



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ALINE DIOGO MARINHO**

**Efeitos renais induzidos pelas fosfolipases A2 Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno  
da serpente *Bothropoides pauloensis*.**

**Fortaleza**

**2018**

**ALINE DIOGO MARINHO**

**Efeitos renais induzidos pelas fosfolipases A2 Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

**Fortaleza**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M29e Marinho, Aline Diogo.

Efeitos renais induzidos pelas fosfolipases A2 Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*. / Aline Diogo Marinho. – 2018.

131 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. *Bothropoides pauloensis*. 2. Efeito renal. 3. PLA2. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 615.1

---

**ALINE DIOGO MARINHO**

**Efeitos renais induzidos pelas fosfolipases A2 Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno  
da serpente *Bothropoides pauloensis*.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 23/02/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Gustavo José da Silva Pereira  
Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

---

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão  
Universidade Estadual do Ceará-UECE

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais, Marinho e Fátima.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por fazer possível esse momento.

Agradeço aos meus pais por tudo, principalmente pelo apoio nos momentos de adversidades.

À toda a minha família MARINHO, em especial meus irmãos, sobrinhos, avó, tia e cunhados.

Ao namorado Guilherme, por todo amor e atenção a mim dedicados.

À minha orientadora Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que foi fundamental para a conclusão dessa etapa tão importante da minha vida. Sem o seu apoio e incentivo, nada disso seria possível. Não tenho palavras para agradecer tudo que a senhora representa pra mim. É um orgulho tê-la como orientanda e poder participar do seu cotidiano.

Às minhas amigas Roberta Jeanne e Isabel Cristina, pelas quais tenho profunda admiração, agradeço em primeiro lugar pela amizade incondicional, em todos os momentos, pela paciência, pelo apoio, pelo incentivo, pelo carinho e pela ajuda acadêmica.

Aos membros do laboratório (LFAVET), em especial, Antônio Rafael, Silvia Helena, Júnior e Pedro Luiz, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

À Profa. Dra. Janaína Serra Azul Evangelista (UECE), por ter gentilmente me recebido em seu laboratório e ter me auxiliado.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pereira (UNIFESP), pela colaboração acadêmica e incentivo.

Às Professoras Dra. Cláudia Bincoletto e Dra. Soraya Smaili (UNIFESP), por disponibilizarem os laboratórios para realização de experimentos.

Aos amigos da UNIFESP, pela ajuda nos experimentos e principalmente ao carinho e atenção a mim dedicados, em especial, Ana, Janaína, Angélica, Daniel, Carol, Rodrigo, Cássia, Lucas, Hanako e Fernanda.

Ao Prof. Dr. Colin W Taylor (University of Cambridge), por ter me aceito e colaborado com a realização dos experimentos.

À Dra. Emily Taylor (University of Cambridge), pela receptividade, apoio e amizade durante toda a minha estadia na Inglaterra.

Aos amigos da UniCambridge, pelo companheirismo e amizade, em especial, Stef, Peace, Anna, Raul, Baboo e Laura.

Aos professores Dra. Nylane Nunes, Dra Danielle Macedo e Dr. Roberto Lima (UFC), pela colaboração e principalmente por tornarem a minha jornada na pós-graduação tão engratecedora, pelos quais tenho enorme gratidão e admiração.

Aos Professores que direta e/ou indiretamente me impulsionaram nessa caminhada, em especial, Profa. Dra. Alice Maria e Dra Geanne.

À secretaria da pós-graduação (Laura e Célia), em especial agradeço à Laura por toda a disponibilidade e atenção.

Aos meus amigos Adriano Chaves e Venúcia, pela ajuda nos experimentos e amizade.

À minha amiga Mara, pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional.

À minha amiga Raquel, pelo acolhimento em SP e amizade.

Aos amigos Marcos e Milva, pela receptividade e amizade em SP.

Aos tios Humberto Lacerda e Isa, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos, pela amizade verdadeira que me proporcionam, pela dedicação e carinho. Alguns em especial: Regiane, Tia Cida, Cristina, Geirlane, Hellen, Sália, Marcela, Rebeca, Dandara, Helana, Jorge.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de doutorado para parte realizada no país e para parte desenvolvida na Inglaterra.

À UFC pela formação e oportunidades.

*“Sem sonhos a vida não tem brilho.  
Sem metas os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades os sonhos não se tornam reais”.*

*Augusto Cury.*

## RESUMO

**Efeitos renais induzidos pelas fosfolipases A2 Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.** Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2018.

A *Bothropoides pauloensis* é uma serpente peçonhenta que habita a região Sudeste do Brasil. Os efeitos biológicos devido ao envenenamento por *B. pauloensis* têm perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, com importantes efeitos locais e sistêmicos graves como a Insuficiência Renal Aguda (IRA). Neste trabalho foi avaliado o efeito nefrotóxico das fosfolipases A2 (PLA<sub>2</sub>) Lys-49 e Asp-49 isoladas do veneno de *Bothropoides pauloensis* em rim isolado de rato e sobre células renais (MDCK e HEK-293). As PLA<sub>2</sub> (3µg/mL) exerceram efeitos significativos no rim isolado de rato, Asp-49 reduziu a pressão de perfusão (PP) aos 90 e 120min (101,0±2,6 e 96,6±2,0, respectivamente), a Resistência Vascular Renal (RVR) aos 90min (4,4±0,3), o Fluxo Urinário (FU) aos 60min (0,17±0,02) o Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) aos 60, 90 e 120min (0,44±0,08; 0,55±0,15 e 0,34±0,08, respectivamente) e os percentuais de transportes tubulares de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>) aos 60, 90 e 120 min. Lys-49, aumentou a PP aos 60, 90 e 120min (130±3,7; 132±7,6 e 142±10,5, respectivamente) e o FU aos 60, 90 e 120min (0,20±0,01; 0,22±0,01 e 0,23±0,01, respectivamente) e diminuiu o RFG aos 60, 90 e 120min (0,50±0,15; 0,44±0,11 e 0,45±0,11, respectivamente) e os %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup> e %TCl<sup>-</sup>. As PLA<sub>2</sub> alteraram, consideravelmente, os níveis de MDA em Lys-49 (16,98±2,53), Nitrito em Asp-49 (301,9±15,51) e Lys-49 (354,3±39,9), GSH em Asp-49 (690,4±65,21) e Lys-49 (1314±37,34) e MPO em Asp-49 (3,133±0,636) e Lys-49 (6,863±0,834). As citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) e anti-inflamatória (IL-10) também estão envolvidas no mecanismo de nefrotoxicidade. Na Asp-49, TNF-α (2,52±0,48) e IL-10 (4,153±0,261), na Lys-49, IL-1β (5,40±0,26), TNF-α (6,59±0,65) e IL-10 (5,86±0,60). O tratamento com as PLA<sub>2</sub> causaram diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens celulares após 24 horas de tratamento. Nas células MDCK, tratadas com Asp-49, houve aumento de espécies reativas de oxigênio, não foi observada ruptura de membrana, não alterou a porcentagem de células em apoptose, necrose e necrose secundária, também não alterou o ciclo celular. Em células HEK-293, não houve liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático.

**Palavras-chave:** *Bothropoides pauloensis*; Efeito renal; PLA<sub>2</sub>; Citotoxicidade.

## ABSTRACT

**Renal effects induced by dos phospholipase A2 Asp-49 e Lys-49 isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom.** Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, 2018.

The *Bothropoides pauloensis* is a poisonous snake habituating area in the southeast of Brazil. The biological effects by envenomation show similar profile than those observed with other *Bothrops*, such as important severe local and systemic effects such as Acute Renal Failure (ARF). In this work, we investigated the renal effects of phospholipases Lys-49 and Asp-49 isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom in isolated rat kidney system and in renal cells lines MDCK and HEK-293. The PLA<sub>2</sub>s (3μg/mL) caused significant effects in isolated rat kidney, Asp-49 reducing perfusion pressure (PP) at 90 and 120min (101,0±2,6; 96,6±2,0, respectively), the Renal Vascular Resistance (RVR) at 90min (4,4±0,3), the Urinary Flow (UF) at 60min (0,17±0,02), the Glomerular Filtration Rate (GFR) at 60, 90 and 120min (0,44±0,08; 0,55±0,15 and 0,34±0,08, respectively) and the percentage of tubular sodium (%TNa<sup>+</sup>), chloride (%TCl<sup>-</sup>) and potassium (%TK<sup>+</sup>). The Lys-49 increased PP at 60, 90 and 120min (130±3,7; 132±7,6 and 142±10,5, respectively) and UF at 60, 90 and 120min (0,20±0,01; 0,22±0,01 and 0,23±0,01, respectively) and decreased the RFG at 60, 90 and 120min (0,50±0,15; 0,44±0,11 and 0,45±0,11, respectively) and the %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup> and %TCl<sup>-</sup>. The PLA<sub>2</sub> caused alterations in MDA Lys-49 (16,98±2,53), Nitrite in Asp-49 (301,9±15,51) and Lys-49 (354,3±39,9), GSH in Asp-49 (690,4±65,21) and Lys-49 (1314±37,34) and MPO in Asp-49 (3,133±0,636) and Lys-49 (6,863±0,834). The cytokines pro-inflammatory (IL-1β e TNF-α) and anti-inflammatory (IL-10) are involvement in nephrotoxicity mechanism. The Asp-49, TNF-α (2,52±0,48) and IL-10 (4,153±0,261), the Lys-49, IL-1β (5,40±0,26), TNF-α (6,59±0,65) and IL-10 (5,86±0,60). The treatments (24h) of PLA<sub>2</sub> were able to reduce cell viability in both cells lines. In MDCK cell, we verified the generation of reactive oxygen species with Asp-49, not induced membrane rupture, not showed the percentage of apoptotic, necrotic or secondary necrotic cells and not caused alteration in cell cycle. In HEK-293, not observed release of calcium from endoplasmatic reticulum

**Keywords:** *Bothropoides pauloensis*; Renal Effects; PLA<sub>2</sub>; Cytotoxicity

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA- ácido aracdônico

AnnV - Anexina V

APAF-1 - Fator de Ativação Associado a apoptose-1

Atg - Autofagia

BSA - albumina sérica bovina

Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio

DCFH-DA - 2,7diclorodiidrofluoresceína diacetato

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DR - *Death Receptors*

EGTA - Ácido Etileno Glicol Tetracético

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

FCCP - Carbonilcianeto-p-tri fluorometoxifenilhidrazon

FU - Fluxo Urinário

HEK-293 – *Human Embryonic Kidney*

IP - Iodeto de propídeo

IP3R - Receptor de trifosfato de inositol

IRA - Insuficiência Renal Aguda

MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney*

MS - Ministério da Saúde

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H

OMS - Organização Mundial de Saúde

%TCl - Percentual de cloreto transportado

%TK+ - Percentual de potássio transportado

%TNa+ - Percentual de sódio transportado

PLA2- fosfolipase A2

PP - pressão de perfusão

PS - fosfatidilserina

RE - Retículo Endoplasmático

RFG - Ritmo de Filtração Glomerular

rTNF - Receptor de fator de necrose tumoral

RVR - Resistência Vascular Renal

RyR - Receptor de rianodina

SBF - Soro Bofino Fetal

SERCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

svLAAO - L- aminoácido oxidase isolada de veneno de serpente

svMPS - Metaloproteinases isoladas de venenos de serpentes

svPLA2 - Fosfolipase isolada de venenos de serpente

t-BHP - Tert-Butilhidroperóxido

TMRE - *Tetramethylrhodamine ethyl ester*

$\Delta\Psi_m$  - potencial de membrana mitocondrial

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação das serpentes.	20
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica no Brasil (2007-2012).	22
<b>Figura 3:</b> Variação sazonal no Brasil (2001-2012).	22
<b>Figura 4:</b> Incidência de acidentes por serpentes, segundo o município de ocorrência, Ceará (2007-2016).	23
<b>Figura 5:</b> <i>Bothropoides pauloensis</i> .	25
<b>Figura 6:</b> O perfil transcriptoma da glândula de veneno de <i>B. pauloensis</i> .	25
<b>Figura 7:</b> Proteoma do veneno de <i>B. pauloensis</i> .	26
<b>Figura 8:</b> Foto do sistema de perfusão de rim isolado.	45
<b>Figura 9:</b> Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.	45
<b>Figura 10:</b> PP registrada durante a calibração do sistema.	46
<b>Figura 11:</b> Fluxo registrado durante a calibração do sistema.	46
<b>Figura 12:</b> Volume urinário registrado durante a calibração do sistema.	47
<b>Figura 13:</b> Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão	48
<b>Figura 14:</b> Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento de MDCK	54
<b>Figura 15:</b> Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular.	55
<b>Figura 16:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 na pressão de perfusão em rim isolado de rato, na concentração de 3µg/mL.	63
<b>Figura 17:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL na resistência vascular renal (RVR).	64
<b>Figura 18:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no fluxo urinário (FU).	64

<b>Figura 19:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no RFG.	65
<b>Figura 20:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNA <sup>+</sup> ).	66
<b>Figura 21:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl <sup>-</sup> )	66
<b>Figura 22:</b> Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK <sup>+</sup> ).	67
<b>Figura 23:</b> Prancha representativa da fotomicrografia dos rins, por área (córtex, outer medulla e inner medulla) em aumento de 200x.	68
<b>Figura 24:A1</b> Imagens representativas dos rins (400x)	69
<b>Figura 24:A2</b> Imagens representativas dos rins (400x)	69
<b>Figura 24:A3</b> Imagens representativas dos rins (400x)	70
<b>Figura 24:B1</b> Imagens representativas dos rins (400x)	70
<b>Figura 24:B2</b> Imagens representativas dos rins (400x)	71
<b>Figura 24:B3</b> Imagens representativas dos rins (400x)	71
<b>Figura 25:</b> Níveis teciduais de MDA.	72
<b>Figura 26:</b> Níveis teciduais de GSH.	73
<b>Figura 27:</b> Níveis teciduais de Nitrito.	73
<b>Figura 28:</b> Níveis teciduais de MPO.	74
<b>Figura 29:</b> Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de TNF-α.	75
<b>Figura 30:</b> Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de IL-1β.	75
<b>Figura 31:</b> Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de IL-10.	76

<b>Figura 32:</b> Percentual de viabilidade das células MDCK tratadas com diferentes concentrações Asp-49 e Lys-49 (MTT)	77
<b>Figura 33:</b> Percentual de viabilidade das células MDCK tratadas com diferentes concentrações Asp-49 e Lys-49 (Alamar Blue).	77
<b>Figura 34:</b> Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.	78
<b>Figura 35:</b> Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial	79
<b>Figura 36:</b> Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo	80
<b>Figura 37:</b> Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular (e sub G1) Controle negativo e Controle positivo.	81
<b>Figura 38:</b> Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular tratadas com Asp-49 (25 e 50 µg)	82
<b>Figura 39:</b> Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular tratadas com Asp-49 (75 e 100 µg)	83
<b>Figura 40:</b> Alterações na morfologia de MDCK	84
<b>Figura 41:</b> Efeito de Asp-49 e Lys-49 sobre a viabilidade de célula renal (HEK-293)	85
<b>Figura 42:</b> Curva dose-resposta para o Carbacol no FlexStation em células HEK-293	86
<b>Figura 43:</b> Curva dose-resposta para Asp-49 e Lys-49 no FlexStation em células HEK-293.	86
<b>Figura 44:</b> Alterações morfológicas nas células HEK-293 tratadas com Asp-49 e Lys-49.	87

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Estudos com veneno total de espécies do gênero <i>Bothrops</i> em Perfusão de Rim Isolado.	31
<b>Quadro 2:</b> Fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais.	49

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	20
1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos	20
1.2 Gênero <i>Bothrops</i> e <i>Bothropoides</i>	23
1.3 <i>Bothropoides pauloensis</i> (serpente e veneno)	24
1.4 Composição química e atividade biológica do veneno	26
1.5 As fosfolipases (PLA <sub>2</sub> s)	27
1.6 O veneno e o rim	29
1.7 Mecanismos oxidantes e inflamatórios	32
1.8 Morte celular	34
1.8.1 Apoptose	34
1.8.2 Necrose	35
1.8.3 Vias de sinalização	36
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	40
<b>3. OBJETIVOS</b>	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	44
4.1 Obtenção do veneno	44
4.2 Ensaio biológicos	44
4.2.1 Perfusão de órgão isolado	44

4.2.2 Animais de experimentação	44
4.2.3 Grupos experimentais	44
4.2.4 Modelo de Perfusão de Rim Isolado	44
4.2.5 Calibração do sistema	46
4.2.6 Solução perfusora	47
4.3 Análises bioquímicas	48
4.4 Determinação de parâmetros funcionais renais	49
4.5 Análise histopatológica	50
4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor e inflamação no tecido renal	50
4.6.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)	50
4.6.2 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)	51
4.6.3 Determinação dos níveis de nitrito (Nitrito)	51
4.6.4 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	52
4.6.5 Detecção de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10)	52
4.7 Ensaios com cultura de células	53
4.7.1 Linhagem celular	53
4.7.2 Cultivo de células MDCK	53
4.8 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	54
4.8.1 Viabilidade celular	54
4.8.2 Ensaio colorimétrico do MTT	54
4.8.3 Ensaio colorimétrico do Alamar Blue	56
4.8.4 Medição de EROs intracelular	56

4.8.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )	57
4.8.6 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.	58
4.8.7 Análise do efeito de Asp-49 sobre o ciclo celular (PI)	59
4.8.8 Avaliação das alterações morfológicas induzidas por Asp-49	60
4.9 Cultivo das células HEK-293	60
4.9.1 Teste de Viabilidade <i>Trypan-Blue</i>	60
4.9.2 Análise da liberação de cálcio (FlexStation)	61
4.9.3 Análise da morfologia celular (Fluid)	61
4.10 Aspectos éticos	61
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>63</b>
5.1 Perfusão de rim isolado	63
5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com Lys-49 e Asp-49	67
5.3 Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor e inflamação no tecido renal	72
5.3.1 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)	72
5.3.2 Determinação da atividade da glutathiona reduzida (GSH)	72
5.3.3 Determinação dos valores de nitrito	73
5.3.4 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)	74
5.3.5 Dosagem de citocinas	74
5.4 Avaliação da atividade de Lys-49 e Asp-49 sobre células MDCK	76
5.4.1 Ensaio de viabilidade celular MTT e Alamar Blue	76
5.4.2 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio	78

5.4.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )	78
5.4.4 Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo	79
5.4.5 Avaliação do efeito de Asp-49 sobre o ciclo celular	80
5.4.6 Alterações morfológicas induzidas por Asp-49 em células MDCK	83
5.5 Ensaio com HEK-293	85
5.5.1 Teste de Viabilidade <i>Trypan-Blue</i>	85
5.5.2 Análise da liberação de cálcio (FlexStation)	86
5.5.3 Análise da morfologia celular (Fluid)	
<b>6. DISCUSSÃO</b>	89
<b>7. CONCLUSÕES</b>	104
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	106

## **ANEXOS**

122

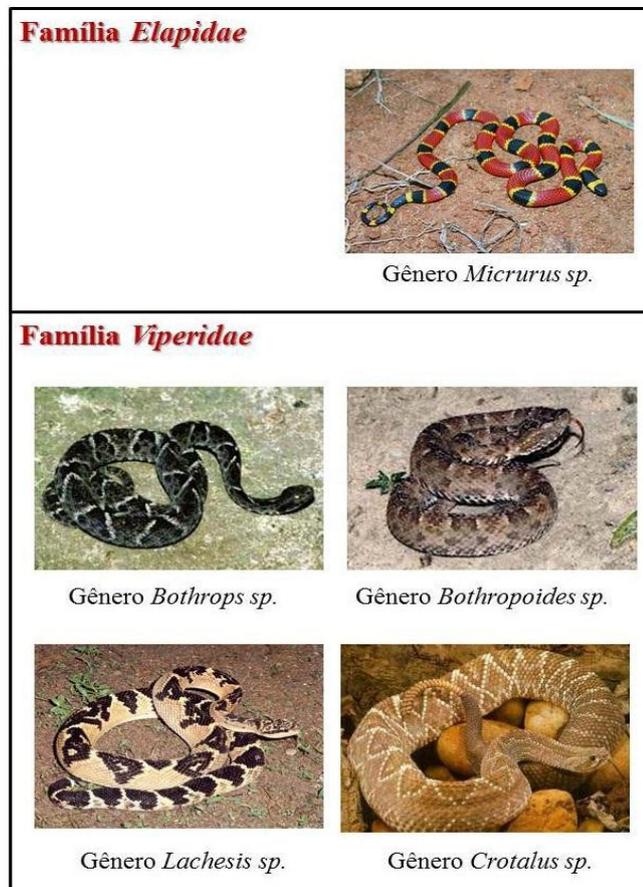
## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

As serpentes pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Reptilia, subclasse Lepdosaura, ordem Squamata, subordem Serpentes (HICKMAM; ROBERTS e LARSON, 2004). Estão presentes em praticamente todo o mundo, constituindo o maior número de reptéis vivos, totalizando aproximadamente 3 mil espécies. No Brasil, estão presentes 75 gêneros, agrupados em 10 famílias, dessas apenas 2 famílias, Viperidae e Elapidae (figura 1), são consideradas peçonhentas, ou seja, possuem glândula produtora de veneno e aparelho inoculador (BÉRNILS, 2011). A família Elapidae compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus*, com mais de 50 espécies. A família Viperidae, composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis*, *Crotalus* e *Lachesis*, representa o mais importante grupo de serpentes, pois é responsável pela maioria e mais graves casos de acidentes ofídicos registrados nos países da América (figura 1) (QUEIROZ *et al.*, 2008).

**Figura 1:** Classificação das serpentes.



Fonte: BÉRNILS, 2011.

Envenenamento por serpentes constitui um importante problema de saúde pública, em países tropicais e subtropicais, representando cerca de 5,4 milhões de acidentes por ano (WHO, 2017). Aproximadamente 137.880 óbitos e cerca de três vezes mais morbi-mortalidade (como amputações, deformações e falência renal) ocorrem (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Uma melhor compreensão dessa epidemiologia (incidência, distribuição geográfica, população de risco, circunstâncias da mordida e gravidade), ajudaria no seu manejo e deveria ser usado para exortar a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluir definitivamente mordidas por serpentes na lista de doenças tropicais negligenciadas (NTD) e convencer agências internacionais de financiamento. Também ajudaria os fabricantes de antivenenos a produzir a quantidade necessária e as Autoridades de Saúde para fornecer os centros de saúde de acordo com a incidência declarada e a distribuição geográfica dos envenenamentos (CHIPPAUX JP, 2017).

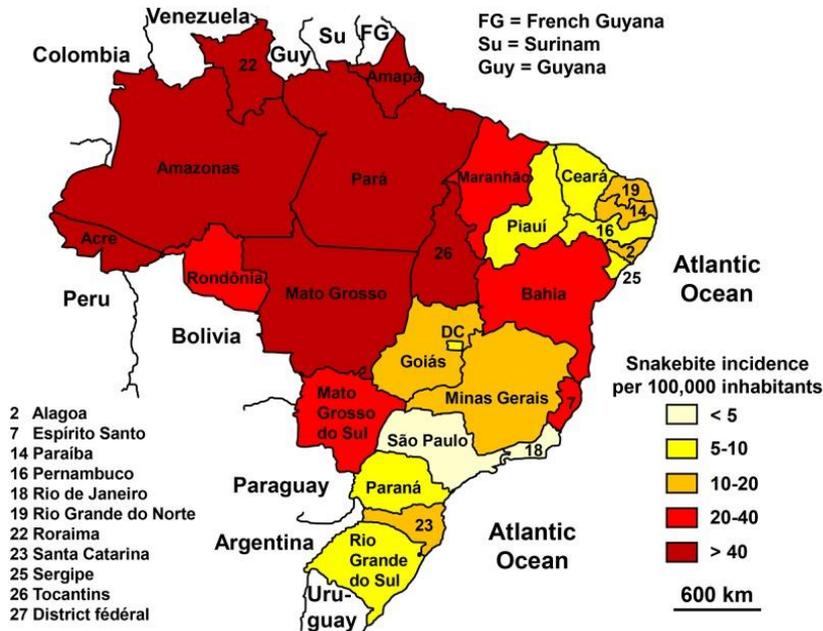
Na América, a incidência média anual é de cerca de 57.500 mordidas (6.2 por 100.000 habitantes) e a mortalidade é próxima de 370 mortes (0,04 por 100.000 habitantes), ou seja, entre um terço e metade das estimativas anteriores. A incidência de acidentes ofídicos é influenciada pela abundância destas, que está relacionada com o clima e altitude, preferências específicas da serpente para ambientes adequados ao seu desenvolvimento e a densidade populacional humana. A literatura recente permitiu notar que a gravidade depende principalmente da serpente responsável (espécie e tamanho) e da acessibilidade dos cuidados de saúde, incluindo disponibilidade de antivenenos (CHIPPAUX JP, 2017).

Esses dados da América, entretanto, são fragmentados e pouco representativos, isso é particularmente verdadeiro em países da América Central e do Sul, como consequência, os países latino-americanos introduziram a notificação obrigatória de acidentes ofídicos na década de 2000 (GUTIÉRREZ, 2011). Na América do Sul, o Brasil passou a notificar os casos a partir de 2001. No período de 2001-2012, o Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) registrou cerca de 27.200 mil casos por ano (15 por 100.000 habitantes) com mais de 115 mortes (0.06 por 100.000 habitantes) (BRASIL, 2012).

No Brasil, a distribuição geográfica mostrou uma clara predominância na região norte, especialmente na Amazônia (figura 2). A distribuição sazonal dos acidentes foi mais pronunciada no verão, particularmente na região sul (figura 3). A incidência por faixa etária variou muito de região para região. Foi maior entre os jovens na Amazônia e nas pessoas com mais de 40 anos no planalto do interior. As espécies de *Bothrops* foram responsáveis pela maioria das picadas em todo o Brasil (85%) (HATAKEYAMA *et al.*, 2018). Os acidentes por *Crotalus durissus* são mais frequentes nas savanas oriental e central e os por *Lachesis sp.*

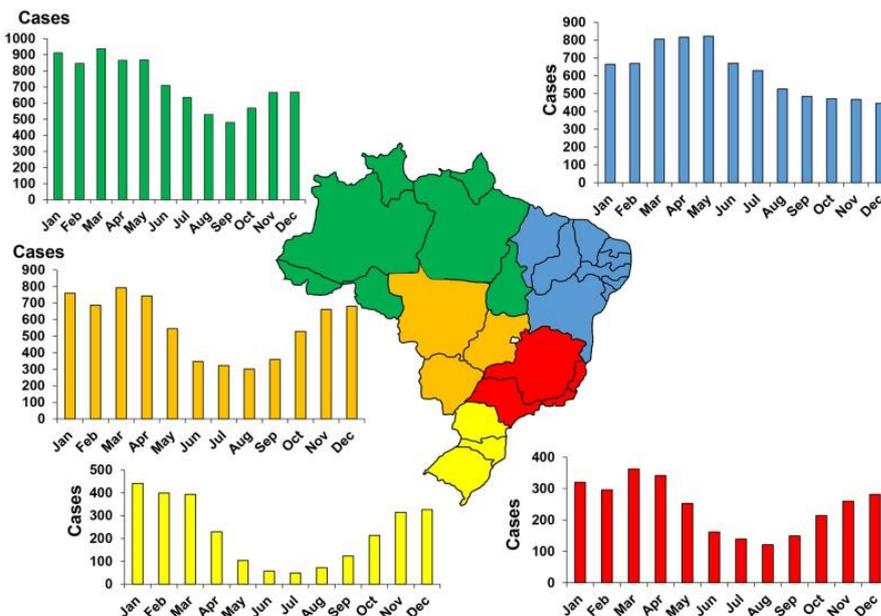
principalmente na região amazônica. Aqueles de *Micrurus sp.* são raras. Finalmente, houve uma forte correlação inversa entre a incidência e a densidade populacional (CHIPPAUX JP, 2015).

**Figura 2:** Distribuição geográfica no Brasil (2007-2012).



Fonte: (Raphael Lorenzeto de Abreu, *Map of Brazil's region*) CHIPPAUX JP, 2017.

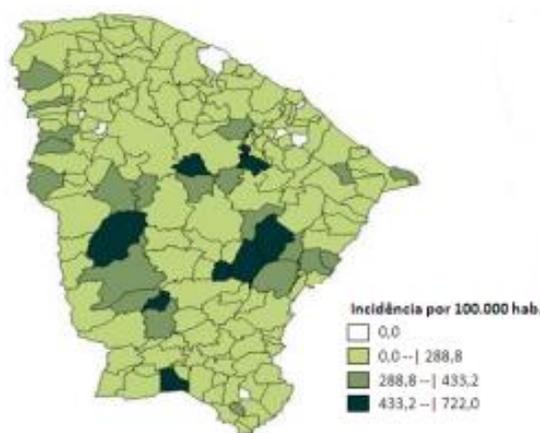
**Figura 3:** Variação sazonal no Brasil (2001-2012).



Fonte: CHIPPAUX, 2017.

No estado do Ceará foram notificados, entre os anos 2007 a 2016, 28.402 acidentes por animais peçonhentos notificados, 23,4% (6.169) foram serpentes (figura 4). No mesmo período, as mulheres representam 20,9% das vítimas e os homens representam 79,1%. Ao analisar a faixa etária, observa-se que grande parte, nos últimos 10 anos, ocorreu entre 20 e 49 anos (SINAN, 2016).

**Figura 4:** Incidência de acidentes por serpentes, segundo o município de ocorrência, Ceará (2007-2016).



Fonte: SINAN, 2016.

### 1.2 Gênero *Bothrops* e *Bothropoides*

Fenwick *et al.* (2009) classificaram as serpentes da família *Viperidae*, mais precisamente o gênero *Bothrops*, em 5 gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*. Esta classificação está fundamentada em um conjunto de dados morfológicos e multigênica mitocondrial (análise comparativa mitocondrial), que reconhece linhagens evolutivamente, ecologicamente e morfológicamente distintas como gêneros. Além dos dados morfológicos e de multigênica mitocondrial, foi considerada a diversidade nutricional à que cada espécie é submetida, pois influencia na composição da peçonha, levando à diversificação destes animais. O arranjo taxonômico pode ter um impacto importante na área médica, no qual a correta identificação da espécie responsável pelo acidente de uma determinada área é essencial para a produção e uso eficiente da soroterapia (RODRIGUES *et al.*, 2012).

No gênero *Bothrops*, portanto, estão incluídas as espécies: *Bothrops atrox*, *Bothrops brasili*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops muriciensis* (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012).

O gênero *Bothropoides* (derivado do grego sendo “bothros” e “ops” relacionados ao poço facial e “oides” que significa semelhante) inclui as espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erytromelas*, *Bothropoides insulares*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*. Essa é a nova classificação atualmente aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012.

As serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (ALBUQUERQUE, 2004; MELGAVAREJO, 2003).

### **1.3 *Bothropoides pauloensis* (serpente e veneno)**

A serpente *Bothropoides pauloensis* (figura 5) (homenageando o Príncipe Alexandre Philipp Maximilian zu Wied-Neuwied, explorador e naturalista alemão, que liderou uma expedição ao sudeste do Brasil de 1815 a 1817) conhecida popularmente como jararaca-pintada, objeto deste estudo, é uma serpente terrestre de corpo que mede 60-70 cm, ocorre no Brasil (Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná) e Paraguai e Bolívia. Habita principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (AMARAL, 1925; CAMPBELL, LAMAR, 2004).

