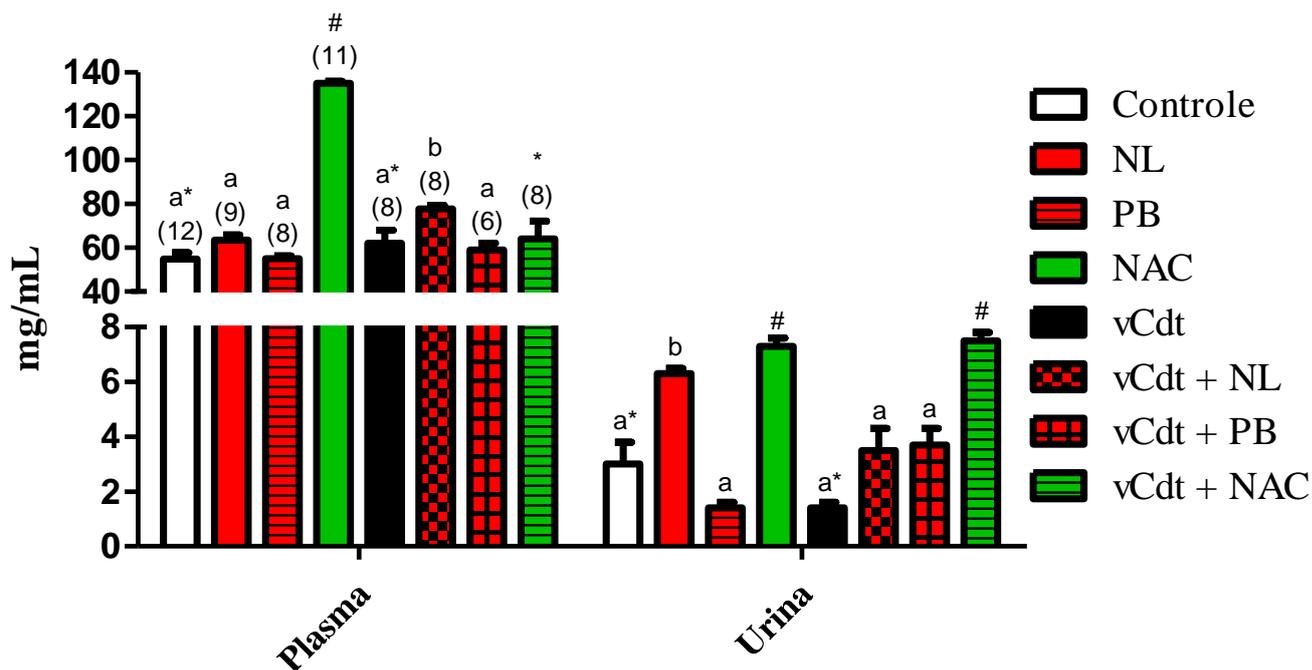


Figura 8 - Proteína do plasma e urina de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses (parâmetros do plasma) e triplicatas de pool de animais: 16 (controle), 9 (NL), 10 (PB), 11 (NAC), 12 (vCdt), 22 (vCdt + NL), 12 (vCdt + PB) e 8 (vCdt + NAC) (parâmetros da urina).

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Plasma ($p < 0,0001$) e Urina ($p = 0,0009$). Student-Newman-Keuls: Plasma ($p < 0,01$) e Urina ($p < 0,05$) (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Plasma ($p = 0,0088$) e Urina ($p = 0,0011$). Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

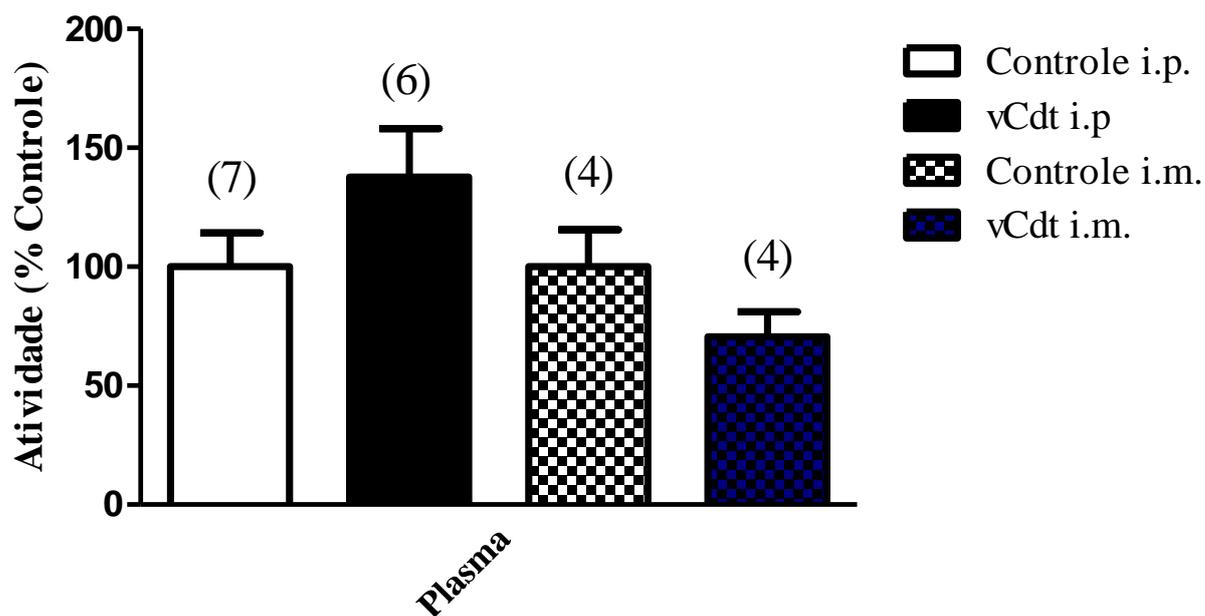


Figura 9 – Creatina quinase do plasma de camundongos tratados com veículo (controle) i.p e i.m, ou veneno de *Crotalus durissus terrificus* (vCdt) i.p e i.m. Valores são a média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle i.p vs vCdt i.p, onde controle = 409,38±58,29 U/L (100±14,23%); Teste t-Student não pareado bicaudal, p=0,1477.

Agrupamento 2: Controle i.m vs vCdt i.m, onde controle = 735,03±114,02 U/L (100±15,5%); Teste t-Student não pareado bicaudal, p=0,1677.

4.4. Estresse oxidativo sob efeito do envenenamento e do alopurinol, probenecid e NAC

A Figura 10 mostra que o padrão de alterações na relação GSSG / GSH causada pelos diferentes tratamentos em estudo foi semelhante no córtex e na medula renal, em comparação com o controle (i.p+p.o). A relação GSSG / GSH aumentou com o *vCdt*. O probenecid diminuiu a relação GSSG / GSH nos grupos não envenenados e ambos, alopurinol e probenecid, normalizaram a relação GSSG / GSH em camundongos envenenados. Embora a NAC não tenha apresentado efeito isoladamente sobre a razão GSSG/GSH em ambas as porções do rim, ela foi capaz de restaurá-la parcialmente no córtex e na medula renal dos envenenados.

A Figura 11 mostra que o probenecid e o *vCdt* não afetaram os níveis de MDA no córtex renal, mas diminuíram ligeiramente esses níveis na medula renal. O alopurinol diminuiu os níveis de MDA no córtex e medula renal nos envenenados e marcadamente nos camundongos saudáveis.

