

Valoración bioquímica, histopatológica e inmunohistoquímica del daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* en ratas

Koscinczuk, P.¹; Ortega, H.³; Daillard, B.³; Mussart, N.B.²

¹Cátedra de Patología Médica y ²Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/fax 03783-425753. ³Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza (Santa Fe). E-mail: pkoscinczuk@hotmail.com

Resumen

Koscinczuk, P.; Ortega, H.; Daillard, B.; Mussart, N.B.: *Valoración bioquímica, histopatológica e inmunohistoquímica del daño renal causado por veneno de Bothrops neuwiedii en ratas.* *Rev. vet.* 18: 1, 14–19, 2007. El objetivo del trabajo fue elucidar algunos aspectos del daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* (yarára chica), especialmente el rol asumido por la mioglobina, teniendo en cuenta el daño muscular provocado por la mordedura de dicho ofidio. Se dispuso de 35 ratas *Wistar* de 280 g de peso. Cinco animales fueron inyectados vía IM con 0,2 ml de solución fisiológica (controles que no registraron cambios significativos) y las restantes con 1400 ug del veneno, siendo divididas en 6 grupos de 5 ratas cada uno, acorde al lapso de sacrificio (3, 6, 12 y 24 horas, 7 y 28 días). En dichos lapsos se les extrajo sangre para realizar determinaciones bioquímicas relacionadas a los daños muscular (creatinfosfoquinasa CPK, aspartatoaminotransferasa AST) y renal (urea, creatinina), orina (pH, densidad), así como muestras de tejido renal para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos (detección de mioglobina por anticuerpos policlonales). Las actividades de AST y CPK se elevaron ($p < 0,05$) con acmés a las 24 y 6 h respectivamente, en el último caso alcanzando valores de 2.895 UI/l, indicadores de severo daño muscular. Ambas enzimas remitieron a valores normales a los 7 días. En suero también aumentaron ($p < 0,001$) los niveles de creatinina (22,7 mg/l a las 6 horas) y urea (1,52 g/l a las 12 h), señalando la presencia de daño renal. La densidad urinaria declinó a partir de las 12 h post-inoculación, alcanzando su mínimo valor (1.010) a los 28 días. La histopatología reveló cambios progresivos que se iniciaron con degeneración hídrica y presencia de cilindros hialinos en túbulos proximales y distales, culminando con necrosis tubular y hemorragia intersticial. La marcación para mioglobina resultó positiva a partir de las 3 h en membrana glomerular, células tubulares y luz tubular. Con el transcurrir del tiempo la mioglobina fue detectada en áreas medulares, incluyendo asas de Henle y túbulos colectores. Se concluye que la mioglobina participa decisivamente en la instalación del daño renal provocado por el veneno estudiado.

Palabras clave: rata, veneno *Bothrops*, daño renal, inmunohistoquímica, mioglobina.

Abstract

Koscinczuk, P.; Ortega, H.; Daillard, B.; Mussart, N.B.: *Biochemical, histopathological and immunohistochemical evaluation of the renal damage caused by Bothrops neuwiedii venom in rats.* *Rev. vet.* 18: 1, 14–19, 2007. The objective of this trial was to elucidate some aspects of the renal damage induced by *Bothrops neuwiedii* (“yarára chica”) venom, caused by myoglobin release after the muscular damage that characterizes this envenoming. Thirty five *Wistar* rats weighting 280 g, were selected. Five animals were injected IM with 0.2 ml of normal saline solution (control animals, which did not register significant changes). The remaining rats were injected with 1400 ug of venom; six groups of five animals each were constituted, according to time to sacrifice (3, 6, 12 and 24 hours, 7 and 28 days). In each group, blood samples were obtained to determine serum biochemical parameters related with muscle damage (creatin phosphokinase CPK, and aspartate aminotransferase AST activities), renal failure (urea, creatinine), and samples of renal tissue for histopathologic studies and immunohistochemistry (polyclonal antibody for myoglobin). Urine samples were also gathered (for pH and density). AST and CPK activities increased ($p < 0.05$), with peaks at 24 and 6 h respectively. CPK showed a maximum value of 2895 IU/l, indicating severe muscle damage. Both enzymes returned to normal values in 7 days. In serum, creatinine (22.7 mg/l at 6 h) and urea (1.52 g/l at 12 h) were increased, thus demonstrating renal damage. Twelve

hours post-inoculation, urinary density declined, reaching its minimum value (1010) at 28 days. Histopathology showed progressive changes that began with hydropic degeneration and presence of hyaline casts in proximal and distal tubules, and tubular necrosis and interstitial haemorrhage in the final stages. Myoglobin was present in the glomerular membrane, tubular cells and tubular lumen at 3 hours post-inoculation. Later, myoglobin was also observed in medullar area, Henle asa, and collector tubules. In conclusion, myoglobin takes an important role in the settle of kidney damage induced by *Bothrops newiedii* venom.