Algumas toxinas de *B. pauloensis* foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente, funcionalmente e/ou estruturalmente, incluindo lectina de tipo C, l-aminoácido oxidase, PLA2s, SVMPs e a serina proteinase BpSP-I de tipo trombina (COSTA *et al.*, 2009). Estudos de venômica e transcriptômica (figura 6) ajudaram a obter uma visão mais profunda do espectro de toxinas importantes presentes no veneno. O proteoma de veneno de *B. pauloensis* compreende toxinas pertencentes a 9 famílias de proteínas (figura 7A). Em consonância com os resultados obtidos na pesquisa transcriptômica, peptídeos vasoativos (peptídeos natriuréticos potenciadores da bradicinina e C-tipo) (12,4%), peptídeos vasculares (42%), peptídeos com

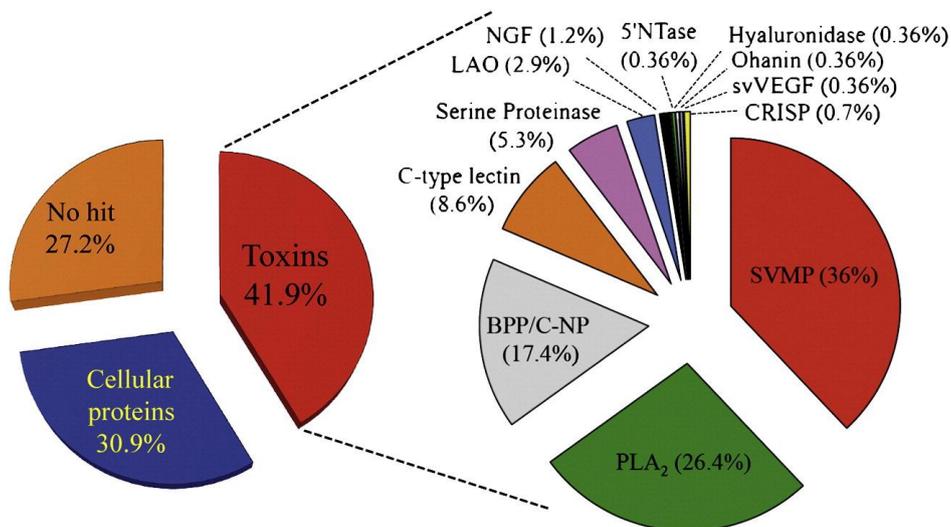
PLA<sub>2</sub>s (32%) e peptídeos vasculares (12,4%), seguidos de serina proteinase (10,5%), representam as principais classes de toxinas (figura 7B). As espécies moleculares únicas de l-aminoácido oxidase (LAO), CRISP, a lectina de tipo C de tipo galactose (lectina Gal-C) e o fator de crescimento nervoso (NGF), juntamente com várias isoformas de extremidade irregular de um RGD- molécula de desintegrina, representando 0,2-2,8% das proteínas de veneno totais (RODRIGUES *et al.*, 2012).

**Figura 5:** *Bothropoides pauloensis*

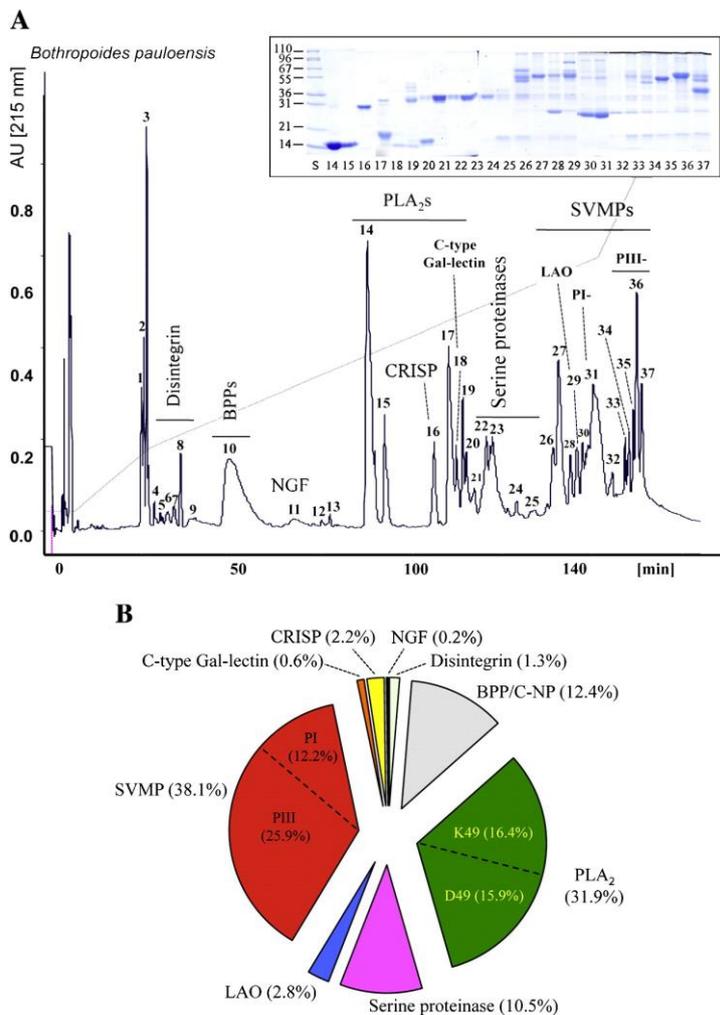


Fonte: Nogueira, 2003.

**Figura 6:** O perfil transcriptoma da glândula de veneno de *B. pauloensis*.



Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2012.

**Figura 7:** Proteoma do veneno de *B. pauloensis*.

Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2012.

#### 1.4 Composição química e atividade biológica do veneno

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos (BON, 1997). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados. Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas, incluindo fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) relacionadas à produção de derivados do ácido araquidônico (SIX e DENNIS, 2000), as metaloproteinases, responsáveis pela proteólise das membranas basais dos vasos, a especificidade de substratos das metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) é muito semelhante ao das metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal da microvasculatura (TANJONI *et al.*, 2003), a qual, quando rompida, deixa

extravasas sangue, constituindo o mecanismo fisiopatológico da hemorragia provocada pelas SVMPs (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005), uma das SVMPs bem estudada, a jararagina, isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, é um dos principais componentes responsáveis pela hemorragia. Além de degradar a matriz extracelular, também atua em proteínas plasmáticas da coagulação importantes para hemostasia (KAMIGUTI *et al.*, 1996), as trombina símiles, que ativam fatores de coagulação, transformam o fibrinogênio em fibrina e induzem a agregação plaquetária (SANTOS *et al.*, 2000) e as L-aminoácido oxidases (LAAO) que induzem ou inibem a agregação plaquetária, além de promover apoptose (DU e CLEMETSON, 2002) São flavoenzimas que catalizam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (PAIVA *et al.*, 2011).

As neurotoxinas de atividade pré e pós-sinápticas que afetam a função neuromuscular (HAWGOOD e SANTANA DE SÁ, 1979), as cardiotoxinas que atuam na membrana celular do músculo cardíaco e despolarizam de modo persistente a membrana das células excitáveis acarretando hemólise (REID, 1964) e as lectinas, que se ligam à glicoproteínas e interfere na formação do coágulo e na agregação plaquetária, não têm atividade enzimática (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Dentre os componentes sem atividade enzimática há constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Os contituintes não orgânicos conhecidos são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH e TU, 1971). Alguns estudos sugerem que o cálcio, o manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON e FOX, 1994).

### **1.5 As fosfolipases (PLA<sub>2</sub>)**

As fosfolipases são comumente encontradas na família *Viperidae*, sendo assim amplamente estudadas devido às suas características químicas e efeitos biológicos. As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas de grande interesse médico-científico devido ao envolvimento em inúmeras patologias humanas inflamatórias e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas. A atividade das PLA<sub>2</sub> foi observada pela primeira vez em peçonha de cobra (*Naja naja*) e em extratos pancreáticos de mamíferos (SOARES *et al.*, 2004). As PLA<sub>2</sub>s são caracterizadas por sequências de aminoácidos curtas (115-125 aminoácidos), de baixo peso

molecular (13-15 kDa) e uma estrutura terciária rígida decorrente da presença de 5-8 ligações dissulfureto que conferem estabilidade à proteólise e resistência à desnaturação (YING *et al.*, 2017).

Em um mesmo veneno são encontradas uma variedade de PLA<sub>2</sub> que podem exercer ampla variedade de atividades farmacológicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (BORGES *et al.*, 2000). Suas propriedades geram um grande interesse nessa fração, pela interferência na biossíntese de eicosanoides, moléculas importantes em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas (MOREIRA *et al.*, 2011).

As enzimas PLA<sub>2</sub> catalizam a hidrólise de glicerofosfolípídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolípídios e ácidos graxos (KRÓL, OSTROWSKI, 2017). Os ácidos graxos liberados podem atuar como segundos mensageiros ou podem estar envolvidos em outras reações, como o ácido araquidônico, que é responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. As PLA<sub>2</sub> estão agrupadas em três famílias principais: (I) citosólicas (cPLA<sub>2</sub>); (II) secretórias dependente de Ca<sup>+2</sup> (sPLA<sub>2</sub>) e (III) intracelulares não dependentes de Ca<sup>+2</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Dentre as fosfolipases dos venenos são reconhecidas três tipos diferentes, as clássicas, com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), as quais apresentam atividade catalítica e variantes contendo lisina ou serina no carbono 49 (Lys49 e Ser49, respectivamente), sendo essas duas últimas enzimaticamente inativas. Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as PLA<sub>2</sub> desestabilizam os fosfolípídios das membranas celulares, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular (YING *et al.*, 2017).

O veneno de *B. pauloensis*, de acordo com isolado até o momento, tem mostrado uma variedade de fosfolipases, principalmente miotóxicas: BnSP-6 e BnSP-7 (PLA<sub>2</sub> miotóxica Lys49), Bp-PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> ácida miotóxica Asp49), BnpTX-I e BnpTX-II (PLA<sub>2</sub> básicas miotóxicas Asp49) e Bp-12 (PLA<sub>2</sub> Lys49), além de outras frações como Bp-LAAO (LAAO), BpSP-I (serinoprotease trombina-like) e neuwiedase (metaloprotease) (CASTANHEIRA *et al.*, 2013).

Rodrigues e colaboradores, (1998) isolaram e caracterizaram as PLA<sub>2</sub> mitóxicas BnSP-6 e BnSP-7, mostrando elevada similaridade com miotoxinas Lys49 de outros venenos botrópicos. A BnSP-7 apresentou atividades anticoagulante, mionecrosante e edematogênica

(RODRIGUES *et al.*, 1998), bactericida (contra *Escherichia coli*), bloqueio de contração neuromuscular, ruptura de lipossomas cálcio independentes (SOARES *et al.*, 2000), dano tecidual local e regeneração tardia, com aumento de produção/liberação citocinas pró-inflamatórias, além do aumento da expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 e 9 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

BnpTX-I mostrou efeitos neurotóxico e bactericida (contra *E. coli*), além das atividades anticoagulante, mionecrosante, edematogênica, citotóxicas contra mioblastos/miotúbulos, comuns também para a toxina BnpTX-II (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em um estudo anterior Borja-Oliveira e colaboradores (2003) haviam mostrado efeito neurotóxico com ação pré-sináptica para o veneno total de *B. pauloensis*.

A Bp-12, PLA<sub>2</sub> enzimaticamente inativa, apresentou alta homologia com outras fosfolipases de venenos botrópicos contendo lisina na posição 49, e foi responsável tanto diretamente quanto indiretamente, pelo bloqueio na junção neuromuscular em preparação de nervo frênico-diafragma (RANDAZZO-MOURA *et al.*, 2008).

Foram descritas para a fração enzimaticamente ativa Bp PLA<sub>2</sub>, indução de agregação plaquetária, atividade hemolítica, edema intenso, miotoxicidade com abundante infiltrado leucocitário e dano muscular após 24 horas de injeção (RODRIGUES *et al.*, 2007).

## 1.6 O veneno e o rim

Pesquisas realizadas abordando a distribuição das peçonhas botrópicas nos órgãos de animais envenenados mostram que os rins são um importante alvo de acumulação do veneno, possivelmente devido ao seu papel na excreção de proteínas ofídicas. A acumulação do veneno no tecido renal pode causar danos morfológicos e funcionais o que interfere na eliminação do veneno (MELLO *et al.*, 2010).

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência de envenenamento ofídico, dentre elas, glomerulonefrite, arterite e necrose tubular, glomerulite e nefrite intersticial, necrose cortical e insuficiência renal (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). Foram descritas ainda hematúria, mioglobinúria, hemoglobinúria e proteinúria (SANO-MARTINS *et al.*, 2011).

A insuficiência renal aguda (IRA) é a principal causa de morte por acidentes com venenos ofídicos, ocorrendo secundariamente aos processos anteriormente descritos (AIRD,

2002; RIBEIRO *et al.*, 1998), mesmo após o tratamento com soro antiofídico (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012).

A patogênese da IRA não está ainda completamente elucidada. No entanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008). Três teorias foram propostas para explicar a patogênese da lesão glomerular, a presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente do processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001).

No modelo de perfusão de rim isolado foi demonstrado por Pirotzky *et al.*(1984), que o rim é capaz de produzir serotonina, histamina e PAF. Embora muitos desses fatores não estejam envolvidos diretamente no sistema de perfusão de rim, as células renais, sob efeito do veneno, podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, fração de complemento e fator de agregação plaquetária (BARRAVIERA; LOMONTE e TARKOWISKI, 1995).

Em estudos prévios, realizados por Martins *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2010; Sousa, 2010; Monteiro, 1990; Havt *et al.*, 2001; 2005; Barbosa *et al.*, 2002; Braga, 2006; Morais *et al.*, 2013; Norões, 2009, foi demonstrado que os venenos de diferentes *Bothrops* alteram os parâmetros de função renal em sistema de rim isolado (*B. erytromelas*, *B. marajoensis*, *B. lutzi*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. insularis*, *B. leucurus*, *B. atrox*, respectivamente).

Como se pode observar no Quadro 1 os efeitos de venenos de serpentes botrópicas em modelo de rim isolado mostra que, apesar de se tratarem de venenos oriundos de um mesmo gênero animal, existem diferenças nas alterações dos parâmetros funcionais renais.

Ainda de acordo com o Quadro 1, resultados semelhantes às alterações dos parâmetros funcionais renais do nosso estudo são encontrados no trabalho realizado por Morais *et al.*, 2013; Evangelista *et. al.*, 2010; Braga, 2006; Havt *et. al.*, 2005; Barbosa *et. al.*, 2002 e Monteiro, 1990. Quanto aos efeitos do veneno total da *B. pauloensis* em rim isolado de rato, Marinho *et al.*, 2015, este reduziu todos os parâmetros funcionais renais avaliados.

Estes resultados reforçam as afirmações de que os efeitos biológicos dos venenos variam de acordo com diversos fatores, dentre eles a concentração da peçonha, pois o dano tecidual pode ser relacionado a quantidade de veneno a que foi exposto, gerando uma série de sinais e sintomas bastante diversificados e às vezes contraditórios (QUEIROZ *et al.*, 2008). A

composição do veneno é responsável pelas variadas atividades observadas, pois a concentração de determinados componentes podem atuar por sinergismo, ou mesmo antagonismo e também depende da localização geográfica do animal, alimentação, idade (MARQUES-PORTO *et al.*, 2008).

**Quadro 1:** Estudos com veneno total do gênero *Bothrops* em Perfusão de Rim Isolado.

Espécie	PP	RVR	FU	RFG	%TNa <sup>+</sup>	%TCI <sup>-</sup>	%TK <sup>-</sup>	Referência
<i>B. pauloensis</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	(MARINHO <i>et al.</i> , 2015).
<i>B. erythromelas</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 90 minutos.	(MARTINS <i>et al.</i> , 2005).
<i>B. marajoensis</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Não alterou.	(EVANGELISTA <i>et al.</i> , 2010).
<i>B. lutzi</i>	Redução aos 60 e 90 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(SOUSA, 2010).
<i>B. jararaca</i>	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Dados não apresentados.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	(MONTEIRO, 1990).
<i>B. jararacuçu</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	(HAVT <i>et al.</i> , 2001).
<i>B. pirajai</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(HAVT <i>et al.</i> , 2005).
<i>B. moojeni</i>	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2002).
<i>B. insularis</i>	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Não alterou.	(BRAGA, 2006)

<i>B. leucurus</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza a aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza aos 120 minutos.	Redução aos 90 minutos	Redução aos 60 e 90 minutos	Não alterou.	(MORAIS et al, 2013).
<i>B. atrox</i>	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Não alterou.	(NORÕES, 2009).

Fonte: elaborado pelo autor.

### 1.7 Mecanismos Oxidantes e Inflamatórios

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para compreender os mecanismos pelos quais o veneno leva à insuficiência renal aguda. Estes estudos procuram caracterizar as lesões renais e tentar elucidar qual(is) o(s) agente(s) desencadeante(s) das mesmas.

Embora a fisiopatologia do envenenamento não seja completamente compreendida, sabe-se que este é responsável por desencadear respostas imunes, levando a liberação de citocinas e óxido nítrico. As citocinas iniciam uma cascata de eventos que conduzem aos sintomas, tais como febre, edema, e, bem como uma série de eventos fisiológicos, tais como a ativação de vasodilatação, hipotensão e aumento da produção de óxido nítrico. O acúmulo destas citocinas desempenha um papel importante na mediação de recrutamento e ativação de células necessárias para a inflamação e a reparação de danos nos tecidos (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012).

Uma ligação comum entre as formas de lesões renais é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies de nitrogênio reativo (RNS) durante lesão/progressão do quadro. Embora sejam necessários níveis baixos de ROS e RNS para sinalização de sobrevivência, proliferação celular e crescimento e regulação de vasorreatividade, um desequilíbrio da geração e eliminação de ROS e RNS leva a inflamação, morte celular, dano tecidual e progressão da lesão. O estresse oxidativo é caracterizado por aumentos de (ROS) e (RNS), porém, existem sistemas antioxidantes endógenos que protegem o rim de danos e buscam manter a função renal normal. Estresse oxidativo diretamente e indiretamente afeta todos os aspectos renais, incluindo reatividade vascular e hemodinâmica renal, filtração glomerular, e reabsorção tubular e secreção em todas as segmentos, podendo resultar em apoptose celular, necrose, expressão alterada de gene, progressão do dano tecidual e promoção de fibrose (RATLIFF *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, tem havido uma quantidade crescente de dados na literatura sobre o papel do estresse oxidativo na patogênese do envenenamento por serpentes já que estes apresentam uma série de peptídeos biologicamente ativos, como L-aminoácido oxidase (LAAO) e fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) que podem estar relacionados à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A PLA<sub>2</sub> de venenos, em contraste com o PLA<sub>2</sub> endógeno, tem sido associado a um amplo espectro de efeitos tóxicos, levando ao aumento do estresse oxidativo sistêmico (GOIS *et al.*, 2017).

A inflamação é uma resposta vascular, celular e humoral, responsável pelo processo defensivo dos organismos vivos frente a agentes agressores. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Uma resposta imune bem-sucedida depende da ativação de um conjunto adequado de efetores imunológicos, sua carga pode determinar a diferenciação do precursor T helper (Th0) em células Th1 e Th2. Estes dois subconjuntos de células Th diferem nas funções dos efetores e, principalmente, no repertório de citocinas que segregam em resposta à estimulação antigênica. As células Th1 promovem uma resposta efetora celular, enquanto que as células Th2 promovem respostas humorais mediadas por células B (CRUZ *et al.*, 2008). A resposta imune inata ocorre rapidamente e envolve macrófagos, células e neutrófilos, enquanto que a resposta adaptativa ocorre dentro de horas, envolve células dendríticas ativadas e interação com células B e T. As células epiteliais tubulares geram citocinas pró-inflamatórias e expressam receptores semelhantes a Toll, que regulam a atividade das células (MOECKEL, 2018).

Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF), catecolaminas e endotelina, são alguns dos mediadores envolvidos. Foi verificada liberação de substâncias vasoativas após acidente por víbora de Russell e aumento de concentrações plasmáticas de norepinefrina, epinefrina, dopamina, tromboxano e endotelina. Envenenamento por *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* induziu elevações significativas de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e NO (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012).

O veneno de *B. asper* induz a expressão de COX-2 com consequente aumento da concentração de prostaglandinas em macrófagos peritoneais (MOREIRA *et al.*, 2009). As PLA<sub>2</sub> Asp 49 e Lys 49 desse veneno, por sua vez, causam morte celular e, em concentrações subletais, provocam aumento da capacidade fagocítica, liberação de peróxido de hidrogênio (ZULIANI *et al.*, 2005). A *jararhagin* apresenta efeito ativador em macrófagos, com produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (CLISSA *et al.*, 2001).

A atividade fosfolipásica pode produzir diversas prostaglandinas vasodilatadoras renais responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e consequente diurese, natriurese e caliurese ou por outro lado liberação de  $\text{PGF}_2\alpha$  que tem ação vasoconstrictora. A  $\text{PLA}_2$  pode ativar o tromboxano  $\text{A}_2$  (via ciclooxigenase) que também tem ação vasoconstrictora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BARBOSA *et al.*, 2006).

A participação de mediadores da resposta inflamatória induzidas por serpentes do gênero *Bothrops*, assim como a interação biológica entre substâncias presentes nos venenos e componentes da resposta imune já está bem caracterizada na literatura (TREBIEN; CALIXTO 1989; BARBOSA *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2000). Estes trabalhos reforçam a idéia de que a resposta inflamatória pode contribuir para a IRA causada pelos venenos botrópicos e pouco se sabe a respeito dos mecanismos patológicos associados. O estudo dos eventos moleculares que ocorrem na resposta imune inata (citocinas, liberação de quimiocinas, conversão de ácido araquidônico em eicosanóides, estimulação de receptores por agonistas inatos, etc.), pode ser ponto chave para se encontrar novos alvos farmacológicos que controlem o processo de inflamação em sua fase inicial e vir a fornecer novos tratamentos complementares à imunoterapia tradicional.

## **1.8 Morte celular**

*The Nomenclature Committee on Cell Death* (NCD) propôs um conjunto de recomendações para a definição de morfologias de morte celular distintas e para o uso apropriado da terminologia relacionada à morte celular. Em vista do progresso substancial na exploração bioquímica e genética da morte celular, houveram mudanças nas definições de modalidades de morte celular (KROEMER *et al.*, 2012). Em vista da vasta denominação de morte celular, optamos por abordar Apoptose e Necrose.

### **1.8.1 Apoptose**

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfologicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese, como também em processos patológicos como o câncer. Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia

da apoptose continuou a ser investigada quanto as alterações morfológicas e bioquímicas, a natureza das vias intracelulares, a complexa biologia de genes e elementos efetores, a sua relação no desenvolvimento embrionário, ao seu papel na homeostase celular e ao seu envolvimento na patogênese de várias doenças, tais como doenças auto-imunes, neurodegenerativas, lesões isquêmicas e câncer. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfológicamente (ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY e NICOTERA, 2003).

Vários estímulos podem levar a apoptose em células tubulares renais, como injúria celular desencadeada por isquemia/hipóxia, estresse oxidativo, danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, perda da adesão célula- matriz e da adesão célula-célula, dentre outros (RANA, SATHYANARAYANA e LIEBERTHAL, 2001).

Assim como a gravidade da depleção de ATP, exposição a grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz morte por necrose, enquanto, estresse oxidativo menos grave leva a apoptose. A produção de grandes quantidades de ROS pode causar danos oxidativos diretos para a célula e seus componentes levando a morte por necrose. Com relação a apoptose o aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do  $\Delta\Psi_m$ . A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que ROS funciona como segundo mensageiro na sinalização da ativação das caspases -9 e -3 (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

### **1.8.2 Necrose**

A necrose é desencadeada principalmente por lesões mecânicas, agentes citotóxicos e hipóxia. Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina, a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos. Devido a depleção de ATP ocorre alteração na permeabilidade da membrana, que tem como consequência comprometimento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Ocorre rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local. Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

Em células renais a morte celular por necrose resulta de efeitos combinados de uma série de vias bioquímicas diferentes que são simultaneamente ativadas por lesões extremamente graves para a célula. Os múltiplos caminhos bioquímicos que são ativados pelo dano celular grave e podem levar à necrose incluem os seguintes eventos: a depleção severa de reservas de energia celular (ATP); aumento do cálcio citosólico livre; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de várias enzimas, incluindo as fosfolipases, proteases e endonucleases (RANA, SATHYANARAYANA e LIEBERTHAL, 2001).

### 1.8.3 Vias de sinalização

Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte, sendo que em geral, duas vias distintas podem estar ativas: via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte) (ELMORE, 2007).

A via intrínseca pode ser desencadeada por estímulos (positivos ou negativos) intracelulares que agem diretamente em alvos dentro da célula e iniciam eventos mitocondriais (ELMORE, 2007).

Estímulos negativos são caracterizados pela ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, levando a falha de supressão de morte programada e ativação de apoptose. Por outro lado, os estímulos positivos incluem (mas não se limitam a esses): radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (ELMORE, 2007).

Qualquer estímulo (positivo ou negativo) causará mudanças na membrana mitocondrial, ocasionando a perda do potencial de membrana, posterior aumento da permeabilidade e a liberação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas (HAIL *et al.*, 2006).

O primeiro grupo compreende: citocromo c, Smac/BIABLO e HtrA2/Omi que ativam a via mitocondrial caspase-dependente. O citocromo c liga-se a Apaf-1 e este complexo liga-se à pró-caspase 9 originando o apoptossomo. Por sua vez, leva a ativação da caspase 9 (iniciadora) e consequente ativação de caspase-3, 6 ou 7 (efetoras) (HAIL *et al.*, 2006; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas incluem AIF (fator indutor de apoptose), a endonuclease G e CAD (DNase Caspase-Ativado), porém são liberados tardiamente, após desencadeamento da apoptose. A proteína AIF promove fragmentação do DNA além da

condensação da cromatina nuclear periférica, considerada como estágio I da condensação. A endonuclease G cliva a cromatina nuclear e produz DNA oligossomal fragmentado, de modo que ambos AIF e endonuclease G tenham função caspase-independente. CAD é liberado depois de endonuclease G e AIF e também promove a fragmentação do DNA oligossomal e condensação de cromatina (estágio II) (ELMORE, 2007).

O processo apoptótico é controlado por proteínas da família Bcl-2, sendo reguladas por *p53* (proteína supressora tumoral), que regula a expressão de outras proteínas da família Bcl-2 (anti ou pró-apoptóticas). Dentre as proteínas antiapoptóticas podem ser citadas: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-w, BAG e pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. Essas proteínas têm a função de promover ou abortar o processo de apoptose e possuem ainda função de regular a liberação do citocromo c (HAIL *et al.*, 2006).

A via extrínseca tem o envolvimento de receptores transmembrânicos que medeiam a interação. Os receptores são da família TNF, membros dessa família compartilham domínios extracelulares ricos em cisteínas e no citoplasma possuem o “domínio de morte” DD (death domain), que leva os sinais de superfície da membrana para a via de sinalização intracelular (HAIL *et al.*, 2006).

Dentre os aceptores e receptores que participam da via extrínseca podemos citar: FASL/FASR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo21/DR5 onde a sequência de eventos que difundem a fase extrínseca são FASL/FASR e TNF- $\alpha$ /TNFR1. Eventos que recrutam proteínas adaptadoras do citoplasma exibindo o domínio de morte irão se complexar com receptores FASL/FASR que resultam no adaptador FADD e TNF- $\alpha$ /TNFR1 na proteína TRADD, recrutando FASS e Rip. Assim, FADD associa-se a pró-caspase 8, o complexo DISC (death inducing signaling complex, complexo sinalizador e indução de morte) é formado e leva à ativação de caspase 8. Uma vez ativada, a caspase 8 é iniciado o processo de apoptose (ELMORE, 2007).

O veneno de *B. leucurus* induz em apoptose em células tubulares renais e tumorais, com redução do potencial transmembrânico e aumento da concentração intracelular de íons cálcio (MORAIS *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2012). Além disso, a jararhagin, metaloproteínase isolada do veneno de *B. jararaca*, causa morte celular por apoptose e indução gênica de mediadores inflamatórios em células endoteliais (LOPES *et al.*, 2012). A PLA<sub>2</sub> Lys 49 do veneno de *Bothrops asper* produz rápida morte celular em macrófagos, com liberação de ATP citoplasmático e de outros constituintes celulares (TONELLO *et al.*, 2012; LEIQUEZ *et al.*,

2011). A metaloproteinase desse veneno, por sua vez, causa morte celular em células endoteliais e tumorais, com evidências da ocorrência de apoptose e outras formas alternativas de morte (BRENES *et al.*, 2010). O veneno total de *B. pauloensis* induziu processo de apoptose em células MDCK, ativando caspase 3/7, gerando espécies reativas de oxigênio e reduzindo potencial transmembrânico (MARINHO *et al.*, 2015).

Dessa forma, acredita-se que parte dos efeitos tóxicos encontrados em animais e pacientes envenenados com peçonhas botrópicas possa ser explicado pela identificação das alterações celulares induzidas por essas substâncias, incluindo parâmetros de morte celular, alterações morfofuncionais e liberação de substâncias que interfiram em processos biológicos.

***JUSTIFICATIVA***

## 1 Justificativa

Até o momento, as imunoglobulinas de antivenenos (soroterapia) são o único tratamento específico para envenenamento por acidente ofídico. Embora os antivenenos sejam eficazes na neutralização dos efeitos sistêmicos, eles são apenas parcialmente efetivos para reverter as alterações patológicas locais induzidas pelos venenos de serpentes, como também a progressão da IRA, cuja fisiopatologia ainda não é esclarecida, sendo a complicação mais comum entre os casos letais (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Conseqüentemente, novas alternativas terapêuticas baseadas em tecnologias de anticorpos recombinantes e novos inibidores específicos de enzimas presentes nos venenos podem representar um avanço no tratamento. Outro aspecto que torna essa pesquisa tão relevante é a busca de novos medicamentos e aplicações em biotecnologia. O trabalho *Animal toxins: state of the art - perspectives in health and biotechnology* de Maria Elena de Lima, destaca o papel do Brasil na pesquisa em toxinologia e não é somente devido a sua grande biodiversidade (25% da biodiversidade mundial), a tradição de estudos na área é remota, a partir dos estudos pioneiros de Vital Brazil (1865-1950). Uma evidência de que o Brasil tem excelência nessa pesquisa é que na revista *Toxicon*, uma das principais na área, conta com vários editores brasileiros e calcula-se que até 30% das publicações são provenientes do país (DE LIMA *et al.*, 2009). Um famoso exemplo de sucesso do estudo de venenos foi a identificação do Fator Potencializador de Bradicinina, por Sérgio Ferreira, em 1963, dentre outros que foram base para desenvolvimento de medicamentos (Captopril, Exenatida, Ziconotida, Prialt, Ancrod, Viperinex, Ranatensin, Echistatin, Eptifibatide) (FERREIRA e SILVA, 1965; BEETON, GUTMAN e CHANDY, 2006).

Em estudos anteriores com o veneno total da serpente *Bothropoides pauloensis*, demonstramos em sistema de perfusão renal, as alterações renais promovidas pelo veneno total e o mecanismo de toxicidade sobre linhagens de células tubulares renais (MDCK), por indução de apoptose, por aumento da expressão de caspase 3/7, redução do potencial transmembranico e geração de espécies reativas de oxigênio (MARINHO *et al.*, 2015). A abordagem proposta neste estudo foi avaliar se as frações PLA<sub>2</sub> Asp-49 e Lys-49 estão envolvidas na nefrotoxicidade do veneno. Considerando que a IRA é a principal causa de morte entre os pacientes que sobrevivem aos efeitos sistêmicos do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, e que não há nenhuma descrição, até o momento, sobre alterações fisiológicas renais, envolvimento de estresse oxidativo, resposta inflamatória renal e mecanismos associados a essas frações em células renais, decidimos investigar os mecanismos envolvidos.

***OBJETIVOS***

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos renais promovidos pelas PLA<sub>2</sub> Asp-49 e Lys-49 isoladas da serpente *B. pauloensis* em rim isolado de rato e em células MDCK e HEK-293.

#### 3.2 Objetivos específicos

##### **Parâmetros avaliados no tecido renal (Perfundido com as PLA<sub>2</sub>)**

- Estudar os efeitos induzidos pela Asp-49 e Lys-49 em sistema de perfusão de rim isolado de rato;
- Avaliar o envolvimento de estresse oxidativo;
- Participação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória;
- Análise histológica.

##### **Em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*)**

- Investigar o efeito das frações sobre a viabilidade de células tubulares renais;
- Avaliar a participação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs);
- Avaliar o efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ );
- Estudar o mecanismo de morte celular;
- Avaliar o efeito sobre o ciclo celular e fase sub-g1;
- Aspecto morfológico.

##### **Em células HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*)**

- Investigar o efeito das frações sobre a viabilidade celular;
- Avaliar o efeito sobre a liberação de cálcio em células HEK-293;
- Aspecto morfológico.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Obtenção do veneno

As PLA<sub>2</sub> Asp-49 e Lys-49 isoladas do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente.

### 4.2 Ensaio biológicos

#### 4.2.1 Perfusão de órgão isolado

#### 4.2.2 Animais de experimentação:

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, climatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec<sup>®</sup>) e água “ad libitum”. Os mesmos foram mantidos em jejum cerca de 4 horas antes dos experimentos de perfusão renal apenas com água “ad libitum”. CEPA: 124/16.

