



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

FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JUNIOR

**INFLUÊNCIA DO ESTABILIZANTE SACAROSE E LIOFILIZADOS CONTENDO
ANTIVENENO: AVALIAÇÃO RENAL *IN VITRO* E *IN VIVO***

FORTALEZA

2023

FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JUNIOR

INFLUÊNCIA DO ESTABILIZANTE SACAROSE E LIOFILIZADOS CONTENDO
ANTIVENENO: AVALIAÇÃO RENAL *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N712i Nogueira Junior, Francisco Assis.
Influência do estabilizante sacarose e liofilizados contendo antiveneno: avaliação renal in vitro e in vivo / Francisco Assis Nogueira Junior. – 2023.
124 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Coorientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

1. Acidente ofídico. 2. Soro antiveneno. 3. Injúria renal aguda. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JUNIOR

INFLUÊNCIA DO ESTABILIZANTE SACAROSE E LIOFILIZADOS CONTENDO
ANTIVENENO: AVALIAÇÃO RENAL *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em 06 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Sayonara Maria Lia Fook
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Profa. Dra. Dayanne Tomaz Casemiro da Silva
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Profa. Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas.

Ao **Mestre Jesus**, modelo e guia moral da humanidade, sustento de todas as horas, presente do Pai para os nossos dias de caminhada.

À minha **Família**, por todo amparo, paciência e amor dedicado.

À **Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, por aceitar me orientar desde o mestrado, ainda que não me conhecesse, pelo conhecimento compartilhado, pela confiança e pela paciência demonstrada até hoje. Um modelo de luta, resiliência e superação diante das situações adversas da vida. Minha gratidão e admiração à sua pessoa e ao seu trabalho desenvolvido ao longo destes anos. Meu muito obrigado.

À **Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge**, pela coorientação deste e de outros trabalhos, pela sua paciência, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada. Sua dedicação à pesquisa é um modelo a ser seguido.

A todos os pesquisadores que fazem parte do **Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica)** e a **Mauren Villalta Arrieta**, pelo grande trabalho desenvolvido, pela contribuição científica prestada ao mundo e por fornecerem as amostras necessárias à execução deste trabalho. Meu muito obrigado.

À **Profa. Dra. Renata de Souza Alves**, pelo apoio, pela ajuda e pelas sugestões para concepção de parte das ideias aqui trazidas. Sem sua boa vontade, parte deste trabalho não seria possível.

À **Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins** e ao **Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes**, pelo apoio e pela contribuição na execução de parte das metodologias que compõem este trabalho.

À **Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos**, pelas aulas, pela execução e pelas análises de parte da metodologia deste trabalho. Meu muito obrigado.

À **Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista**, à **Profa. Dra. Sandra Maria Nunes Monteiro** e ao **Dr. Carlos Manuel Serra Azul Monteiro**, por serem parceiros e componentes essenciais da maquinaria de funcionamento do laboratório de Toxinologia.

Ao **Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes**, à **Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista** e à **Profa. Ana Celeste Ximenes Oliveira**, pelas contribuições na qualificação deste trabalho, assim como aos professores que compuseram minha banca de defesa.

À **Sílvia Helena**, componente fundamental da metodologia de perfusão renal, por toda ajuda, pela paciência, pelos ensinamentos e pelas risadas, desde a minha chegada ao mestrado. Sem ela, muita coisa não teria sido realizada.

Aos **demais integrantes do laboratório e grupo de pesquisa**, sempre deixei clara a importância de cada um no desenvolvimento dos trabalhos e das parcerias.

A todos que fazem parte do **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM – UFC)**.

Aos coordenadores do **Programa de Pós Graduação em Farmacologia (PPGF – UFC)**, **Prof. Dr. Alexandre Havt** e **Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**.

Também à Laura e Milena, sempre solícitas em ajudar nas minhas demandas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pelo financiamento científico deste trabalho.

RESUMO

Influência do estabilizante sacarose e liofilizados contendo antiveneno: avaliação renal *in vitro* e *in vivo*