Key words: rat, *Bothrops* venom, renal damage, immunohistochemistry, myoglobin.

INTRODUCCIÓN

El veneno de *Bothrops neuwiedii* (yarára chica), al igual que otros venenos del mismo género de ofidios, se caracteriza por poseer sustancias capaces de producir lesiones locales y sistémicas. Dentro de las primeras se destacan edemas, hemorragias y necrosis musculares y entre las sistémicas figuran las alteraciones de la coagulación y la falla renal aguda^{1, 3, 5, 10, 20, 21, 23}. El daño renal es una secuela asociada a distintos venenos ofídicos. En su etiología han sido señalados los efectos de agentes nefrotóxicos directos⁴, el desarrollo de coagulación intravascular diseminada^{1, 9} y la acción de enzimas proteolíticas y sustancias vasoactivas que actuarían sobre las células epiteliales tubulares¹⁷. Por otra parte, debería tenerse en cuenta la acción ejercida sobre el parénquima renal por sustancias liberadas a partir de áreas de necrosis, como la mioglobina^{15, 16, 19}. No obstante, para que la mioglobina pueda inducir insuficiencia renal aguda se necesitan varios factores como hipovolemia/deshidratación, aciduria e intensa vasoconstricción, obstrucción intraluminal por cilindros pigmentados y necrosis de las células epiteliales tubulares proximales por toxicidad directa intra y/o extracelular³¹.

Una vez que la mioglobina es liberada en gran cantidad a partir del músculo esquelético dañado, excede la capacidad de las globulinas transportadoras del plasma y se filtra rápidamente por los glomérulos, fenómeno favorecido por su bajo peso molecular^{29, 31}. De esta manera pasa a integrar el filtrado glomerular, a partir del cual puede ser reabsorbida merced a receptores de la membrana de las células epiteliales tubulares¹¹ o quedar libre en el filtrado, dando lugar a la formación de cilindros pigmentados. Algunos investigadores proponen que esta mioglobina libre podría inducir injuria oxidativa como resultado de la liberación de hierro a partir del propio pigmento. En este caso, el hierro podría realizar un ciclo *redox* promoviendo las reacciones de peroxidación lipídica como una consecuencia de su habilidad para descomponer hidroperóxidos lipídicos a radicales *peroxyl* y *alkoxyl*²⁴.

Considerando que el veneno de *B. neuwiedii* posee fosfatasa miotóxica¹² y que el daño muscular induce a la liberación de mioglobina, se postula que este pigmento podría asumir algún rol en el desarrollo de la insuficiencia renal. Bajo esta hipótesis, el objetivo del trabajo fue detectar la presencia de mioglobina en el

tejido renal luego de la administración del veneno de dicha víbora.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispuso de 35 ratas *Wistar* de 280±20 g de peso y sexo macho, las que fueron divididas en 7 grupos, cada uno de ellos integrado por 5 animales. Uno de los grupos operó como control, siendo inyectado vía IM con 0,2 ml de solución fisiológica. Los ejemplares restantes fueron inoculados con 1.400 ug de veneno vehiculizados en 0,2 ml de solución fisiológica, aplicados vía IM en el gastronemio. Se utilizó veneno crudo obtenido por extracción manual de ejemplares adultos de *Bothrops neuwiedii diporus* capturados en la Provincia de Corrientes, el cual fue desecado en campana de vacío, homogeneizado y conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

Las ratas de los seis grupos experimentales fueron sacrificadas sucesivamente a las 3, 6, 12 y 24 horas, 7 y 28 días post inoculación del veneno. Para obtener las muestras de sangre y tejido renal, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral intraperitoneal (0,3 ml/200 g de peso) y sometidos a dislocación de la articulación atlanto-occipital.