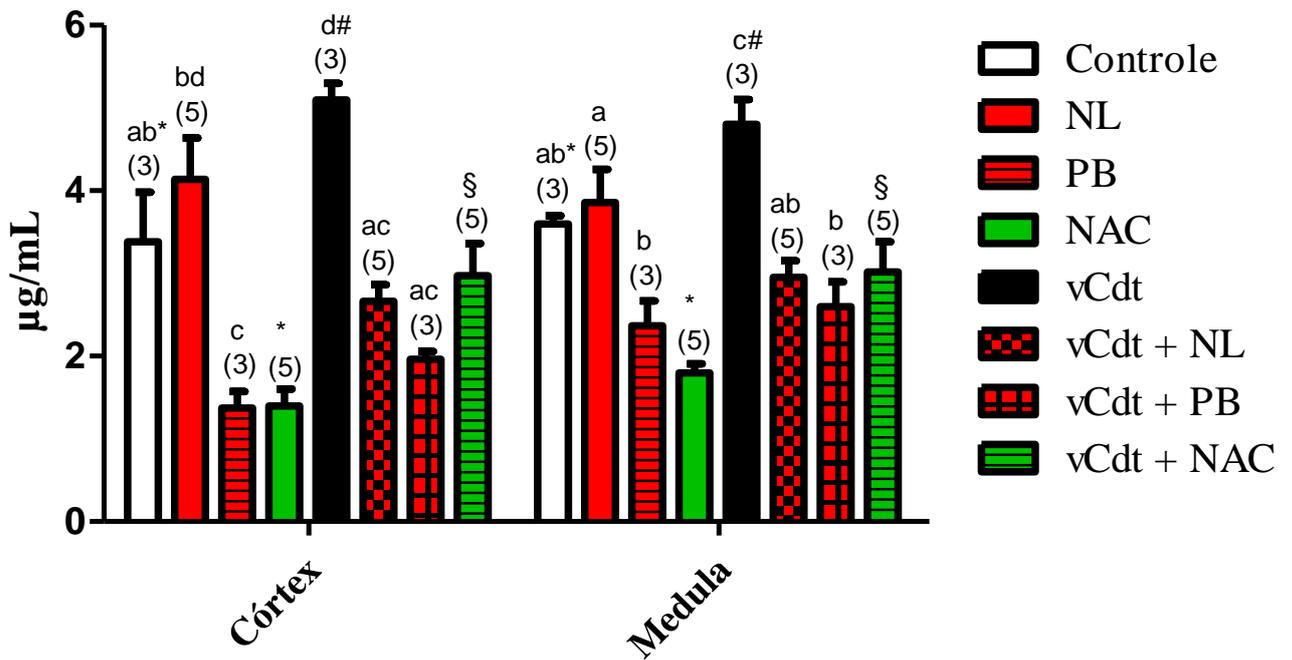


Figura 10 – Razão GSSG/GSH do córtex e medula renal de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), n-acetil-L-cisteína p.o (NAC), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL), PB p.o (vCdt+PB) ou NAC p.o (vCdt+NAC), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre os grupos:

Agrupamento 1: Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Córtex ($p < 0,0001$) e Medula ($p = 0,0009$). Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (letras diferentes indicam valores diferentes).

Agrupamento 2: Controle vs NAC vs vCdt vs vCdt+NAC. ANOVA: Córtex ($p < 0,0001$) e Medula ($p < 0,0001$). Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (símbolos diferentes indicam valores diferentes).

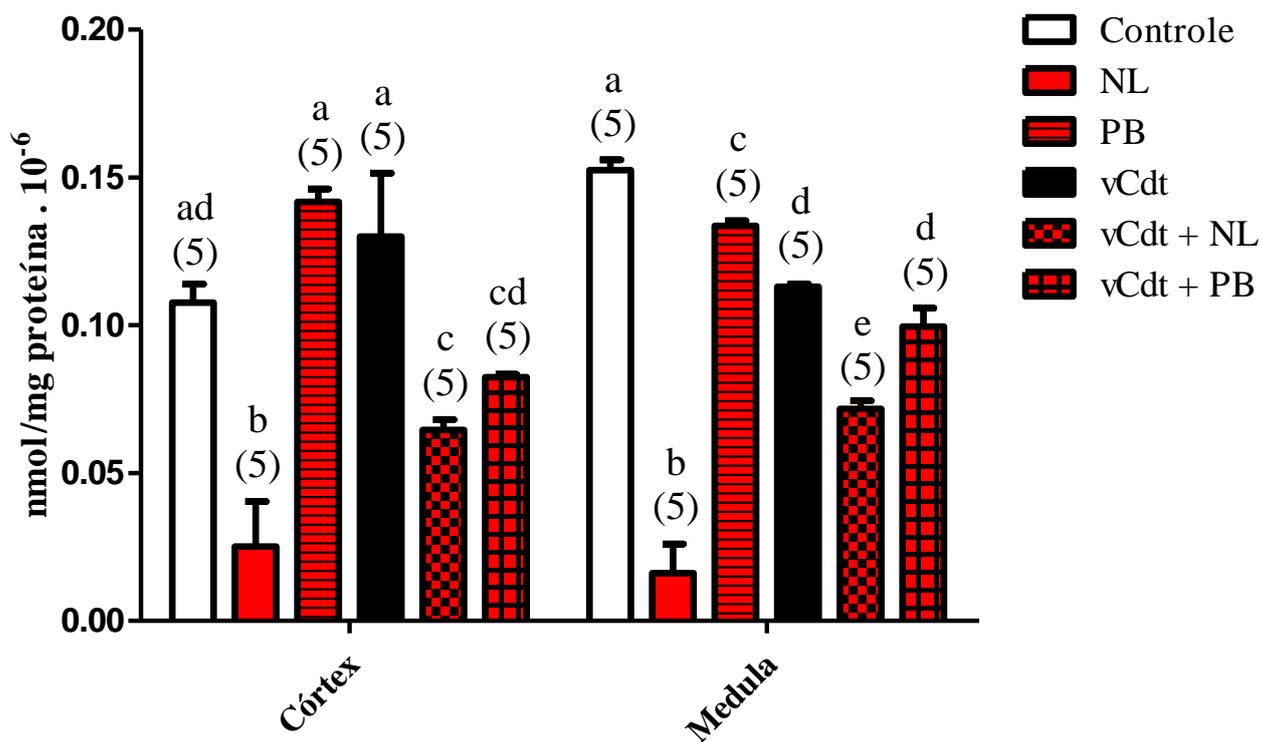


Figura 11 – Teores de MDA do córtex e medula renal de camundongos tratados com veículo i.p+p.o (controle), alopurinol p.o (NL), probenecid p.o (PB), e veneno de *Crotalus durissus terrificus* i.p (vCdt) seguido de NL p.o (vCdt+NL) ou PB p.o (vCdt+PB), após 2 horas. Valores são a média \pm E.P.M. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre os grupos:

Controle vs NL vs PB vs vCdt vs vCdt+NL vs vCdt+PB. ANOVA: Córtex ($p < 0,0001$) e Medula ($p < 0,0001$). Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (letras diferentes indicam valores diferentes).

4.5. Histologia

Alterações histopatológicas tais como fibrose, edema e necrose tubular foram observadas em ratos envenenados, corroborando relatos anteriores sobre efeitos nefrotóxicos diretos deste veneno (PINHO et al., 2000; PINHO et al., 2005; PINHO et al., 2008). Essas alterações foram predominantes no córtex. Os rins dos animais tratados com alopurinol ou probenecid têm alterações muito menos intensas e menos numerosas, com uma aparência que se assemelha ao dos animais controle. Alguns destes aspectos histológicos estão ilustrados na Figura 12.