Acidentes envolvendo serpentes são um grave problema de saúde pública, muitas vezes negligenciado, que acomete todo o mundo. Este tipo de agravo está associado a um grande número de morbidade e mortalidade quando não tratados a tempo. O antiveneno ou soroterapia é a única indicação para o tratamento destes acidentes. Ela consiste na utilização parenteral de imunoglobulinas específicas que neutralizam as toxinas circulantes do veneno. Atualmente, os antivenenos podem ser apresentados na forma líquida ou liofilizada. As formas liofilizadas podem ser armazenadas a temperaturas superiores a 25°C e são indicadas e distribuídas para regiões onde o armazenamento frio não pode ser garantido (regiões tropicais ou desérticas do mundo). Durante o processo de liofilização, são adicionados à formulação estabilizantes e/ou lioprotetores que protegem as proteínas do estresse térmico do processo. Um deles é a sacarose, que está associada, quando administrada por via intravenosa, à indução de lesões renais agudas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos renais ocasionadas por um antiveneno poliespecífico liofilizado formulado com duas concentrações diferentes de sacarose. Para isso, foram utilizados dois modelos: *in vitro*, que usa células de túbulo proximal renal, pertencentes à linhagem LLC-MK2, e *in vivo*, que utiliza camundongos *swiss* fêmeas, as quais foram injetadas por via intravenosa com doses específicas de antiveneno. Como resultados dos ensaios *in vitro*, foram observadas alterações na viabilidade celular, alterações nos marcadores de estresse oxidativo (nos dois modelos estudados) e alterações morfológicas, na arquitetura renal, semelhantes a um quadro de nefrose osmótica induzida por solutos exógenos. Um mapeamento proteômico do tecido renal também foi realizado buscando observar as proteínas envolvidas nas alterações encontradas. Em contrapartida, os antivenenos, mesmo mostrando sinais de alteração na homeostase renal, possivelmente associada à presença da sacarose, foram capazes de neutralizar a ação do veneno total da serpente *Bothrops asper* no modelo *in vitro*. Já a ação do antiveneno isolado no modelo *in vivo* apresentou resultados semelhantes aos encontrados nos ensaios *in vitro*. No entanto, a formulação com 5% de sacarose mostrou uma ação semelhante à do antiveneno formulado sem sacarose e sem muitos danos associados. Como perspectivas futuras, faz-se necessário um estudo em que se avalie a ação conjunta do veneno e antiveneno, de forma a complementar e esclarecer os resultados obtidos até aqui, atestando, assim, a segurança e eficácia do antiveneno na regressão dos sintomas do envenenamento.

Palavras-chave: acidente ofídico; soro antiveneno; injúria renal aguda.

ABSTRACT

Influence of the stabilizer sucrose and lyophilized containing antivenom: renal evaluation in vitro and in vivo

Accidents involving snakes are a serious public health problem, often neglected, that affects the entire world. This type of condition is associated with a large number of morbidity and mortality when not treated in time. Antivenom or serum therapy is the only indication for the treatment of these accidents. It consists of the parenteral use of specific immunoglobulins that neutralize the circulating toxins of the venom. Currently, antivenoms can be presented in liquid or lyophilized form. Freeze-dried forms can be stored at temperatures above 25°C and are recommended and distributed to regions where cold storage cannot be guaranteed (tropical or desert regions of the world). During the freeze-drying process, stabilizers and/or lyoprotectants are added to the formulation that protect proteins from the thermal stress of the process. One of them is sucrose, which is associated, when administered intravenously, with the induction of acute kidney injuries. Thus, this study aimed to evaluate the renal effects caused by a lyophilized polyspecific antivenom formulated with two different concentrations of sucrose. For this, two models were used: in vitro, which uses renal proximal tubule cells, belonging to the LLC-MK2 lineage, and in vivo, which uses female Swiss mice, which were injected intravenously with specific doses of antivenom. As results of in vitro tests, changes in cell viability, changes in oxidative stress markers (in both models studied) and morphological changes in renal architecture were observed, similar to osmotic nephrosis induced by exogenous solutes. Proteomic mapping of kidney tissue was also carried out to observe the proteins involved in the changes found. On the other hand, antivenoms, even showing signs of alteration in renal homeostasis, possibly associated with the presence of sucrose, were able to neutralize the action of the total venom of the *Bothrops asper* snake in the in vitro model. The action of the isolated antivenin in the in vivo model showed results similar to those found in in vitro tests. However, the formulation with 5% sucrose showed an action similar to that of the antivenom formulated without sucrose and without much associated damage. As future perspectives, a study is needed to evaluate the joint action of poison and antivenom, in order to complement and clarify the results obtained so far, thus attesting to the safety and effectiveness of antivenom in the regression of poisoning symptoms.

Keywords: snakebite; antivenins; acute kidney injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição global do número de acidentes ofídicos, divididos por continentes.....	20
Figura 2	<i>Bothrops asper</i> e sua distribuição geográfica na América Central.....	22
Figura 3	Perfis proteômicos do veneno da serpente <i>B. asper</i> . Variações individuais entre espécimes provenientes das regiões do Caribe e do Pacífico (Costa Rica), isoladas geograficamente.....	23
Figura 4	Associação entre envenenamento por serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e os biomarcadores renais associados aos locais específicos da lesão.....	26
Figura 5	Vital Brazil Mineiro da Campanha e Clodomiro Picado Twilight.....	33
Figura 6	Esquema resumido do processo utilizado para obtenção de anticorpos por meio do plasma de animais hiperimunizados com veneno de serpentes.....	35
Figura 7	Representação dos tipos de monômeros ativos que constituem os antivenenos.....	37
Figura 8	Representação do mecanismo proposto para ação protetora das moléculas de açúcar no processo de liofilização de proteínas.....	39
Figura 9	Mecanismo proposto para indução do processo de lesão renal causada por sacarose (nefrose osmótica ou nefrose por solutos exógenos)	42
Figura 10	Desenho experimental utilizado no estudo no modelo <i>in vivo</i>	53
Figura 11	Viabilidade de células LLC-MK2 após tratamento com veneno de <i>B. asper</i> , relação concentração-resposta da citotoxicidade e determinação da IC50 para esta linhagem	61
Figura 12	Avaliação da viabilidade das células tubulares renais LLC-MK2 diante dos antivenenos formulados com ou sem sacarose.....	62
Figura 13	Ensaio de viabilidade celular, diante do bloqueio do veneno total de <i>B. asper</i> (5xIC50) utilizando os antivenenos formulados com 2,5% e 5% de sacarose.....	63
Figura 14	Produção de ERO citoplasmáticas em células renais tubulares do tipo LLC-MK2 por meio do ensaio utilizando o DCFH-DA, para o veneno total de <i>Bothrops asper</i> e os antivenenos formulados com ou sem sacarose.....	65