#### 4.2.3 Grupos experimentais

O estudo das frações PLA<sub>2</sub> Asp-49 ou Lys-49 ( $3\mu\text{g/mL}$ ) do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* sobre a função renal foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

- Grupo controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (n = 6);
- Grupo tratado com Lys-49 ou Asp-49 na concentração de  $3\mu\text{g/mL}$  (n = 6).

#### 4.2.4 Modelo de Perfusão de Rim Isoldado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  (Figura 8 e 9). Este sistema apresenta a vantagem da manutenção

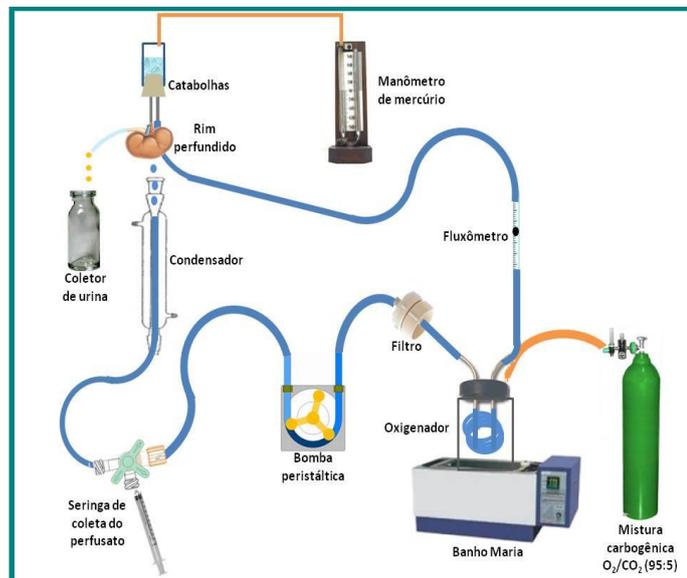
constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.

**Figura 8:** Foto do sistema de perfusão de rim isolado.



Fonte: LAFAVET – UFC

**Figura 9:** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

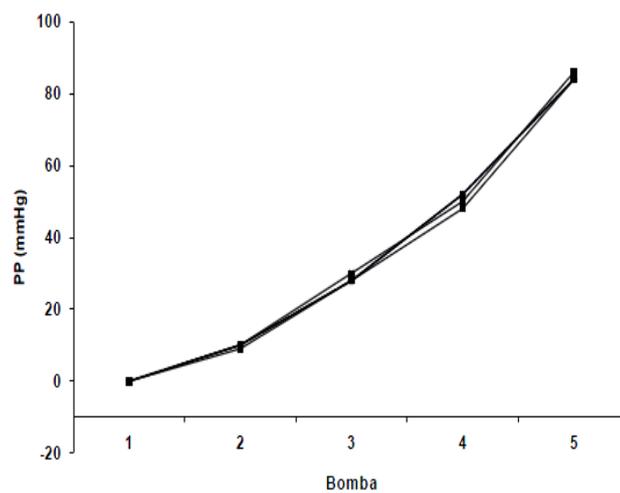


Fonte: LAFAVET – UFC

#### 4.2.5 Calibração do sistema

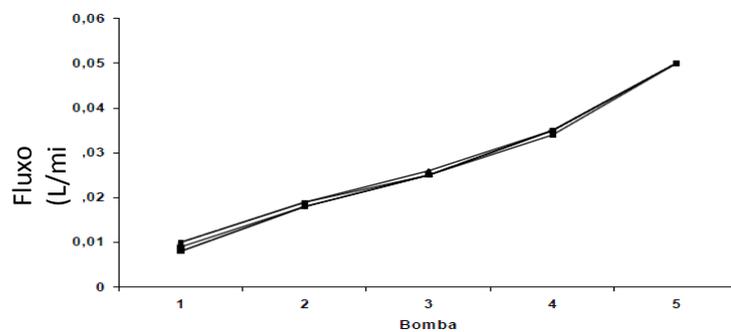
O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foi avaliado em cada uma das bombas (1,2,3,4 e 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/min) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As figuras 10, 11 e 12 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

**Figura 10:** Pressão de perfusão (PP) registrada durante a calibração do sistema (n = 6).



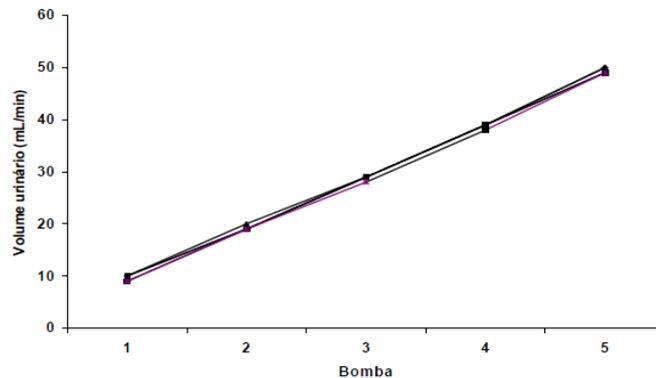
Fonte: LAFAVET-UFC

**Figura 11:** Fluxo (L/min) registrado durante a calibração do sistema (n=6).



Fonte: LAFAVET-UFC

**Figura 12:** Volume urinário (mL/min) registrado durante a calibração do sistema (n = 6).



Fonte: LAFAVET-UFC

#### 4.2.6 Solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 3,2g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO<sub>3</sub> = 4,2g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada, com o objetivo de retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK e LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ajustado para os valores entre 7,3 e 7,4.

#### Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados (conforme CEPA: 124/16). As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhmann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões

perpendiculares à linha alba para melhor observação das estruturas anatômicas. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30.

A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo.

**Figura 13:** Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão



Fonte: LFAVET-UFC

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, por 120 min. Amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal, resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio ( $\%T\text{Na}^{+}$ ), potássio ( $\%T\text{K}^{+}$ ) e cloreto ( $\%T\text{Cl}^{-}$ ).

### 4.3 Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto

utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer® diagnostica).

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – modelo 5520 ESCOR).

#### 4.4 Determinação de parâmetros funcionais renais

O quadro 2 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978).

**Quadro 2:** Fórmulas usadas em parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula
1. <b>PP</b> (mmHg)- Pressão de Perfusão	<u>Leitura em manômetro</u>
2. <b>FU</b> (mL.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo Urinário	<b>FU</b> = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3. <b>RFG</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Ritmo de Filtração Glomerular	<b>RFG</b> = (DOU <sub>in</sub> / DOP <sub>in</sub> x FU) sendo DOU <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina na urina e DOP <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina no perfusato.
4. <b>FPR</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
5. <b>RVR</b> (mmHg/mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Resistência vascular renal.	<b>RVR</b> = PP (mmHg) / FPR
6. <b>FNa<sup>+</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Sódio filtrado	<b>FNa<sup>+</sup></b> = RFG x PNa <sup>+</sup>
7. <b>ENa<sup>+</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Sódio excretado	<b>ENa<sup>+</sup></b> = FU x UNa <sup>+</sup>
8. <b>TNa<sup>+</sup></b> (μEq.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) - Sódio transportado	<b>TNa<sup>+</sup></b> = FNa <sup>+</sup> - ENa <sup>+</sup>
9. <b>%TNa<sup>+</sup></b> - Percentual de sódio transportado	<b>%TNa<sup>+</sup></b> = TNa <sup>+</sup> x 100/ FNa <sup>+</sup>

10.	$\mathbf{FKa}^+$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio filtrado	$\mathbf{FKa}^+ = \text{RFG} \times \text{PKa}^+$
11.	$\mathbf{EK}^+$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio excretado	$\mathbf{EK}^+ = \text{FU} \times \text{UKa}^+$
12.	$\mathbf{TK}^+$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio transportado	$\mathbf{TK}^+ = \text{FK}^+ - \text{EK}^+$
13.	% $\mathbf{TK}^+$ - Percentual de potássio transportado	$\mathbf{\%TK}^+ = \text{TK}^+ \times 100 / \text{FK}^+$
14.	$\mathbf{TCI}^-$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto transportado	$\mathbf{TCI}^- = \text{FCI}^- - \text{ECI}^-$
15.	% $\mathbf{TCI}^-$ - Percentual de cloreto transportado	$\mathbf{\%TCI}^- = \text{TCI}^- \times 100 / \text{FCI}^-$
16.	$\mathbf{FCI}^-$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto filtrado	$\mathbf{FCI}^- = \text{RFG} \times \text{PCI}^-$
17.	$\mathbf{ECI}^-$ ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto excretado	$\mathbf{ECI}^- = \text{FU} \times \text{UCI}^-$

Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.

#### 4.5 Análise histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu\text{m}$ . Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon).

#### 4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor e alterações inflamatórias no tecido renal

##### 4.6.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*) -, representadas principalmente pelo Malondialdeído (MDA) são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica que podem ser detectadas pelo ensaio TBARS usando ácido tiobarbitúrico como um reagente (KIL *et al.*, 2014).

A concentração de Malondialdeído (MDA) no tecido renal foi determinada como um indicador da peroxidação lipídica, tal como descrito anteriormente, utilizando o método das

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MIHARA *et al.*, 1980). Porções do rim direito foram homogeneizados com 1,15% de KCl, seguido pela adição de 1% de ácido fosfórico e de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi incubada a 96 °C durante 20 minutos para a formação de um cromógeno cor-de-rosa. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 532 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido.

#### 4.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Para a determinação da glutathiona reduzida ( $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH), o homogenato do tecido renal foi preparado com 0,02 M de EDTA. As amostras foram misturadas ao ácido tricloroacético a 50%, centrifugado (3000 rpm, 15 min), 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado a 800  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20  $\mu\text{L}$  de DTNB (5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)). Por fim, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em  $\text{mcg/g}$  de tecido.

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada GSSG, que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas duas moléculas (razão GSH/GSSG), são interpretadas como prova de desequilíbrio redox (GIUSTARINI *et al.*, 2011).

#### 4.6.3 Determinação dos níveis de nitrito em tecido renal

A dosagem de nitrito é baseada no reagente de Griess, que tem a capacidade de expor a presença de nitrito em amostras por uma reação de diazotização, formando durante a reação um cromóforo de cor roséa. A determinação de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  baseia-se na reação de  $\text{NO}_2^-$  com uma amina primária aromática em meio para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess), que absorve na região do visível do espectro eletromagnético (ELLIOT e PORTER, 1971). O íon  $\text{NO}_3^-$  é determinado, geralmente, como íon  $\text{NO}_2^-$ , após redução pela enzima nitrato redutase. No método descrito por CHIEN *et al.* (2000), uma parte do rim direito foi homogeneizada a 10% com solução gelada de KCl 1,15%. O nitrato das amostras foi convertido em  $\text{NO}_2^-$  através da incubação em placas (*overnight*, 37°C) de 40 $\mu\text{L}$  do homogenato com 40 $\mu\text{L}$  da solução contendo nitrato redutase, fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

reduzida (NADPH) e água destilada. Após incubação, foram colocados 80µL da solução de Griess (sulfanilamida 2%, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço e feito a leitura em leitora de microplacas a 540nm. A concentração de nitrito foi calculada através de uma curva padrão utilizando-se nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e os resultados expressos em µM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

#### **4.6.4 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos utilizada como marcador indireto da presença dessas células nos tecidos inflamados. A atividade enzimática da MPO foi detectada por Bradley *et al.* (1982). Para isso a MPO foi extraída a partir das amostras de rim em suspensão com 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) misturado com tampão de potássio na proporção de 50mg de tecido para 1mL de HTAB (pH 6,0), homogeneizada e submetida a um processo de congelamento e descongelamento rápido. O homogeneizado foi centrifugado a 1500 x g durante 20 min à 4°C resultando em um sobrenadante e um sedimento. O sobrenadante foi novamente centrifugado 1500 x g por 10min para melhorar a remoção dos contaminantes. Para a determinação da atividade de MPO, 7µL de sobrenadante foram misturados com 200µL da solução de leitura (5mg O-dianisidine; 15µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3mL de tampão fosfato; 27mL de H<sub>2</sub>O). A MPO foi determinada por espectrofotometria, medindo a variação da absorbância a 450nm (t<sub>0</sub>= 0min e t<sub>1</sub>= 1min). Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de degradar 1µmol de peróxido/min e os resultados obtidos foram expressos como a atividade de MPO/mg de tecido (MPO U/mg de tecido).

#### **4.6.5 Detecção de citocinas (IL-1β, TNF-α e IL-10) em tecido renal por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

Os níveis de IL-1β, TNF-α e IL-10 presentes nas amostras foram mensurados por Elisa, como descrito anteriormente por Cunha *et al.* (1993). Os rins obtidos da perfusão renal foram estocados em freezer -80°C até o momento do ensaio. Os tecidos coletados foram homogeneizados e processados como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). Resumidamente, os anticorpos primários anti-IL-1β, anti-TNF-α ou anti-IL-10 (2µg/mL) foram incubados durante a noite à 4°C em microplacas de 96 poços. Após o bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo secundário produzido em caprinos anti os anticorpos primários anti-IL-1β, anti-TNF-α ou anti-

IL-10 (na proporção de 1:1000 diluído com tampão de ensaio, BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 100µL do complexo estreptavidina-HRP diluída 1:200 foi adicionado em cada poço. Em seguida foi acrescentado o substrato aos poços (1:1 mistura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina; R&D systems, EUA) e após 20 min de incubação à temperatura ambiente em local protegido da luz, a reação enzimática foi parada utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2N. As leituras das reações colorimétricas foram realizadas a 490nm em um leitor de microplacas (EMAX). A concentração de citocinas nas amostras renais analisadas foram determinadas a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com diferentes diluições da proteína e os resultados expressos em pg/mg de tecido.

#### Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão dos seis experimentos. Diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) com significância de 5%.

### **4.7 Ensaios com cultura de células**

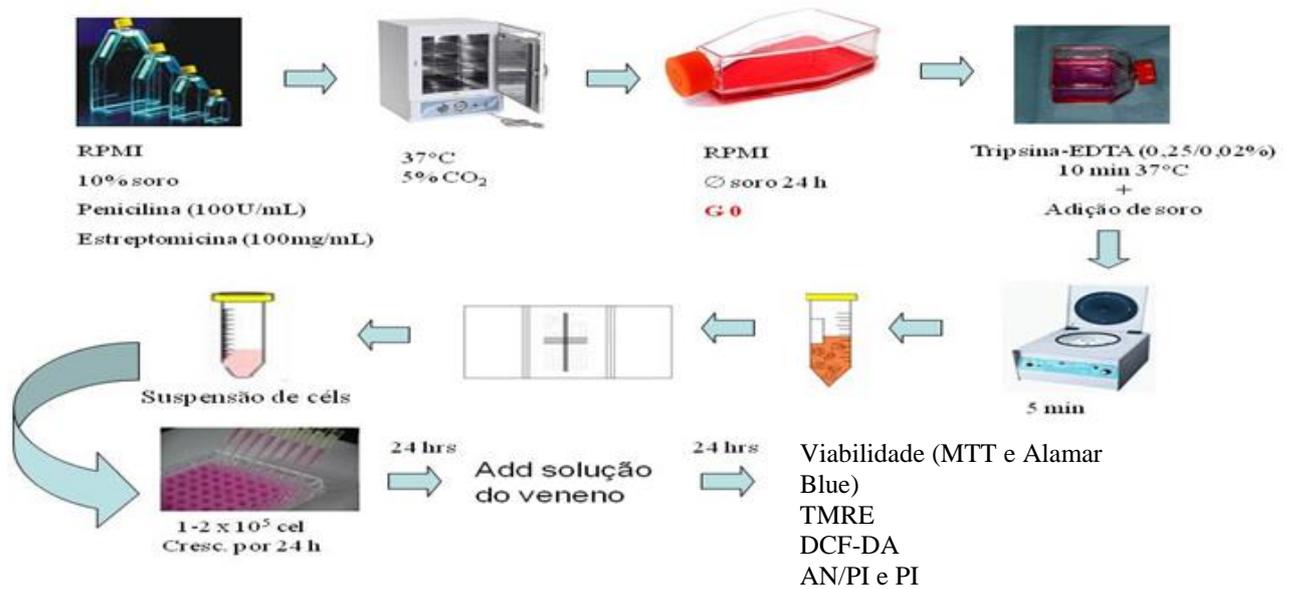
#### **4.7.1 Linhagem celular**

As células utilizadas foram células tubulares epiteliais renais MDCK (*Madin-Darby Kanine Kidney*) e HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Modo de Ação de Drogas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Taylor Lab Ca<sup>2+</sup> Signalling da Universidade de Cambridge, Inglaterra, respectivamente.

#### **4.7.2 Cultivo das células MDCK**

As células MDCK foram cultivadas em placas, com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (figura 14) (BUTLER e DAWSON, 1992).

**Figura 14:** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK.



Fonte: Adaptado de MORAIS ICO, 2015.

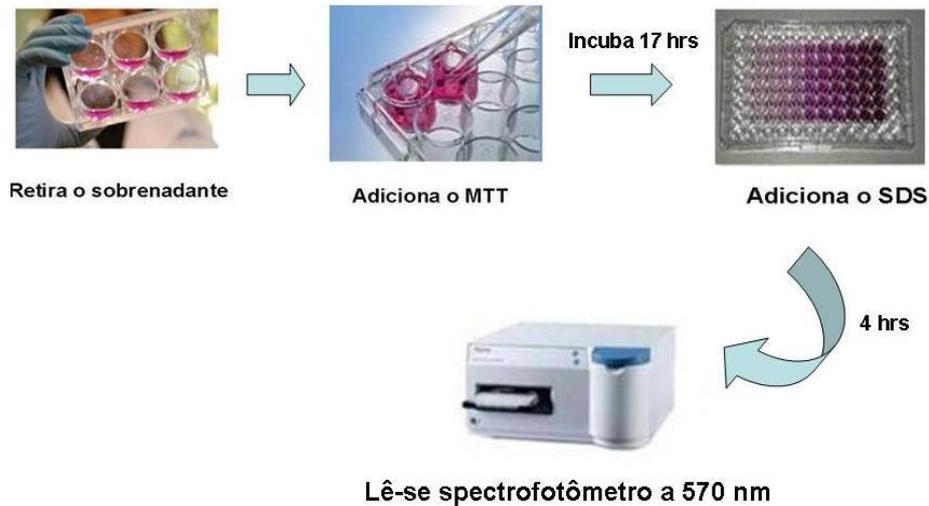
## 4.8 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

### 4.8.1 Viabilidade celular

### 4.8.2 Ensaio colorimétrico do MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomiais. Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorvância. A intensidade da coloração do produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (figura 15) (HEINRICH *et al.*, 2005).

**Figura 15:** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular.



Fonte: Adaptado de MORAIS ICO, 2015.

#### Protocolo experimental

As células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas para sincronizá-las entre as fases G<sub>0</sub> e G<sub>1</sub> do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10 min em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram plaqueadas a 1x10<sup>5</sup> céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações de Asp-49 ou Lys-49 (400; 300; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL). Após 24 horas do tratamento com a substância-teste, foi removido 100 µL do sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C e após 17 horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

O controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas em presença do veículo de diluição da substância teste e a viabilidade celular foi determinada

por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

#### Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração das PLA<sub>2</sub>. Utilizando GaphPad Prism, versão 5.01, os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada significativamente diferente.

#### **4.8.3 Ensaio colorimétrico do Alamar Blue**

A resazurina (conhecido comercialmente como Alamar Blue) é utilizada em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular e determinação de função mitocondrial. A mesma age pela reação enzimática ou química (processo não é bem estabelecido) em células viáveis. Sua cor azul e não fluorescente, é reduzida à resofurin, de cor rosa e fluorescente, como indicador de oxido-redução, e não precipita após ser reduzida, permitindo a avaliação da atividade celular metabólica por leitura fluorescente (ROLÓN *et al.*, 2006). É um método rápido, sensível e não-citotóxico.

#### Protocolo experimental

Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se inicialmente o mesmo procedimento de padronização determinado para o MTT, nas concentrações de 400, 300, 200 e 100 µg/mL.

#### Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração das PLA<sub>2</sub>. Utilizando GaphPad Prism, versão 5.01, os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada significativamente diferente.

#### **4.8.4 Medição de EROs intracelular**

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) geradas intracelularmente foram avaliadas utilizando diacetato-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Sigma, EUA), que se difunde

através das membranas celulares e é facilmente hidrolizado por esterases intracelulares para formar o DCFH (não fluorescente) que depois é rapidamente oxidado a DCF (2',7'-diclorohidrofluoresceína), altamente fluorescente, por uma ampla diversidade de EROs. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formada intracelularmente.

#### Protocolo experimental

Após o tratamento de 24 horas com Asp-49 (50 e 100µg), as células foram incubadas com 20 µM de H<sub>2</sub>DCF-DA e mantidas a 37°C por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação as células foram centrifugadas duas vezes, lavadas e ressuspensas com tampão PBS e analisadas imediatamente por citometria de fluxo, com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. O hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com DMSO. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan. Os dados baseados no canal FL1 foram analisados com o programa CellQuest.

#### Análise estatística

Em cada experimento foram analisados 10000 eventos. Os dados foram expressos como a média ± o erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### **4.8.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Essa técnica baseia-se na capacidade do corante fluorescente específico, se ligar diretamente as mitocôndrias de células viáveis. O éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), é um indicador catiônico que se acumula preferencialmente em mitocôndrias energizadas. Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo do TMRE de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência.

#### Protocolo experimental

Após 24 horas do tratamento com Asp-49 (50 e 100µg), as células foram recolhidas e colocadas em frascos do citômetro, centrifugadas e o precipitado ressuspenso em 200µL PBS contendo o TMRE na concentração de 50 nM, após 20 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo.

#### 4.8.6 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.

Nesse estudo foi analisada a capacidade da Asp-49 (50, 100 e 200 $\mu$ g), de induzir apoptose e/ou necrose utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V com o kit BD Pharmingen™ Annexin V-FITC. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídios de membrana plasmática, através de suas cargas negativas, na presença de íons cálcio. Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose - enquanto a membrana celular continua intacta - até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V é uma evidência da apoptose. A anexina V pode ser conjugada com fluórocromos como o FITC que serve como uma sonda sensível para análises por citometria de fluxo das células que estão sofrendo apoptose. A necrose, por outro lado, é acompanhada pela perda da integridade da membrana celular e é avaliada ao se adicionar o corante vital iodeto de propídeo (IP). O corante iodeto de propídeo se liga ao DNA e emite alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, no entanto, as células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. As células viáveis apresentarão baixa fluorescência podendo distinguir as células em apoptose precoce (FITC positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia se coram com ambos FITC e IP devido ao estágio final de desintegração celular não havendo como diferenciar células em necrose de células em apoptose tardia por este ensaio (BOERSMA *et al.*, 2005).

##### Protocolo experimental

As células MDCK foram tratadas com Asp-49 na concentração de 50, 100 e 200  $\mu$ g/mL. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi coletado, colocado em um tubo (50 mL) e centrifugado a 1200rpm por 5 min para coletar células em suspensão. As células aderidas a placa foram lavadas com PBS três vezes e tripsinizadas. O “pellet” obtido após a tripsinização foi ressuspenso no meio que foi retirado do frasco e separado previamente. As células foram centrifugadas novamente (1200rpm por 5 min) e o “pellet” então, ressuspenso em 50 $\mu$ L de tampão do Kit para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100 $\mu$ L desta suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida foi adicionado 5 $\mu$ L de anexina V, iodeto de

propídeo, ou ambos, em cada frasco do citômetro, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos com papel alumínio. Por fim, foi adicionado 200µL do tampão e os frascos foram levados para o citômetro de fluxo.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACS, BD, New Jersey, USA). Os dados foram obtidos através do software Cell Quest e os resultados foram analisados através do software WinMDI.

#### Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada significativamente diferente.

#### **4.8.7 Análise do efeito de Asp-49 sobre o ciclo celular (PI)**

O ciclo celular é um processo complexo que culmina na divisão e resulta em duas células filhas, mas exige um profundo controle. A parada do ciclo celular, independente da fase, pode ser desencadeada por diversos estímulos, sejam intrínsecos ou extrínsecos. O entendimento da progressão do ciclo celular e de seus reguladores permite uma compreensão, inclusive, dos mecanismos moleculares da carcinogênese e do desencadeamento de morte celular. Esse conhecimento pode levar ao desenvolvimento de terapias adequadas a esse processo patológico (VIALARD *et al.*, 2001).

#### Protocolo experimental

Para avaliar os efeitos nas fases do ciclo celular, as células MDCK foram tratadas com Asp-49 (25, 50, 75 e 100 µg/mL) avaliados no tempo de 24 horas. Após isso, foram lavadas duas vezes com 1,0 mL de PBS gelado e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Ao botão celular formado, foi adicionado, por gotejamento, 500µL de solução fixadora de etanol a 70% gelado. Os tubos foram armazenados em caixa de isopor com gelo (10-15min), *overnight*. Após esse período de incubação, as células foram lavadas em PBS gelado e suspendidas com 1,0 mL de solução contendo 200 µg/mL de RNase (Sigma-Aldrich™) e 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich™), incubadas a 4°C, protegidos de luz por 1 hora. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo e os resultados expressos em porcentagem de células em cada fase do ciclo celular.

#### 4.8.8 Avaliação das alterações morfológicas induzidas por Asp-49 em células MDCK.

Para avaliar as alterações morfológicas induzidas por Asp-49 sobre as células MDCK, utilizamos um Microscópio Óptico Trinocular Motic para análise qualitativa do tratamento com 50 e 100µg diretamente nas placas de 24 poços após 24 horas.

#### 4.9 Cultivo das células HEK-293

As células HEK-293 foram cultivadas em frascos plásticos com DMEM (*high glucose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de aminoácidos. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER e DAWSON, 1992).

##### 4.9.1 Teste de Viabilidade *Trypan-Blue*

A viabilidade das células HEK-293 foi determinada utilizando-se a coloração vital *Trypan-Blue* (TB). O método de TB é muito comum para avaliar a citotoxicidade em investigações experimentais, onde as células mortas absorvem o TB para o citoplasma por causa da perda da seletividade da membrana, enquanto as células que permanecem vivas não são coradas. Assim, o número de células coradas (mortas) e não-coradas (vivas) é obtido por contagem das células utilizando contador de células automático.

##### Protocolo experimental

As células HEK-293 foram mantidas em meio de cultura DMEM (*high glucose*), por 24 horas em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações de Asp-49 e Lys-49 (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). Após 24 horas do tratamento com a substância-teste, as células foram tripsinizadas (50uL/poço -2min, 37°C) e transferidas para eppendorfs. Foram adicionados em cada *slide* de contagem 10µL de células + 10µL de TB e feita a leitura

##### Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração das PLA<sub>2</sub>. Utilizando GgraphPad Prism, versão 5.01, os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada significativamente diferente

#### **4.9.2 Análise da liberação de cálcio (FlexStation)**

Usamos o FlexStation para avaliar as alterações de cálcio livre citoplasmático em células HEK-293 (com Fluo-8). O FlexStation oferece flexibilidade adicional, baseado em distribuidores, transferindo diretamente reagentes de uma placa de fonte para a placa de leitura, o que reduz o reagente e o consumo. A capacidade para definir reagentes individuais e concentrações a serem entregues a cada coluna da placa celular permite que mais condições de ensaio sejam exploradas em um único experimento, e torna o sistema ideal para estudos agonistas e antagonistas. As mudanças de fluorescência em tempo real nessas células são medidas antes e durante a aplicação de um agonista (carbacol) usando o modo FLEX da FlexStation 3. O efeito de um antagonista (BAPTA-AM) também foi examinado. Os dados foram transferidos do software SoftMax Pro para construir gráficos concentração-resposta de ativadores e inibidores. No caso dos tratados, foram usadas apenas as frações (“ativadoras”), sem inibidor.

##### Protocolo experimental

As células HEK-293, confluentes em placas de 96 poços, foram lavadas com 100µL de HBS em seguida adicionamos Fluo-8 (2 µM ), o qual permaneceu por 1h no escuro. Após esse período o Fluo-8 foi removido, adicionado 100µL de HBS por 30 min no escuro. Enquanto a placa permaneceu em repouso, preparou-se as “placas de composição” com Asp-49 e Lys-49 (concentração final 400, 300, 200, 100, 50 e 25ug) e Carbacol (agonista- controle positivo). Para finalizar, o HBS foi removido, adicionamos 60 µL HBS e colocamos no Flexstation para a leitura da placa.

#### **4.9.3 Análise da morfologia celular (Fluoid)**

As células tratadas com Asp-49 ou Lys-49, por um período de 24h, foram fotomicrografadas usando o microscópio *FLuoid® Cell Imaging Station*.

#### **4.10 Aspectos éticos**

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo 124/16).

***RESULTADOS***

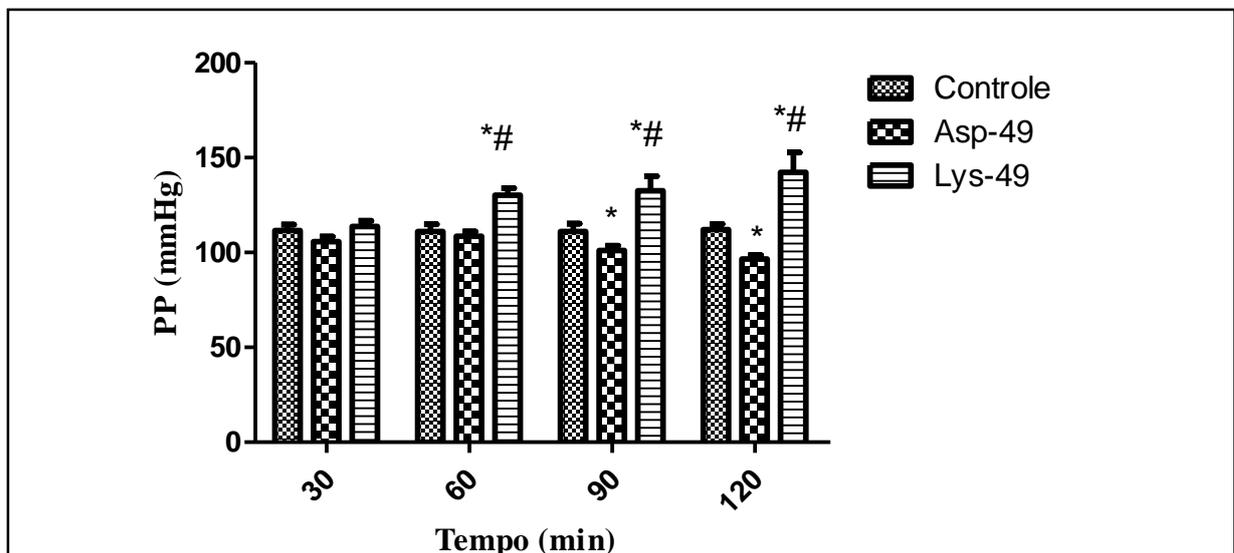
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Perfusão de rim isolado

As frações Asp-49 ou Lys-49 foram administradas ao sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos depois do início dos experimentos, esse período é considerado como controle interno de cada experimento. Um grupo, chamado controle externo, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit, foi comparado ao grupo tratado, e os grupos tratados comparados entre si.

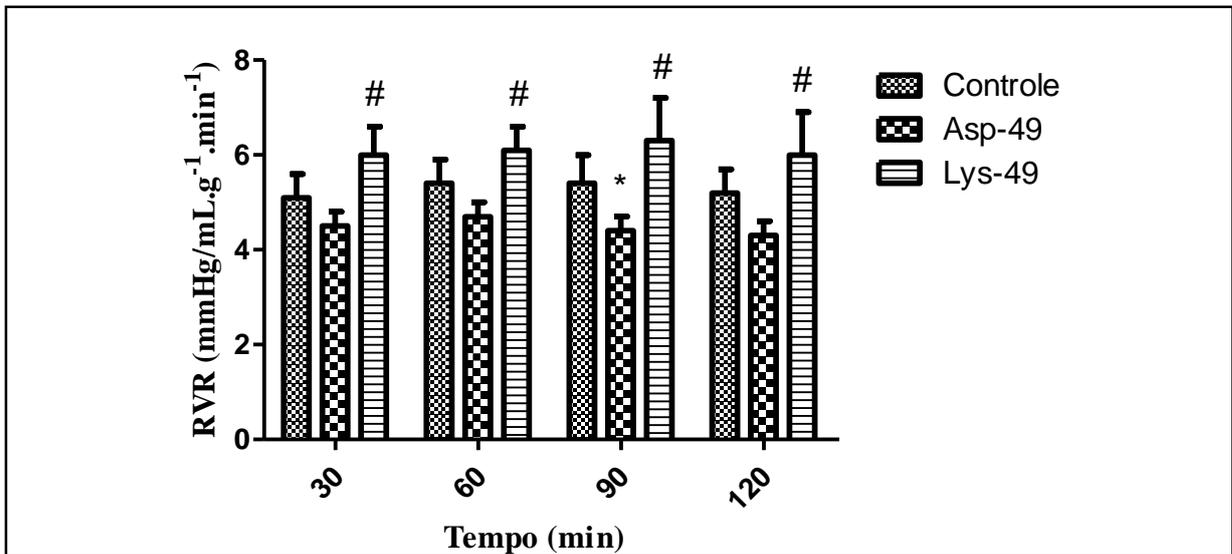
Após aplicação das frações foram observadas alterações na fisiologia renal nos parâmetros estudados. Com relação aos parâmetros vasculares, no grupo Asp-49 verificamos queda na pressão de perfusão (PP) aos 90 e 120 min e no grupo Lys-49 aumento de PP aos 60, 90 e 120 min. A resistência vascular renal (RVR) tem uma discreta redução no grupo Asp-49 aos 90min. O grupo Lys-49 não apresentou aumento significativo (Figuras 16 e 17, respectivamente).