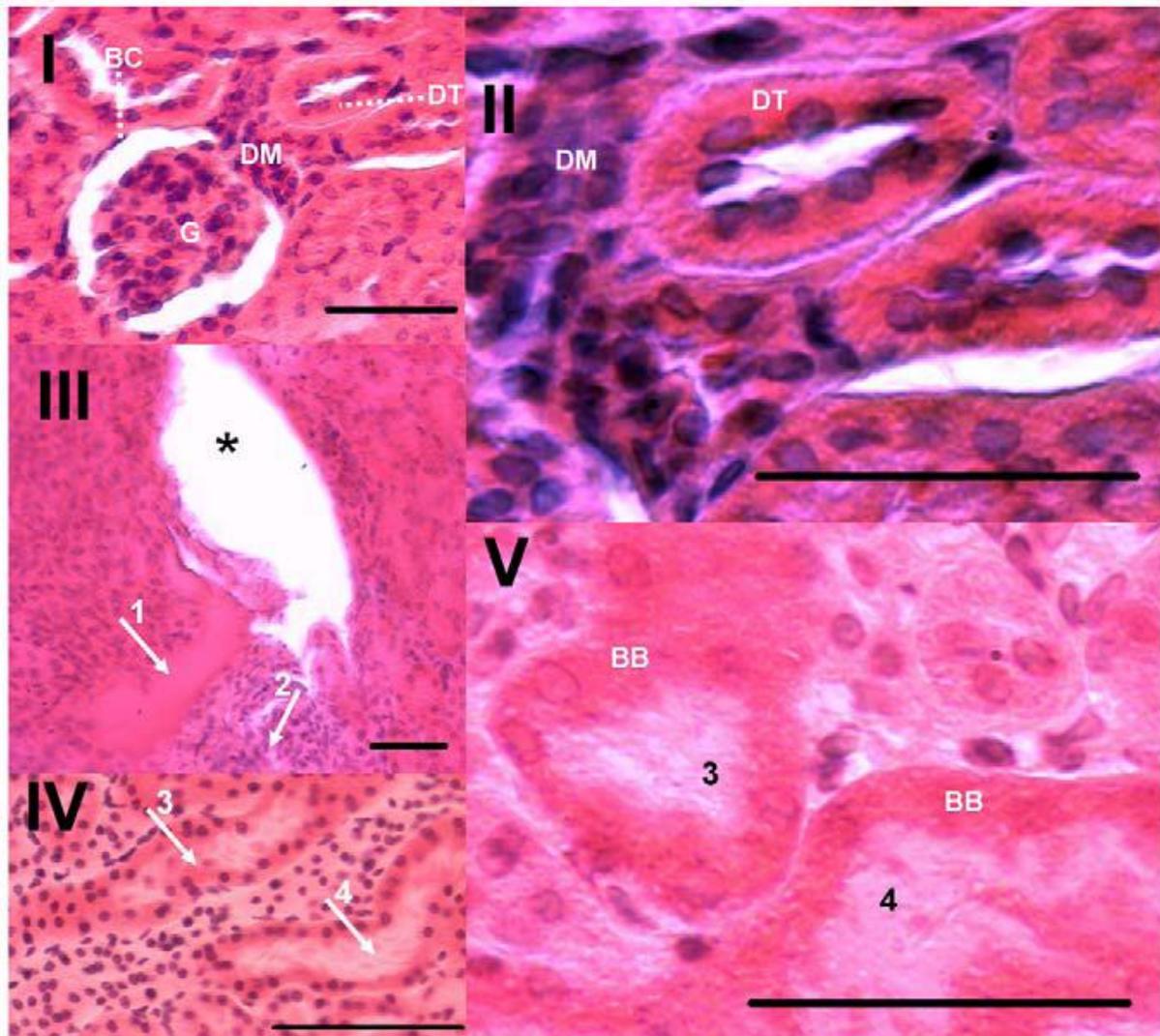


Figura 12 – Características histopatológicas de amostras renais. Cortes sagitais de rins de camundongos, corados com hematoxilina-eosina e tratados com: I e II: veículo (controle); ver a aparência normal de cápsula de Bowman (BC), glomerulos (G), mácula densa (DM) e túbulo distal (DT); III, IV e V: veneno de *C. d. terrificus*; as mudanças mais frequentemente detectadas foram edema (*), fibrose (1) com influxo celular (2), e necrose tubular, com túbulos marcadamente dilatados e detritos celulares no lúmen (3, 4) e na borda em escova (BB). Os tratamentos dos envenenados com alopurinol ou probenecid atuam indistintamente na melhora da frequência e intensidade das alterações histológicas detectáveis, comparativamente com os camundongos envenenados não tratados. Barras = 100 μ m.

5. Discussão

5.1. Agente antioxidante

No presente estudo, verificou-se que a NAC não afeta a letalidade induzida pelo *vCdt*, mas favorece alguns eventos benéficos no envenenamento. Isoladamente, a NAC promove hipercreatinemia, hipouremia, hiperosmolalidade urinária, leve diminuição da uréia urinária, hiperproteinemia e hiperproteinúria em animais sadios. A NAC também diminui o teor proteico e aumenta a atividade DPPIV na fração de membrana do córtex e da medula renal destes animais sadios. A NAC agrava a hipo-osmolalidade urinária e aumenta as atividades APN e DPPIV da fração de membrana do córtex renal de animais envenenados por *vCdt* e, tal como nos animais sadios, decresce a uréia urinária, gera hipercreatinemia, hiperproteinúria e decresce o teor proteico na fração de membrana da medula renal. A hiperosmolalidade urinária promovida pela NAC reflete o aumento no teor de eletrólitos no sangue (em especial, o sódio) e a hiperproteinúria, com conseqüente hiperproteinemia. Em concordância com isso, a ocorrência de decréscimo da uréia urinária, assim como a hipercreatinemia, sugerem um efeito de diminuição do fluxo sanguíneo renal e uma redução da taxa de filtração glomerular. Porém, somente a persistência por médio prazo dessa diminuição do fluxo sanguíneo renal pode promover alteração significativa da função tubular que chegue a acarretar necrose tubular (DOUGLAS, 2001). A concomitante diminuição de proteína de fração de membrana do tecido renal e a hiperproteinúria causadas pela NAC são, possivelmente, ocorrências transitórias e talvez benéficas, considerando-se a reconhecida seletividade desta droga para auxiliar a eliminação de proteínas oxidadas. Um efeito semelhante, aparentemente associado com a capacidade de solubilização de proteínas de membranas do tecido renal, também foi observado para o ácido lipóico (ALEGRE et al., 2010). De fato, por exemplo, o aumento da atividade DPPIV na fração de membrana do rim coincide com a diminuição do teor proteico. Como a DPPIV está envolvida no transporte de dipeptidases (independentes de sódio) e tripeptidases (dependentes de sódio) através da membrana intestinal e renal (TIRUPPATHI et al., 1990), este aumento de atividade DPPIV pela NAC é pró-homeostático. Além disso, estudos de adesão celular revelaram que a DPPIV está envolvida na interação da matriz extracelular (JOHNSON et al., 1993), além de contribuir para a proliferação e diferenciação de linfócitos (REINHOLD et al., 1994) e ativação de células T (FLENTKE et al., 1991). Um

padrão similar de efeitos isolados da NAC (exceto o efeito sobre a osmolalidade urinária) nos animais envenenados por *vCdt*, sugere implicações similares. No entanto, pelas mesmas razões a hipo-osmolalidade urinária, paradoxalmente agravada pela NAC no envenenamento por *vCdt*, reflete um efeito claramente deletério, mesmo considerando-se um aumento de diurese, já que este pode, a curto prazo, levar à depleção da volemia, prejudicando a recuperação da função renal (DOUGLAS, 2001). Por sua vez, a APN renal contribui para o catabolismo extracelular de glutatona (SCOTT; CURTHOYS, 1987) e, assim, o aumento desta atividade na fração de membrana do córtex renal de animais envenenados por *vCdt* também é claramente deletério. Em geral, as peptidases avaliadas no presente estudo desempenham múltiplos papéis, tais como a regulação de hormônios, citocinas e peptídeos relevantes para a proliferação celular, adesão, sinalização celular, ativação celular, diferenciação e comunicação celular (VLAHOVIC; STEFANOVIC, 1998), o que torna difícil avaliar detalhadamente as repercussões acarretadas por alterações da atividade destas enzimas a nível sistêmico.

A atividade APN da fração solúvel do córtex e da medula renal (restauração plena), o teor proteico da fração de membrana do córtex renal (ultrapassa a redução necessária para alcançar o teor observado nos controles) e a atividade DPPIV da fração de membrana do córtex renal (ultrapassa o aumento necessário para alcançar o nível de atividade observado nos controles) são beneficiados pelo tratamento do envenenamento por *vCdt* com a NAC. A diminuição do teor de proteína de fração de membrana do córtex renal causada pela NAC, como mencionado em parágrafo precedente, deve contribuir com a eliminação de proteínas oxidadas, sendo indicativo de uma resposta pró-homeostática contra o efeito nefrotóxico direto ou aumento da permeabilidade vascular causadas pelo *vCdt* (MONTEIRO et al., 2001). As observações sobre o papel da APN e DPPIV discutidas em parágrafos anteriores devem ser levadas em conta ao avaliar os efeitos do *vCdt* e seu tratamento com a NAC. No envenenamento crotálico, Alegre et al. (2010) constataram que o ácido lipóico, apesar de importantes benefícios sobre a função renal, tais como a restauração da uricemia, diminuição da proteína nas frações de córtex e medula e restabelecimento do equilíbrio redox, em geral diminui as atividades aminopeptidásicas. Então, no presente estudo, a restauração, pela NAC, das atividades APN e DPPIV afetadas pelo *vCdt*, é uma base consistente para sugerir a avaliação do potencial terapêutico da associação do ácido lipóico com esta droga no tratamento do envenenamento crotálico em humanos.