Figura 15 –	Potencial transmembrânico mitocondrial em células tubulares renais LLC-MK2, submetidas à ação do veneno total de <i>Bothrops asper</i> e do antiveneno formulado com ou sem sacarose.....	67
Figura 16 –	Níveis de glutatona reduzida em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose.....	68
Figura 17 –	Níveis de TBARS em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose.....	69
Figura 18 –	Níveis de nitrito em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com ou sacarose.....	70
Figura 19 –	KIM-1 (A) e GGT (B) urinário, em camundongos, administrados, por via intravenosa, com antiveneno polivalente estabilizado ou não com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo...	71
Figura 20 –	Fotomicrografias de rim de camundongos tratados, por via endovenosa, com antiveneno polivalente estabilizado ou não com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo.....	73
Figura 21 –	VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno sem sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho), e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$	75
Figura 22 –	VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno formulado com 2,5% de sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho) e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$	76
Figura 23 –	VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno formulado com 5% de sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho) e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$	77

- Figura 24** – Classificação das proteínas quanto à função molecular. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle..... 80
- Figura 25** – Classificação das proteínas quanto aos processos biológicos. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle..... 81
- Figura 26** – Classificação das proteínas quanto a sua classe. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle..... 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Soro administrado de acordo com o tipo, especificidade e gravidade do acidente em nível de Brasil.....	29
Quadro 2	– Soro administrado de acordo com o tipo, a especificidade e a gravidade do acidente em nível de América Central.....	29
Quadro 3	– Composição e capacidade de neutralização dos antivenenos produzidos no Brasil, tomando como referência as espécies de maior letalidade.....	30
Quadro 4	– Composição e capacidade de neutralização dos antivenenos produzidos na América Central, tomando como referência as espécies de maior letalidade.....	31
Quadro 5	– Identificação das formulações finalizadas.....	47
Quadro 6	– Grupos experimentais em função do tempo.....	53
Quadro 7	– Proteínas comuns e exclusivas entre os grupos analisados, que têm como base a análise do PLS-DA / vip-score.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem do total de proteínas separadas por cromatografia líquida do veneno de <i>B. asper</i> com base em diferentes regiões e idade dos espécimes.....	24
Tabela 2	Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado sem sacarose.....	60
Tabela 3	Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado com 2,5% de sacarose.....	60
Tabela 4	Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado com 5% de sacarose.....	60
Tabela 5	Percentual de viabilidade em células tubulares renais LLC-MK2 diante do veneno total de <i>B. asper</i>	61
Tabela 6	Percentual de viabilidade das células tubulares renais LLC-MK2 diante dos antivenenos formulados com ou sem sacarose.....	62
Tabela 7	Percentual de viabilidade celular, diante do bloqueio do veneno total de <i>B. asper</i> (5xIC50) utilizando os antivenenos formulados sem ou com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5%.....	64
Tabela 8	Percentual de ERO citoplasmáticas em células renais tubulares do tipo LLC-MK2 por meio do ensaio utilizando o DCFH-DA, para o veneno total de <i>Bothrops asper</i> e antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose.....	65
Tabela 9	Potencial transmembrânico mitocondrial em células tubulares renais LLC-MK2, submetidas à ação do veneno total de <i>Bothrops asper</i> e do antiveneno formulado com ou sem sacarose.....	67
Tabela 10	Níveis de GSH em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com sacarose ou sem sacarose.....	68
Tabela 11	Níveis de TBARS em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com ou sem sacarose.....	69
Tabela 12	Níveis de nitrito em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com sacarose.....	70
Tabela 13	Valores de KIM-1 e GGT urinário, em camundongos, administrados por via endovenosa com antiveneno polivalente estabilizado ou não com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo.....	71