**Figura 16:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 na pressão de perfusão em rim isolado de rato, na concentração de 3µg/mL.



Os dados são expressos em (média ± E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa p<0,05 relacionando ao controle externo, ”#” representa p<0,05 relacionando as duas frações entre si.

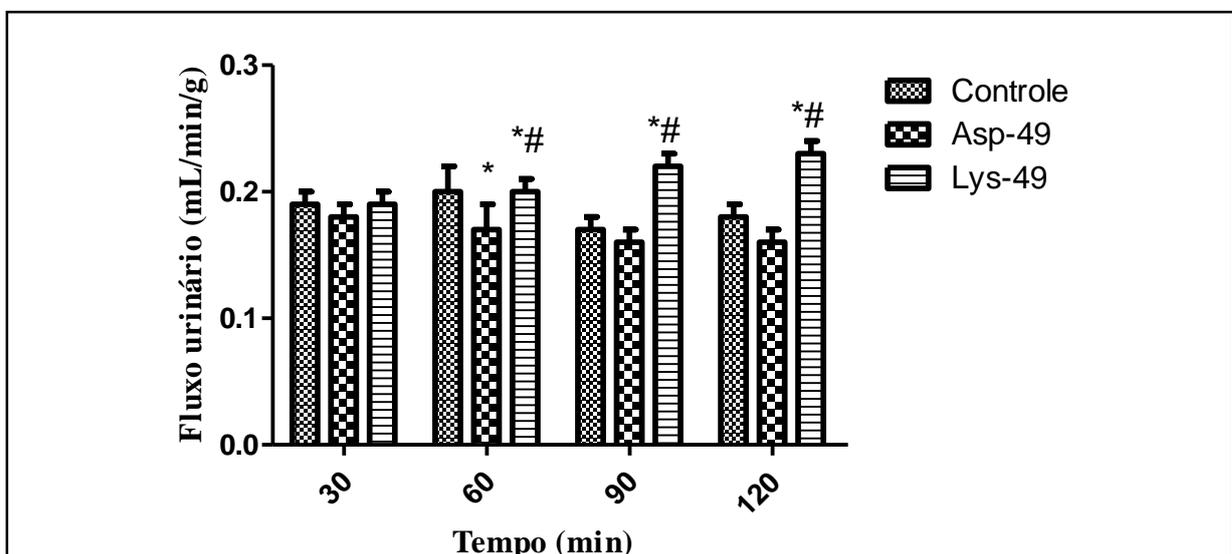
**Figura 17:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3 $\mu$ g/mL na resistência vascular renal (RVR).



Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

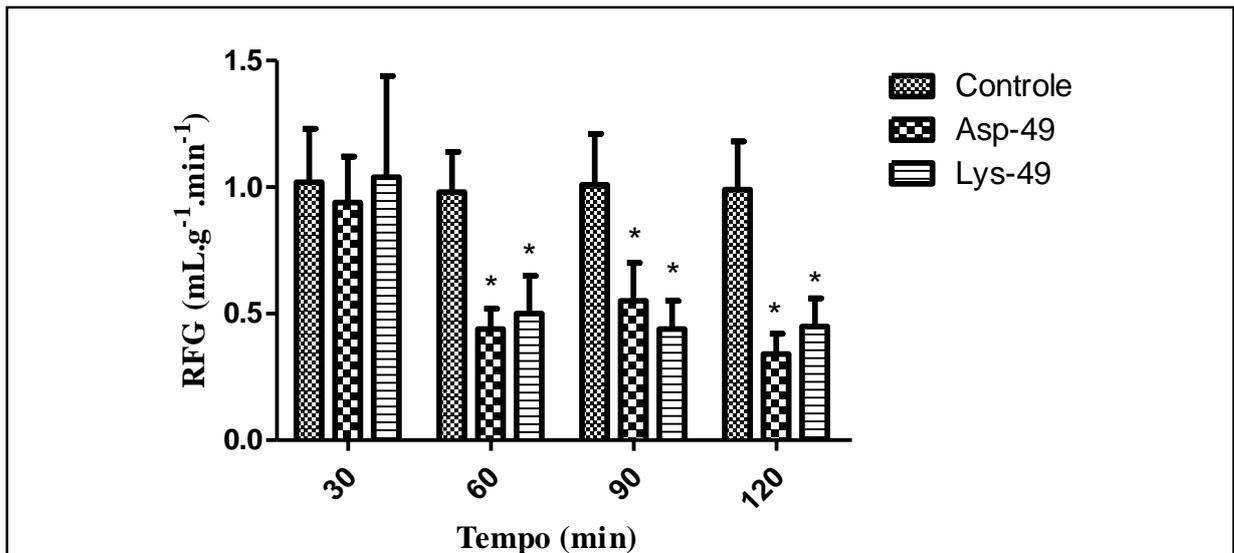
O fluxo urinário (FU) diminuiu aos 60 min no grupo Asp-49, não apresentando diferença significativa aos 90 e 120 min. No grupo Lys-49 o FU aumentou aos 60, 90 e 120 min. O ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentou uma redução a partir dos 60 min em ambos os tratamentos, mantendo-se diminuído até o final do experimento, não havendo diferença significativa entre as frações (Figuras 18 e 19, respectivamente).

**Figura 18:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3 $\mu$ g/mL no fluxo urinário (FU).



Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

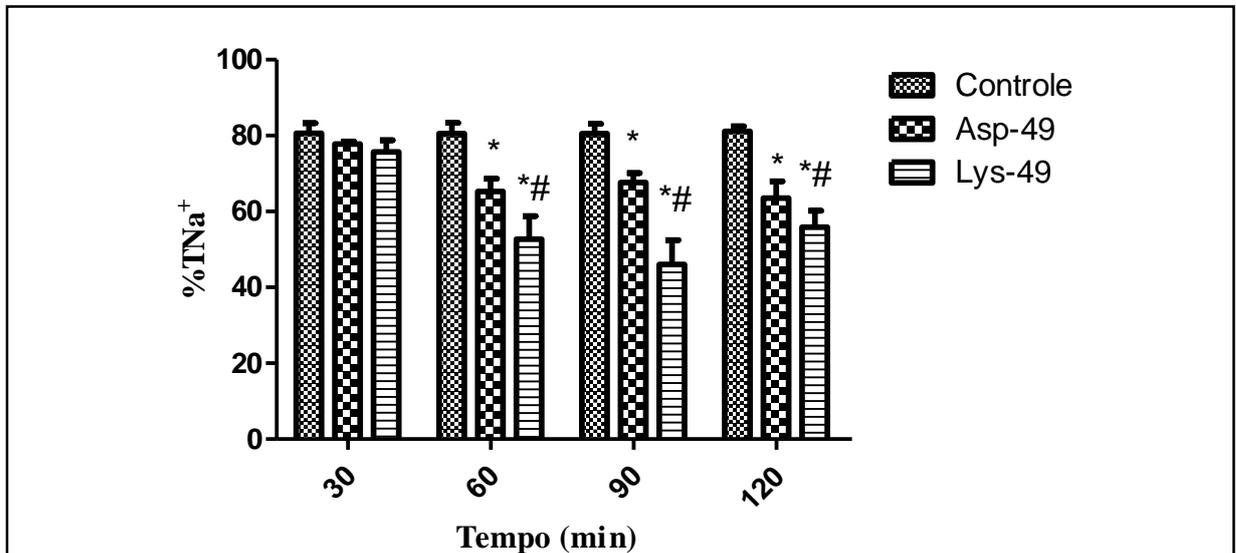
**Figura 19:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49  $3\mu\text{g/mL}$  no ritmo de filtração glomerular (RFG).



Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

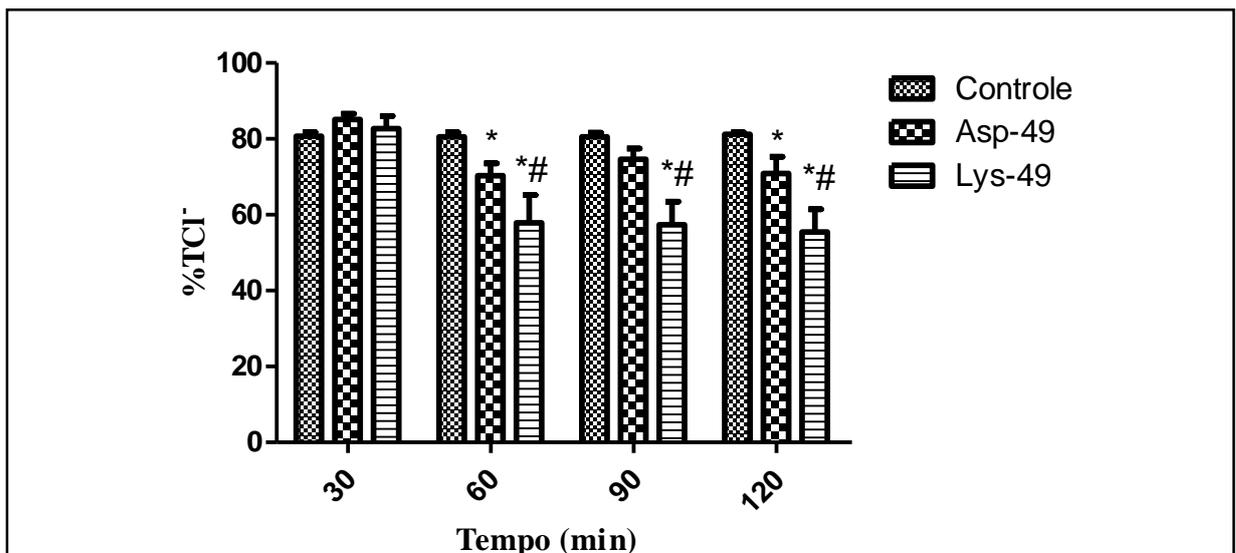
O percentual de transporte tubular de sódio (% $\text{TNa}^+$ ) foi reduzido no grupo Lys-49 e Asp-49 nos tempos de 60, 90 e 120 min, apresentando diferença significativa entre as frações em todos os tempos, apresentando uma maior redução no grupo Lys-49. O transporte tubular de cloreto (% $\text{TCl}^-$ ) também foi reduzido aos 60 e aos 120 min no grupo Asp-49, apresentando uma temporária recuperação aos 90 min. Quanto ao grupo Lys-49 houve redução aos 60, 90 e 120 min, apresentando diminuição significativa em relação ao grupo Asp-49. O transporte tubular de potássio (% $\text{TK}^+$ ) diminuiu aos 60, 90 e 120 minutos em ambos os grupos, havendo diferença significativa entre as frações no tempo de 60 e 90 min, o grupo Lys-49 apresentando redução mais acentuada aos 90 min (Tabela 3 e 4, Figuras 26, 27 e 28, respectivamente).

**Figura 20:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3 $\mu$ g/mL no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>).



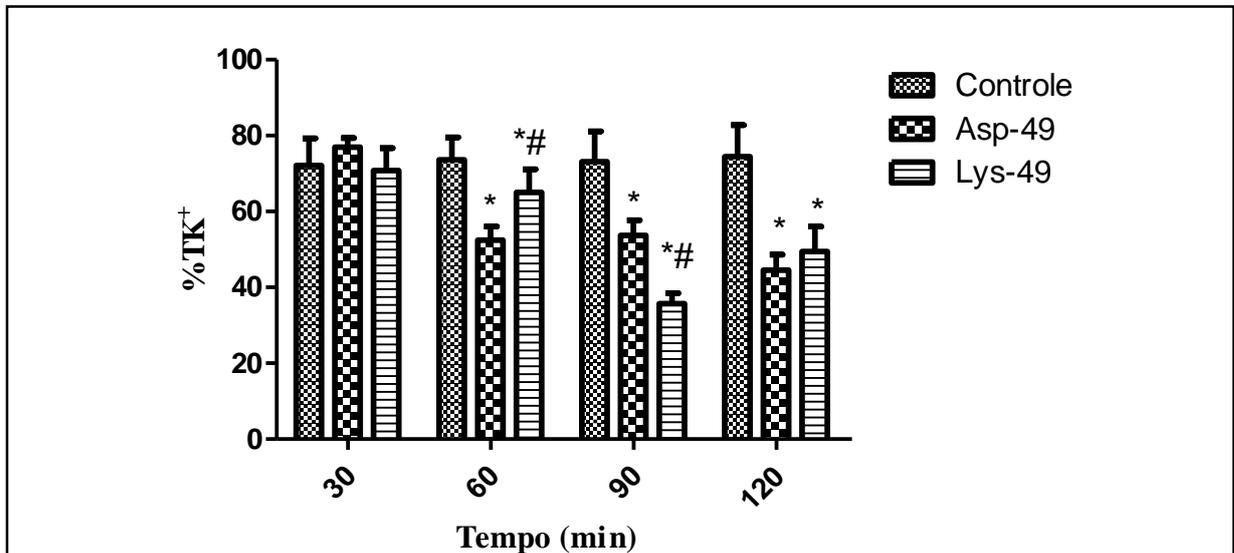
Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

**Figura 21:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3 $\mu$ g/mL no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl<sup>-</sup>).



Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.) n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

**Figura 22:** Efeitos promovidos por Lys-49 e Asp-49 3µg/mL no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>).

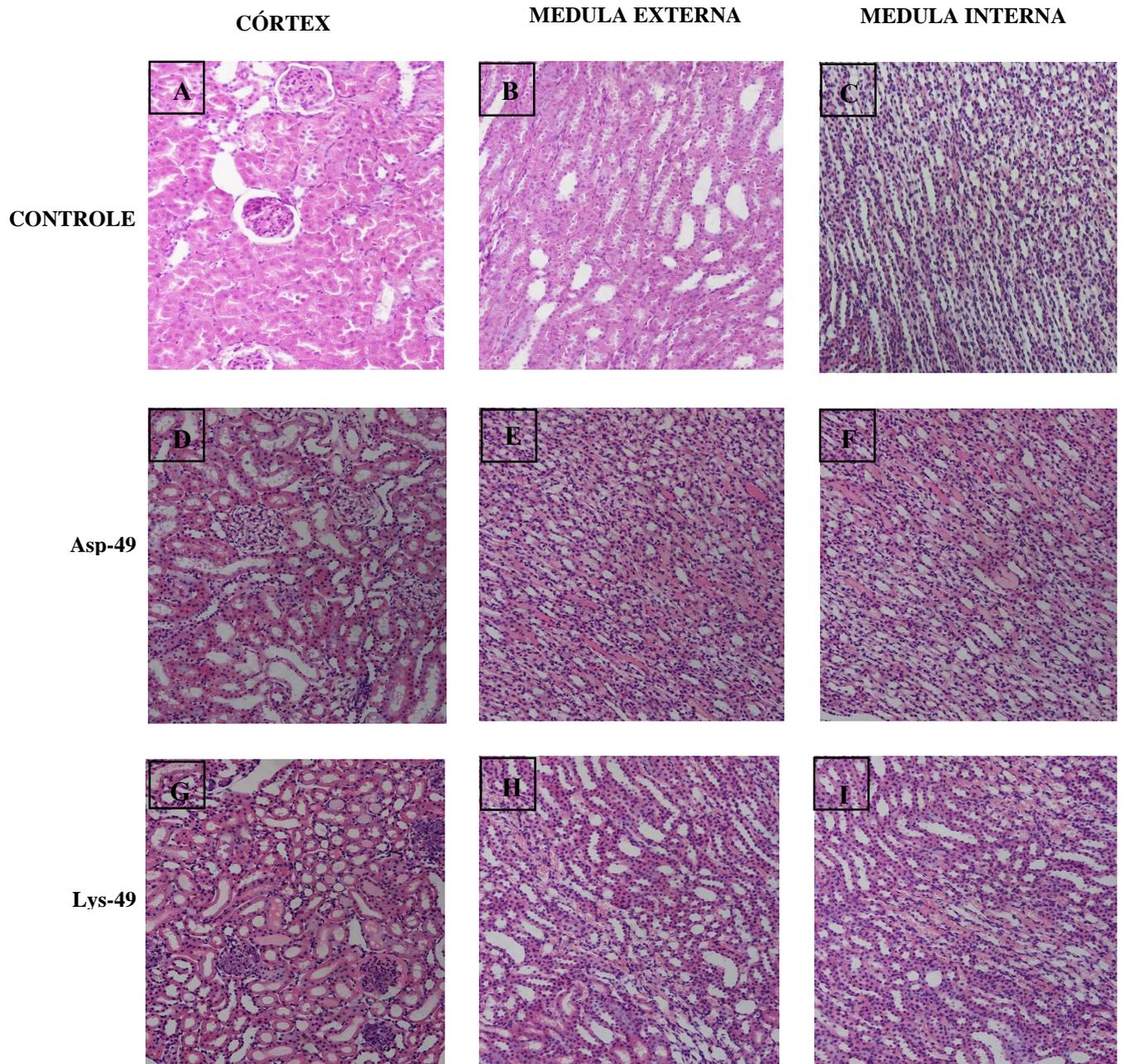


Os dados são expressos em (média ± E.P.M.), n=6. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, “\*” representa p<0,05 relacionando ao com o controle externo, “#” representa p<0,05 relacionando as duas frações entre si.

## 5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com Lys-49 e Asp-49

Os cortes histológicos do rim direito perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit não apresentou alterações. As lâminas analisadas demonstraram glomérulos, túbulos e vasos normais, sem deposição proteinácea e com núcleos preservados (A-B-C). O grupo Asp-49 apresentou glomérulos atrofiados, degeneração hidrópica em célula tubular, deposição de material protéico intratubular, discreto infiltrado inflamatório (D). Degeneração vacuolar tubular e deposição de proteína (E). Deposição de material protéico intratubular (F). O grupo Lys-49 apresentou atrofia e degeneração glomerular, depósito de material proteináceo no espaço de Bowman e intratubular, infiltrado inflamatório, degeneração hidrópica da célula epitelial (G). Degeneração vacuolar tubular e deposição de proteína (H). Deposição de material protéico intratubular (I) -(Figura 23). Figura 24 em aumento de 400x.

**Figura 23:** Prancha representativa da fotomicrografia dos rins, por área (córtex, medula externa e medula interna) em aumento de 200x.

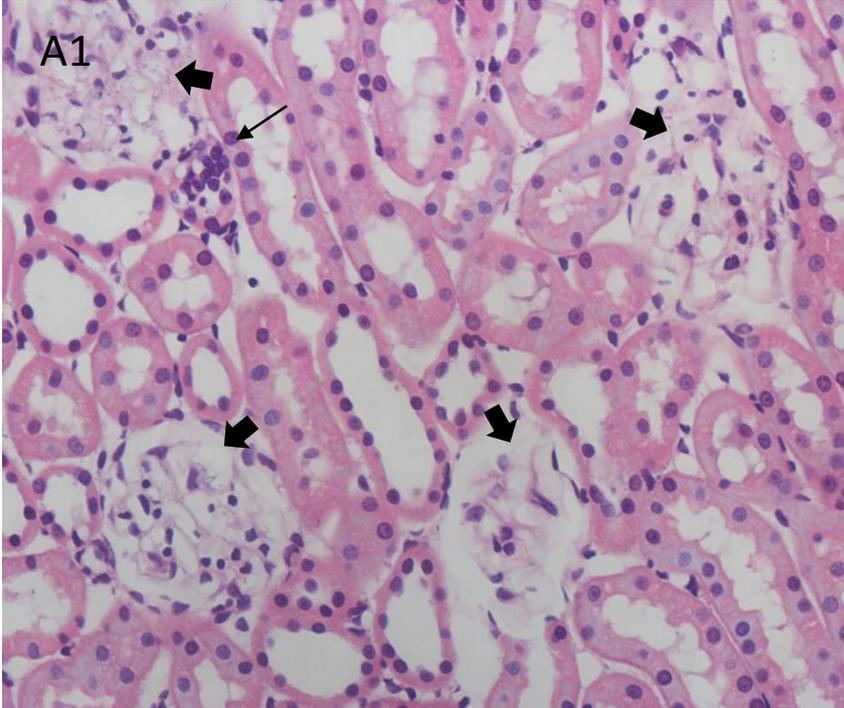


(A-B-C) Corte histopatológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada por 120 min em região do córtex, medula externo e medula interna, respectivamente. (D-E-F) Corte histológico de rim perfundido com Asp-49 (3 $\mu$ g/mL) em região do córtex, medula externa e medula interna, respectivamente. (G-H-I) Corte histológico de rim perfundido com Lys-49 (3 $\mu$ g/mL) em região do córtex, medula externa e medula interna, respectivamente. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

**Figura 24:** Imagens representativas da fotomicrografia dos rins, por área (córtex, medula externa e medula interna) em aumento de 400x.

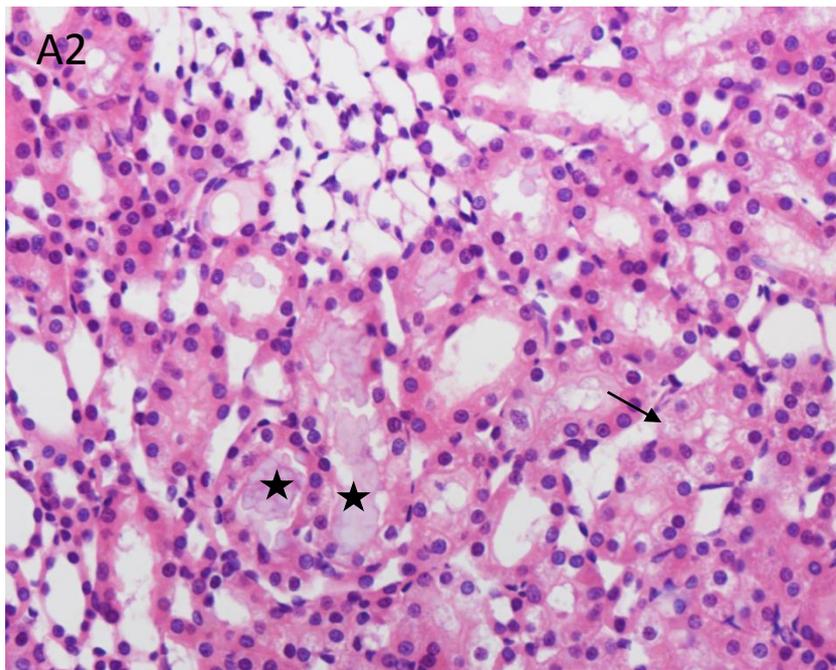
Asp-49

**CÓRTEX**

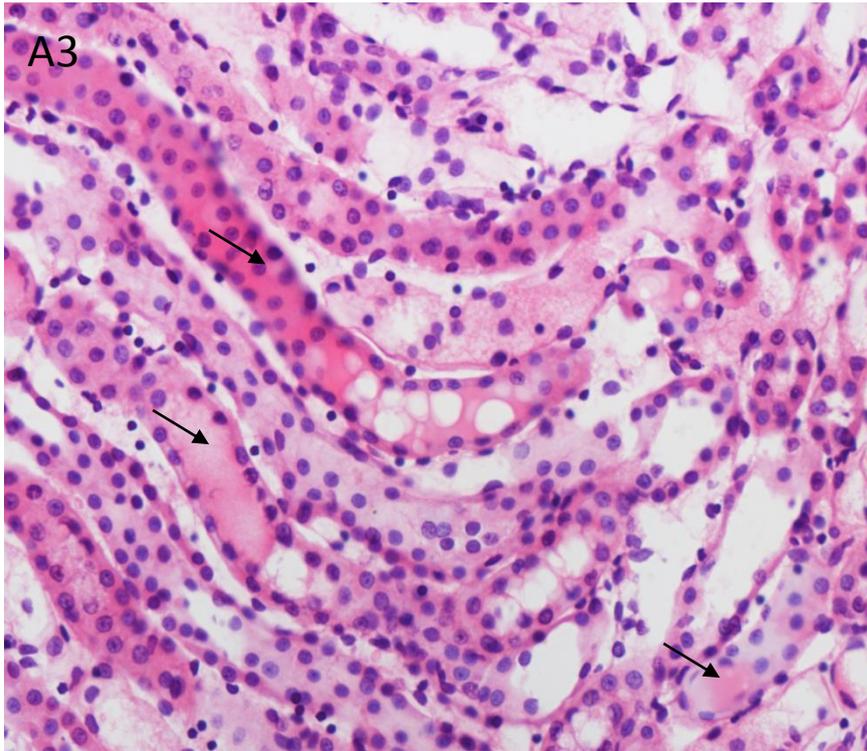


- ➡ Degeneração glomerular
- ➔ Infiltrado

**MEDULA EXTERNA**

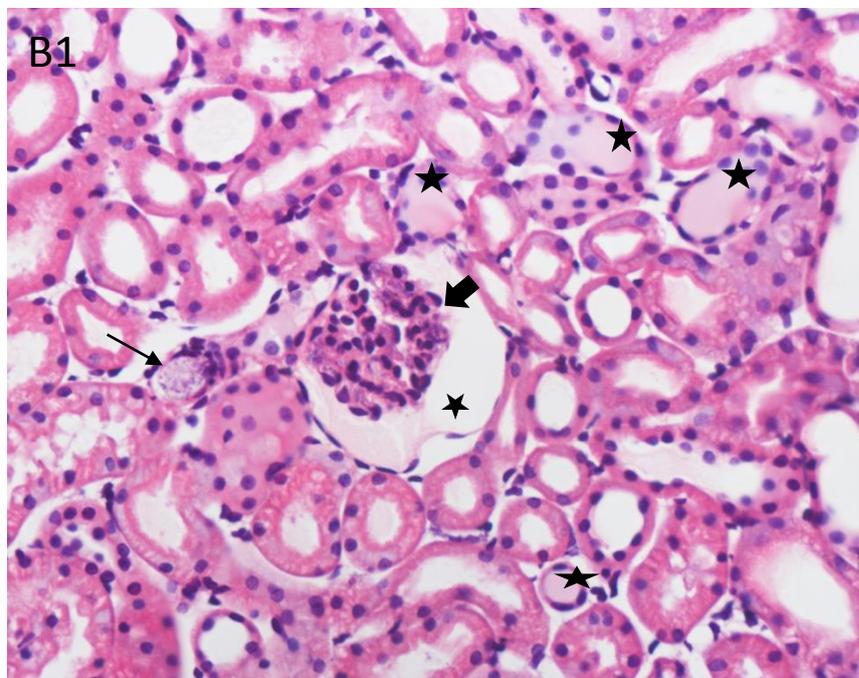


- ★ TAMM HORSFALL
- ➔ Degeneração hidrónica de células tubulares

**MEDULA INTERNA**

→ Deposição intratubular de proteínas

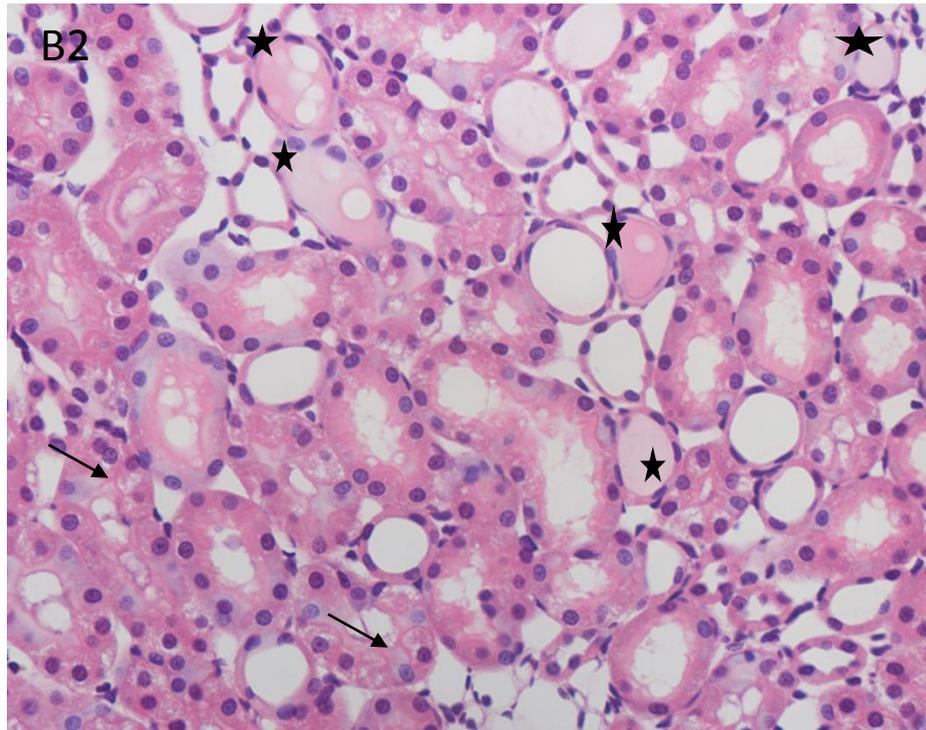
Lys-49

**CÓRTEX**

→ TAMM HORSFALL

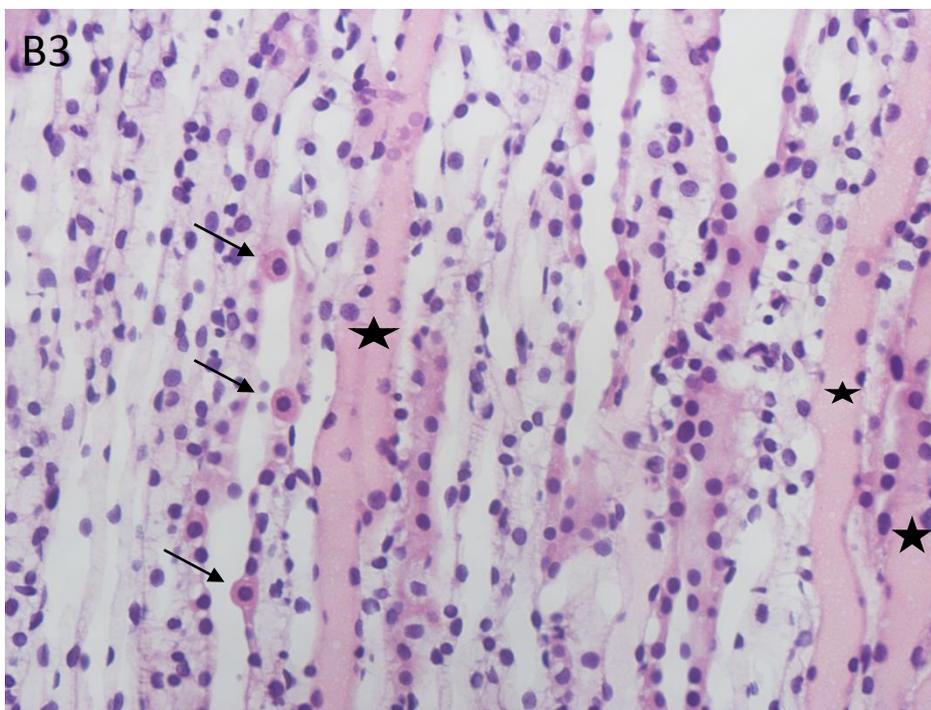
➡ Atrofia glomerular

★ Deposição de proteína

**MEDULA EXTERNA**

★ Deposição intratubular de proteínas

→ Degeneração hidrópica de células tubulares

**MEDULA INTERNA**

★ Deposição intratubular de proteínas

→ Células inflamatórias

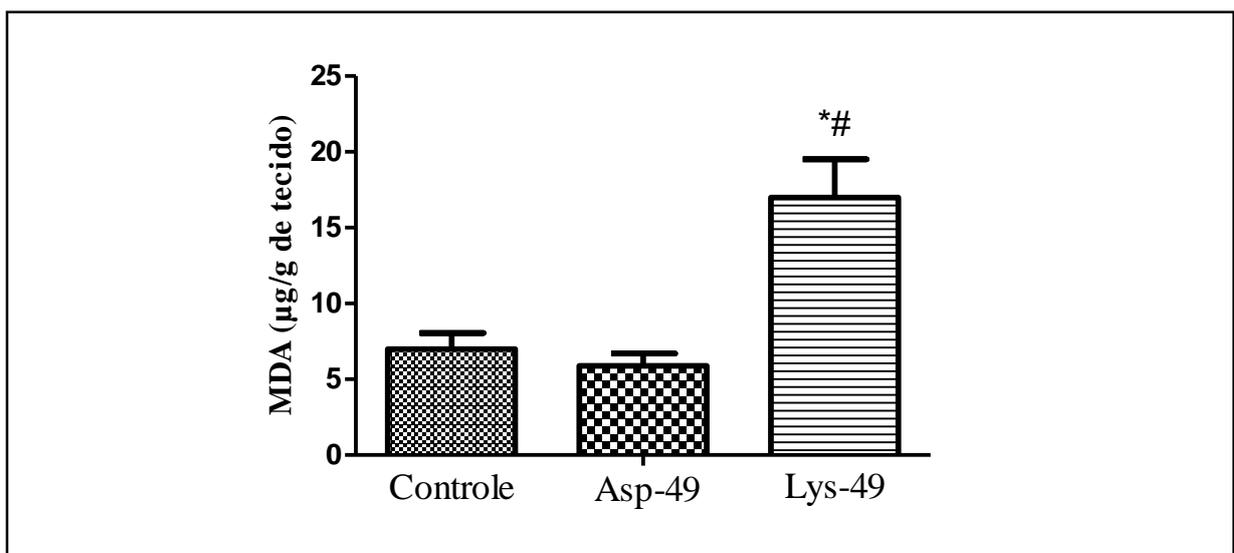
Corte histopatológico de rim perfundido com Asp-49 (A1, A2 E A3) e Lys-49 (B1, B2 E B3), referetes ao córtex, medula externa e medula interna, respectivamente, por 120 min. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

### 5.3 Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor e inflamação no tecido renal

#### 5.3.1 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA)

O dano oxidativo é um dos principais eventos responsáveis pela diminuição da funcionalidade renal. O malondialdeído (MDA) é um dos principais marcadores utilizados para caracterizar a participação do estresse oxidativo. Conforme exposto na Figura 25, o nível de MDA aumentou de forma significativa no grupo Lys-49, quando comparado ao grupo controle ao grupo Asp-49, que, por sua vez, não apresentou diferença estatística com relação ao grupo controle.