Porém, ainda que a recomposição dos níveis normais de atividades aminopeptidásicas pela NAC tenha sua relevância terapêutica, o fato é que os resultados do presente estudo mostraram que somente o alopurinol efetivamente reduziu a letalidade do *vCdt*. Conseqüentemente, conveio tratar o restabelecimento da uricemia e do balanço oxidativo renal (restauração parcial) como efeitos mais importantes da NAC, inclusive porque se acumulam evidências consistentes de que ambos são mesmo os eventos primordiais para o desencadeamento da disfunção renal por efeito direto do veneno crotálico (ALEGRE et al., 2010; YAMASAKI et al., 2008). Provavelmente, a NAC exerça seu efeito antioxidante e antiuricêmico ao facilitar a biossíntese de GSH (ANDRADE et al., 2004), já que o aumento dos níveis intracelulares desta protege *in vitro* os túbulos proximais renais de anóxia (PALLER; FERRIS, 1984) e constata-se aumento de GSH intracelular no tecido renal após a administração da NAC (NITESCU et al., 2006; THIELEMANN; ROSENBLUT, 1990). Sob estas evidências o presente estudo relevou a avaliação de alterações de atividades aminopeptidásicas quando tratou de priorizar o foco na avaliação dos efeitos do alopurinol e do probenecid sobre o estresse oxidativo, sobre parâmetros funcionais clássicos e sobre a histopatologia renal.

5.2. Agentes uricostático e uricosúrico

Apesar da importância dos agentes capazes de reduzir o ácido úrico e, por sua vez, do potencial destes agentes como recursos adicionais na soroterapia de envenenamentos ofídicos, este é o primeiro estudo correlacionando-os com a IRA induzida por veneno de serpente. Mesmo sendo uma condição médica comum a muitas outras condições patológicas, não existe um tratamento específico e comumente são utilizados apenas cuidados de suporte para tratar a IRA em geral (IKEDA et al., 2006) ou aquela causada por venenos de serpentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Considerando-se o tratamento atualmente recomendado para a IRA induzida pelo veneno de *Crotalus*, qual seja a hidratação, alcalinização (por administração parenteral de bicarbonato de sódio, monitorada por gasometria), a indução de diurese osmótica (pela administração intravenosa de manitol 20%), e em casos de oligúria, o uso de diuréticos de alça como a furosemida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), pode-se estimar o nível de cuidados necessários no manejo desses pacientes, uma vez que excesso de líquido é também uma consequência muito comum do tratamento e pode ser agravada pela infusão de líquido para corrigir a acidez e pela nutrição parenteral, solução salina hipotônica,

solução de glicose, etc. Além disso, a hipo-osmolalidade urinária na IRA induzida pelo *vCdt* pode resultar no aumento do teor de diversos eletrólitos no sangue (do sódio, em particular, como já mencionado) e, por outro lado, durante a fase de recuperação da IRA, um aumento da diurese pode causar a depleção do volume intravascular, retardando a recuperação da função renal. Nesse sentido, este aumento na produção de urina pode ocorrer devido à diurese osmótica produzida pela hiperuricemia, provavelmente na presença da função tubular pouco recuperada em relação à filtração glomerular.

O envenenamento por *C. d. terrificus* produz hiperuricemia e hipercreatinemia, com uma queda na osmolalidade e na excreção de ácido úrico na urina, sendo que o presente estudo mostra que o alopurinol e o probenecid restauraram completamente a uricemia em camundongos injetados com *vCdt*. Além disso, o probenecid restaurou a uricosúria, enquanto que o alopurinol restabeleceu a osmolalidade urinária do grupo envenenado aos níveis normais, sendo que ambos melhoraram as alterações histopatológicas causadas pelo veneno. Sobretudo, o alopurinol diminuiu significativamente a letalidade do *vCdt*.

Como mencionado anteriormente, o *vCdt* é reconhecido como causa de uma miotoxicidade sistêmica (nefrotoxicidade indireta), que é caracterizada pela liberação de mioglobina no sangue e urina (processo chamado de rabdomiólise), com elevação de CK sérica (PINHO et al., 2000). No entanto, no presente estudo foi observado que os níveis de CK no plasma não aumentaram 24 horas após a injeção i.p e i.m da mesma dose de *vCdt* (80% da DL50 i.p). Este dado indica que a ação nefrotóxica do veneno de *C. d. terrificus* é predominantemente direta, nesta dose e na via i.p, como já observado por outros autores (MARTINS et al., 1998; AMORA et al., 2006; ALEGRE et al., 2010).

Apesar de haver exercido sua típica atividade farmacológica, o probenecid não ofereceu os mesmos efeitos benéficos do alopurinol contra a letalidade do *vCdt* (apesar de que tendeu a reduzir a mortalidade de 43% para 25%, mas ainda sem significância estatística). Como mostra o presente estudo, o aumento do “antioxidante” ácido úrico no plasma, paradoxalmente induz o estresse oxidativo *in vivo* em rins de camundongos injetados com *vCdt*, corroborando o relato prévio de Yamasaki et al. (2008). Além disso, o presente trabalho evidencia que tanto o alopurinol quanto o probenecid são eficientes no restabelecimento do valor normal do índice de estresse oxidativo (GSSG/GSH). A sinvastatina (YAMASAKI et al. 2008) e o ácido lipóico (ALEGRE et al., 2010) também foram capazes de melhorar a razão GSSG/GSH no tecido renal, mas estes fármacos também não afetam a letalidade causada pelo

vCdt em camundongos. Assim, a redução deste índice de estresse oxidativo não foi o único responsável pela redução da letalidade do *vCdt*.

O alopurinol, na mesma dose utilizada no presente estudo, administrado por via oral durante 7 dias, causa um potente efeito hipouricêmico em camundongos (KONG et al., 2004). O probenecid, na mesma dose e via utilizada no presente estudo, acelera a excreção de ácido úrico em camundongos (YAMADA et al., 1999). Uma única dose de alopurinol, trinta vezes menor do que a utilizada neste estudo e pela mesma via, foi efetiva em produzir um efeito uricostático (TURNHEIM et al., 1999), enquanto que a quinquagésima parte de uma dose única de probenecid pela mesma via utilizada no presente estudo mostrou uma consistente resposta uricosúrica em humanos (CACERES et al., 1987). Além disso, a mesma dose de alopurinol usada aqui, mas administrada por infusão intra-arterial, aboliu totalmente o estresse oxidativo vascular (GEORGE et al., 2006), enquanto que cerca da metade desta dose administrada pela mesma via melhora a capacidade vasodilatadora periférica e o fluxo sanguíneo (localmente e sistemicamente) em humanos com insuficiência cardíaca crônica (DOEHNER et al., 2002). O alopurinol, após a administração oral de longo prazo com metade da dose utilizada neste estudo, também melhorou a função endotelial em pacientes com diabetes tipo 2 que desenvolveram hipertensão leve (BUTLER et al., 2000). George et al. (2006) também mostraram que o alopurinol em uma dose duas vezes mais baixa foi mais eficaz que o probenecid na melhoria da função endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, apesar da redução equivalente do ácido úrico (no presente estudo a relação entre as doses de alopurinol e probenecid foi de 1:12). Estes autores sugeriram que o alopurinol pode ser protetor devido ao bloqueio de oxidantes associados à xantina oxidase, ao contrário da redução simples de ácido úrico causado pelo probenecid, uma vez que a via da xantina oxidase, que leva à síntese de ácido úrico, pode formar espécies reativas de oxigênio, como o MDA (SELMANOĞLU et al., 2011), que por sua vez pode atacar uma grande variedade de componentes celulares (RHODEN et al., 2000). O presente estudo mostra que além de reduzir o ácido úrico, o alopurinol foi ativo em diminuir os níveis de MDA no tecido renal, o que preveniria uma possível peroxidação lipídica no rim causada pelo MDA. No entanto, não observamos alterações significativas nos níveis de MDA que causem peroxidação lipídica em ratos envenenados, comparativamente aos controles saudáveis. Yu et al. (2010) sugeriram que o ácido úrico por si pode causar disfunção endotelial, a qual exige uma captação intracelular de ácido úrico (como observado pela capacidade do probenecid de bloquear os efeitos do ácido úrico nas células vasculares). Neste sentido, o alopurinol pode ser