Tabela 14 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado sem sacarose, comparado ao grupo controle.....	75
Tabela 15 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado com 2,5% de sacarose, comparado ao grupo controle.....	76
Tabela 16 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado com 5% de sacarose, comparado ao grupo controle.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Arteriola Aferente
AE	Arteriola Eferente
ATP	Adenosina Trifosfato
3FTxs	Toxinas three-fingers
CRISP	Proteína secretora rica em cisteína
CTL	Lectina tipo-C
DIS	Desintegrinas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável ou constante
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GSH	Glutaciona reduzida
IB	Instituto Butantan
IC50	Concentração inibitória média
ICP	Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica)
IFR	Intensidade de Fluorescência Relativa
IgG	Imunoglobulina G
KAZ	Serino protease do tipo Kazal
kDA	Kilodalton
KIM1	Molécula de injúria renal
LAO	L-aminoácido oxidase
LLC-MK2	Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells
LRA	Lesão renal aguda
NGF	Fator de crescimento nervoso
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
NUCL	Nucleotidasas
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MTT	Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDE	Fosfodiesterase
PLA2	Fosfolipase A2

SABr	Soro antibotrópico pentavalente
SABC	Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotático
SABL	Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético
SACr	Soro anticrotático
SAEla	Soro antielaídico bivalente
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VEGF	Fatores de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Epidemiologia dos acidentes ofídicos.....	19
1.2	Acidentes causados por serpentes da espécie <i>Bothrops</i> na América Latina.....	21
1.3	Envenenamento por serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e suas implicações renais.....	24
1.4	Soroterapia: tratamento para os acidentes envolvendo serpentes.....	27
1.5	Histórico e produção dos soros antiofídicos.....	31
1.6	Formulações liofilizadas.....	38
1.7	Lesão renal associada ao uso de agentes estabilizadores.....	40
2	JUSTIFICATIVA.....	43
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo geral.....	45
3.2	Objetivos específicos.....	45
4	METODOLOGIA.....	46
4.1	Aspectos éticos e animais.....	46
4.2	Veneno.....	46
4.3	Antiveneno: produção e formulação.....	46
4.3.1	Caracterização físico-química das formulações.....	47
4.3.1.1	<i>Aspectos macroscópicos dos antivenenos liofilizados.....</i>	<i>47</i>
4.3.1.2	<i>Concentração total de proteínas.....</i>	<i>48</i>
4.3.1.3	<i>Quantificação de endotoxinas bacterianas.....</i>	<i>48</i>
4.3.1.4	<i>Concentração de monômeros.....</i>	<i>48</i>
4.3.1.5	<i>Concentração de sacarose.....</i>	<i>48</i>
4.4	Modelo experimental: <i>in vitro</i>	49
4.4.1	Manutenção e cultivo das Células LLC-MK2.....	49
4.4.2	Ensaio de viabilidade celular por meio do MTT.....	49
4.4.3	Ensaio de bloqueio do veneno total diante do antiveneno.....	50
4.4.4	Produção de espécies reativas do oxigênio citoplasmáticas.....	50
4.4.5	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	51
4.5	Modelo Experimental: <i>in vivo</i>	52

4.5.1	Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.....	53
4.5.1.1	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	54
4.5.1.2	Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	54
4.5.1.3	Determinação dos níveis de nitrito.....	55
4.5.2	Determinação dos níveis urinários de KIM-1 e GGT.....	55
4.5.3	Análise histológica.....	56
4.5.4	Análise proteômica do tecido renal.....	57
4.5.4.1	Extração, quantificação e digestão das proteínas.....	57
4.5.4.2	Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas.....	58
4.5.4.3	Análise dos dados.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	Caracterização físico-química das formulações finalizadas.....	60
5.2	Viabilidade celular para linhagem LLC-MK2.....	61
5.3	Bloqueio do veneno total diante dos antivenenos.....	63
5.4	Produção de espécies reativas do oxigênio citoplasmáticas por meio do DCFH-DA.....	64
5.5	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	66
5.6	Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo <i>in vivo</i>.....	68
5.6.1	Níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	68
5.6.2	Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	69
5.6.3	Níveis de nitrito.....	70
5.7	Determinação dos marcadores bioquímicos.....	71
5.7.1	Molécula de injúria renal aguda (KIM-1) e gama glutamil transpeptidase urinária (GGT).....	71
5.8	Análise histológica.....	72
5.9	Análise proteômica do tecido renal.....	74
6	DISCUSSÃO.....	84
7	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXO I	116
	ANEXO II.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

O envenenamento por serpentes foi classificado, em 2017, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada de alta prioridade, o que ocasionou, posteriormente, em maio de 2018, a resolução de prevenir estes acidentes. Por isso, durante a Assembleia Mundial da Saúde, a OMS lançou um roteiro, que visa reduzir pela metade as mortes e a invalidez causadas por serpentes até 2030 (The lancet, 2019).