**Figura 25:** Níveis teciduais de MDA.



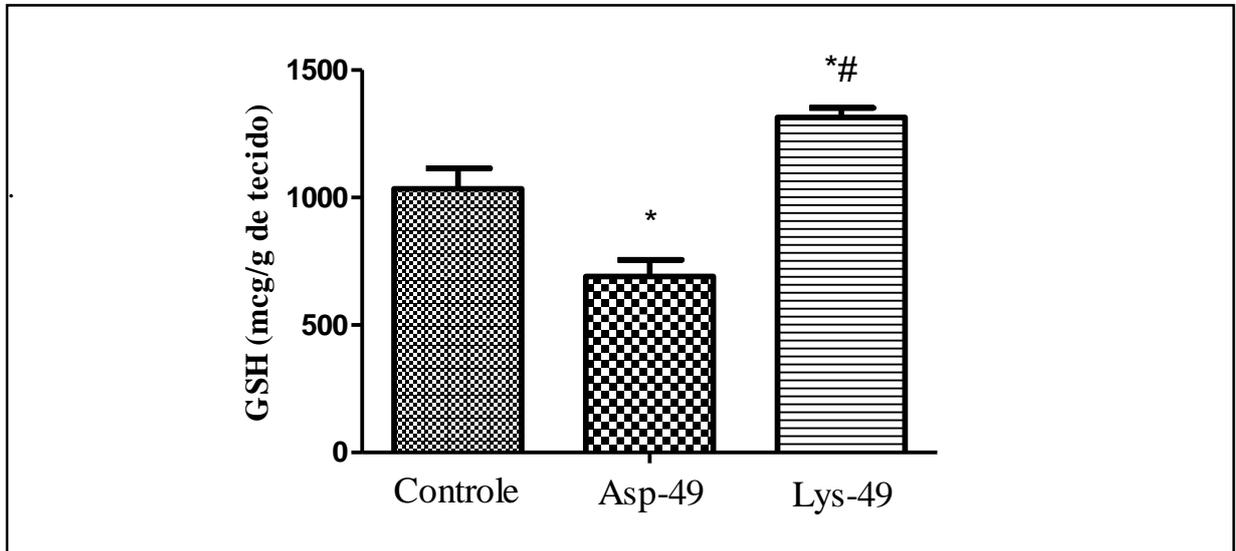
Os experimentos foram realizados com n=6, e os dados expressos como razão de massa de MDA por grama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

#### 5.3.2 Determinação da atividade da glutatona reduzida (GSH)

O ensaio de dosagem da glutatona reduzida ( $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH) é uma ferramenta utilizada para avaliar desequilíbrio redox em tecidos vivos. De acordo com a Figura

26, o grupo Asp-49 apresentou redução significativa na atividade da glutathiona reduzida quando comparada ao grupo controle e ao grupo Lys-49, que apresentou aumento significativo.

**Figura 26:** Níveis teciduais de GSH.

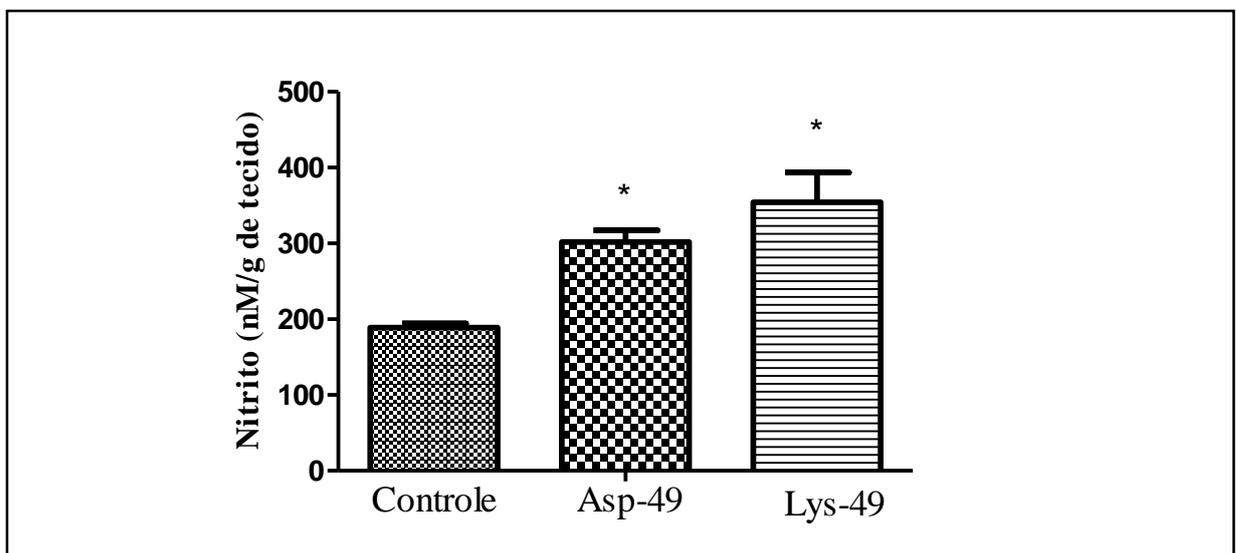


Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de massa de GSH por grama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p<0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p<0,05$  relacionando as duas frações entre si.

### 5.3.3 Determinação dos valores de nitrito

Como exposto na Figura 27, valores elevados de nitrito foram observados nos grupos Lys-49 e Asp-49 com relação ao controle, mas não apresentou diferença significativa entre as frações.

**Figura 27:** Níveis teciduais de Nitrito.

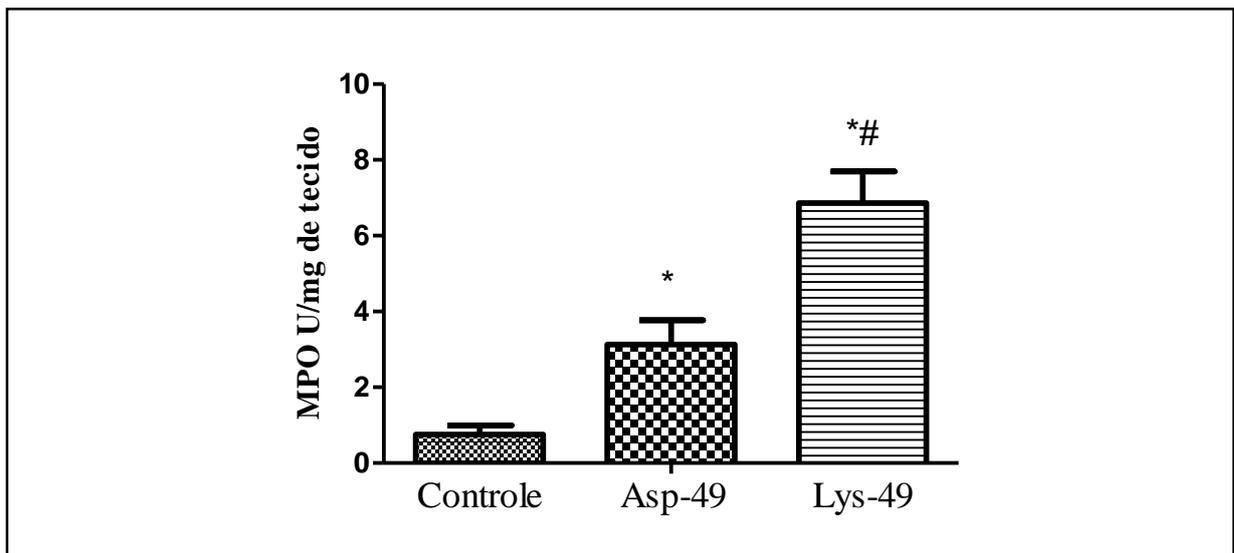


Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de massa de Nitrito por grama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p<0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p<0,05$  relacionando as duas frações entre si.

### 5.3.4 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Conforme a Figura 28, os grupos Asp-49 e Lys-49 apresentaram aumento da atividade da mieloperoxidase de foram significativa em relação ao controle. Grupo Lys-49 apresentou aumento estatístico em relação ao grupo Asp-49. Os dados numéricos referentes às dosagens de Nitrito e MPO estão contidos na tabela 6.

**Figura 28:** Níveis teciduais de MPO.



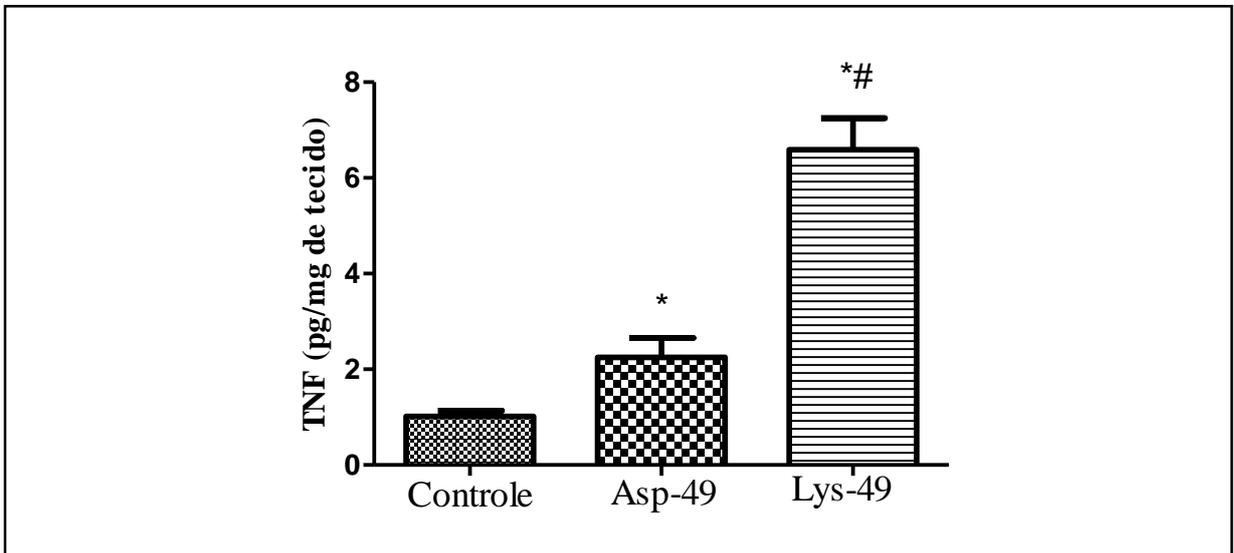
Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de Unidade de MPO por miligrama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p<0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p<0,05$  relacionando as duas frações entre si.

### 5.3.5 Dosagem de citocinas

As figuras abaixo mostram o efeito de Asp-49 e Lys-49 sobre os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-10}$  em rins perfundidos. As frações aumentaram significativamente os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$ , e o grupo Lys-49 apresentou diferença significativa em relação ao grupo Asp-49 (Figura 29). Os níveis de  $\text{IL-1}\beta$  aumentaram apenas no grupo Lys-49, apresentando diferença significativa em relação ao

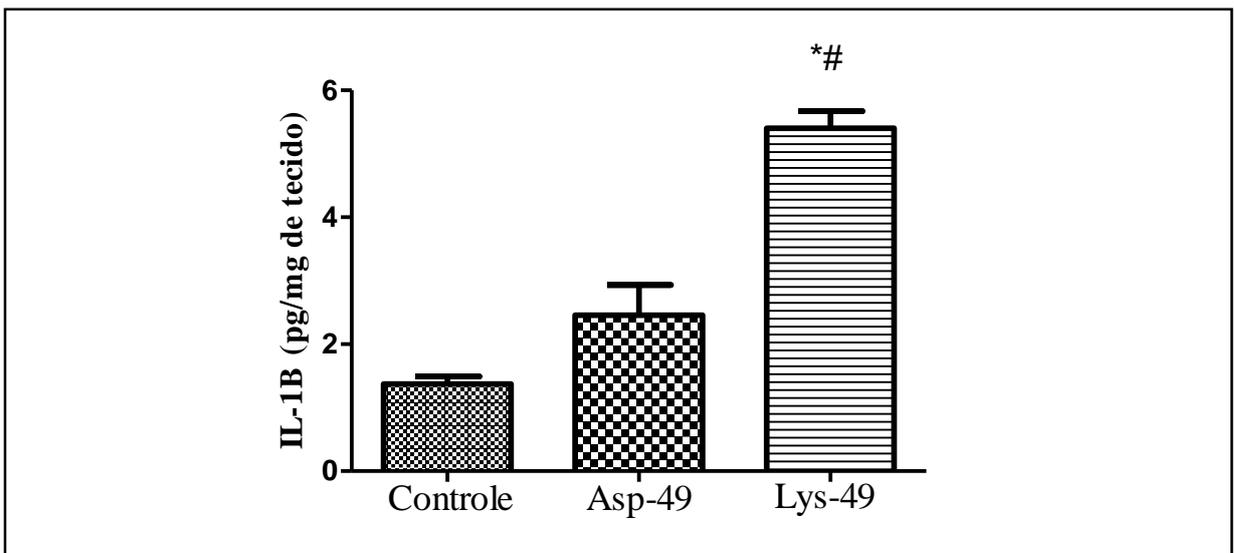
controle e ao grupo Asp-49 (Figura 30). E os níveis de IL-10 aumentaram em ambos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles (Figura 31).

**Figura 29:** Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de TNF- $\alpha$ .



Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de massa de TNF- $\alpha$  por miligrama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p<0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p<0,05$  relacionando as duas frações entre si.

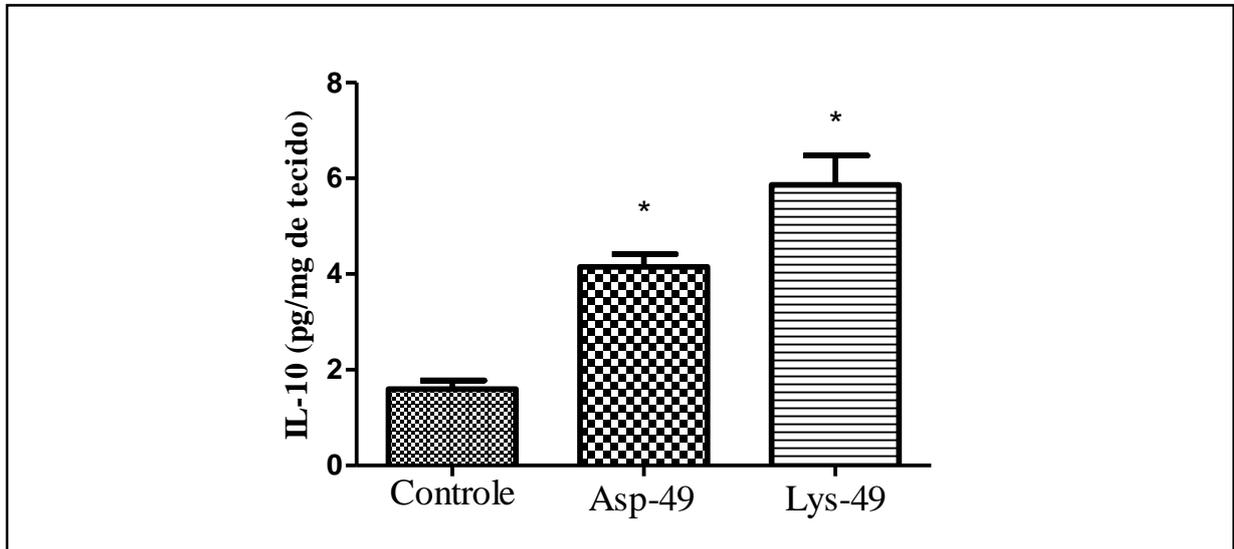
**Figura 30:** Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de IL-1 $\beta$ .



Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de massa de IL-1 $\beta$  por miligrama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de

pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

**Figura 31:** Efeito de Lys-49 e Asp-49 sobre os níveis de IL-10.



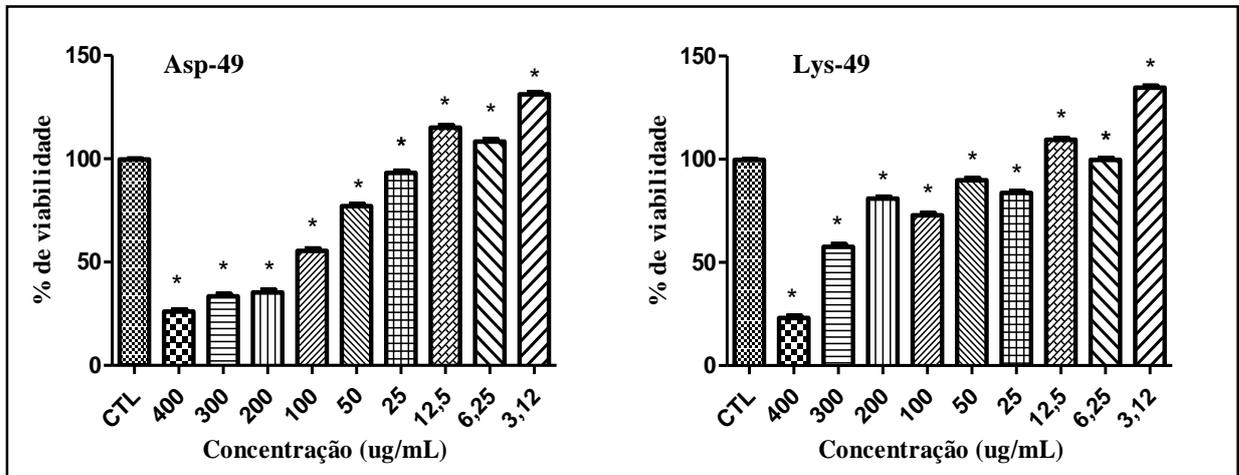
Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como razão de massa de IL-10 por miligrama de tecido  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, “\*” representa  $p < 0,05$  relacionando ao com o controle externo, “#” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas frações entre si.

#### 5.4 Avaliação da atividade de Asp-49 e Lys-49 sobre células MDCK.

##### 5.4.1 Ensaio de viabilidade celular MTT e Alamar Blue

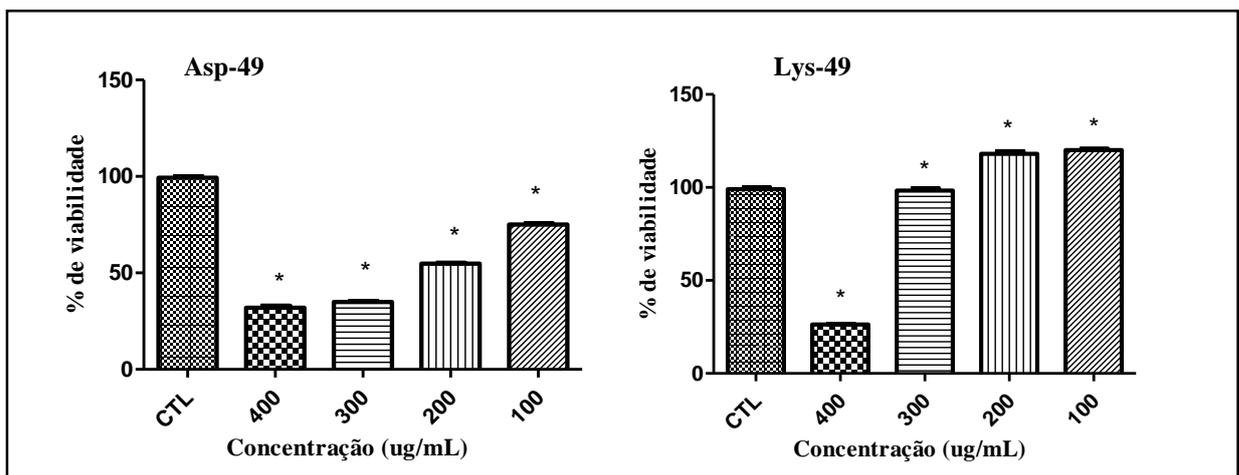
A citotoxicidade das PLA<sub>2</sub> Asp-49 e Lys-49 foi avaliada em células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações das frações (400; 300; 200; 100; 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ ). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que as frações reduziram a viabilidade das células MDCK nas maiores concentrações testadas quando comparadas ao controle, enquanto as menores induziram a proliferação. No ensaio de Alamar Blue também observa-se uma redução da viabilidade em concentrações elevadas, enquanto concentrações menores tem efeito proliferativo. As figuras 32 e 33 representam a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

**Figura 32:** Percentual de viabilidade das células MDCK tratadas com diferentes concentrações Asp-49 e Lys-49 (MTT)



Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como percentual de viabilidade  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni,  $*p<0,05$  vs. grupo controle.

**Figura 33:** Percentual de viabilidade das células MDCK tratadas com diferentes concentrações Asp-49 e Lys-49 (Alamar Blue).

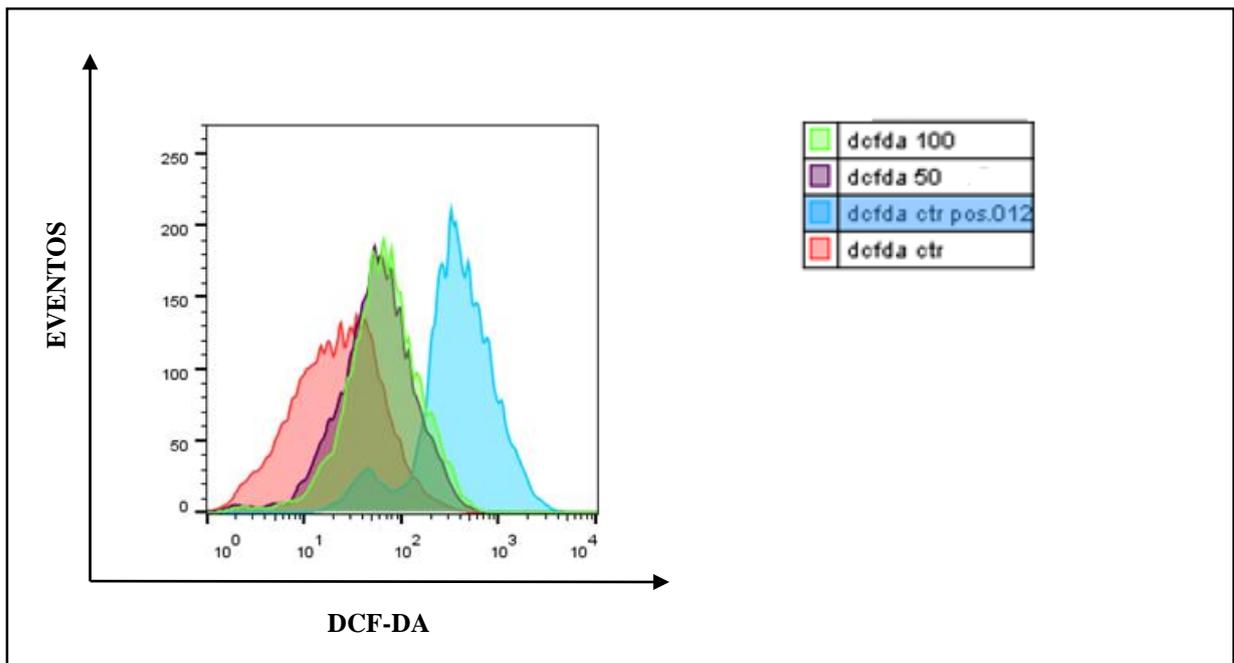


Os experimentos foram realizados com  $n=6$ , e os dados expressos como percentual de viabilidade  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni,  $*p<0,05$  vs. grupo controle.

### 5.4.2 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio

Observou-se que nas concentrações testadas (50 e 100  $\mu\text{g}$ ), a Asp-49 foi capaz de gerar EROs após 24h de incubação, representado pelo desvio à direita.

**Figura 34:** Histograma representativo da formação de ERO pela técnica de DCF-DA.



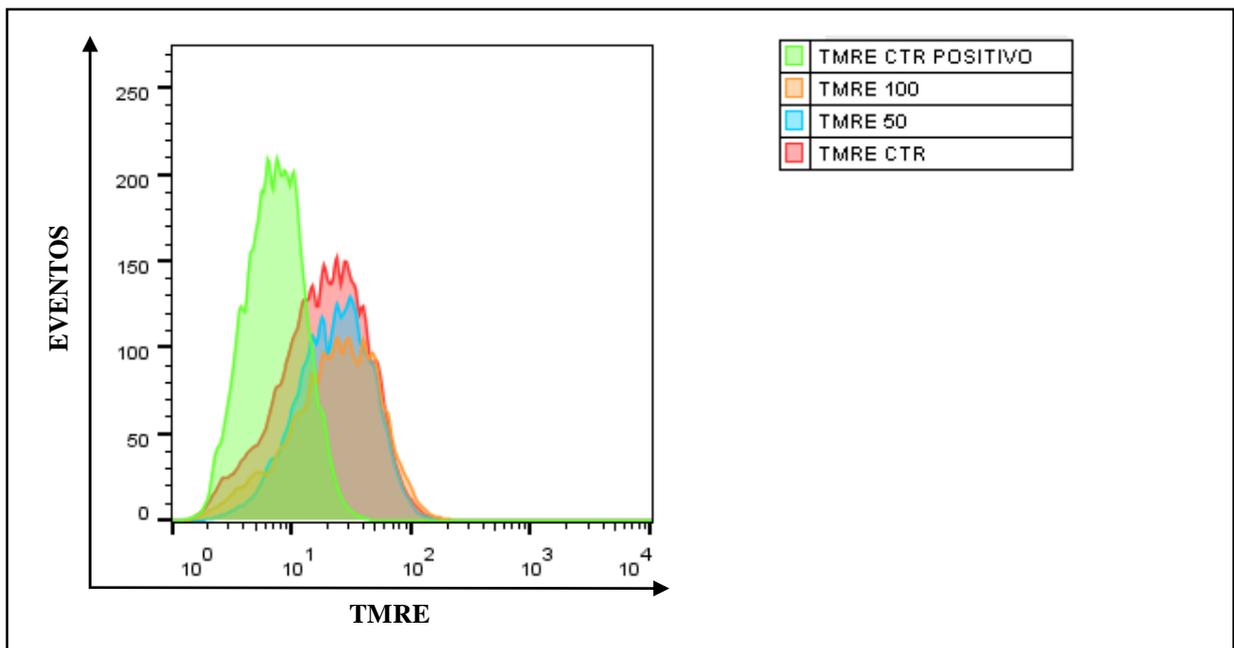
Os experimentos foram realizados em triplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar a substância testada. O hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) foi utilizado como controle positivo. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan. Geração de ROS foi expressa como uma proporção da intensidade de fluorescência relativa em comparação com o grupo controle.

### 5.4.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

Nesse ensaio as células MDCK foram incubadas com tetrametilrodamina (TMRE), corante fluorescente específico que se liga diretamente as mitocôndrias de células viáveis. Em células que estejam em processo de apoptose, especificamente pela via intrínseca ou mitocondrial, a mitocôndria sofre alterações no seu potencial transmembrânico, ocorrendo perda do TMRE acumulado na mitocôndria para o citosol, havendo uma emissão menor de fluorescência na organela.

A análise do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada com as células MDCK tratadas com Asp-49 (50 e 100 $\mu$ g/mL). A figura 35, evidencia que o tratamento não modifica a concentração do TMRE no citosol. Não há extravasamento, nem a consequente despolarização mitocondrial, indicando queda do  $\Delta\Psi_m$ , o qual seria demonstrado pelo deslocamento do gráfico à esquerda.

**Figura 35:** Histograma representativo da análise do potencial mitocondrial

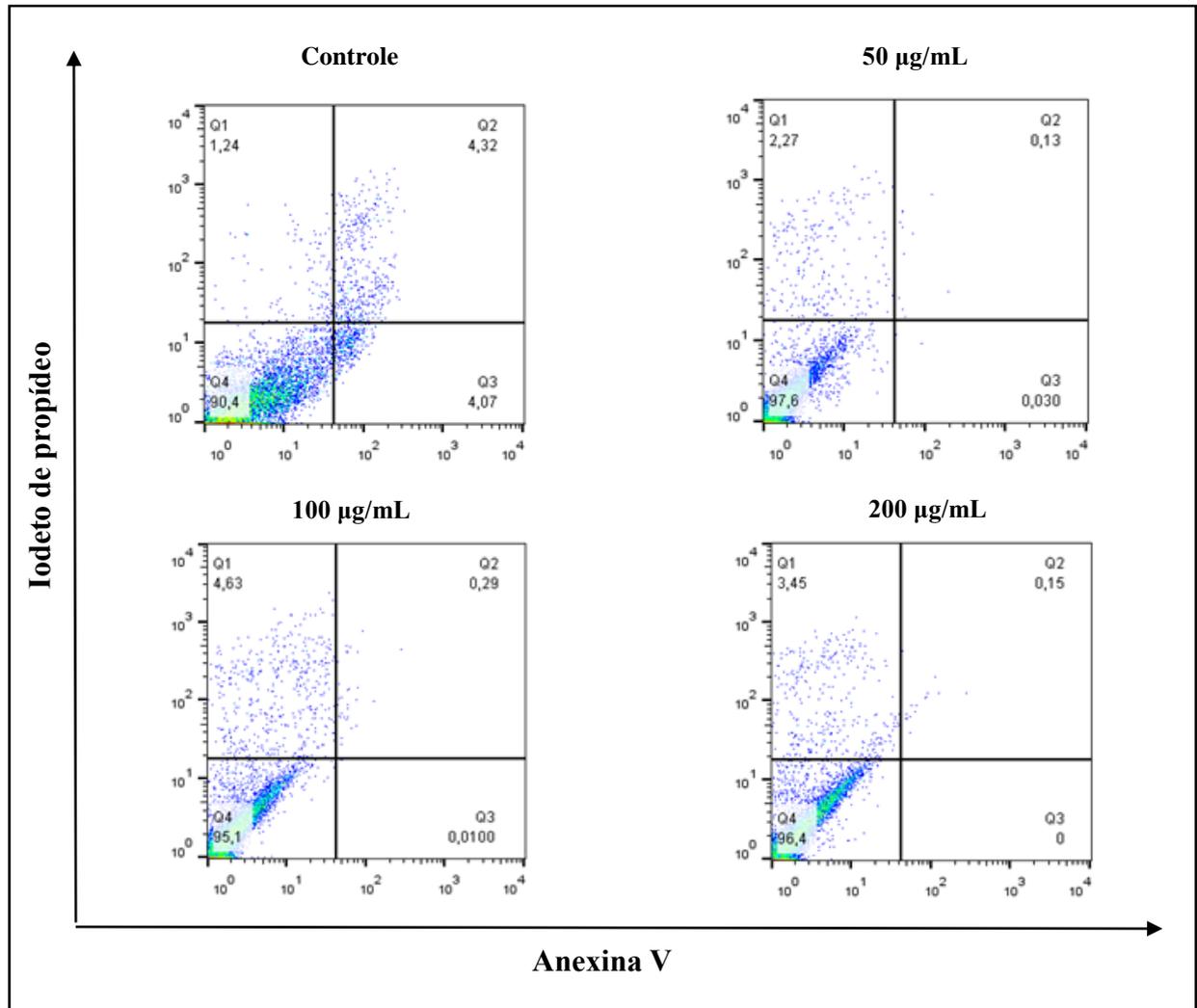


Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial em células foi medido pela coloração TMRE e detectado por citometria de fluxo. FCCP foi usado como controle positivo. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan.