mais eficaz na redução intracelular dos níveis de ácido úrico, quando a produção celular é alta, como observada na insuficiência cardíaca (GEORGE et al., 2006), fato que sugere que a hiperuricemia induzida pelo *vCdt* é devida ao aumento da produção celular de ácido úrico. Assim, o ácido úrico, sendo um antioxidante no meio extracelular, tem efeito pró-oxidante direto quando consegue entrar nas células (AMES et al., 1981). O mecanismo pelo qual o ácido úrico induz estresse oxidativo nas células ainda é desconhecido, mas sabe-se que quando o ácido úrico reage com oxidantes tais como o peroxinitrito, gera tanto radicais quanto espécies alquilantes, degradando o peroxinitrito (SAUTIN; JOHNSON, 2008). No meio extracelular, estas substâncias podem dissipar-se na circulação, mas no meio intracelular estas substâncias reagem com componentes locais. Além disso, em um ambiente hidrofílico o ácido úrico pode ser mais propenso a funcionar como um antioxidante (como no meio extracelular), o que não ocorre no meio intracelular, um ambiente primordialmente hidrofóbico (SANTOS et al., 1999). Yu et al. (2010) relataram que a ativação do RAS local e dos receptores de angiotensina pelo ácido úrico em células endoteliais humanas foi dependente da indução de estresse oxidativo, já que a produção de espécies reativas de oxigênio foi o primeiro sinal, ocorrendo aos 15 minutos de estimulação pelo ácido úrico e não sendo suprimida na presença de bloqueador do RAS. Estes autores também sugerem algumas semelhanças entre o ácido úrico e a angiotensina II na indução de danos renais e vasculares. Ambos, ratos hiperuricêmicos e infundidos com angiotensina II, desenvolvem hipertensão, arteriopatia aferente, hipertrofia glomerular e inflamação intersticial no rim (MAZZALI et al., 2001; MAZZALI et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2003). O tratamento com alopurinol reduziu as alterações precoces na inflamação, como a ativação de leucócitos, reduzindo a aderência, a circulação e o extravasamento (GRANGER et al., 1989). Houve também outros efeitos sugeridos pela inibição da xantina oxidase por meio do alopurinol, tais como a quelação de cobre, a prevenção da oxidação de LDL (MALKIEL et al., 1993), inibindo a expressão das proteínas de choque térmico (NISHIZAWA et al., 1999) e a sensibilização pelo cálcio (KHAN et al., 2004).

É bem conhecido que o probenecid diminui a taxa de excreção de ácido úrico com uma dose baixa e aumenta essa taxa em doses elevadas, mostrando o chamado efeito paradoxal (YAMADA et al., 1999). Os determinantes para a baixa eficiência do probenecid em comparação com o alopurinol sobre a letalidade do *vCdt* poderia ser devido a este efeito paradoxal e/ou efeitos que ocorrem somente na administração em animais envenenados. No caso do alopurinol, este efeito foi somente a hiperproteinemia, enquanto que a administração

do probenecid em animais envenenados causou hipercreatininemia, hipocreatinúria e agravamento da hipo-osmolalidade urinária. Nesse sentido, a letalidade da IRA causada pelo *vCdt* estaria relacionada, em parte, com a situação de hiperuricemia e hipo-osmolalidade urinária. Por sua vez, a hiperuricemia e a hipo-osmolalidade urinária podem ocorrer devido a um aumento da produção (mais que de uma dificuldade de excreção) de ácido úrico nos animais envenenados, uma vez que o agente uricostático (alopurinol) é o eficaz (e não o agente uricosúrico, probenecid) em promover a sobrevivência destes animais. No entanto, essa ineficácia relativa do probenecid, em comparação com o alopurinol, também pode ser resultado da sobreposição dos seus efeitos deletérios (hipocreatinúria, hipercreatinemia e hipo-osmolalidade urinária) sobre os seus efeitos benéficos. Em favor da primeira hipótese temos a lise celular devido ao *vCdt*, contribuindo para a formação de ácido úrico e consequente depósito de urato. Em favor da segunda hipótese, temos a possibilidade de que o aumento da excreção urinária de ácido úrico nos animais envenenados induzida pelo probenecid pode piorar a disfunção renal já instalada pela ação do *vCdt*. Por outro lado, se o efeito protetor do alopurinol contra a letalidade do *vCdt* for devido a um mecanismo antioxidante, tal efeito antioxidante difere do probenecid por estar relacionado com oxidantes associados à xantina oxidase. Assim, o efeito antioxidante da sinvastatina (YAMASAKI et al., 2008), ácido lipóico (ALEGRE et al., 2010), NAC, alopurinol e probenecid, bem como a letalidade do *vCdt* não pode ser relacionado simplesmente a mecanismos dependentes da formação de cristais. Assim como neste envenenamento, outros estudos experimentais sugerem que a melhoria da função endotelial observada em pacientes com hiperuricemia, insuficiência cardíaca (BERGAMINI et al., 2009) ou diabetes (BUTLER et al., 2000) ocorre devido aos efeitos benéficos da redução de ácido úrico entre pacientes que receberam alopurinol, mas não entre aqueles que receberam outros medicamentos destinados a reduzir os níveis de ácido úrico. Uma possível explicação para tais resultados é que os inibidores da xantina oxidase são mais eficazes que outros agentes na redução dos níveis intracelulares de ácido úrico e, conseqüentemente, têm maior influência sobre a regulação intracelular da atividade celular. Alternativamente, o ácido úrico pode ser mais que um marcador, e os benefícios do alopurinol podem ser o resultado de sua capacidade de bloquear os oxidantes associados à xantina oxidase (FEIG et al., 2008). No entanto, restam importantes limitações nestes dados e, portanto, por enquanto devemos ser cautelosos em considerar o ácido úrico como responsável pelo dano renal e pela letalidade do *vCdt*, uma vez que ainda não sabemos com certeza se os efeitos benéficos observados para o alopurinol são devido à redução do

efeito antioxidante do ácido úrico intracelular ou devido a uma redução de outros oxidantes, associados à xantina oxidase, que não o MDA, haja visto que o próprio *vCdt* atua diminuindo o teor de MDA (ao menos na medula renal) em relação aos controles sadios.

6. Conclusões

Os dados confirmam a hipótese proposta por Yamasaki et al. (2008) de que o aumento do ácido úrico no sangue e o estresse oxidativo renal têm um envolvimento inter-relacionado nos estágios iniciais da IRA induzida pela ação nefrotóxica direta do veneno de *C. d. terrificus*. O estudo permitiu delinear o padrão de atuação do antioxidante NAC sobre aminopeptidases renais representativas e sobre o estresse oxidativo e função renal em camundongos normais e envenenados por *C. d. terrificus*. Contrapondo-se a ação da NAC com o que se conhece sobre a ação do ácido lipóico no envenenamento crotálico (ALEGRE et al., 2010; YAMASAKI et al., 2008) e, além disso, considerando-se a elevada margem de segurança destas drogas, a associação da NAC e do ácido lipóico poderia ser promissora como coadjuvante da soroterapia do envenenamento crotálico. No entanto, comparativamente com a NAC e com a droga uricosúrica avaliada, destaca-se a eficácia do alopurinol. O presente estudo mostra que, além do envenenamento crotálico constituir um modelo animal interessante para estudar a hiperuricemia, a intervenção terapêutica com alopurinol, numa fase precoce, foi capaz de prevenir ou recuperar o camundongo dos efeitos renais deste veneno e, especialmente, diminuir a sua letalidade. Assim, este estudo fornece evidências consistentes da relação do ácido úrico com a IRA induzida pelo envenenamento crotálico e, com isto, deveria estimular a realização de ensaios clínicos para avaliar se o alopurinol pode contribuir na soroterapia desse envenenamento em humanos. Com base nessas conclusões, os mecanismos propostos para as ações das drogas aqui estudadas, alopurinol, probenecid e NAC, sobre a IRA induzida por *vCdt* estão esboçados na Figura 12.