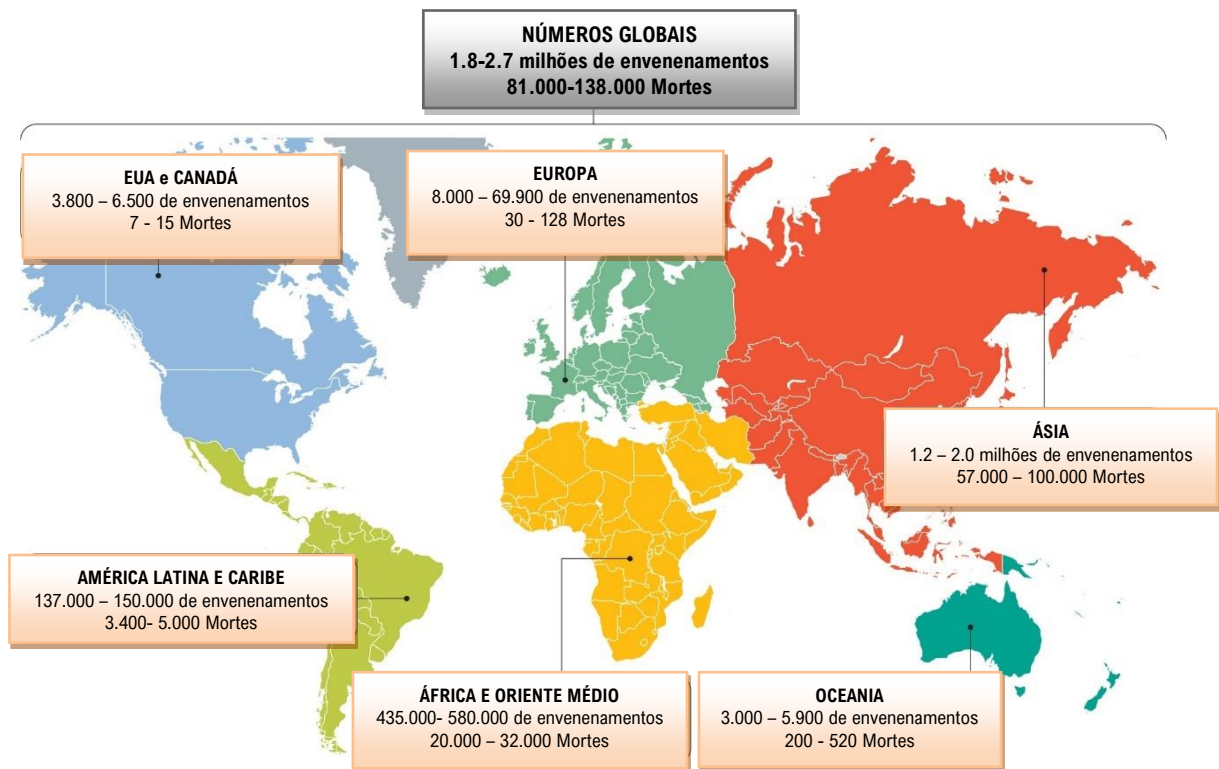
Os acidentes envolvendo serpentes se tornam uma doença ocupacional e ambiental que atinge populações específicas em risco, ocorre de forma diferente entre os países e é associada à agricultura rural devido à alta incidência de casos e de mortes nesse meio (Gutiérrez *et al.*, 2017b; Harrison *et al.*, 2009). Os principais afetados são mulheres, crianças e agricultores em comunidades rurais pobres em países de baixa e média renda, principalmente onde os sistemas de saúde são mais fracos e os recursos médicos escassos (Who, 2021).

Tomando, como exemplo, a África Ocidental, é possível dizer que agricultores e crianças, em comunidades rurais dessa região, são consistentemente identificados como os grupos de maior risco (Chippaux; Diallo, 2002; Chippaux; Kambewasso, 2002; Enwere; Obu; Jobarteh, 2000), como também os colhedores de chá no sul da Índia e no Sri Lanka e os seringueiros na Libéria, Tailândia, Malásia e Brasil (Pierini *et al.*, 1996; Stahel, 1980; Warrell *et al.*, 1986), além de trabalhadores do campo, das florestas e das águas no Brasil (Brasil, 2019). Convém destacar que, na Nigéria e no Sri Lanka, o envenenamento foi reconhecido como uma causa importante de aborto e hemorragia anteparto (Habib *et al.*, 2008).

A OMS estima que ocorram cerca de 5,4 milhões de acidentes ofídicos a cada ano, o que resulta em 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamento, gerando um número de mortes que fica entre 81.410 e 137.880 e cerca de três vezes mais amputações e outras incapacidades permanentes. A maioria destes acidentes ocorrem na África, Ásia e América Latina. Os números mais precisos apontam que, na Ásia, até 2 milhões de pessoas são envenenadas por serpentes a cada ano, enquanto, na África, há cerca de 435.000 a 580.000 picadas anualmente que precisam de tratamento (Who, 2021).