En cada uno de los tiempos planificados, previamente al sacrificio se realizaron extracciones de sangre por punción de la vena cava posterior. Con el suero obtenido y mediante kits analíticos *Wiener Lab* se realizaron las determinaciones de aspartatoaminotransferasa (AST, técnica UV optimizada c/NADH-oxaglutamato, 334 nm), creatinfosfoquinasa (CPK, método UV optimizado con ATP-cisteína, 340 nm), urea (técnica de la ureasa, lecturas a 570 nm) y creatinina (método directo sin desproteinización, técnica del ácido pícrico, 510 nm). Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro digital Zeltec ZL-5000.

La recolección de las muestras de orina, en cada tiempo programado, se realizó desde el piso de las jaulas previamente cubierto por láminas de plástico. Luego de medir la densidad mediante refractometría, se evaluó el pH y la presencia o ausencia de proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina y urobilinógeno mediante tiras reactivas *Multistix* (Bayer). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min para examinar microscópicamente el sedimento urinario.

Tabla 1. Valores de CPK, AST, urea y creatinina ($\bar{x} \pm DE$), según lapso de muestreo (n=35).

grupo	CPK (UI/l)	AST (UI/l)	urea (g/l)	creatinina (mg/l)
controles (n=5)	585 \pm 210 ^a	43 \pm 13 ^a	0,43 \pm 0,14 ^a	10,6 \pm 1,3 ^a
3 horas (n=5)	2.124 \pm 105 ^b	52 \pm 7 ^a	0,90 \pm 0,20 ^a	13,4 \pm 2,5 ^a
6 horas (n=5)	2.895 \pm 674 ^b	130 \pm 10 ^b	1,35 \pm 0,29 ^b	22,7 \pm 1,5 ^b
12 horas (n=5)	2.410 \pm 135 ^b	103 \pm 16 ^b	1,52 \pm 0,38 ^b	22,4 \pm 1,9 ^b
24 horas (n=5)	785 \pm 465 ^a	246 \pm 39 ^b	1,08 \pm 0,46 ^b	15,6 \pm 2,0 ^a
7 días (n=5)	444 \pm 122 ^a	40 \pm 4 ^a	0,54 \pm 0,80 ^a	9,6 \pm 0,89 ^a
28 días (n=5)	604 \pm 263 ^a	61 \pm 11 ^a	0,48 \pm 0,50 ^a	14,4 \pm 0,14 ^a

En cada línea, diferentes letras indican diferencias significativas.

Tabla 2. Densidad y pH urinario ($\bar{x} \pm DE$), según lapso de muestreo (n = 35).

grupo	densidad	pH
controles (n=5)	1.060 \pm 0.010 ^a	8,0
3 horas (n=5)	anuria	anuria
6 horas (n=5)	1.074 \pm 0.013 ^a	6,0
12 horas (n=5)	1.015 \pm 0.031 ^b	5,6
24 horas (n=5)	1.017 \pm 0.006 ^b	6,5
7 días (n=5)	1.013 \pm 0.085 ^b	8,5
28 días (n=5)	1.010 \pm 0.078 ^b	7,8

En cada línea, diferentes letras indican diferencias significativas.

Las muestras de tejido renal fueron procesadas según la técnica histológica convencional y coloreadas con hematoxilina-eosina (HyE) y ácido periódico de Schiff (PAS). La expresión de mioglobina en tejido renal se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHQ), usando un anticuerpo policlonal (*BioGenex*). Para la marcación se utilizó el método estreptavidina-peroxidasa (Histostain-SP Peroxidase Bulk Kits, *Zymed*, USA) y como cromógeno se empleó la 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB-Plus-*Zymed*, USA).

El análisis de la variancia de los datos obtenidos a partir de las muestras de suero se realizó mediante estadísticas paramétricas (ANOVA de una vía), previa verificación de la simetría distribucional (test de Wilk Shapiro). Las diferencias entre medias fueron establecidas utilizando el test de Duncan. Los datos recogidos a partir de las muestras de orina fueron tratados como no paramétricos, aplicándose el test de Kruskal-Wallis. Para todas las inferencias se estipuló un riesgo alfa del 5%, por debajo del cual fue rechazada la hipótesis nula de igualdad.