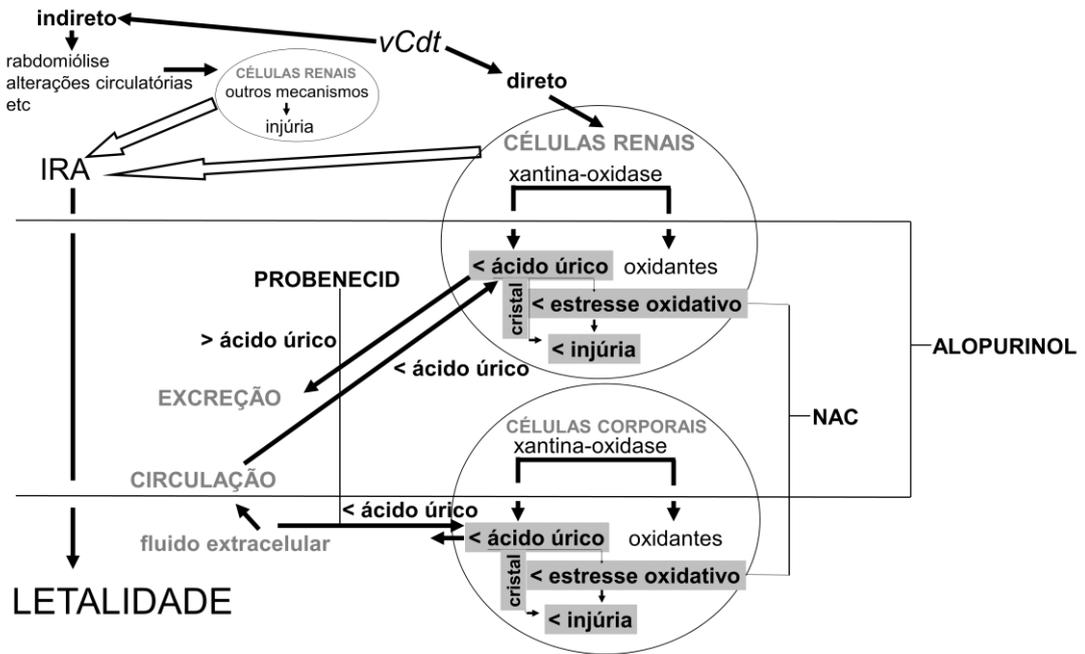


Figura 12 - Diagrama esquemático mostrando os mecanismos e ações hipotéticas do alopurinol, probenecid e NAC, na nefrotoxicidade por *vCdt*. A IRA induzida por *vCdt* ocorre por meio de ações diretas e indiretas que levam à letalidade. As ações diretas causadas pelo *vCdt* geram hiperuricemia e estresse oxidativo renal. O ácido úrico tem efeitos intracelulares pró-oxidantes diretos. A NAC promove efeitos benéficos nos parâmetros renais, provavelmente por meio da melhora do estresse oxidativo renal, mas isso não é suficiente para diminuir a letalidade induzida pelo *vCdt*. O alopurinol e o probenecid restauram a uricemia e o estresse oxidativo (GSSG/GSH) renal causado pelo *vCdt*. Estes efeitos benéficos devem ser em parte exercidos por meio da redução do depósito intracelular de urato, com uma conseqüente redução da formação de ácido úrico, devido à inibição da xantina oxidase (alopurinol), ou uma inibição do transportador de ânions orgânicos que bloqueia a entrada do ácido úrico nas células (probenecid). O alopurinol, mas não o probenecid, protege contra a letalidade causada pelo *vCdt*. Este efeito protetor do alopurinol não está relacionado com o oxidante MDA, mas parece mais intimamente relacionado com o bloqueio de efeitos oxidantes causados pelo aumento da produção de ácido úrico no meio intracelular do que com a entrada do ácido úrico nas células.

7. Referências

AHMAD, N.S.; FARMAN, M.; NAJMI, M.H.; MIAN, K.B.; HASAN, A. Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. **J Ethnopharmacol.**, v. 117, p. 478-82, 2008.

AIRD, S.D. Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. Mol. Biol.** v. 140, n. 1, p.109-26, 2005.

ALEGRE, V. S.; BARONE, J. M.; YAMASAKI S. C.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, v. 56, p. 402-10, 2010.

AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, p. 6858–62, 1981.

AMORA, D.N.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.; BARBOSA, P.S.; MAGALHÃES, M.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; DE MENEZES, D.B.; MONTEIRO, H.S. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. v. 47, n. 3, p. 260-4, 2006.

ANDRADE, S. C.; SHIBUYA, C. A.; WATANABE, M.; DEZZOTI, C.; VATTIMO, M. F. F. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do Alopurinol e N-acetilcisteína como antioxidantes. **J. Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 69-75, 2004.

BECKER, B. F. Towards the physiological function of uric acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 14, p. 615–31, 1993.

BERGAMINI, C.; CICOIRA, M.; ROSSI, A.; VASSANELLI, C. Oxidative stress and hyperuricaemia: pathophysiology, clinical relevance, and therapeutic implications in chronic heart failure. **Eur. J. Heart. Fail**, v. 11, p. 444-52, 2009.

BEYER, R. H.; WIEBELHAUS, V. D.; RUSSE, H. F.; PECK, H. M.; MCKINNEY, S. E. Benemid: An anticatabolite; its pharmacological properties. **Federation Proceedings**, v. 9, p. 258, 1950.

BOGER, W. P.; STRICKLAND, S. C. Probenecid (Benemid): Its uses and side effects in 2502 Patients. **American Medical Association Archives of Internal Medicine**. v. 95, p. 83–92, 1955.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemist**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, A.; CASKEY, C. T. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 742–46, 1994.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**. v. 82, n. 9-10, p. 851-9, 2000.

BRIGUORI, C.; QUINTAVALLE, C.; DE MICCO, F.; CONDORELLI, G. Nephrotoxicity of contrast media and protective effects of acetylcysteine. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 3, p. 165-73, 2011.

BUTLER, R.; MORRIS, A. D.; BELCH, J. J. F.; HILL, A.; STRUTHERS, A. D. Allopurinol Normalizes Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetics With Mild Hypertension. **Hypertension**, v. 35, p. 746-51, 2000.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; MARTÍNEZ, A. M. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. **J. Ethnopharmacol.**, v. 19, p. 233-45, 1987.

CAMILLO, M.A.; ARRUDA PAES, P.C.; TRONCONE, L.R.; ROGERO, J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**. V. 39, n. 6, p. 843-53, 2001

CERDÁ, J.; LAMEIRE, N.; EGGERS, P.; PANNU, N.; UCHINO, S.; WANG, H.; BAGGA, A.; LEVIN, A. Epidemiology of acute kidney injury. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 3, p. 881-6, 2008.

CHAO. J.; TERKELTAUB, R. A critical reappraisal of allopurinol dosing, safety, and efficacy for hyperuricemia in gout. **Curr. Rheumatol. Rep.**, v. 11, p. 135-40, 2009.

CHOHAN, S.; BECKER, M.A. Update on emerging urate-lowering therapies. **Curr. Opin. Rheumatol**. v. 21, n. 2, p. 143-9, 2009.

CHOUHDURY, D. Acute kidney injury: current perspectives. **Postgrad. Med.**, v. 122, n. 6, p. 29-40, 2010.

CORRY, D. B.; ESLAMI, P.; YAMAMOTO, K.; NYBY, M. D.; MAKINO, H.; TUCK, M. L. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin–angiotensin system. **J. Hypertens.**, v. 26, p. 269–75, 2008.

CRAVEN, P. A.; DE RUBERTIS, F. R. Effects of thiol inhibitors on hepatic guanylate cyclase activity: evidence for the involvement of vicinal dithiols in the expression of basal and agonist-stimulated activity. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 524, n. 1, p. 231-44, 1978.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. 42–46, 2009.

CUNNINGHAM, R. F.; ISRAILI, Z. H.; DAYTON, P. G. Clinical pharmacokinetics of probenecid. **Clinical Pharmacokinetics**. n. 6, p. 135–51, 1981.

DAVENPORT, A.; BOUMAN, C.; KIRPALANI, A.; SKIPPEN, P.; TOLWANI, A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. M. Delivery of renal replacement therapy in acute kidney injury: what are the key issues? **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, p. 869-75, 2008.

DAY, R. O.; GRAHAM, G. G.; HICKS, M.; MCLACHLAN, A. J.; STOCKER, S. L.; WILLIAMS, K. M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol and oxypurinol. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 46, p. 623-44, 2007.

DOEHNER, W.; SCHOENE, N.; RAUCHHAUS, M.; LEYVA-LEON, F.; PAVITT, D. V.; REAVELEY, D. A.; SCHULER, G.; COATS, A. J. S.; ANKER, S. D.; HAMBRECHT, R. Hyperuricemic Patients With Chronic Heart Failure Results From 2 Placebo-Controlled Studies. **Circulation**, v. 105, p. 2619-24, 2002.

DOUGLAS, C.R. **Patofisiologia de Sistemas Renal**. 1ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 2001.