Os dados mostrados na Figura 1, a seguir, apresentam uma aproximação da estimativa de envenenamentos e mortes por picadas de serpentes. Apesar da subnotificação desta condição, de forma geral, está em consonância que os maiores números ocorrem na Ásia, África Subsaariana, América Latina e partes da Oceania (Chippaux, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2017b; Kasturiratne *et al.*, 2008).

Figura 1 – Distribuição global do número de acidentes ofídicos, divididos por continentes.



Fonte: Adaptado de Gutiérrez *et al.* (2017b), com base nas estimativas de Chippaux (1998); Kasturiratne *et al.* (2008).

Em 2021, estimou-se que existiam mais de 3000 espécies de serpentes em todo mundo, dentre as quais cerca de 800 podem causar acidentes com humanos (Uetz; Freed; Hošek, 2021). As serpentes com grande importância clínica pertencem a duas famílias: Elapidae, composta por 374 espécies, e Viperidae, composta por 356 espécies, conhecidas como víboras do velho mundo, cascavéis americanas, jararacas e víboras asiáticas; a família Viperidae está dividida em duas subfamílias: Viperinae (“*True Vipers*”, 104 espécies) e Crotalinae (“*Pit Vipers*”, 250

espécies) (Gómez-Betancur *et al.*, 2019; Tasoulis; Isbister, 2017; Uetz; Freed; Hošek, 2021).

1.2 Acidentes causados por serpentes da espécie *Bothrops* na América Latina

Na América Latina, os acidentes por serpentes peçonhentas envolvendo humanos estão relacionados a duas famílias: família Viperidae (subfamília Crotalinae), a qual pertencem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucu), e a família Elapidae, a qual pertencem os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*, cujas espécies são popularmente conhecidas com corais verdadeiras (Lemos *et al.*, 2009; Matos; Ignotti, 2020).

Epidemiologicamente, a grande maioria dos envenenamentos são causados por espécies do gênero *Bothrops*, que estão amplamente distribuídas do Sul do México à Argentina (Segura *et al.*, 2010). Na América central, existem 139 espécies de serpentes, dentre as quais, 22 são peçonhentas, 5 espécies de Elapídeos, 16 espécies de Viperídeos e uma serpente marinha (família Elapidae, subfamília Hydrophiinae) (Lomonte *et al.*, 2014).

No Brasil, existem 32 espécies de Viperídeos (sendo 30 espécies de *Bothrops*, 01 espécie de *Crotalus*, dividida em seis subespécies, e 01 espécie de *Lachesis*) e 35 espécies de Elapídeos (Uetz; Freed; Hošek, 2021). No grupo *Bothrops*, são de importância médica as espécies *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus* (Sul e Sudeste), *Bothrops moojeni* (Centro-Oeste), *Bothrops atrox* (Norte) e *Bothrops erythromelas* (Nordeste) (Albuquerque *et al.*, 2019).

A maioria dos acidentes ofídicos no Brasil, entre 2012 a 2022, foi ocasionada por serpentes do grupo *Bothrops* (n=257.825; 87%), seguido pelo grupo *Crotalus* (n=25.381; 9,8%). Poucos são os casos de acidentes por *Micrurus* e *Lachesis*. As regiões brasileiras onde há maior taxa de incidência de acidentes ofídicos são a Nordeste e a Centro-Oeste. Os meses de maior frequência de acidentes são os quentes e chuvosos, períodos de maior atividade em áreas rurais. A maioria dos acidentes é classificada clinicamente como leve, porém, a demora no atendimento médico e soroterápico pode elevar a taxa de letalidade (SINAN, 2023).

Na América Central, os elevados números de acidentes envolvendo serpentes são causados pela espécie *Bothrops asper*, popularmente conhecida como Terciopelo ou barba amarilla (Figura 2), responsável por 50-80% das picadas. Este fato está associado à ampla distribuição e capacidade de adaptação ambiental desta espécie (Alape-Girón *et al.*, 2009; Gutiérrez; Theakston; Warrell, 2006; Oteropatiño, 2009; Sasa; Wasko; Lamar, 2009).

B. asper é a única espécie de *Bothrops* que ocorre na ilha de Trinidad, México e América Central (Campbell; Lamar, 2004). Sua distribuição caribenha se estende continuamente ao longo da costa do Golfo do México, Península de Yucatán, América Central, Panamá, costa do Caribe e pelos vales interandinos da Colômbia e Venezuela. A distribuição, no Pacífico, inclui a região da parte central e sul da Costa Rica, através do Panamá, continuando ao longo da Colômbia ocidental, norte do Equador e extremo nordeste do Peru (Alape-Girón *et al.*, 2008, 2009).