RESULTADOS

Bioquímica clínica. Como muestra la Tabla 1, la actividad AST presentó su valor promedio más alto a las 24 horas, retornando a valores semejantes a los de los animales controles en la primer semana. En cambio CPK ostentó su acmé a las 6 horas y luego descendió alcanzando valores semejantes a los iniciales a los 7 días. Los niveles de urea y creatinina se elevaron a partir de las 3 y 6 horas post-inoculación respectivamente, con picos máximos a las 12 y 6 horas respectivamente. Para todas las determinaciones séricas, el análisis de la va-

rianza reveló diferencias significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Urianálisis. Dentro de las primeras 12 horas post-inoculación del veneno se observaron cambios de la coloración de la orina, coincidentes con la aparición de sangre-hemoglobina-mioglobina detectada por las tiras reactivas. Durante las tres primeras horas el color fue rojo oscuro; luego la tonalidad fue disminuyendo. A las 24 horas solamente

unos pocos ejemplares mantenían coloración anormal de la orina, siendo normal en los restantes. La densidad (Tabla 2) reveló una ligera elevación inicial (6 horas) para luego disminuir en forma sostenida y progresiva hasta la cuarta semana, diferencias que fueron estadísticamente significativas. Los cambios de pH fueron algo irregulares, manteniéndose por debajo del nivel normal durante las primeras 24 horas.

En el sedimento urinario de las ratas controles no se presentaron anomalías, en tanto que en las inoculadas aparecieron cristales de urato amorfo y fosfato triple acompañados por otros de color anaranjado brillante, que se interpretaron como cristales de mioglobina. Paralelamente se registró la presencia de cilindros hialinos, granulosos y celulares. Estos cambios alcanzaron mayor magnitud a las 12 horas. Durante la primer semana se constató proteinuria constante, con acmé a las 12 horas. En el grupo sacrificado a las 24 horas también se verificó glucosuria.

Histopatología e inmunohistoquímica. En todos los animales, a las tres horas se observaron fenómenos de degeneración hidrópica en las células epiteliales de los túbulos proximales y distales, con cilindros hialinos, dilatación de la luz tubular y congestión renal. Estos fenómenos se intensificaron hacia las 6 horas, con pérdida del ribete en cepillo, vacuolización citoplasmática y, en algunos túbulos, degeneración y necrosis con congestión y hemorragia intersticial (Figura 1).

Por otra parte, desde las 3 horas post-inoculación se visualizaron cilindros hialinos rosados, homogéneos, ocupando toda la luz de los túbulos contorneados proximales, distales y asas de Henle. Tales cilindros aún estaban presentes en el grupo sacrificado a las 24 horas. Con la coloración de PAS se observó ruptura de

las membranas basales de algunos túbulos contorneados a las 6 horas post-inoculación (Figura 2).

A las 4 semanas se observó tumefacción de células del epitelio tubular con dilatación de la luz, presencia de cilindros hialinos y células descamadas en la luz de los túbulos contorneados. Mientras que los túbulos de algunas nefronas presentaban células epiteliales aplanadas, otras permanecieron normales. En algunos glomérulos se observó un aumento del espacio de Bowman.

La técnica inmunohistoquímica evidenció la presencia de mioglobina en todos los animales, a las 3 horas post-inoculación del veneno, tanto en la membrana glomerular como en la luz de los túbulos contorneados y colectores, formando los cilindros hialinos observados en los cortes coloreados con HyE (Figuras 3 y 4). Esta marcación se tornó más débil hacia las 24 horas, desapareciendo a partir de los 7 días.

DISCUSIÓN

Utilizando una dosis de 0,4 mg/kg de veneno de *B. moojeni* vía EV, otros investigadores describieron que a las 5 horas aparecía pérdida del ribete en cepillo y vacuolas citoplasmáticas en las células tubulares, así

como degeneración y descamación de tejido necrótico⁴, observaciones semejantes a las verificadas en nuestro ensayo utilizando dosis más alta por vía intramuscular. La coloración PAS permitió confirmar las lesiones de la membrana basal. A las 3 horas la superficie apical de las células epiteliales tubulares presentaron destrucción del ribete en cepillo, semejante a la reportada por otros investigadores²⁷, con áreas de engrosamiento y pérdida de la continuidad de la membrana basal, como fuera descrito para el veneno de *B. moojeni*⁵. Al igual que para el veneno de *B. jararacussu*²² en las ratas del presente ensayo se observó edema e infiltrado inflamatorio intersticial.