EJAZ, A. A.; MU, W.; KANG, D. H.; RONCAL, C.; SAUTIN, Y. Y.; HENDERSON, G.; TABAH-FISCH, I.; KELLER, B.; BEAVER, T. M.; NAKAGAWA, T.; JOHNSON, R. J. Could uric acid have a role in acute renal failure? **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, p. 16-21, 2007.

ELLIS, J.H.; COHAN, R.H. Reducing the risk of contrast-induced nephropathy: a perspective on the controversies. **AJR. Am. J. Roentgenol**. v. 192, n. 6, p. 1544-9, 2009.

ERDOGAN, H.; FADILLIOGLU, E.; YAGMURCA, M.; UCAR, M.; IRMAK, M. K. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdoesteine and N-acetylcysteine. **Urol. Res.**, v. 34, n. 1, p. 41-6, 2006.

FAILI, A.; RANDON, J.; FRANCISCHETTI, I. M.; VARGAFTIG, B. B.; HATMI, M. Convulxin-induced platelet aggregation is accompanied by a powerful activation of the phospholipase C pathway. **Biochem. J.**, v. 298 n. 1, p. 87-91, 1994.

FAURE, G.; VILLELA, C.; PERALES, J.; BOM, C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A2 with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. **Eur. J. Biochem.** v. 267, n. 15, p. 4799-808, 2000.

FEIG, D. I.; KANG, D-H.; JOHNSON, R. J. Uric Acid and Cardiovascular Risk. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 1811–21, 2008.

FLENTKE, G. R.; MUNOZ, E.; HUBER, B. T.; PLAUT, A. G.; KETTNER, C. A.; BACHOVCHIN, W. W. Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1556-9, 1991.

FOK, T. F. Adjunctive pharmacotherapy in neonates with respiratory failure. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 14, n.1, p. 49-55, 2009.

FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. *In*: CARDOSO, J. L. C. FRANÇA F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 22.

GEORGE, J.; CARR, E.; DAVIES, J.; BELCH, J. J. F.; STRUTHERS, A. High-Dose Allopurinol Improves Endothelial Function by Profoundly Reducing Vascular Oxidative Stress and Not by Lowering Uric Acid. **Circulation**, v. 114, p. 2508-16, 2006.

GERSCH, C.; PALII, S. P.; KIM, K. M.; ANGERHOFER, A.; JOHNSON, R. J.; HENDERSON, G. N. Inactivation of nitric oxide by uric acid. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, p. 967–78, 2008.

GRANGER, D. N.; BENOIT, J. N.; SUZUKI, M.; GRISHAM, M. B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 5, p. 683–688, 1989.

GUTMAN, J.; KACHUR, S.P.; SLUTSKER, L.; NZILA. A.; MUTABINGWA, T. Combination of probenecid-sulphadoxine-pyrimethamine for intermittent preventive treatment in pregnancy. **Malar. J.** v. 9, n. 11, p. 9, 2012.

HINK, H. U.; SANTANAM, N.; DIKALOV, S.; MCCANN, L.; NGUYEN, A. D.; PARTHASARATHY, S.; HARRISON, D. G.; FUKAI, T. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1402–08, 2002.

HOSTE, E.A.; KELLUM, J.A. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. **Curr. Opin. Crit. Care.** v. 12, n. 6, p. 531-7, 2006.

IKEDA, M.; PRACHASILCHAI, W.; BURNE-TANEY, M. J.; RABB, H.; YOKOTA-
IKEDA, N. Ischemic acute tubular necrosis models and drug discovery: a focus on cellular inflammation. **Drug Discov. Today**, v. 11, p. 364-70, 2006.

JOHNSON, R. C.; ZHU, D.; AUGUSTIN-VOSS, H. G.; PAULI, B. U. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. **The Journal of cell biology**, v. 121, n. 6, p. 1423-32, 1993.

KANG, D. H.; PARK, S. K.; LEE, I. K.; JOHNSON, R. J. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, p. 3553–62, 2005a.

KANG, D. H.; HAN, L.; OUYANG, X.; KAHN, A. M.; KANELIS, J.; LI, P.; FENG, L.; NAKAGAWA, T.; WATANABE, S.; HOSOYAMADA, M.; ENDOU, H.; LIPKOWITZ, M.; ABRAMSON, R.; MU, W.; JOHNSON, R. J. Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. **Am. J. Nephrol.**, v. 25, p. 425–33, 2005b.

KANJANABUCH, T.; SITPRIJA, V. Snakebite nephrotoxicity in Asia. **Semin. Nephrol.**, v. 28, p. 363-72, 2008.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS. Med.**, v. 5, n. 11, p. 218, 2008.

KATTAH, R. N; FERRAZ, V; SANTORO M. M; CAMARGOS, E. R. S; DINIZ, C. R; LIMA, M. E. analysis of fatty acids released by crotoxin in rat brain synaptosomes. **Toxicon**, v. 40, p. 43-9, 2002.

KHAN, S. A.; LEE, K.; MINHAS, K. M.; GONZALEZ, D. R.; RAJU, S. V.; TEJANI, A. D.; LI, D.; BERKOWITZ, D. E.; HARE, J. M. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 15944-48, 2004.

KHOSLA, U. M.; ZHARIKOV, S.; FINCH, J. L.; NAKAGAWA, T.; RONCAL, C.; MU, W.; KROTOVA, K.; BLOCK, E. R.; PRABHAKAR, S.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. **Kidney Int.**, v. 67, p. 1739-42, 2005.

KIM, J.; JANG, H. S.; PARK, K. M. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 298, n. 1, p. 158-66, 2010.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1987.

KONG, L. D.; YANG, C.; GE, F.; WANG, H. D.; GUO, Y. S. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 325-30, 2004.

MAGALHÃES, R. A; RIBEIRO, M. M; DE REZENDE, N. A; AMARAL, C. F. Rhabdomyolysis secondary to a crotalid bite (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop**, Sao Paulo, v. 28, n. 4, p. 228-33, 1986.

MALKIEL, S.; HAR-EL, R.; SCHWALB, H.; URETZKY, G.; BORMAN, J. B.; CHEVION, M. Interaction between allopurinol and copper: possible role in myocardial protection. **Free Radic. Res. Commun**, v. 18, p. 7-15, 1993.

MARINHO, C. E.; OLIVO, R. D. O. A.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; RIBEIRO-DE-ANDRADE, T. N.; FERNANDES, C. M.; SILVEIRA, P. F. Renal and macrophage aminopeptidase activities in cyclosporin-treated mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 415-25, 2006.

MARTINS, A.M.; MONTEIRO, H.S.; JÚNIOR, E.O.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. v. 36, n. 10, p. 1441-50, 1998.

MAZZALI, M.; HUGHES, J.; KIM, Y. G.; JEFFERSON, J. A.; KANG, D. H.; GORDON, K. L.; LAN, H. Y.; KIVLIGHN, S.; JOHNSON, R. J. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystalindependent mechanism. **Hypertension**, v. 38, p. 1101–06, 2001.

MAZZALI, M.; KANELIS, J.; HAN, L.; FENG, L.; CHEN, Q.; KANG, D. H.; WATANABE, S.; NAKAGAWA, T.; LAN, H. Y.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure independent mechanism. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 6, p. 991–997, 2002.

MEHTA, R. L.; KELLUM, J. A.; SHAH, S. V.; MOLITORIS, B. A.; RONCO, C.; WARNOCK, D. G.; LEVIN, A.; **Acute Kidney Injury Network**. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit. Care.**, v. 11, n. 2, p. 31, 2007.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. *In*: CARDOSO, J. L. C. FRANÇA F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42.

MILLEA, P. J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. **American family physician**. v. 80, n. 3, p. 265-9, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. v. 2, p. 29-97, 2012.

MOCKENHAUPT, M. The current understanding of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. **Expert. Rev. Clin. Immunol.** v. 7, n. 6, p. 803-13, 2011.

MONTEIRO, H. A. S.; DA SILVA, I. M. S. C.; MARTINS, A. M. C.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1347-52, 2001.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; ZAMUNÉR, S.R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C.DE F. Secretory phospholipases A(2) isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**. v. 52, n. 3, p. 428-39, 2008.

MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Phosphodiesterase from the venom of *Crotalus ruber ruber*. **Int. J. Biochem.** v. 19, n. 2, p.115-9, 1987.