Figura 2 – *Bothrops asper* e sua distribuição geográfica na América Central

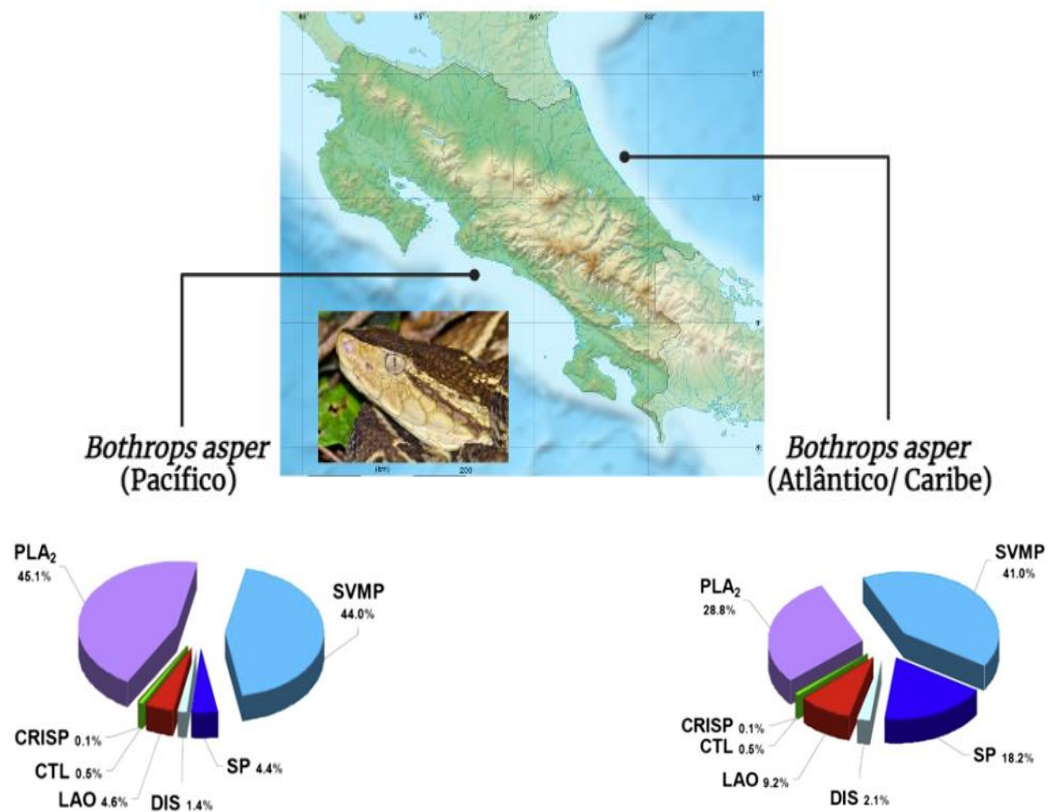


Fonte: Adaptado de Serpientes venenosas de Costa Rica (ICP, 2022).

A espécie *B. asper* está distribuída em duas populações geograficamente isoladas na Costa Rica, parte habita o Caribe e outra parte, o Pacífico (Figura 3). O isolamento geográfico se reflete no perfil de proteínas presentes no veneno total da serpente (Tabela 1). De acordo com esse perfil, pode-se observar o aspecto toxicológico do envenenamento causado pela espécie.

Estudos experimentais envolvendo camundongos injetados com veneno de *B. asper* mostraram congestão glomerular, degeneração vacuolar de células tubulares, áreas hemorrágicas na medula (Chaves; Gutiérrez; Brenes, 1992), sangramento sistêmico grave e hipoperfusão renal com formação de microtrombos na microvasculatura, com alta concentração de PLA₂s (Fosfolipase A2) citotóxicas e homólogos, sugerindo também uma ação nefrotóxica direta (Gutiérrez; Escalante; Rucavado, 2009; Gutiérrez; Lomonte, 1995).

Figura 3 – Perfis proteômicos do veneno da serpente *Bothrops asper*. Variações individuais entre espécimes provenientes das regiões do Caribe e do Pacífico (Costa Rica), geograficamente isoladas



SVMP: Metaloproteinase; PLA: Fosfolipase A2; CRISP: Proteína secretora rica em cisteína; CTL: Lectina tipo-C / Lectina-like; LAO: L-aminoácido oxidase; DIS: Desintegrinas; SP: Serinoprotease.
 Fonte: Adaptado de Lomonte et al. (2014).

Tabela 1 – Porcentagem do total de proteínas separadas por cromatografia líquida do veneno de *B. asper* com base em diferentes regiões e idade dos espécimes

Família de Proteínas	% de proteínas no veneno total			
	Caribe		Pacífico	
	Adulto	Filhote	Adulto	Filhote
Desintegrinas de tamanho médio	2.1	1.6	1.4	0.6
Fosfolipase A2	28.8	23.7	45.1	27.7
K49	18.8	2.1	36.0	4.2
D49	10	21.6	9.1	23.5
Proteína secretora rica em cisteína - CRISP	0.1	2.5	0.1	<0.1
Serino Protease	18.2	6.7	4.4	2.6
L-aminoácido Oxidase - LAAO	9.2	2.5	4.6	3.4
Lectina Tipo-C	0.5	< 0.1	0.5	0.2
Metaloproteinase-Zn ²⁺	41.0	63.0	44.0	65.5
PI	32.2	2.9	30.5	7.1
PIII	8.8	61.0	13.3	5.2

Fonte: Alape-Girón *et al.* (2008).