#### 5.4.4 Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo.

Após verificar a citotoxicidade, buscamos identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por Asp-49, as células tratadas por 24 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por iodeto de propídio (PI) e anexina-FITC. Na figura 36 observa-se que a quantidade de células marcadas com anexina V (que caracteriza o processo de morte por apoptose) e a marcação por PI (que evidencia células em processo de necrose) não foram significativas com relação ao controle. O processo de morte celular por necrose secundária (ou apoptose tardia) também não foi observado. A staurosporina foi utilizada como controle positivo.

**Figura 36:** Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo

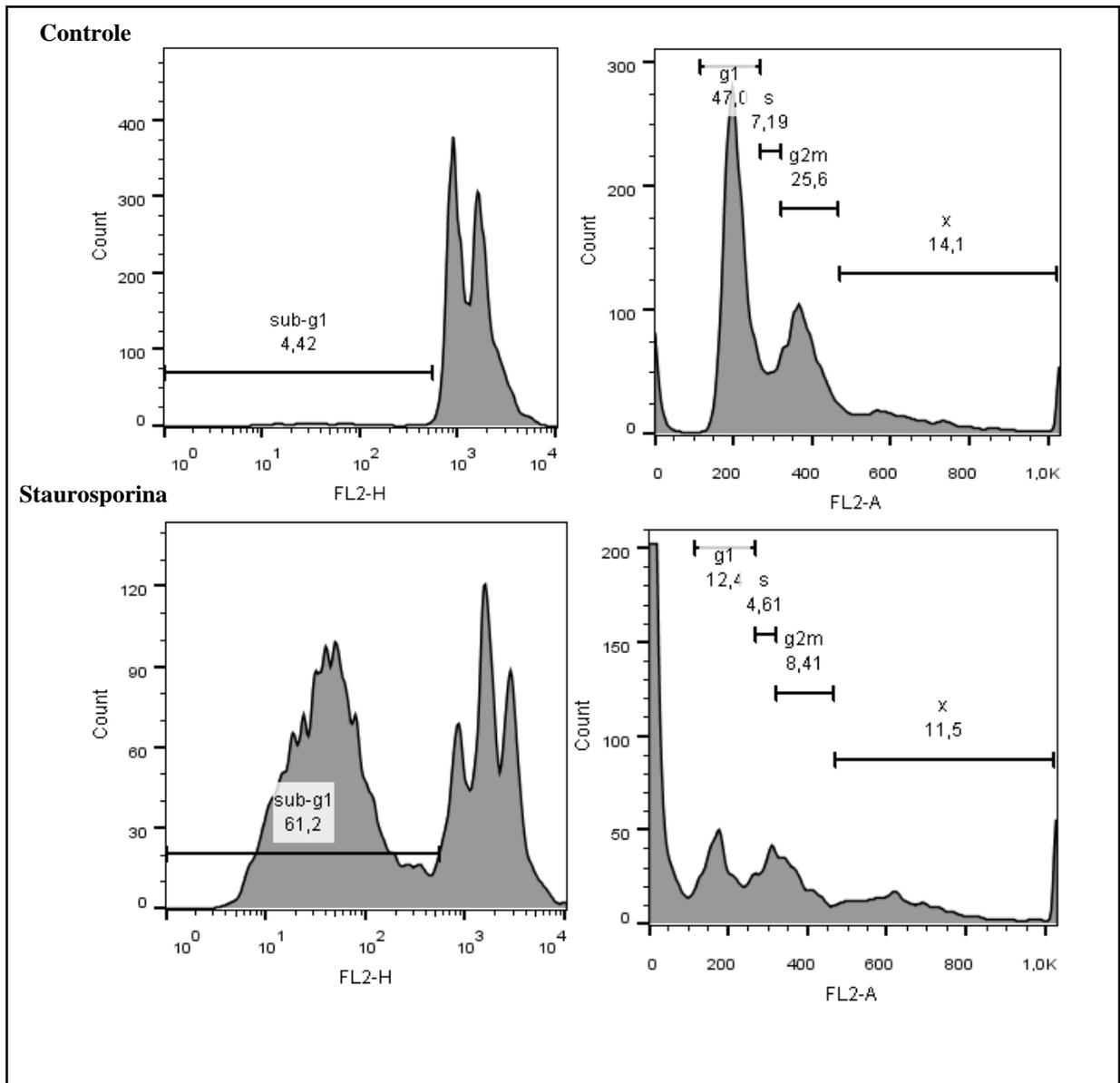


Gráficos de dispersão representativos do perfil de marcação simultânea de células MDCK expostas a diferentes concentrações de Asp-49 (50, 100 e 200 µg/mL) por um período de 24 horas, com Anexina-V-FITC (quadrante inferior direito das plotagens – indício de apoptose), PI (quadrante superior esquerdo das plotagens – indício de necrose). No quadrante inferior esquerdo das plotagens, estão representadas as células sem marcação (células que demonstram estar viáveis). No quadrante superior direito das plotagens estão representadas as células com dupla marcação (indício de necrose secundária).

#### 5.4.5 Avaliação do efeito de Asp-49 sobre o ciclo celular (e fase sub-G1)

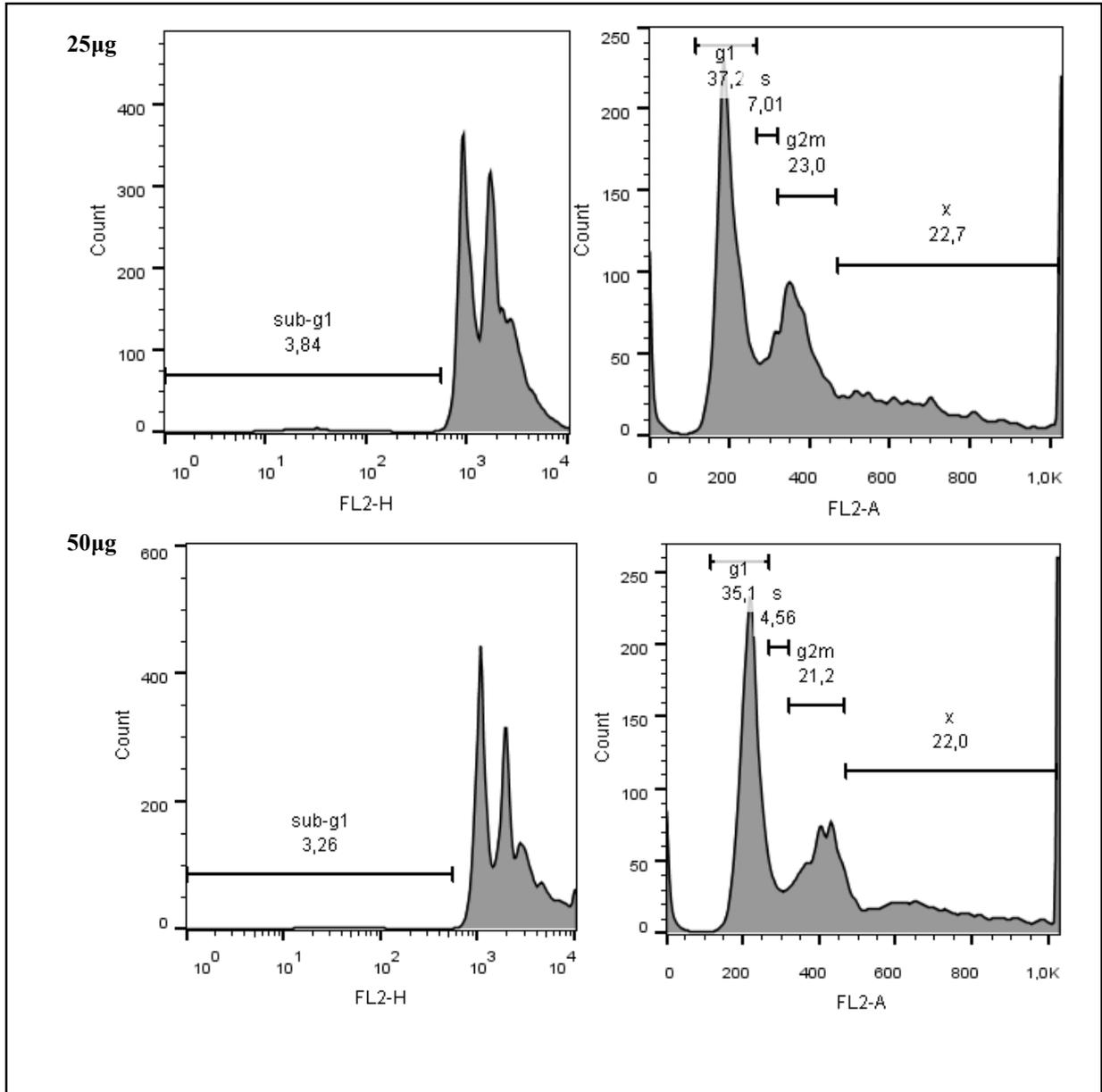
Para avaliação da progressão do ciclo celular em 24 horas em células MDCK, realizamos o tratamento com Asp-49 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg. O tratamento em nenhuma das concentrações desencadeou parada em fase sub-G1, em G0/G1, em S ou em G2/M. Staurosporina foi utilizada como controle positivo.

**Figura 37:** Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular Controle negativo e Controle positivo.



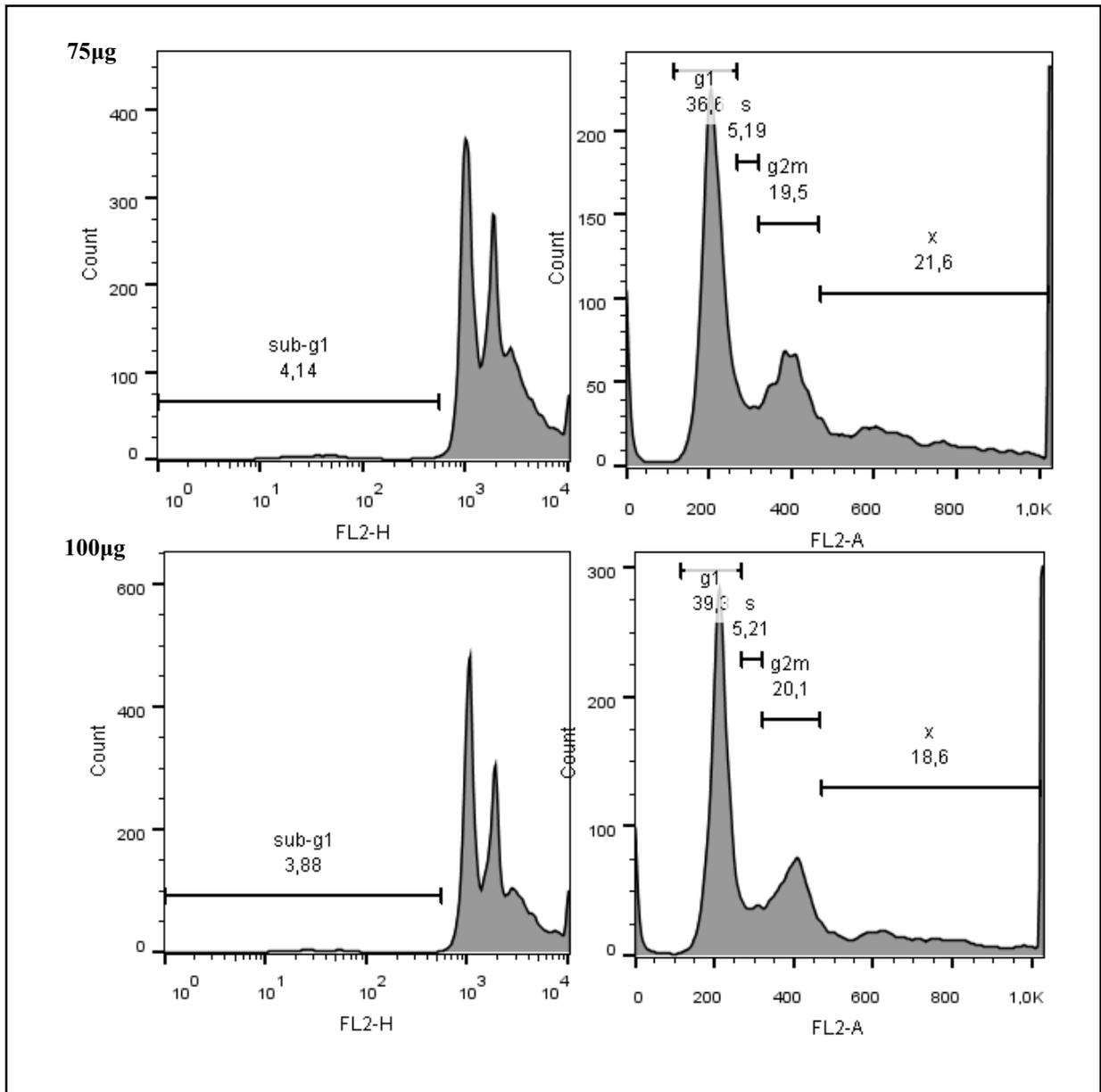
Histogramas obtidos por citometria de fluxo usando a marcação de iodeto de propídio em células MDCK.

**Figura 38:** Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular tratadas com Asp-49 (25 e 50  $\mu\text{g}$ )



Histogramas obtidos por citometria de fluxo usando a marcação de iodeto de propídio em células MDCK.

**Figura 39:** Histogramas de células MDCK em cada fase do ciclo celular tratadas com Asp-49 (75 e 100  $\mu\text{g}$ )



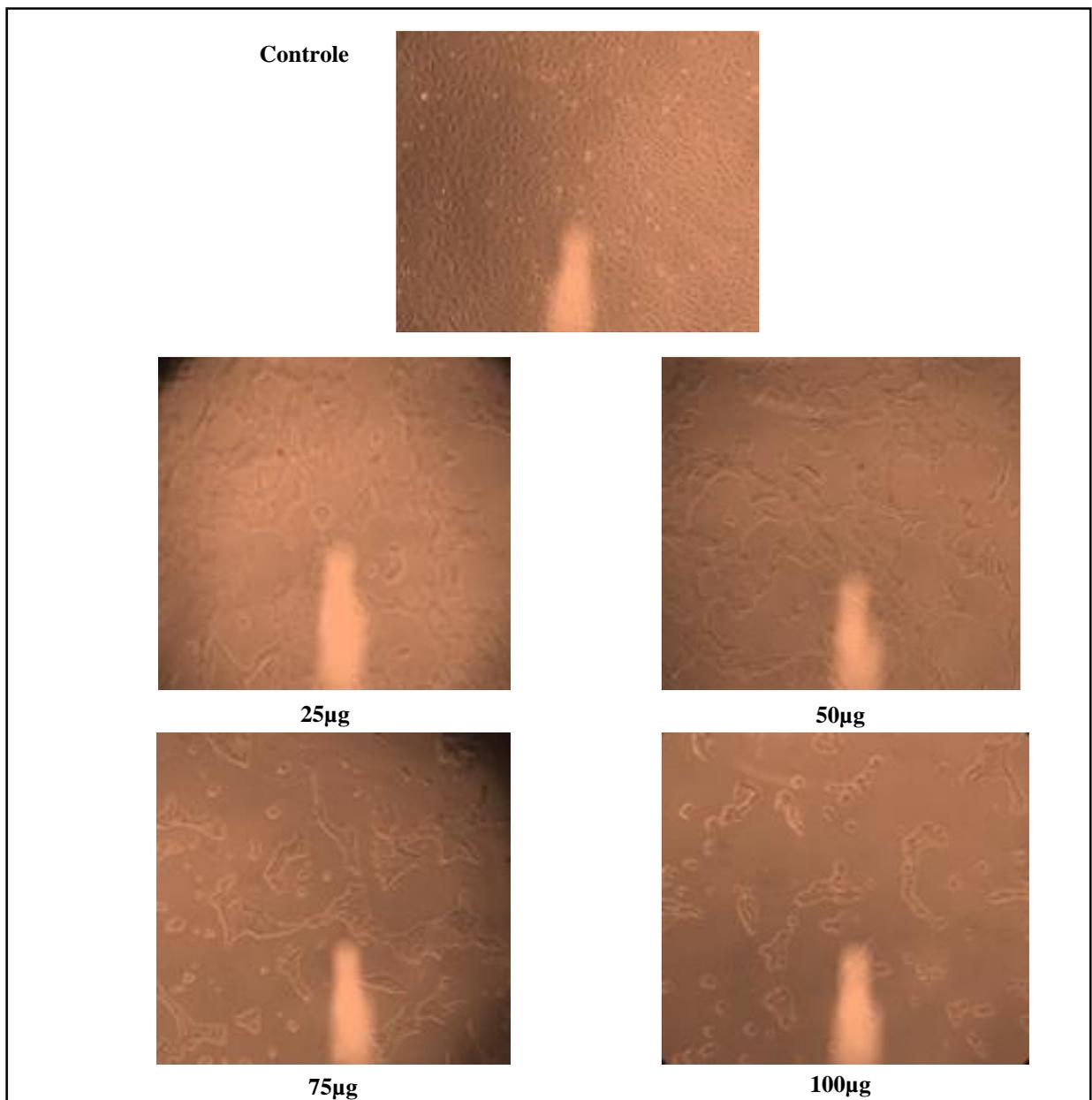
Histogramas obtidos por citometria de fluxo usando a marcação de iodeto de propídio em células MDCK.

#### 5.4.6 Alterações morfológicas induzidas por Asp-49 em células MDCK

Após 24 horas de incubação das células MDCK com Asp-49 (25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) realizamos microfotografias para avaliação morfológica. As alterações são mostradas na figura 47. No grupo controle, as células apresentaram moderada coesão, com pleomorfismo moderado (células poligonais, irregulares ou fusiformes), com citoplasma amplo, por vezes, com

múltiplos pequenos vacúolos irregularmente distribuídos, núcleos de contornos regulares, cromatina fina e nucléolos evidentes. Raros focos de sobreposição celular. No grupo tratado foram encontradas diversas alterações morfológicas importantes, abundante sobreposição celular, células desnudas de moderada anisocariose, aparente perda de adesão (inibição de adesão) características que se tornam mais marcantes a medida que a concentração aumenta.

**Figura 40:** Alterações encontradas na morfologia das células MDCK tratadas com Asp-49.



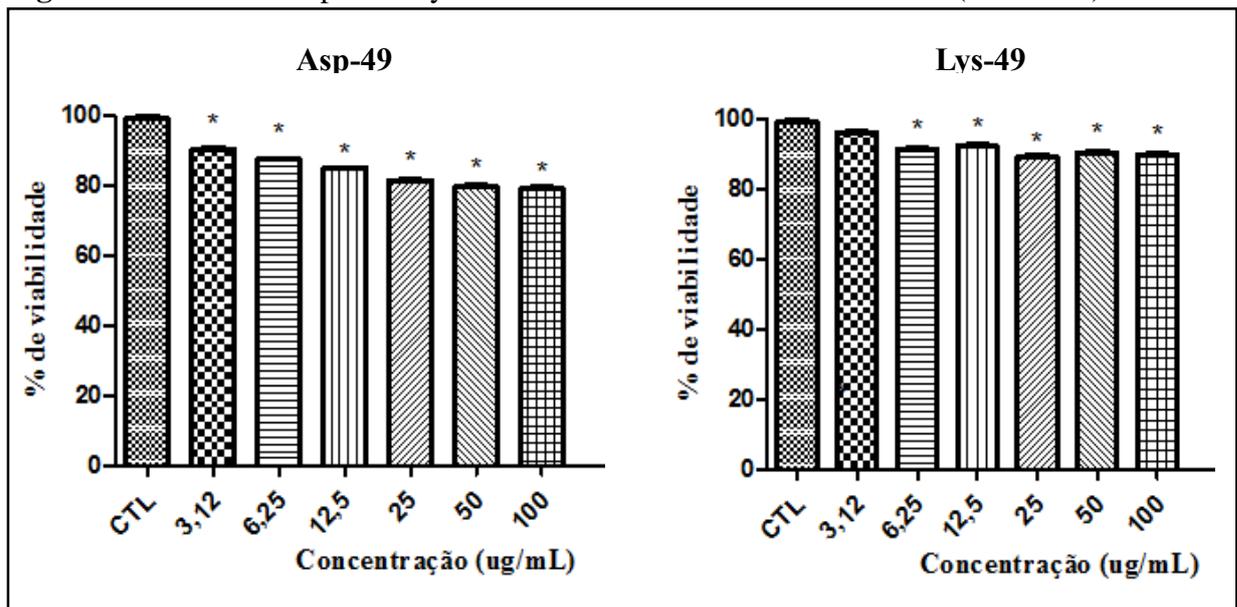
Fotomicrografias em aumento de 200x e 400x das alterações morfológicas induzidas por Asp-49 (25, 50, 75 e 100 µg) em células MDCK após 24 horas de incubação, observadas em Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

## 5.5 Ensaios com HEK-293

### 5.5.1 Teste de Viabilidade *Trypan-Blue*

A citotoxicidade da Asp-49 e Lys-49 foi avaliada em células HEK-293 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações da toxina através do teste de *Trypan Blue*. Como mostrado na Fig. 41, as frações induziram discreta morte celular ( $p < 0.05$ ).

**Figura 41:** Efeito de Asp-49 e Lys-49 sobre a viabilidade de célula renal (HEK-293).

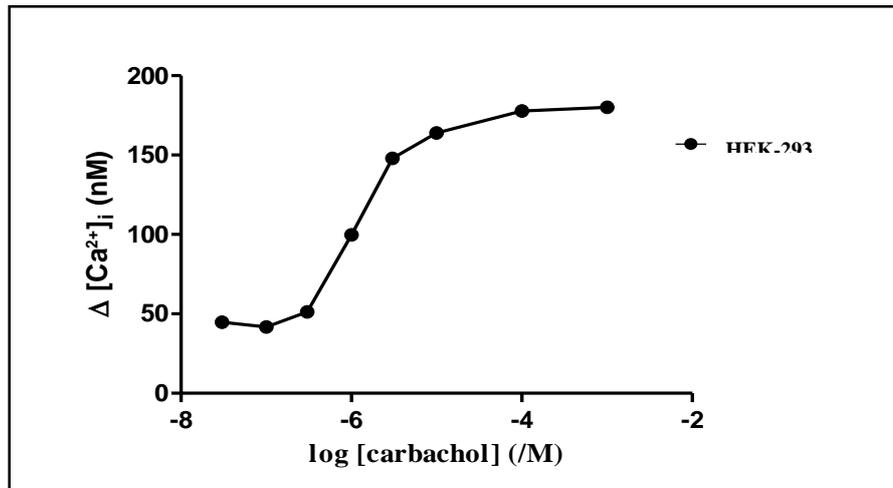


As células foram tratadas com diferentes concentrações de Lys-49 e Asp-49 por 24 h. Os resultados se expressam como porcentagem de morte celular das amostras tratadas comparadas com as amostras controle. Valores foram dados como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (teste Anova One-way, seguido do pós-teste de Dunnett).

### 5.5.2 Análise da liberação de cálcio (FlexStation)

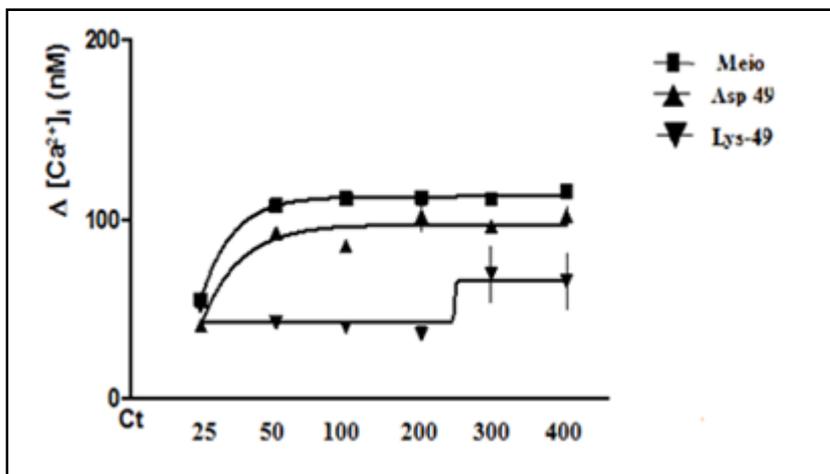
Para avaliar se as frações Lys-49 e Asp-49 eram capazes de alterar a mobilização de cálcio citosólico em células HEK-293, estas foram incubadas com o indicador de cálcio citosólico Fluo-8 AM e analisadas no FlexStation. Podemos observar na figura 42 que o Carbacol induziu um aumento significativo de  $Ca^{2+}$  citosólico na forma dose dependente em células HEK-293. Quando tratamos com as frações Asp-49 e Lys-49 (figura 43), observamos que a Asp-49 e Lys-49 não causaram liberação quando comparada as células tratadas apenas com HBS (meio onde a substância foi solubilizada).

**Figura 42:** Curva dose-resposta para o Carbachol no FlexStation em células HEK-293.



O gráfico mostra valores médios de duas repetições. Algumas barras de erro estão ocultas pelo ponto de dados. Análise realizada na ausência ou presença de BAPTA-AM. Os dados foram transferidos e processados no software SoftMax Pro 5.4 e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  calculada segundo Grynkiewicz et al., 1985.

**Figura 43:** Curva dose-resposta para Asp-49 e Lys-49 no FlexStation em células HEK-293.



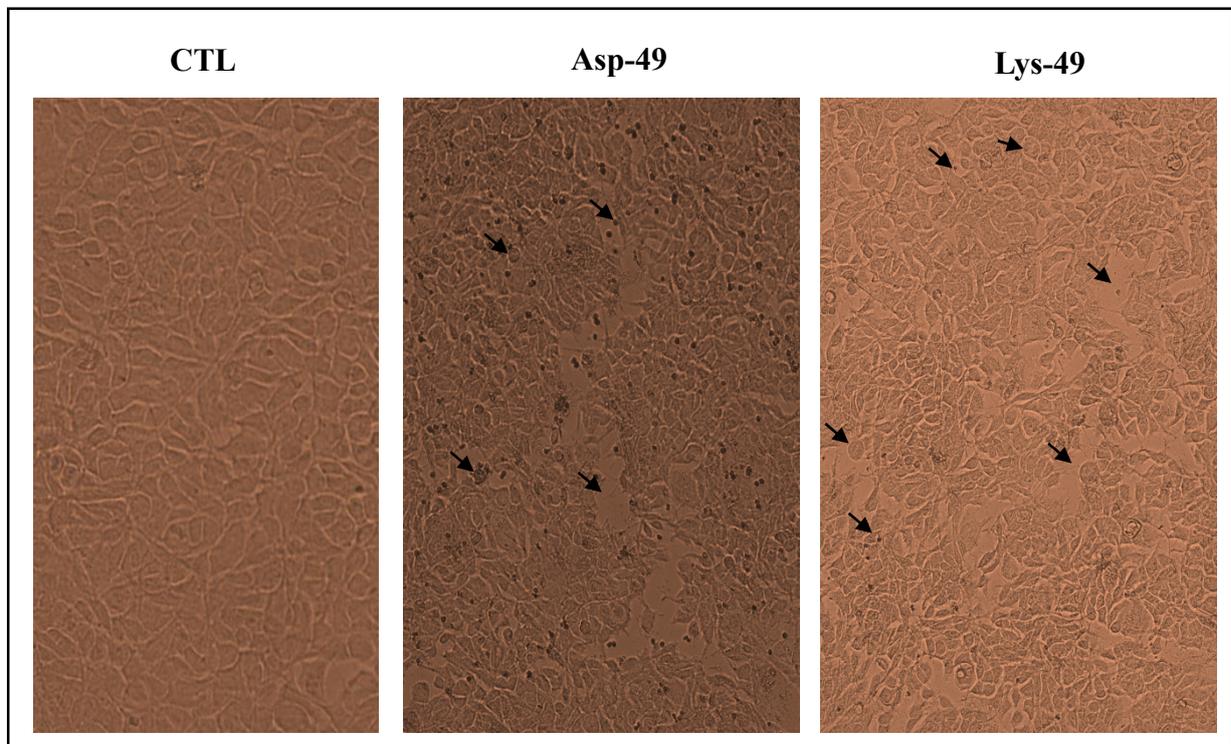
O gráfico mostra valores médios de duas repetições. Algumas barras de erro estão ocultas pelo ponto de dados. Os dados foram transferidos e processados no software SoftMax Pro 5.4 e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  calculada segundo Grynkiewicz et al., 1985.

### 5.5.3 Análise da morfologia celular (Fluor)

Após 24 horas de incubação das células HEK-293 com Asp-49 e Lys-49 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) realizamos microfotografias para avaliação morfológica. As alterações são mostradas na Figura 44. No grupo controle, as células apresentaram moderada coesão, com pleomorfismo moderado

(células poligonais, irregulares ou fusiformes), com citoplasma amplo, por vezes, com múltiplos pequenos vacúolos irregularmente distribuídos, núcleos de contornos regulares, cromatina fina e nucléolos evidentes. Raros focos de sobreposição celular. No grupo tratado foram encontradas diversas alterações morfológicas importantes (sugestivo de morte celular), sem rompimento aparente da membrana, perda do formato característico, perda de aderência, presença de agregado celular com citoplasma granuloso, núcleo picnótico, desnudo, tumefação celular. Essas características foram mais marcantes no grupo Asp-49.

**Figura 44:** Alterações morfológicas nas células HEK-293 tratadas com Asp-49 e Lys-49.



Fotomicrografias em aumento de 200x das alterações morfológicas induzidas por Asp-49 e Lys-49 em células HEK após 24 horas de incubação, observadas em Microscópio Fluid.

***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são usados como ferramentas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com uma ampla variedade de ações farmacológicas e aplicações biotecnológicas sendo descritas para as substâncias que compõem estes venenos. Assim, o isolamento e a caracterização funcional dos componentes dos venenos podem fornecer informações para o seu mecanismo de ação e tornar possível o seu uso como agentes terapêuticos e/ou futuros modelos moleculares.

Marinho *et al.* (2015), ao estudar os efeitos renais do veneno total de *Bothropoides pauloensis* em sistema de perfusão de rim isolado, observaram alterações nos parâmetros funcionais renais. O veneno total diminuiu a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), o fluxo urinário (FU), o ritmo de filtração glomerular (RFG) e os percentuais de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>). Com conhecimento dos efeitos renais do veneno total, desenhamos o presente estudo com as frações PLA<sub>2</sub> Asp-49 ou Lys-49 na perspectiva de investigar o seu envolvimento na nefrotoxicidade causada pelo veneno. De acordo com Cintra-Francischenelli *et al.*, (2010), as PLA<sub>2</sub> miotóxicas exercem um papel primordial na patogênese do envenenamento, sendo amplamente encontrada nos venenos botrópicos e devido a sua abundância e variedade de efeitos tóxicos (toxicidade, miotoxicidade e atividades inflamatórias) é um dos componentes mais estudados (DE PAULA *et al.*, 2009). Diversos estudos em rim isolado de rato têm demonstrado que PLA<sub>2</sub> isoladas de venenos de serpentes provocam lesão renal, em particular aquelas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* (BARBOSA *et al.*, 2002, 2005, 2006; BRAGA *et al.*, 2008; EVANGELISTA *et al.*, 2010).