NAKAGAWA, T.; MAZZALI, M.; KANG, D. H.; KANELLIS, J.; WATANABE, S.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. **Am. J. Nephrol.**, v. 23, p. 2–7, 2003.

NEEDHAM, E. Management of acute renal failure. **Am. Fam. Physician.**, v. 72, p. 1739-46, 2005.

NISHIZAWA, J.; NAKAI, A.; MATSUDA, K.; KOMEDA, M.; BAN, T.; NAGATA, K. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. **Circulation**, v. 99, p. 934–41, 1999.

NITESCU, N.; RICKSTEN, S. E.; MARCUSSEN, N.; HARALDSSON, B.; NILSSON, U.; BASU, S.; GURON, G. N- acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 21, p. 1240–47, 2006.

NUNES, F.P.; SAMPAIO, S.C.; SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**. v. 49, n. 8, p. 1090-8, 2007.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-70, 2005.

OKUSA, M.D.; CHERTOW, G.M.; PORTILLA, D.; Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** v. 4, n. 3, p. 520-2, 2009.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-63, 2005.

PALLER, M. S.; FERRIS, J. R. Protective effects of glutathione, glycine, or alanine an in vitro model of renal anoxia. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, p. 1338-44, 1984.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, p. 24-9, 2001.

PINHO, F. M.; ZANNETA, D. M.; BURDMANN, E. A. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. **Kidney Int.**, v. 67, p. 659-67, 2005.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualizações em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 3, p. 162-8, 2000.

PINHO F.M.; YU L.; BURDMANN E.A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. **Semin. Nephrol.** V. 28, p. 354–62, 2008.

PRICE, K. L.; SAUTIN, Y. Y.; LONG, D. A.; ZHANG, L.; MIYAZAKI, H.; MU, W.; ENDOU, H.; JOHNSON, R. J. Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, p. 1791–95, 2006.

REINHOLD, D.; BANK, U.; BÜHLING, F.; KÄHNE, T.; KUNT, D.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) specifically suppress proliferation and modulate cytokine production of strongly CD26 expressing U937 cells. **Immunobiology**, v. 192, n. 1-2, p. 121-36, 1994.

RHODEN, E.; TELOKEN, C.; LUCAS, M.; RHODEN, C.; MAURI, M.; ZETTLER, C.; BELLO-KLEIN, A.; BARROS, E. Protective effect of allopurinol in the renal ischemia-reperfusion in uninephrectomized rats. **Gen. Pharmacol.**, v. 35, n. 4, p. 189-93, 2000.

RIEGERSPERGER, M.; COVIC, A.; GOLDSMITH, D. Allopurinol, uric acid, and oxidative stress in cardiorenal disease. **Int. Urol. Nephrol.** v. 43, n. 2, p. 441-9, 2011.

RIZZI, C. T.; CARVALHO-DE-SOUZA, J. L.; SCHIAVON, E.; CASSOLA, A. C.; WANKE, E.; TRONCONE, L. R. Crotonamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 553-62, 2007.

ROBBINS, N.; KOCH, S.E.; TRANTER, M.; RUBINSTEIN, J. The history and future of probenecid. **Cardiovasc. Toxicol.** V. 12, n. 1, p. 1-9, 2012.

RYU, H.J.; SONG, R.; KIM, H.W.; KIM, J.H.; LEE, E.Y.; LEE, Y.J.; SONG, Y.W.; LEE, E.B. Clinical Risk Factors for Adverse Events in Allopurinol Users. **J. Clin. Pharmacol.**, 2012 (In press).

SALES PB, SANTORO ML. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.** v. 47, n. 1 p.85-95, 2008.

SAMPAIO, S. C; ALBA-LOUREIRO, T. C; BRIGATTE, P; LANDGRAF, R. G; DOS SANTOS, E. C; CURI, R; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the

inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 313-21, 2006.

SAMPAIO, S.C; HYSLOP, S; FONTES, M. R; PRADO-FRANCESCHI, J; ZAMBELLI, V. O; MAGRO, A. J; BRIGATTE, P; GUTIERREZ, V. P; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-60, 2010.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; SOTO, V.; TAPIA, E.; AVILA-CASADO, C., SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T.; FRANCO, M.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; JOHNSON, R. J. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 295, p. 1134–41, 2008.

SANTOS, C. X.; ANJOS, E. I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 372, p. 285–94, 1999.

SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, p. 608–19, 2008.

SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T.; ZHARIKOV, S.; JOHNSON, R. J. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 293, p. 584–96, 2007.

SCOTT, R. D.; CURTHOYS, N. P. Renal clearance of glutathione measured in rats pretreated with inhibitors of glutathione metabolism. **Am. J. Physiol.**, v. 252, n. 5, p. 877-82, 1987.

SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon.**, v. 18, n. 3, p. 235-47, 1980.

SELMANOĞLU G.; KARACAOĞLU E.; KILIÇ A.; KOÇKAYA E.A.; AKAY M.T. Toxicity of food contaminant furan on liver and kidney of growing male rats. **Environ. Toxicol.** doi: 10.1002/tox.20673, 2011.

SHIN, Y.J.; LEE, J.H.; OH, J.H.; LEE, Y.J. Low-dose probenecid selectively inhibits urinary excretion of phenolsulfonphthalein in rats without affecting biliary excretion. **J. Appl. Toxicol.** doi: 10.1002/jat.1778, 2011.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442–48, 2006.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 33, n. 9, p. 877-88, 2001.

SRISAWAT, N.; KELLUM, J.A. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. **Curr. Opin. Crit. Care.** v. 17, n. 6, p. 548-55, 2011.

STAVRIC, B.; JOHNSON, W. J.; GRICE, H. C. Uric acid nephropathy: an experimental model. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 130, p. 512-16, 1969.

THIELEMANN, L. E.; ROSENBLUT, E. W. Sulfur-containing amino acids that increase renal glutathione protect the kidney against papillary necrosis induced by 2-bromothylamine. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 8, p. 19-24, 1990.

TIRUPPATHI, C.; MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V.; ROESEL, R.A.; WHITFORD, G.M.; LEIBACH, F.H. Hydrolysis and transport of proline-containing peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 3, p. 1476-83, 1990.

TURNHEIM, K.; KRIVANEK, P.; OBERBAUER, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol in elderly and young subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 48, p. 501-9, 1999.

UCHINO, S. The epidemiology of acute renal failure in the world. **Curr. Opin. Crit. Care.** v. 12, n. 6, p. 538-43, 2006.

VAN AUBEL, R.A.M.H.; MASEREEUW, R.; RUSSEL, F.G.M. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 279, p. F216-32, 2000.

VAN GILST, W. H.; DE GRAEFF, P. A.; DE LEEUW, M. J.; SCHOLTENS, E.; WESSELING, H. Converting enzyme inhibitors and the role of the sulfhydryl group in the potentiation of exo- and endogenous nitrovasodilators. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 18, n. 3, p. 429-36, 1991.

VLAHOVIĆ, P.; STEFANOVIĆ, V. Kidney ectopeptidases. Structure, functions and clinical significance. **Pathologie-biologie**, v. 46, n. 10, p. 779-86, 1998.

WARING, W. S.; WEBB, D. J.; MAXWELL, S. R. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 38, p. 365–71, 2001.

WHITEHOUSE, L. W.; WONG, L. T.; PAUL, C. J.; PAKUTS, A.; SOLOMONRAJ, G. Postabsorption antidotal effects of N-acetylcysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 63, n. 5, p. 431-7, 1985.

YAMADA, H.; KOTAKI, H.; FURITSU, H.; SAWADA, Y.; IGA, T. Mechanism of uricosuric action of E3040, a drug used to treat inflammatory bowel disease II: study using DBA/2N mice. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 20, p. 271-6, 1999.

YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; BARONE, J. M.; ALEGRE, V. S.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. *Crotalus durissus terrificus* venom and simvastatin affect oxidative stress and plasma, urine and renal aminopeptidases in mice. **Toxicon**, v. 52, p. 445-54, 2008.

YU, M. A.; SANCHES-LOZADA, L.; JOHNSON, R. J.; KANG, D. H. Oxidative stress with an activation of the renin–angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. **Journal of Hypertension**, v. 28, p. 1234–42, 2010.

ZHARIKOV, S.; KROTOVA, K.; HU, H.; BAYLIS, C.; JOHNSON, R. J.; BLOCK, E. R.; PATEL, J. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 295, p. 1183–90, 2008.