La necrosis tubular aguda ha sido reportada en accidentes naturales causados por distintas especies de *Bothrops*^{1,2,6}. Si bien fue sugerido que la necrosis cortical podría deberse a coagulación intravascular, injuria tóxica directa del endotelio vascular y/o espasmo¹, en el presente trabajo no se encontraron trombos en las pequeñas arterias, arteriolas o capilares glomerulares. Por este motivo, no se puede afirmar que la coagulación intravascular pudiera ser la causa de la isquemia y necrosis cortical por oclusión vascular, como lo describieran los mencionados autores.

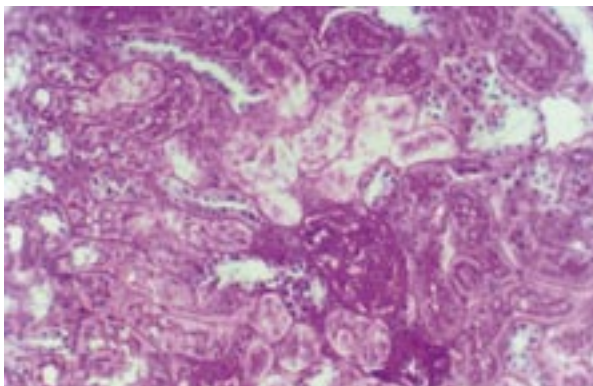


Figura 1. Riñón (6 horas post-inoculación del veneno). Alteraciones degenerativas y necrosis en el epitelio tubular (PAS, 200X).

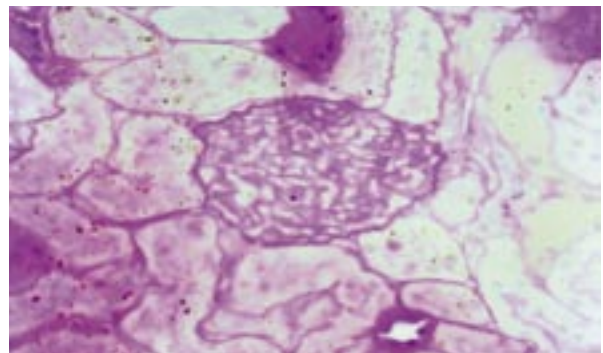


Figura 2. Riñón (6 horas post-inoculación del veneno). Necrosis y pérdida de los restos celulares en túbulos renales, dejando descubierta la membrana basal. Pigmento amarillo-verdoso entre los restos celulares (PAS, 400X).

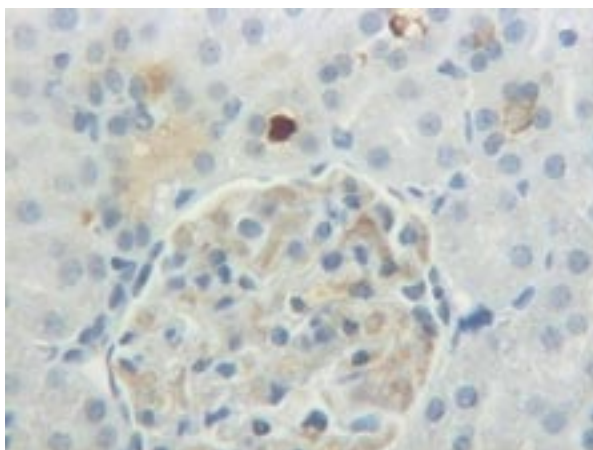


Figura 3. Riñón (3 horas post-inoculación del veneno). Inmunomarcación de mioglobina en el glomérulo y en la luz de los túbulos (IHQ, 400X).

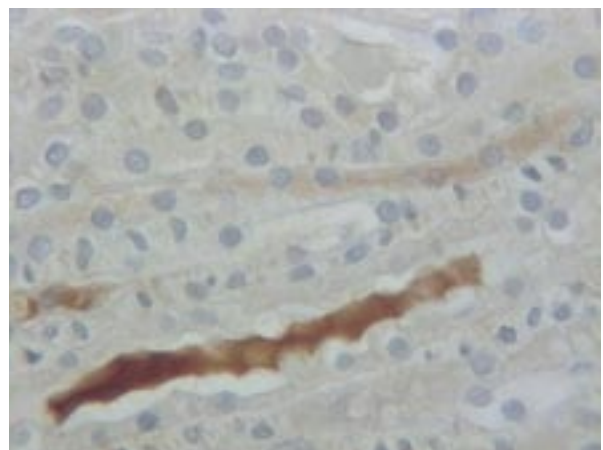


Figura 4. Riñón (3 horas post-inoculación del veneno). Intensa inmunomarcación de mioglobina en intersticio y túbulos colectores de zona medular (IHQ, 400X).