A fração Asp-49 (3ug/mL) causou nefrotoxicidade através da alteração dos parâmetros funcionais renais. Reduziu a PP, RVR, FU, RFG e os percentuais de transporte total de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Parâmetros similares foram descritos no estudo com o veneno total, que reduziu todos os parâmetros analisados. A fração Lys-49 aumentou a PP, FU e reduziu RFG e os percentuais de transportes totais de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Monteiro (2010) estudando os efeitos renais de duas PLA<sub>2</sub> isoladas do veneno de *B. erythromelas*, na perfusão renal, verificou que a fração de baixa atividade enzimática (no caso, a Lys-49) apresentou alterações marcantes, corroborando, assim, com os nossos resultados.

Comparando as sequências de miotoxinas e fosfolipases isoladas de venenos de serpentes, Kini (2003) sugeriram que o sítio catiônico associado com a região hidrofóbica, localizado na região C-terminal, é responsável pela miotoxicidade, sendo independente da

atividade fosfolipásica (podendo determinar a lesão celular pela desorganização da barreira lipídica, afetando em consequência o influxo de cálcio e causando necrose) sugerindo que a atividade fosfolipásica não é essencial para o efeito farmacológico. As regiões hidrofóbicas e catiônicas estão previstas como determinantes na miotoxicidade das PLA2. A especificidade pelo tecido ou célula devido à sua afinidade em relação a proteínas específicas do veneno ofídico, influenciam no efeito, em vez de domínios lipídicos. Após a ligação inicial, as enzimas PLA2 induzem vários efeitos farmacológicos por mecanismos que são dependentes ou independentes da sua atividade enzimática (KINI e EVANS, 1989). Mora-Obando *et al.*, (2014), relataram que a combinação das miotoxinas (Asp-49 e Lys-49) apresentaram citotoxicidade significativamente maior em comparação com o efeito de qualquer toxina isolada. Estes estudos sugerem justificativas para os diferentes efeitos encontrados pelas frações Asp-49 e Lys-49, hipótese também sustentada por Barbosa *et al.*, (2002; 2005), Braga *et al.*, (2008),

Muitos mecanismos estão envolvidos na patogênese do envenenamento. Foi demonstrado também que componentes isolados do veneno, como fosfolipases, promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012).

Todos esses mediadores são o passo inicial para o desenvolvimento de complicações teciduais renais, incluindo a IRA (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). As citocinas estão envolvidas em dois grupos importantes: as pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e as anti-inflamatórias, tais como IL-10. Outro mediador envolvido é o NO, que atua na manutenção do tônus vasodilatador e da pressão arterial e tem sido sugerido que o choque circulatório é causado por ativação da isoforma induzível (tipo II) da NOS (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Efeitos hemodinâmicos de toxinas em experimentos de perfusão de rim isolado refletem o efeito vascular renal das toxinas sem interferências que ocorreriam em metodologias *in vivo*, onde os efeitos observados seriam provenientes de respostas renais secundárias de mediadores inflamatórios vasoativos endogenamente produzidos no animal em estudo. No caso do estudo com o veneno da víbora de Russell (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012) observa-se a diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular em estudo com animal *in vivo*, enquanto que na perfusão de rim isolado o fluxo sanguíneo renal não é alterado, mas a taxa de filtração glomerular é reduzida. Essa descoberta indica que o veneno em estudo não tem efeito vascular no músculo liso e a taxa de filtração glomerular reduzida é devido ao efeito de veneno em células mesangiais, envolvendo a liberação de mediadores inflamatórios vasoativos

endogenamente gerados, incluindo as catecolaminas, renina, angiotensina II, endotelinas (CHAIYABUTR e SITPRIJA, 1999). Estudo posterior provou que o efeito era mediado por prostaglandinas, tendo seu efeito bloqueado por indometacina (THAMAREE *et al.*, 1994).

Os venenos botrópicos apresentam vários peptídeos que intensificam a resposta à bradicinina, e conseqüentemente, a produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular. Rocha e Silva e colaboradores foram os primeiros a descobrir e descrever o neuropeptídeo bradicinina como regulador crucial da pressão sanguínea (ROCHA e SILVA *et al.*, 1949). Posteriormente, esses peptídeos foram isolados do veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwidi* e *Bothrops jararacussu* e caracterizados como inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (FERREIRA *et al.* 1970, 1992, 1998). A bradicinina participa fisiologicamente da regulação da pressão sanguínea e da função renal. Trata-se de uma potente substância vasodilatadora que atua pela ativação de receptores B2, estimulando a liberação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MOUREAU *et al.*, 2005). Guimarães *et al.*, (1986) demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal em rim isolado de rato.

O córtex renal normal produz grande quantidade de PGE2 e PGI2 e pouca quantidade de TXA2. PGE2 e PGI2 têm ação vasodilatadora no rim. Estes prostanóides seriam responsáveis por influenciar o fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e liberação de renina (OSBORN *et al.*, 1984). Infusões intrarenal de prostaglandinas aumentaram o fluxo sanguíneo renal e produziram efeito natriurético, inibindo a reabsorção tubular de sódio e na alça ascendente de Henle reduziram o transporte tubular de cloreto (SIMMONS *et al.*, 2004).

O estudo de Pirotzky *et al.* (1984) evidencia a participação de substâncias vasoativas como histamina e PAF, que podem ser liberadas em rim isolado de rato. O PAF em doses baixas produz vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular.

Diante de dados encontrados na literatura, podemos sugerir que mediadores como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-10 e int feron-gama (INF- $\gamma$ ), podem estar envolvidos nesse processo de diminui o da PP, uma vez que pe onhas geralmente induzem a libera o dessas subst ncias (CRUZ *et al.*, 2008). Nesse contexto, os pept deos potenciadores da bradicinina, associados a libera o dos mediadores inflamat rios com a o vasodilatadora, poderiam estar envolvidos na redu o da press o de perfus o observados no grupo Asp-49 (levando em considera o a concentra o experimental utilizada, de 3ug, pode ter havido pouca libera o de mediadores para a redu o de tais par metros vasculares). Enquanto que o grupo Lys-49 apresentou um aumento da PP, resultado que

corroborar ao encontrado por Souza (2010), que estudou a Lys-49 de *B. erythromelas*. Quanto a RVR houve alteração significativa apenas em Asp-49.

Ainda sobre a Lys-49, o aumento de PP associado ao aumento do FU levando ao aumento de excreção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem ter envolvimento de substâncias vasoconstritoras, com produção de derivados do AA (atuação indireta), como prostaglandinas F2x, o tromboxano A2 e o fator de agregação plaquetária, que fisiologicamente promovem redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI *et al.*, 2000).

Contudo, a Asp-49, esses mediadores inflamatórios com potencial relaxante podem ter contribuído também para a redução da Resistência Vascular Renal (RVR) observado (apenas aos 90min), de caráter discreto e transitório. Esses resultados tornam a identificação de moléculas endógenas e exógenas cada vez mais importante para elucidarmos esse complexo mecanismo do tônus vascular. A redução do RFG e do FU (significante aos 60 min), pode ser correlacionado com a diminuição da PP (e em partes, da RVR), o que pode ter ocasionado isquemia em algumas áreas dos rins, e dessa forma promovendo lesão renal de modo indireto e também por ação citotóxica direta do veneno. Ressaltando-se, novamente, a participação do NO, ele também participa do controle de fluidos extracelulares. Esse mediador exerce um papel importante na excreção renal. Um estudo no qual se inibiu experimentalmente a produção de NO, resultou em diminuição da irrigação renal e na diminuição do transporte de sódio, demonstrando que esse mediador estimula a excreção de sódio (SANTHOSH *et al.*, 2013), o que pode estar envolvido no nosso estudo.

A literatura também destaca que os venenos Botrópicos são extremamente lesivos aos túbulos renais (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). Os efeitos renais no envenenamento ofídico podem ser decorrentes de coagulação intravascular disseminada, ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica do veneno ou a espasmos dos vasos sanguíneos decorrentes da liberação de substâncias vasoativas (CHAIYABUTR e SITPRIJA, 1999; CALGAROTTO *et al.*, 2008). Vários autores concordam que a ação proteolítica dos venenos botrópicos tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ e LOMONTE, 1995), induzindo liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas (CHAVE *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que o veneno de *Bothropoides pauloensis* apresenta uma intensa atividade proteolítica (OLIVEIRA *et al.*, 2009), podendo desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. No nosso estudo, o próprio acúmulo de proteínas nos túbulos pode estar impedindo a reabsorção de  $\text{Na}^+$ . O aumento da permeabilidade

(possivelmente com o envolvimento do PAF ou mediadores inflamatórios, como histamina) pode estar ocasionando o extravasamento de proteínas, tornando-se lesivo aos túbulos renais. Todos esses fatores citados podem estar contribuindo para a perda da função de transporte das células epiteliais renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos como sódio, cloreto e potássio observados nesse estudo (em ambas as frações), o que é reforçado pela nossa análise histológica.

No presente estudo, a análise histológica renal é compatível com um efeito tóxico do veneno. As alterações nos túbulos renais são bem pronunciadas. Observou-se deposição proteinácea em túbulos proximais, distais, coletores e alça de henle, podendo, assim, justificar a diminuição do transporte de eletrólitos (sódio, cloreto e potássio). Apresentando deposição de proteínas nos glomérulos, assim como atrofia e degeneração. Em diversas lâminas, observamos discreto infiltrado inflamatório (córtex, outter e inner medula), (por vezes, plasmócito e mastócito) o que também reforça os resultados de envolvimento inflamatório (a ser discutido mais adiante), proteínas de Tamm Horsfall intratubular, degeneração hidrópica de células epiteliais, degeneração vacuolar tubular. Em vista dos resultados observados na perfusão de rim com as frações Lys-49 e Asp-49, decidimos investigar se os mediadores inflamatórios e os mecanismos oxido-redutores estão envolvidos na ação destas.

O veneno de *Bothropoides pauloensis* é dotado de atividades tóxicas, que incluem efeitos proteolíticos, coagulantes e hemorrágicos, com o desenvolvimento de dano tecidual local proeminente: sangramento, bolhas, mionecrose e dermonecrose. Entre os efeitos sistêmicos, a IRA é de extrema importância. A inflamação é uma característica local importante do envenenamento, na maioria dos casos, o tratamento escolhido começa várias horas após o acidente, assim, o processo inflamatório é bem avançado no momento do início da soroterapia. Os antivenenos comerciais muitas vezes não neutralizam efetivamente esses efeitos e a IRA se instala, sendo responsável pela maioria dos óbitos. Neste contexto, devemos considerar que a variabilidade geográfica exibida pelos venenos aumenta a diversidade dos efeitos farmacológicos observados experimentalmente e, como consequência, os fenômenos inflamatórios caracterizados podem apresentar grandes variações. A pesquisa atual em imunotoxicologia está focada no mecanismo dos eventos moleculares que ocorrem na resposta imune inata (citocinas, liberação de quimiocinas, conversão de ácido araquidônico em eicosanóides, estimulação de receptores por agonistas inatos, etc.), com o objetivo de encontrar novos alvos farmacológicos que controlam o processo de inflamação em sua fase inicial, para fornecer novos tratamentos complementares à imunoterapia tradicional.

Portanto, neste estudo buscamos caracterizar os principais eventos inflamatórios induzidos pelas PLA<sub>2</sub> Lys-49 e Asp-49 isoladas de *B. pauloensis* em rim isolado de rato. Há relatos que demonstram que venenos e toxinas isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* são capazes de ativar funções de macrófagos, como fagocitose, produção de oxigênio reativo, citocinas e eicosanoides (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A ação das PLA<sub>2</sub> envolve principalmente a degradação dos lipídeos da membrana, seguida de sua ruptura e liberação de conteúdo intracelular (FERNANDES *et al.*, 2014). Todos esses eventos realmente contribuem profundamente para provocar o estresse oxidativo e a inflamação. A hidrólise catalítica da ligação acilo sn-2 de glicerofosfolípidos da membrana plasmática gera lisofosfolípídios e ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico. A lisofosfatidilcolina gerada pelo PLA<sub>2</sub> é considerada como um agente inflamatório potente e demonstrou modular a intensidade da produção de ROS no local da inflamação. Além disso, o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico também leva à formação de ROS tóxicos, podendo assim alterar a homeostase redox (DENNIS, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Nosso estudo aponta um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 em ambas as frações, enquanto que a fração Lys-49 apresentou um aumento significativo de IL-1 $\beta$  (não observado em Asp-49). Alguns estudos corroboram com esse envolvimento de mediadores inflamatórios no mecanismo de ação de venenos, como Echeverría *et al.*, (2018), que avaliaram os efeitos pró-inflamatórios do veneno de *Bothrops alternatus* em células Raw 264.7 (o que é muito relevante para o nosso estudo uma vez que se trata de uma célula de tecido imunocompetente implicadas no desencadeamento de resposta inflamatória) e macrófagos peritoneais de rato, observando o aumento da permeabilidade celular e o extravasamento celular (principalmente os neutrófilos), aumento na liberação de IL1, TNF $\alpha$ , IL-13 e IL-10 e a indução de enzimas relacionadas à sinalização de lipídios, como COX-2. Como nos dados apresentados, o estudo observou um aumento de citocinas pró-inflamatórias e, curiosamente, as anti-inflamatórias, uma vez que os rins perfundidos com as PLA<sub>2</sub> (Lys-49 e Asp-49) apresentaram aumento no nível de IL-10, o que pode ser interpretado como um mecanismo de contra-regulação do início do processo inflamatório. A Asp-49 apresentou aumento também em TNF- $\alpha$ , mas não de IL-1 $\beta$  (apesar da análise mostrar uma tendência ao aumento, mas não foi significativo), o que confirma seu papel precoce e potente na resposta inflamatória. Já a Lys-49 aumentou os níveis da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Outro resultado que reafirma essa liberação de citocinas inflamatórias foi o aumento, por ambas as frações, dos níveis de MPO (uma heme proteína presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos/macrófagos, que tem a função de catalisar a produção do ácido

hipocloroso e a oxidação de substratos endógenos, além de recrutar citocinas (KUMAR *et al.*, 2004).

A ação de PLA<sub>2</sub> em membranas celulares não deve ser limitada à liberação de AA, mas também a de outros ácidos graxos insaturados, como ácido oleico, ácido linoleico e ácidos graxos  $\omega$ -3 (por exemplo, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA), que são precursores de mediadores lipídicos antiinflamatórios), bem como lisofosfolípidos, como lisofosfatidilcolina e ácido lisofosfatídico (MURAKAMI *et al.*, 2011). No referido estudo, foi usado o veneno de *Crotalus durissus terrificus* como controle na resposta inflamatória de *B. alternatus*, e este revelou maior expressão de IL-10, o que pode ser relacionado diretamente ao alto teor de PLA<sub>2</sub> do veneno (quase 50%) em comparação com *B. alternatus* (7,8%). Desta forma, a liberação de AA certamente implica a produção de eicosanóides inflamatórios, mas, além disso, outros ácidos graxos podem ser liberados no espaço extracelular e atuam como agonistas de receptores inflamatórios que desencadeiam um agravamento do processo inflamatório (ECHEVERRÍA *et al.*, 2018).

Outro estudo com *B. asper*, avaliou os efeitos inflamatórios evocados por variantes de PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas e inativas, e apesar de poucas diferenças na cinética de liberação, MT-II (Lys49-PLA<sub>2</sub>) e MT-III (Asp49-PLA<sub>2</sub>) foram capazes de estimular a produção e liberação de mediadores inflamatórios como IL-1 e IL-6, TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> no local da sua injeção, bem como em condições *in vitro* (ZULIANI *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2008). Esses efeitos estão de acordo com os relatados para veneno total. Além disso, a regulação ascendente da expressão de COX-2 ativa, mas não de COX-1, e a liberação de ácido araquidônico por MT-III foram demonstradas em macrófagos isolados. Assim, a COX-2 é a maior isoforma envolvida na síntese de prostaglandinas e tromboxano induzidas por PLA<sub>2</sub> de veneno (MOREIRA *et al.*, 2008). Mais uma vez, este estudo corrobora com os nossos achados.

Oliveira *et al.*, (2009), avaliaram a progressão do dano e inflamação do tecido local induzida por BnSP-7 (uma proteína cataliticamente inativa, com massa molecular em torno de 13,5-14 kDa e sua estrutura é essencialmente idêntica à estrutura de outras PLA<sub>2</sub> Lys49 miótóxicas), uma miotóxina isolada do veneno de *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* e observaram liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8), enquanto a IL-1 $\beta$  apresentou o maior nível. O uso de peptídeos sintéticos provou que a região C-terminal (115-129) é responsável pelas atividades tóxicas em alguns PLA<sub>2</sub> miotóxicas Lys49 (NÚÑEZ *et al.*, 2001; LOMONTE *et al.*, 2003). Esta região combina aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos

responsáveis pelo mecanismo de danos das membranas celulares. Os resíduos catiônicos podem interagir eletrostaticamente com grupos aniônicos de um local aceitante possivelmente fosfolípidios de membrana carregados negativamente (LOMONTE *et al.*, 2003), enquanto que os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, podem interagir e, possivelmente, penetrar a bicamada fosfolipídica, resultando na sua desestabilização (NÚÑEZ *et al.*, 2001). No entanto, o fato de um único peptídeo desempenhar todas as principais atividades tóxicas da molécula de origem não impede a existência de outros motivos que possam participar ou complementar a ação do local efector tóxico (LOMONTE *et al.*, 2003). Em contraste, os peptídeos C-terminais de algumas PLA<sub>2</sub> miotóxicas Asp49 não mostraram atividade de dano direto da membrana, sugerindo que o mecanismo tóxico exercido por essas proteínas, provavelmente envolve sua atividade catalítica como um passo importante, é diferente do utilizado pelo PLA<sub>2</sub> Lys49 miotóxica (NÚÑEZ *et al.*, 2001) fato que pode explicar as diferenças dos achados entre as PLA<sub>2</sub> em estudo.

Embora as manifestações sistêmicas e locais no envenenamento por serpente sejam consideradas graves, a relevância do estresse oxidativo nessa patologia é largamente negada. No entanto, durante a última década, os estudos forneceram evidências substanciais para a presença de estresse oxidativo persistente em vítimas de acidentes (ZENGIN *et al.*, 2014; SUNITHA *et al.*, 2015). É um fato bem estabelecido que as PLA<sub>2</sub> desencadeiam uma resposta inflamatória mediada pelo metabolismo do ácido araquidônico. As ROS geradas no devido curso desses eventos e pelo estímulo de leucócitos no local inflamado são mostrados para agravar a inflamação por mediadores inflamatórios reguladores da elevação através da sinalização redox (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Ambos os componentes enzimáticos e não enzimáticos do veneno desempenham um papel fundamental na alteração redox nas vítimas. Um estudo de Al Asmari *et al.* (2006) pela primeira vez ressaltou a importância do estresse oxidativo na citotoxicidade induzida por veneno de *Echis pyramidum*. A administração de veneno em camundongos, seguida da medida dos níveis de MDA em órgãos vitais em diferentes intervalos de tempo, revelou significativa peroxidação lipídica, que persistiu durante várias horas sugerindo distorção da homeostase redox.

Dessa forma, o nível de estresse oxidativo no tecido renal foi avaliado através da mensuração do MDA, Nitrito e GSH. Foi observado um aumento significativo do MDA, nitrito e GSH no grupo Lys-49. Enquanto que a Asp-49, diminuiu GSH, sem aumento de MDA, mas aumentou os níveis de Nitrito. Uma razão baixa de GSH/GSSG é uma manifestação bem estabelecida do processo de envelhecimento e de uma variedade de estados de doença humana,

incluindo a diabetes, insuficiência renal, pneumonia, malignidade, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e catarata (BALLATORI *et al.*, 2009).

Da Silva *et al.*, (2011) evidenciaram a ocorrência de estresse oxidativo e alteração no metabolismo hepático em ratos injetados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*. A injeção de veneno aumentou significativamente a atividade de peroxidação lipídica, catalase e glutationa-S-transferase no fígado. Vários estudos corroboram que uma estratégia antioxidante pode reduzir as complicações associadas a IRA. Barone *et al.*, (2011) demonstraram que a função renal alterada, bem como o estado redox em camundongos envenenados *Bothrops jararaca*, podem ser restaurados por tratamento com ácido lipóico e sinvastatina, enquanto o tratamento NAC efetivamente restaurou a relação GSSG / GSH tanto no córtex renal quanto na medula renal de camundongos envenenados. Um interessante estudo de Katkar *et al.*, (2014) mostraram que, além do veneno de víbora, um tratamento com antiveneno em si pode alterar a homeostase redox até certo ponto em animais envenenados e também não conseguiu bloquear danos causados por órgãos afetados. Um estudo de Mukhopadhyay *et al.*, (2008) relatou uma descoberta de que os pacientes com insuficiência renal aguda mediada por serpente (SARF) mostraram aumento do estresse oxidativo em comparação com os casos de insuficiência renal crônica normoglicêmica (IRC).

Strapazzon *et al.*, (2015) apresentaram aumento marcado e persistente de vários marcadores de estresse oxidativo em pacientes internados por envenenamento por *Bothrops*. Diante desse achado, Gois *et al.*, (2017) avaliaram o efeito protetor do Alopurinol (um inibidor de xantina oxidase) em modelo de IRA associado a *B. jararaca*, e mostraram uma redução do estresse oxidativo (aumento de GSH no soro e diminuição de nitrotirosina plasmática e renal) e melhorou a hemodinâmica renal e perfusão dos órgãos (melhorou o RFG, fluxo sanguíneo renal, resistência vascular renal e os níveis de lactato arterial).

Estudos citados, corroboram com nossos resultados, no qual observamos que as frações Lys-49 e Asp-49 causam desequilíbrio redox no rim. A Asp-49 apresentou diminuição dos níveis de GSH (considerada um dos agentes mais importantes na defesa antioxidante), aumento dos níveis de nitrito (estresse nitroativo tem papel importante no dano renal), mas os níveis de MDA não foram alterados. Esses achados sugerem um dano renal por diminuição da resposta antioxidante, evidenciada pela redução significativa de GSH. A Lys-49 apresentou níveis elevados de MDA, nitrito e GSH. Demonstrando, assim, uma potente alteração no equilíbrio redox, uma vez que GSH se mostra aumentado possivelmente como mecanismo de combate à

produção de EROS, resultado que corrobora com Zager *et al.* (1993), que relata uma possível proteção sobre túbulos renais pela privação de oxigênio. Assim, a partir das evidências acima, pode-se afirmar que o estresse oxidativo é um fenômeno altamente relevante na fisiopatologia do envenenamento e pode desempenhar um papel essencial na persistência de complicações.

As células tubulares epiteliais são os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). Marinho *et al.*, (2015), estudaram o efeito do veneno total de *B. pauloensis* em células MDCK, observando diminuição da viabilidade celular, e a morte celular foi predominantemente por apoptose e apoptose tardia, com ativação de caspases 3 e 7, colapso do potencial de membrana mitocondrial e produção de EROS. A fim de caracterizar melhor esse efeito, estudamos as frações Asp-49 e Lys-49 em células MDCK. Para análise da possível via de morte celular, realizamos as seguintes metodologias: testes de viabilidade, geração de EROS, medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), análise do efeito apoptótico e necrótico e do ciclo celular e expressão de proteínas (possivelmente envolvidas), assim como a análise morfológica celular.

Realizou-se o estudo do efeito das frações Lys-49 e Asp-49 em diferentes concentrações sobre células tubulares renais MDCK, que trata-se de uma linhagem de células com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO, SUEUR e CRUZ-HÖFLING, 2002). Utilizamos o ensaio de MTT e alamar blue, técnicas largamente usadas para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular (MOSMAN *et al.*, 1993). Observamos uma redução significativa da viabilidade celular, nas maiores concentrações estudadas. Resultado que corrobora com outros dados descritos na literatura. Nascimento *et al.*, (2007) avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus*, Collares buzato *et al.*, (2002) estudos com a *Bothrops moojeni* e Moraes *et al.*, 2013, com a *Bothrops leucurus*, todos em células MDCK, também verificaram redução da viabilidade celular. Nas menores concentrações, aparente capacidade de aumentar a viabilidade celular *in vitro*, resultado que corrobora com outros estudos (MENEZES *et al.*, 2012).

Diante do resultado obtido nos testes de viabilidade celular, nosso estudo prosseguiu utilizando a fração Asp-49, a fim de elucidar o possível mecanismo envolvido. Observamos uma discreta geração de EROS. A exposição à grande quantidade de EROs induz a morte celular por necrose, enquanto que o estresse oxidativo menos grave leva à apoptose. Com relação à apoptose, o aumento nos níveis de EROs leva à oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do  $\Delta\Psi_m$  (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

Alguns trabalhos sugerem que o potencial de membrana mitocondrial aumenta após indução de apoptose, iniciada por EROS, cálcio, Bax e ceramidas (LIU *et al.*, 2013). Assim, decidimos investigar se a fração Asp-49 seria capaz de sensibilizar as mitocôndrias. Verificamos que nessas condições experimentais (concentração/tempo) não houve colapso do potencial mitocondrial.

Os experimentos para o estudo de indução de apoptose e de necrose foram realizados com Kit para detecção de morte celular que permite a marcação das células com anexinaV-FITC, que caracteriza a apoptose e iodeto de propídeo (PI) que caracteriza necrose. Foi observado nesse ensaio o aparecimento de três populações celulares: células viáveis, não marcadas com PI ou anexina-FITC; células apoptóticas, detectadas pela ligação específica da anexina-FITC à fosfatidilserina translocada para o folheto externo da membrana plasmática; e células marcadas duplamente, consideradas células que passaram pelo processo de indução apoptótica e, por não terem sido fagocitados, são lisados e entram em necrose secundária (ou apoptose tardia).

Mora *et al.*, (2005), ao estudarem a citotoxicidade de PLA<sub>2</sub> miotóxicas sobre células linfoblastóides, verificaram que em concentrações elevadas da toxina, a morte ocorreu predominante por necrose, caracterizada por rompimento da membrana plasmática e tumefação mitocondrial. Em concentrações menores, a toxina induziu apoptose. Os autores concluíram que o tipo de resposta citotóxica predominante observada, ou seja, apoptose ou necrose, depende da concentração da toxina e, conseqüentemente, da extensão da lesão da membrana plasmática.

Estudos têm demonstrado que o início do processo necrótico pode depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer sequencialmente, onde numa concentração relativamente baixa do composto pode ocorrer colapso do potencial de membrana mitocondrial e posteriormente, usando uma maior concentração, ocorre rompimento de membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY *et al.*, 2006). No caso do nosso estudo, com Asp-49, o resultado não sugere uma marcação por apoptose ou necrose.

Os experimentos de citometria de fluxo, no qual o DNA nuclear das células foi corado por um fluorocromo específico (PI), permitindo a sua quantificação e refletindo a posição das células no ciclo celular, foram realizados, com o objetivo de avaliar os efeitos de Asp-49 no

processo de divisão celular. O ciclo celular é uma série de processos contínuos e repetitivos que ocorrem durante uma divisão celular normal. O ciclo é dividido em interfase e mitose. A interfase é ainda subdividida nas fases G0, G1, S e G2, nas quais ocorre a duplicação de DNA e a preparação de células para o próximo estágio. A mitose é caracterizada pelo próprio processo de divisão celular (DA SILVA *et al.*, 2015). A Asp-49 não foi capaz de induzir qualquer alteração significativa no ciclo celular e fase sub-G1 das células MDCK.

Um estudo com Lys-49 isolada de *B. pauloensis* mostrou que em células sadias de mama esta não causou morte celular, enquanto na linhagem de câncer de mama a fração foi capaz de causar morte destas. Resultado que corrobora com nossos achados, uma vez que não houve marcação de AN/PI.

Analisando as células MDCK, observamos alterações morfológicas importantes, como abundante sobreposição celular, células desnudas de moderada anisocariose, perda de adesão, características que se tornam mais marcantes a medida que a concentração aumenta, revelando que algum evento está em curso no tratamento/tempo de experimentação. Necessitamos de técnicas específicas de coloração para descrever com mais precisão as alterações celulares.

O tratamento de células HEK-293 com as frações demonstrou um pequeno potencial tóxico às células, uma vez que 24h de tratamento ocasionou uma discreta indução de morte celular (sem aparente rompimento aparente da membrana, com perda do formato característico, perda de aderência, presença de agregado celular com citoplasma granuloso, núcleos picnóticos, tumefação celular) mais pronunciada na fração Asp-49. As imagens dos tratamentos nos revela essa diferença.

O  $\text{Ca}^{2+}$  é o mais versátil dos mensageiros intracelulares, sabe-se que a homeostase deste íon é de fundamental importância para a regulação das diversas atividades fisiológicas da célula, bem como para a sobrevivência celular. Pesquisas recentes mostram que a sobrecarga celular de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou alteração da compartimentalização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pode induzir citotoxicidade ou acionar a morte celular por apoptose ou necrose (PATERGNANI *et al.*, 2015). O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  ocorre não somente pelo influxo do íon a partir do meio extracelular, mas também pelo esvaziamento de estoques intracelulares, tais como retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (SMAILI *et al.*, 2008). A saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE se dá principalmente através dos receptores de IP3 (IP3Rs) e dos receptores de rianodina (RyRs), ambos localizados na membrana desta organela (BERRIDGE; BOOTMAN e RODERICK, 2003). Além disso, o ácido araquidônico que atua como um mensageiro lipofílico e é o precursor da síntese dos

eicosanóides, é capaz de modular a atividade de vários canais de íons e além disso, ele e/ou seus metabólitos podem estar envolvidos na regulação da homeostase do cálcio intracelular (AJMAT *et al.*, 2013).

Strigow & Erlich (1997) investigaram a influência de ácido araquidônico e alguns dos eicosanóides nas propriedades dos canais IP3R e RyR em microsomas de cerebelo canino. Eles mostraram que os IP3Rs e os RyRs são regulados de maneiras diferentes pelo ácido araquidônico e seu produto leucotrieno B4 (IP3Rs são inibidos pelo ácido araquidônico, enquanto RyRs são ativado pelo ácido araquidônico através do seu metabolito leucotrieno B4). Villalobos *et al.*, 2007, estudaram a citotoxicidade induzida por uma PLA<sub>2</sub> Lys49 da serpente *Bothrops asper* na linha celular do músculo esquelético murino (C2C12). Nesse estudo, as células foram tratadas com o agente quelante EGTA (extracelular) e o BAPTA-AM (citossólico). O EGTA causou aumento da citotoxicidade, resultou na eliminação de Ca<sup>2+</sup> extracelular, apoiando assim um papel importante do influxo de Ca<sup>2+</sup> neste evento patológico e sugerindo uma regra protetora de membrana. Resultado interessante neste caso porque o aumento da citotoxicidade por EGTA não se deve a uma dependência de Ca<sup>2+</sup> da ação de Lys-49 (não dependente de cálcio). O tratamento de células com BAPTA-AM não modificou a citotoxicidade.

Mora *et al.*, 2006, estudaram um homólogo de fosfolipase A2 Lys49 da serpente *Bothrops asper* em linfoblastoideo. As células tratadas com alta concentração induziram necrose e menor concentração induzida apoptose ou uma resposta proliferativa. As células foram tratadas com o agente quelante EGTA ou com vermelho de rutênio (um inibidor do transporte de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial). O tratamento com vermelho de rutênio e BAPTA-AM inibiu a apoptose. O tratamento com inibidores do retículo endoplasmático Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) e pelo bloqueio do receptor de rianodina inibiu a resposta à proliferação.

Apesar de muitos estudos, como os citados acima, abordarem a importância da sinalização do Ca<sup>2+</sup> como uma via de atuação de venenos em células, as pesquisas sobre venenos de serpentes não exploram o papel da mobilização intra-extracelular de cálcio em seu efeito de nefrotoxicidade. Morais *et al.* (2015), estudaram a LAAO do veneno de *Bohrops leucurus* na linha de células MDCK e HK2 (ambas células tubulares epiteliais). Eles avaliaram os níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> usando Fura-2AM evidenciando o aumento de Ca<sup>2+</sup> citossólico induzido por LAAO. Em células tratadas com thapsigargina, a mobilização de Ca<sup>2+</sup> citossólico diminuiu devido à inibição de SERCA. Quando as células foram tratadas com diferentes

inibidores do canal  $\text{Ca}^{2+}$ , como a ryanodina (RyR) e 2-APB (IP3R), diminuíram os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Outro aspecto ainda não explorado é o envolvimento da autofagia.  $\text{Ca}^{2+}$  implica em apoptose e autofagia. A diminuição de  $\text{Ca}^{2+}$  em ER pode induzir autofagia devido à diminuição da transferência de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial basal ou suprimir a autofagia devido ao aumento diminuído do citosol  $\text{Ca}^{2+}$ . No presente trabalho, ao investigarmos o efeito das PLA2s Lys-49 e Asp-49 sobre a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , a fim de investigar seu mecanismo de ação, porém não encontramos evidências da participação de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na ação das frações.

Considerando um estudo realizado por Mora-Obando *et al.* (2014), onde apontou a importância do sinergismo das frações (Asp-49 e Lys-49 do veneno de *B. asper*), nossos resultados são compatíveis com tal hipótese. De forma mais geral, nossas descobertas enfatizam a necessidade de estudar a ação dos venenos de serpentes de uma perspectiva holística, ou seja, analisando não só a ação de toxinas purificadas, mas também a interação de diferentes componentes no contexto da complexidade da envenenamento.

***CONCLUSÕES***

## 7. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos pela perfusão do órgão isolado indicam alteração de função renal, sugerindo envolvimento de efeito inflamatório e oxidativo dependente da liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) com ativação neutrofílica, com alterações na arquitetura renal, principalmente a nível tubular. *In vitro* (MDCK) observamos produção de EROs, mas sem efeito sobre o  $\Delta\Psi_m$ , sem indícios de indução de morte celular por apoptose/necrose, sem alteração do ciclo celular ou liberação de cálcio (HEK-293), com alterações na morfologia celular característica.

***REFERÊNCIAS***

## 7. REFERÊNCIAS

- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon.**, v.40, n.4, p.335-393, 2002.
- AJMAT, M.T.; BONILLA, F.; HERMOSILLA, P.C.; ZELARAYAN, L.; BUHLER, M.I. Role of phospholipase A2 pathway in regulating activation of *Bufo arenarum* oocytes. **Zygote**, v.21, n.3, p.214-20, 2013.
- AL ASMARI, A.; AL MOUTAERY, K.; MANTHARI, R.A.; KHAN, H.A. Time-course of lipid peroxidation in different organs of mice treated with *Echis pyramidum* snake venom. **J Biochem Mol Toxicol**, v.20, n.2, p.93-5, 2006.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical pitvipers. **Contrib Harv Inst Biol Med**, v.2, p. 1-64, 1925.
- ARAÚJO, A.L.; DE SOUZA, A.O.; DA CRUZ-HOFLING, M.A.; FLORES, C.A.; BOM, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v.38, n.2, p.209-21, 2000.
- AZEVEDO, F.V.P.V.; LOPES, D.S.; GIMENES, S.N.C.; ACHE, D.C.; VECCHI, L.; ALVES, P.T.; GUIMARÃES, D.O.; RODRIGUES, R.S.; GOULART, L.R.; RODRIGUES, V.M.; YONEYAMA, K.A.G. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82, p.671-677, 2016.
- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.
- BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.42, n.5, p.515-23, 2003.
- BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. v.40, n°10, p.1427-35, 2002.

- BARBOSA, P.S.F.; MARTINS, A.M.C.; ALVES, R.S.; AMORA, D.N.; MARTINS, R.D.; TOYAMA, M.H.; HAVT, A.; NASCIMENTO, N.R.F.; ROCHA, V.L.C.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The role of indomethacin and tezasetan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. **Toxicon**, v.47, n.8, p.831-837, 2006.
- BARBOSA, P.S.F.; MARTINS, A.M.C.; HAVT, A.; TOYAMA, D.O.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; FERREIRA, D.P.P.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v.46, n.4, p.376-386, 2005.
- BARONE, J.M.; ALPONTI, R.F.; FREZZATTI, R.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P.F. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. **Toxicon**, v.57, n.1, p.148-56, 2011.
- BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWISKI, A. A Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops spp.* and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**. v.1, p.11-22, 1995.
- BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p.403-414, 2006.
- BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2011.
- BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D., RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, p. 517–529, 2003.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BOERSMA, H.H.; KIETSELAER, B.L.; STOLK, L.M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G.A.; REUTELINGSPERGER, C.P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v.46, n.12, p.2035-50, 2005.
- BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) *Snakes a natural history*. **New York: Sterling Publishing Co.**, p.194-209, 1997.
- BORGES, M. H., SOARES, A .M., RODRIGUES, V. M., ANDRILAO-ESCARSO, S. H., DINIZ, H., HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIERREZ, J. M., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2000.

- BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DURIGON, A.M.; VALLIN, A.C.C.; TOYAMA, M.H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S. RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 617-624, 2003.
- BRADLEY, O.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v.78, n.3, p.206-9. 1982.
- BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno de *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- BRASIL, 2012. **Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –SINAN Net**. Acesso em 27/09/2017.
- BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **ExpMolPathol**.v. 88, n. 3, p. 424-32, 2010.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford; Blackwell, 1992.
- CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2008.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W..A. The venomous reptiles of the western hemisphere. Comstock (Cornell University Press), Ithaca, NY , p962, 2004.
- CASTANHEIRA, L.E., NUNES, D.C.O., CARDOSO, T.M., SANTOS, P.S., GOULART, L.R., RODRIGUES, R.S., RICHARDSON, M. BORGES, M.H., YONEYAMA,K.A.G., RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **I.J.Biol. Macromolecules**, v.54,p.57-64, 2013.
- CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. **J. Nat. Toxins** v. 20, n. 5, p. 574-577. 1999.
- CHAVE, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERRES, J. M. Role of TNF -  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p.171-178, 2005.

- CHIPPAUX, J.P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 23, 2017.
- CHIU, H.W.; SU, Y.C.; HONG, J.R. Betanodavirus B2 protein triggers apoptosis and necroptosis in lung cancer cells that suppresses autophagy. **Oncotarget**, v.8,n.55, p.94129-94141, 2017.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MONTECUCCO, C. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.32, p.14140-5, 2010.
- CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DASILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v.39, n.10, p.1567-73, 2001.
- COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103–121, 1977.
- COLLARES-BUZATO, C.B.; LE SUEUR, L.P.; CRUZ- HOFLING. M.A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, p. 124–132, 2002.
- COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and Functional Characterization of a Thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725-735, 2009.
- CRUZ-HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ÁBREU, A. C. F. Histopathological changes in avain kidney caused by *Bothrops insularis*(jararaca ilhóa) venom and phospholipase A2-containing fraction. **Histology and Histopathology**, v.16, p.185-195, 2001.
- CRUZ, A.H., GARCIA-JIMENEZ, S., MENDONZA, R.Z., PETRICEVICH, V.L. Proandcanti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**. 2008.
- DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B.

Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (Lm TX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v.49, p.678-692, 2007.

DA SILVA, J.G.; SOLEY, S.B.; GRIS, V.; PIRES, R.A.A.; CADEIRA, S.M.; HERMOSO, A.P.; BRACHT, A.; DALSENTER, P.R.; ACCO, A. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. **J Biochem Mol Toxicol**, v.25, n.3, p.195-203, 2011.

DA SILVA, C.P.; COSTA, T.R.; PAIVA, R.M.A.; CINTRA, A.C.O.; MENALDO, D.L.; ANTUNES, L.M.G.; SAMPAIO, S.V. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacuçu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **J Venom Animal Toxins Includ Trop Dis**, v.21, n.44, 2015.

DE LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; ZINGALI, R.B.; ROCHAT, H. Animal toxins: State of the art-Perspectives in health and biotechnology. **J Venom Animal Toxins Includ Trop Dis**, v.15, n.3, p.585-586, 2009.

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, n.1, p.151-156, 2008.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, v.269, n.18, p.13057-60, 1994.

DU, X.Y. e CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

ELLIOTT, R.J.; PORTER, A.G. A rapid cadmium reduction method for determination of nitrate in bacon and curing brines. *Analyst*, v.96, p.522-527, 1971.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495-516, 2007.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELONGSPERGER, C.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

ECHEVERRÍA, S.; LEIGUEZ, E.; GUIJAS, C.; DO NASCIMENTO, N.G.; ACOSTA, O.; TEIXEIRA, C.; LEIVA, L.C.; RODRÍGUEZ, J.P. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. **Chem Biol Interact**, v.281, p.24-31, 2018.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A; NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1061-1070, 2010.

- FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.
- FERNANDES, C.A.; BORGES, R.J.; LOMONTE, B.; FONTES, M.R. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta**, v.1844, n. 12, p.2265-76, 2014.
- FERNÁNDEZ, A.F. Autophagy and Proteases: Basic Study of the Autophagic Flux by Western Blot. **Proteases and Cancer**, v.1731, p.77-81, 2018.
- FERREIRA, L.A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; RABERMEUL, G. Isolation : analysis and properties of three bradykinin- potentiating peptides ( BPP-II, BPP-III, and BPP-V, from *Bothrops neuwied* venom. **J Protein chem**, v. 17, p. 285-289, 1998.
- FERREIRA, L.A.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M.B.C.; PREZOTO, B.C.; ANDREONI, A.S.S.; ZERNIK, R.; HABERMEHL, C. A new bradykinin- potentiating peptide ( peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 30, p. 33-40, 1992.
- FERREIRA, S.H.; BARTELD, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n.13, p. 2583- 2595, 1970.
- FERREIRA, S.H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v.21, n.6, p.347–349, 1965.
- FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci**, v. 33, n. 5, p. 431-436, 1983.
- FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2, p. 191-197, 1998.
- FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmac**, v.20, p.1549-1556, 1971.
- GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., MILZANI, A.; ROSSI, R. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mech. Ageing Dev.** v. 132, p. 141–148, 2011.
- GOIS, P.H.F.; MARTINES, M.S.; FERREIRA, D.; VOLPINI, R.; CANALE, D.; MALAQUE, C.; CRAJOINAS, R.; GIRARDI, A.C.C.; SHIMIZU, M.H.M.; SEGURO, A.C. Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation. **Plos Negl Trop Dis**, v.11, n.11, 2017.

- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**. v.48, n.1, p.44-54, 2006.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- GUTIÉRREZ, J.M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes em América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Bol. Malariol. Salud Amb**, v. 51, p. 1–16, 2011.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J.; HABIB, A.G.; HARRISON, R.A.; WILLIAMS, D.J.; WARREL, D.A. Snakebite envenoming. **Nature**, v.3, 2017.
- HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006
- HATAKEYAMA, D. M.; MORAIS-ZANI, K.; SERINO-SILVA, C.; GREGO, F.; SANTÁNNA, S.S.; FERNANDES, W.; ANIZ, A.E.A.; TORQUATO, R.J.S.; TANAKA, A.S.; CALVETE, J.J.; TANAKA- AZEVEDO, A.M. Examination of biochemical and biological activities of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae; Wied-Neuwied 1824) snake venom after up to 54 years of storage. **Toxicon**, v.141, p.34-42, 2018.
- HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.1, p.130-41, 2005.
- HAVT, F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF. **Toxicon**, v.39, n.12, p.1841-1846, 2001.
- HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A<sub>2</sub> at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v..4, p.293-306, 1979.
- HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of câncer cells: A multiparameter approach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-344, 2005.

- HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. Princípios integrados de zoologia. **Guanabara Koogan**, cap. 28, n.11, p. 540-541, 2004.
- KAMIGUT, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; XUXEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, n.6, p. 1996.
- KALTAR, G.D.; SUNDARAM, M.S.; HEMSHEKHAR, M.; SHARMA, D.R.; SANTHOSH, M.S.; SUNITHA, K.; RANGAPPA, K.S.; GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. Melatonin alleviates Echis carinatus venom-induced toxicities by modulating inflammatory mediators and oxidative stress. **J Pineal Res**, v.56, n.3, p.295-312, 2014.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic boiological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, p.239-57, 1972
- KLIONSKY, D.J.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v.8, n.4, p.445-544, 2012.
- KIL, H. N.; EOM, S. Y.; PARK, J. D.; KAWAMOTO, T.; KIM, Y. D.; KIM, H. A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric Acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. **Toxicol Res**. v. 30, n. 1, p. 7-11, 2014.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.
- KROEMER, G., KEPP, O. e GALLUZZI, L. Mitochondria: master regulators of danger signaling. **Nature**, v.13,p.780-789, 2012.
- KRÓL, A., OSTROWSKI, M. Enzymatic and non-enzymatic functions of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **Postepy Biochem.**, v.63, n. 3, p.198-204, 2017.
- KUMAR, A.P.; PIEDRAFITA, F.J.; REYNOLDS, W.F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. **J Biol Chem**, v.279, n.9, p.8300-15, 2004.
- LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J. P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A<sub>2</sub> from snake 86 venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A<sub>2</sub> and distinct signaling pathways. **J Leukoc Biol**. v. 90, n. 1, p. 155-166, 2011.
- LIU, G.; WANG, T.; WANG, T.; SONG, J.; ZHOU, Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. **Biomed Rep**, v.1, n.6, p.861-867, 2013.

- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. **Toxicon**, v.42, p.307-312, 2003.
- LOOS, B.; TOIT, A.D.; HOFMEYR, J.H. Definining and measuring autophagosome flux-concept and reality. **Autophagy**, v.10, n.11, p.2067-2096, 2014.
- LOPES, D.S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G.S.; LIMA, I.C.; BALDO, C.; FOX, J.W.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CLISSA, P.B. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v.60, n.6, p.1072-84, 2012.
- MARINHO, A.D.; MORAIS, I.C.; LIMA, B.D.; JORGE, R.J.; MENEZES, R.R.; MELLO, C.P.; PEREIRA, G.J.; SILVEIRA, J.A.; TOYAMA, M.H.; ÓRZAES, M.; MARTINS, A.M.; MONTEIRO, H.S. Bothropoides pauloensis venom effects on isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelial cells. **Toxicon**, v.108, p.126-33, 2015.
- MARQUES-PORTO, R.; LEBRUM, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in *Bothrops jararaca* venom: **The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. Comparative Biochemistry and Physiology Part C** v.147, p424-433, 2008.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v1477, p146-156, 2000.
- MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, cap. 4, p. 33, 2003.
- MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO H. D.; FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STARUCH, M. A.; FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N, CALILELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; SILVA A. J. M.; COSTA, P. R. R. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl<sub>4</sub> intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochem Med.** v. 23, n. 3, p. 302-11, 1980.
- MOECKEL, G.W. Pathologic Perspectives on Acute Tubular Injury Assessment in the Kidney Biopsy. **Semin Nephrol**, v.38, n.1, p.21-30, 2018.

MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Subunit dissociation, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin like protein from snake venom. **Biochemistry**, v.42, n.2, p.509-515, 2003.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da Ciclooxygenase no rim perfundido de rato**. 1990. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, 1990.

MORAIS, I.C.O. **Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus***. 2015. 96 f. Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MORAIS, I. C.; TORRES, A. F.; PEREIRA, G. J.; PEREIRA, T. P.; BEZERRA DE MENEZES, R. R. P. P.; MELO, C. P.; COELHO, J. A. R.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. M. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**. v. 61, p. 38-46, 2013.

MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 47, p. 75–86, 2005.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PloS One**, v.9, n.10, 2014.

Mora R, Maldonado A, Valverde B, Gutierrez JM. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon** (47) 75-86, 2006.

MOREIRA,V.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; ZAMUNÉR, S.R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C.F.P. Secretory phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E(2) and D(2) and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v.52, p. 428-439, 2008.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; AMARAL, R.B.; ZAMUNÉR, S.R.; TEIXEIRA, C.F. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.80, n.2-3, p.107-14, 2009.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; LOMONTE, B.; PRUGATO, E.; TEIXEIRA, C. A phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in

culture: Expression of cyclooxygenase-2 and PGE2 biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, p. 288–296, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.

MOUREAU, M.E.; GARBACHI, N.; MOLINARO, G. ; BROWN, N.J. ; MARCEAU, F. ; ADAM, A. The kalikrein- Kinin system : Current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MUKHOPADHYAY, S.; GHOSH, A.; KAR, M. Methylglyoxal increase in uremia with special reference to snakebite-mediated acute renal failure. **Clin Chim Acta**, v.391, n.1-2, p.13-7, 2008.

MURAKAMI, T.; KAMIKADO, N.; FUJIMOTO, R.; HAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, H.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; ODA-UEDA, N. A Lys49 phospholipase A2 from *Protobothrops flavoviridis* venom induces caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma-membrane rupture in human leukemia cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.75, n.5, p.864-870, 2011.

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSCOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol**, v. 85, p. 591–605 , NOGUEIRA, C. **Call Photos**, 2003. Disponível em: [http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0803+0687](http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0803+0687). Acesso em 30 de agosto de 2017.

NORÕES, T. B. S. **Efeitos renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops atrox* e a produção do óxido nítrico**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.; SILVA, T.G.; AGUIAR, J.S.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.; GUARNIERI, M.C.; COELHO, L.C.; CORREIA, MT. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v.59, n.7-8, p.667-71, 2012.

NÚÑEZ, E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v.39, p.1587-1594, 2001.

OLIVEIRA , C. F.; LOPES D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; HAMAGUCHI A, D. E ALCÂNTARA, T. M; CLISSA P. B; RODRIGUES V. M. Insights of

- local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.
- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 552-565 2003.
- OSBORN, J. L.; KOPP, U. C.; THAMES, M. D.; DIBONA, G. F. Interactions among renal nerves, prostaglandins, and renal arterial pressure in the regulation of renin release. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 706-713, 1984.
- PAIVA, R.M.A.; FIGUEIREDO, R. F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; BIANCHI, M. L.; P; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; PIETRO, R. C. L. R.; MARTINS, C. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 7, p. 1-7, 2011.
- PATERGNANI, S.; MISSIROLI, S.; MARCHI, S.; GIORGI, C. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. **Front Oncol**, v.25, p.173, 2015.
- PINHO, F. M. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v.22, n.3, p.162-168, 2000.
- PIROTZKY, E.; BIDAULT, J.; BURTIN, C.; GLUBERY, M. C.; BENVISTE, J. Release of platelet- activating factor, slow-reacting substance vasoactives , amines from isolated rat kidney. **Kidney int**, v. 25, p. 404-410, 1984.
- QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of brasilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p.842-851, 2008.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflamation. **Toxicon**, v.44, p1-17, 2004.
- RANA, A.; SATHIANARA, P.; LIEBERTHAL, W. Role of apoptosis on renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. **Apoptosis**, v. 6, p. 83-102, 2001.
- RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A(2) homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein Journal**, v. 27, n. 6, p. 355-362, 2008.
- RATLIFF, B.B.; ABDULMAHDI, W.; PAWAR, R.; WOLIN, M.S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxid Redox Signal**, v.25, n.3, p.119-46, 2016

- REID, H. A. Cobra-bites. **Br. Med. J.**, v.2, p.540-561, 1964.
- RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES-DE-CAMPOS, V. A. F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo: avaliação de 43 casos,1988/93. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.44, n.4, p.312-318, 1998.
- RÓLON, M.; VEJA, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, v.99, n.2, p.103-7, 2006.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.** V.156, p. 261–273, 1949.
- RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C ; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic Variations In The Composition Of Myotoxins From *Bothrops neuwiedi* Snake Venoms: Biochemical Characterization And Biological Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.
- RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTANETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.
- RODRIGUES, R.S., BOLDRINI-FRANÇA, J., FONSECA, F.P.P., de la TORRE, P., HENRIQUE-SILVA, F., SANZ, L., CALVETE, J. J., RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J. Proteomics**. V. 75, n. 9, p. 2707-20, 2012.
- ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.
- ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U 937 ( a human monocytic cell line). **Pharmacological Research**, v. 53, p. 293 – 302 2006.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.115, n.7, p.1265-75, 1995.

- SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CASTRO, S. C. B.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **J. Q. Med.**, v.95, p.551-559, 2011.
- SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBES Lett.**, v.477, p199-202, 2000.
- SANTHOSH, M.S., SUNDARAM, M.S., SUNITHA, K., KEMPARAJU, K., GIRISH, K.S. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflamm. Res.** v. 62, p.721–731, 2013.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T., Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.
- SINAN, 2016. Boletim epidemiológico: acidentes por animais peçonhentos. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/boletim\\_ac\\_animais\\_peconhentos\\_10\\_06\\_2016%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/boletim_ac_animais_peconhentos_10_06_2016%20(1).pdf). Acesso em 5 de janeiro de 2018.
- SITIPRIJA, V.; CHAIYABUR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins.**, v.8, p.271-277, 1999.
- SITIPRIJA, V.; SITIPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v.60, p.943-953, 2012.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, n1-2, p.1-19, 2000.
- SMALI, S.S.; ROSENSTOCK, T.R.; HSU, Y.T. Evaluation of some cell death features by real time real space microscopy. **Methods Enzymol**, v.442, p.27-50, 2008.
- SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p.201-209, 2000.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian reptiles- List of espécies disponível em: <<http://WWW.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 18.08.2017.

- SOUSA, D. F. **Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi***. 2010. 151 f. Dissertação (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- STRAPAZZON, J.O.; PARISOTTO, E.B.; MORATELLI, A.M.; GARLET, T.R.; ZIMERMANN, I.R. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. *J Appl Biomed*, v.13, p.161–167, 2015.
- STRIGGOW, F.; EHRLICH, B.E. Regulation of intracellular calcium release channel function by arachidonic acid and leukotriene B4. ***Biochem Biophys Res Commun***, v.237, n.2, p.413-8, 1997.
- SUNITHA, K.; HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R.M.; SANTHOSH, S.; SUNDARAM, M.S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K.S. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. ***Toxicon***, v.98, p.89-97, 2015.
- THAMAREE, S., SITPRIJA, V., LEEPIPATPAIBOON, S. Mediators and renal hemodynamics in Russell's viper envenomation. ***J. Nat. Toxins*** Vv.9, p. 43–48, 2000.
- TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. ***Toxicon***, v.42, n.7, p.801-808, 2003.
- TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; DE CORDOVA, C.A.; CHARÃO, C.C.; DE LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. ***J Pineal Res***, v.35, n.4, p.262-8, 2003.
- TEIXEIRA, C., CURY, Y., MOREIRA, V., PICOLO, G., CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. ***Toxicon***, v.54, p.67-76, 2009.
- TONELLO, F.; SIMONATO, M.; AITA, A.; PIZZO, P.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. A Lys49-PLA2 myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. ***Cell Death Dis.*** Jul 5;3:e343, 2012.
- TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. ***Agents Actions***, v.26, n.3-4, p.292-300, 1989.
- TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. ***Plenum Press***, p37-62, 1996.
- VIIALLARD, J.F.; LACOMBE, F.; BELLOC, F.; PELLEGRIN, J.L.; REIFFERS, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. ***Cancer Radiother***, v.5, n.2, p.109-29, 2001.

- Villalobos JC, Mora R, Lomonte B, Gutierrez JM, Angulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicology in Vitro** (21) 1382–1389, 2007.
- WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1995.
- WANG, P.; SHAO, B.Z.; DENG, Z.; CHEN, S.; YUE, Z.; MIAO, C.Y. Autophagy in ischemic stroke. **Progress in neurobiology**, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *WHO* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/> (2017).
- ZAGER, R.A.; SCHIMPF, B.A.; GMUR, D.J.; BURKE, T.J. Phospholipase A2 activity can protect renal tubules from oxygen deprivation injury. **Proc Natl Acad Sci**, v.90, p.8297-8301, 1993.
- ZEGIN, S.; AL, B.; YARBIL, P.; GUZEL, R.; ORKMEZ, M.; YILDIRIM, C. An assessment of oxidant/antioxidant status in patients with snake envenomation. *Emerg Med J*, v.31, p.48-52, 2014.
- ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News. Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.
- ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, J.M.; GUTIÉRRES, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v.45, p. 335-346, 2005.



**Tabela 1:** Parâmetros vasculares da perfusão de rim isolado de ratos na presença de Lys-49 e Asp-49 (3µg/mL).

Tempo	PP (mmHg)			RVR (mmHg.mL/g/min.)		
	Controle	Asp-49	Lys-49	Controle	Asp-49	Lys-49
30	111.6 ± 3.2	115.7 ± 2.7	113.8 ± 2.9	5.1 ± 0.5	4.5 ± 0.3	6.0 ± 0.6#
60	111.1 ± 3.8	108.5 ± 2.6	130.2 ± 3.7*#	5.4 ± 0.5	4.7 ± 0.3	6.1 ± 0.5#
90	111.1 ± 4.2	101.0 ± 2.6*	132.6 ± 7.6*#	5.4 ± 0.6	4.4 ± 0.3*	6.3 ± 0.9#
120	112.0 ± 3.1	96.6 ± 2.0 *	142.2 ± 10.5*#	5.2 ± 0.5	4.3 ± 0.3	6.0 ± 0.9#

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.).

**Tabela 2:** Parâmetros funcionais da perfusão de rim isolado de ratos na presença de Lys-49 e Asp-49 (3µg/mL).

Tempo	FU (mL.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )			RFG (mL.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )		
	Controle	Asp-49	Lys-49	Controle	Asp-49	Lys-49
30	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	1.02 ± 0.21	0.94 ± 0.18	1.04 ± 0.4
60	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.02 *	0.20 ± 0.01*#	0.98 ± 0.16	0.44 ± 0.08 *	0.50 ± 0.15*
90	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.01*#	1.01 ± 0.20	0.55 ± 0.15*	0.44 ± 0.11*
120	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.01*#	0.99 ± 0.19	0.34 ± 0.08*	0.45 ± 0.11*

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.).

**Tabela 3:** Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio e cloreto da perfusão de rim isolado de ratos na presença de Lys-49 e Asp-49 (3µg/mL).

Tempo	% TNa <sup>+</sup>			% TCl <sup>-</sup>		
	Controle	Asp-49	Lys-49	Controle	Asp-49	Lys-49
30	80.66±2.66	77.79± 0.70	75.72±3.07	78.8±1.3	85.15± 1.50	82.69± 3.38
60	80.52±2.82	65.32± 3.30*	52.70±6.07*#	80.2± 2.9	70.29± 3.28*	57.88± 7.31*#
90	80.52±2.61	67.65± 2.48*	46.04±6.45*#	81.3± 1.2	74.61±2.84	57.35± 6.11*#
120	81.15±1.31	63.55± 4.40*	55.86±4.33*#	80.5± 2.5	70.84±4.45*	55.49± 5.97*#

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.).

**Tabela 4:** Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de potássio da perfusão de rim isolado de ratos na presença de Lys-49 e Asp-49 (3µg/mL).

Tempo	% TK <sup>+</sup>		
	Controle	Asp-49	Lys-49
30	72.14±7.11	76.93± 2.47	70.80±5.92
60	73.66±5.86	52.49± 3.57*	65.01±6.09*#
90	73.15±7.98	53.71± 3.97*	35.72±2.73*#
120	74.46±8.33	44.55± 4.10*	49.43±6.65*

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.).

**Tabela 5:** Dosagens de MDA e GSH.

<b>Grupos</b>	<b>MDA (<math>\mu\text{g/g}</math> tecido)</b>	<b>GSH (<math>\text{mcg/g}</math> tecido)</b>
<b>Controle</b>	$6,88 \pm 1,07$	$1034 \pm 80,21$
<b>Asp-49</b>	$5,89 \pm 0,81$	$690,4 \pm 65,21^*$
<b>Lys-49</b>	$16,98 \pm 2,53^{*}\#$	$1314 \pm 37,34^{*}\#$

Os dados estão expressos como média padrão  $\pm$  EPM.

**Tabela 6:** Dosagens de Nitrito e MPO.

<b>Grupos</b>	<b>Nitrito (<math>\text{nM/g}</math> tecido)</b>	<b>MPO (MPO U/g tecido)</b>
<b>Controle</b>	$188,9 \pm 5,62$	$0,7522 \pm 0,2420$
<b>Asp-49</b>	$301,9 \pm 15,51^*$	$3,133 \pm 0,6369^*$
<b>Lys-49</b>	$354,3 \pm 39,9^*$	$6,863 \pm 0,8346^{*}\#$

Os dados estão expressos como média padrão  $\pm$  EPM.

**Tabela 7:** Dosagem de citocinas.

<b>Grupos</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>(<math>\text{pg/mg}</math> tecido)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b> <b>(<math>\text{pg/mg}</math> tecido)</b>	<b>IL-10</b> <b>(<math>\text{pg/mg}</math> tecido)</b>
<b>Controle</b>	$1,017 \pm 0,122$	$1,373 \pm 0,117$	$1,594 \pm 0,182$

<b>Asp-49</b>	2,252 ± 0,481*	2,456 ± 0,473	4,153 ± 0,261*
<b>Lys-49</b>	6,593 ± 0,656*#	5,405 ± 0,266*#	5,867 ± 0,609*

Os dados estão expressos como média padrão ± EPM.



**FeSBE**  
FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES  
DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL

## X Reunião Regional Salvador - BA



### Certificamos que

O trabalho IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR ENVOLVIDAS NA CITOTOXICIDADE RENAL POR VENENO DA SERPENTE *Bothropoides pauloensis* de autoria Marinho, A. D. , Morais, I. C. O. , Jorge, R. J. B. , Menezes, R. R. P. P. B. , Sousa, P. C. P. , Silveira, J. A. M. , Lima, D. B. , Martins, A. M. C. , Monteiro, H. S. A. - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – UFC, foi apresentado sob a forma de Comunicação Oral no Módulo Temático Produtos naturais como fontes de novos medicamentos na

X Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada de 04 a 06 de junho de 2015, no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, Salvador - BA.

  
Comissão Organizadora





## X Reunião Regional Salvador - BA



### Certificamos que

O trabalho 05.041 intitulado IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR ENVOLVIDAS NA CITOTOXICIDADE RENAL POR VENENO DA SERPENTE BOTHROPOIDES PAULOENSIS. Marinho AD, Morais ICO, Jorge RJB, Menezes RRPPB, Sousa PCP, Silveira JAM, Lima DB, Martins AMC, Monteiro HSA - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - UFC, foi contemplado com Menção Honrosa pela brilhante apresentação

X Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada de 04 a 06 de junho de 2015, no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, Salvador - BA.

  
Comissão Organizadora





ELSEVIER

Toxicon

Volume 108, 15 December 2015, Pages 126-133



## *Bothropoides pauloensis* venom effects on isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelial cells

Aline D. Marino <sup>a</sup>  , Isabel C.O. Morais <sup>a</sup>, Dânya B. Lima <sup>b</sup>, Antônio R.C. Jorge <sup>a</sup>, Roberta J.B. Jorge <sup>a</sup>, Ramon R.P.B. Menezes <sup>a</sup>, Clarissa P. Mello <sup>b</sup>, Gustavo J.S. Pereira <sup>c</sup>, João A.M. Silveira <sup>a</sup>, Marcos H. Toyama <sup>d</sup>, Mar Orzáez <sup>e</sup>, Alice M.C. Martins <sup>b</sup>, Helena S.A. Monteiro <sup>a</sup>

Certificate of Recognition

conferenceseries.com

Conference Series LLC

2360 Corporate Circle, Suite 400 Henderson, NV 89074-7722, USA  
Ph: +1-888-843-8169, Fax: +1-650-618-1417, Toll free: +1-800-216-6499

Conference Series LLC and the Editors of Journal of Clinical & Experimental  
Pharmacology, Biochemistry & Pharmacology: Open Access and Cardiovascular  
Pharmacology: Open Access wish to thank

Prof/Dr. **Aline Diogo Marinho**

Federal University of Ceara, Brazil

for her phenomenal and worthy oral presentation  
at the "3<sup>rd</sup> World Congress on Pharmacology"  
held during August 08-10, 2016 in Birmingham, UK

CEJ van Rensburg (Connie Medlen)  
University of Pretoria, South Africa

Pharmacology 2016 Organizing Committee Members

- |   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>Karen Mulkijanyan</b><br>Tbilisi State Medical University<br>Georgia | <b>CEJ van Rensburg (Connie Medlen)</b><br>University of Pretoria<br>South Africa | <b>Walber Toma</b><br>Santa Cecilia University<br>Brazil | <b>Maria Elena de Lima</b><br>Federal University of Minas Gerais<br>Brazil |
|---|---|--|--|



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430970 Fortaleza – CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DA NEFROTOXICIDADE E DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR INDUZIDOS PELAS FRAÇÕES PLA2 ASP-49 E LYS-49 DA SERPENTE BOTHROPOIDES PAULOENSIS”, protocolo 124/16, sob responsabilidade de Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	01/07/2017 à 29/07/2018
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	24
Peso	250 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC

*Alexandre Havt Bindá* Fortaleza, 29 de junho de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
 Coordenador do CEUA UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**ALEXANDRE HAVT BINDÁ**  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1060002

*Antonio Fajal Coelho Louze*