Los cilindros hialinos que se tiñeron homogéneamente con HyE y fueron positivos a la inmunomarcación para mioglobina en los túbulos proximales, distales y asa de Henle, fueron semejantes a los reportados para otros venenos de ofidios^{25,26}.

La presencia de mioglobina en los túbulos puede desarrollar insuficiencia renal aguda. Hay evidencias que relacionan las lesiones oxidativas con las alteraciones sufridas por las hemoproteínas dentro de las células epiteliales tubulares^{24, 29, 31}. No se descarta que estos daños oxidativos ocurran simultáneamente a otras lesiones que pudieran ejercer las toxinas en forma directa, como la injuria renal inducida por la peroxidación lipídica. Este efecto fue demostrado en células epiteliales tubulares aisladas de ratas machos de la cepa Wistar, tratadas con veneno de *B. jararaca*⁸. Tampoco pueden dejar de considerarse las alteraciones del flujo de filtración y del filtrado glomerular generados por el veneno de *B. jararaca* administrado por vía endovenosa⁷, o los efectos antibacterianos y nefrotóxicos inducidos en ratas por las miotoxinas I y II aisladas del veneno de *B. jararacussu*³.

Los venenos de serpientes son excretados por los riñones^{13, 18, 30} en tanto éstos dispongan de un alto flujo sanguíneo y elevada capacidad para concentrar sustancias en la orina. Se asume que la concentración tubular puede alcanzar 10 a 20 veces la concentración sanguínea⁸. En el presente ensayo, la anuria registrada en las primeras horas y las precoces elevaciones de urea y creatinina sugieren el establecimiento de una insuficiencia renal aguda, como fuera descrito por otros autores²⁸. El ulterior incremento de la concentración urinaria podría relacionarse al aumento de los solutos del filtrado glomerular¹⁴, en nuestro caso representados por glucosa y proteínas.

Los cambios histopatológicos alcanzaron su máxima expresión hacia las 24 horas (necrosis tubular), coincidiendo con las mayores alteraciones fisicoquímicas de la orina. En cambio, en ese lapso los parámetros séricos comenzaron a descender, probablemente debido a una hemodilución instalada como consecuencia de la regulación compensadora de la ingesta hídrica. Usualmente, el daño de las células tubulares renales se acompaña de alteraciones de los mecanismos de concentración de orina y de regulación de la natremia, provocando poliuria y polidipsia como respuestas compensadoras. En el presente ensayo, el aumento del volumen urinario y la disminución de la densidad concordaron con los hallazgos histopatológicos de necrosis tubular aguda, en coincidencia con lo reportado por otros investigadores^{14,28}.

Se concluye que la presencia temprana de mioglobina en la luz de los túbulos contorneados, asa de Henle y colectores, asociada a las manifestaciones degenerativas y necróticas observadas, indican que dicho pigmento participa en la instalación del daño renal provocado por el veneno de *Bothrops neuwiedii*.

REFERENCIAS

1. **Amaral CF, da Silva AO, Godoy P, Miranda D.** 1985. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23: 877-885.
2. **Amaral CF, Rezende NA, Silva AO, Ribeiro MM, Magalhaes RA, Reis RJ, Carneiro JG, Castro JR.** 1986. Insuficiencia renal aguda secundaria a accidente ofídico botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 28: 220-227.
3. **Barbosa P, Havt A, Faco PE, Sousa TM, Becerra IS, Fonteles MC, Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Monteiro HS.** 2002. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 40: 1427-35.
4. **Boer Lima PA, Rocha Gontijo JA, Da Cruz-Hoffling MA.** 1999. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am J Trop Med Hyg* 61: 698-706.
5. **Boer Lima PA, Rocha Gontijo JA, Da Cruz-Hoffling MA.** 2002. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am J Trop Med Hyg* 67: 217-222.
6. **Bonnet EF, Pedace EA.** 1971. Muerte por picadura de víbora yarará. Consideraciones histopatológicas y médico legales. *Acad Nac Medic* 48: 417-432.
7. **Burdmann EA, Woronik V, Prado EB, Abdulkader RC, Saldanha LB, Barrete OC, Marcondes M.** 1993. Snake-bite-induced acute renal failure: an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 48: 82-88.
8. **Castro I, Burdmann EA, Seguro AC, Yu L.** 2004. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon* 43: 833-839.
9. **Cupo P, Marques MM, Hering SE.** 1991. Crotalid bites in children: clinical, laboratory, epidemiologic aspects and treatment approach. *Rev Soc Bras Med Trop* 24: 87-96.
10. **Esteso SC.** 1985. *Ofidismo en la República Argentina*, Ed. Arpón, Córdoba, p. 175.
11. **Gburek J, Verroust PJ, Willnow TE, Fyfe JC, Nowacki W, Jacobsen C, Moestrup SK, Christensen EI.** 2002. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. *J Am Soc Nephrol* 13: 423-430.
12. **Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M, Lomonte B.** 1999. Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina. *Toxicon* 37: 735-746.
13. **Gesek FA, Wolf DW, Strandhoy JW.** 1987. Improved separation method for rat proximal and distal tubules. *Am J Physiol* 253: F358-F365.
14. **Graff SF.** 1987. *Análisis de orina*, Panamericana, Buenos Aires, p. 30.
15. **Gutiérrez JM, Cerdas L.** 1984. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev Biol Trop* 32: 213-222.
16. **Gutiérrez JM, Lomonte B.** 1995. Phospholipase A myotoxins from *Bothrops* snakes venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.

17. **Havt A, Fonteles MC, Monteiro HS.** 2001. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAFblockers. *Toxicon* 39: 1841-1846.
18. **Khin OL, Aye AM, Tun P, Theingie N, Min N.** 1984. Russell's viper venos levéis in serum os snake bite victims in Burma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 165-168.
19. **Knochel JP.** 1999. Nefropatía por pigmentos. En: *Tratado de las Enfermedades Renales* (Greenberg A ed.), 2° ed., Harcourt Brace, Barcelona, p. 282-286.
20. **Koscinczuk P, Maidana HR, Acosta de Pérez OA.** 1995. Evolución y tratamiento del accidente ofídico por yará en caninos. *Rev Med Vet* 76: 310-318.
21. **Koscinczuk P, Borda JT, Maruñak S, Acosta de Pérez O, Mussart de Coppo N.** 2004. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 64: 320-324.
22. **Milani R, Jorge MT, Ferraz de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, Ribeiro LA, Fan HW, Franca FO, Sano Martins IS, Cardoso D, De Cássia O, Ferreira Fernandez I, Fernández JC, Aldred VL, Sandoval MP, Puerto G, Thcakston RD, Warrell DA.** 1997. Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State. *Brazil Q J Med* 90: 323-334.
23. **Ministerio da Saúde, Fundacao Nacional de Saude.** 1998. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Pecoehentos, Brasília, p. 24.
24. **Moore KP, Holt SG, Patel RP, Svistunenko DA, Zackert W, Goodlert D, Reeder BJ, Clozel M, Anand R, Cooper CE, Morrow JD, Wilson MT, Darley-Usmar V, Roberts IJ.** 1998. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J Biol Chem* 273: 31731-31737.
25. **Ponraj D, Gopalakrishnakone P.** 1995. Morphological changes induced by a generalized myotoxin (myoglobinuria-inducing toxin) from the venom of *Pseudechis australis* (king brown snake) in skeletal muscle and kidney of mice. *Toxicon* 33: 1453-1465.
26. **Ponraj D, Gopalakrishnakone P.** 1996. Establishment of an animal model for myoglobinuria by use of a myotoxin from *Pseudechis australis* (King Brown snake) venom in mice. *Lab Anim Sci* 46: 393-398.
27. **Rezende NA, Amaral CF, Barabirra EA, Lachatt JJ, Coimbra TM.** 1989. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Bras J Med Biol Res* 22: 407-416.
28. **Safirstein R.** 1999. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. En: *Tratado de las Enfermedades Renales* (Greenberg A ed.), 2° ed., Harcourt Brace, Barcelona, p. 253-259.
29. **VanHolder R, Sever MS, Ereke E, Lamiere N.** 2000. Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 11: 1553-1561.
30. **Warrell DA, Davidson NM, Omerod LD, Pope HM, Watkins BJ, Greenwood BM.** 1974. Bites by the saw scaled or carpet viper (*Echis carinatus*): trial of two specific antivenoms. *Br Med J* 4: 437-440.
31. **Zager RA.** 1996. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int* 49: 314-326.