1.3 Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* e suas implicações renais

O envenenamento é o resultado da injeção de uma secreção tóxica altamente especializada, chamada de veneno, que é injetado por meio de presas ou dentes conectados por um duto a uma glândula de veneno, ocorrendo em humanos geralmente em situações acidentais (Gutiérrez *et al.*, 2017b). A composição do veneno de serpente apresenta alta complexidade e diversidade, resultando em perfis bioquímicos e toxicológicos variáveis que determinam uma ampla gama de manifestações clínicas (Gómez-Betancur *et al.*, 2019).

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas, desenvolvidas, em algumas espécies, para imobilização e digestão de presas, bem como para defesa contra predadores, e sua composição inclui vários tipos de toxinas, principalmente metaloproteinases (SVMPs) dependentes de Zn²⁺, fosfolipases A₂ (PLA₂s), serino proteinases (SVSPs) e L-aminoácidos oxidases (LAAOs). Além disso, apresentam outros tipos de toxinas, como: desintegrinas (DIS), lectinas do tipo C/proteínas do tipo lectina (CTL), proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs), fatores de crescimento nervoso (NGFs), fatores de crescimento

endotelial vascular (VEGFs), 5'-nucleotidases (NUCL), fosfodiesterases (PDE), proteínas do tipo Kazal (KAZ) e toxinas de três dedos (3FTxs). Assim, é possível perceber que a fisiopatologia do envenenamento ofídico envolve uma série complexa de eventos que dependem das ações, combinadas ou não, desses componentes (Charvat *et al.*, 2018; Lomonte *et al.*, 2014; Solano *et al.*, 2018; Tasoulis; Isbister, 2017).

O envenenamento por toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* afeta principalmente os tecidos musculares e a coagulação do sangue, possuindo ações proteolítica, coagulante e hemorrágica. Uma das principais consequências do envenenamento por toxinas é a Lesão Renal Aguda (LRA), uma complicação intimamente associada à causa de mortes envolvendo acidentes ofídicos. A LRA é dez vezes mais comum em acidentes crotálicos, no entanto, as incidências são semelhantes entre os gêneros quando comparados. Isso ocorre devido ao fato de o maior número de acidentes serem causados por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (Albuquerque *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2018; Pinho; Yu; Burdmann, 2008).

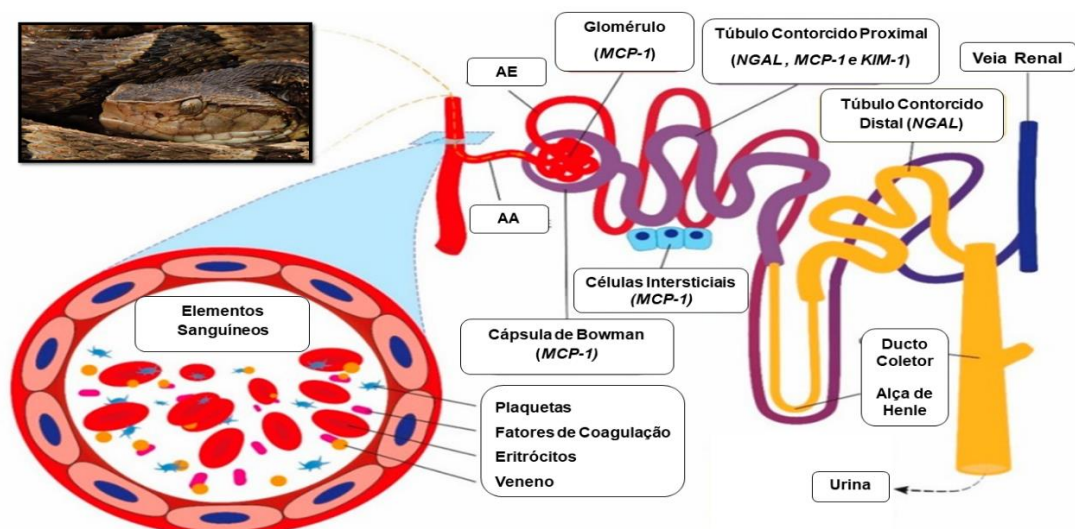
A patogênese da LRA, após um acidente ofídico, é multifatorial, e os fatores desencadeantes atuam de maneira combinada ou isolada. Convém destacar que a ação destes fatores pode acontecer de duas formas: direta ou indiretamente (Albuquerque *et al.*, 2014; Rodrigues Sgrignolli *et al.*, 2011). A ação direta está relacionada à atividade da peçonha sobre o epitélio tubular renal. Embora sua concentração seja maior no local da picada, os mecanismos de concentração, transporte tubular e excreção (exclusivamente renal) favorecem a ocorrência de toxicidade renal direta (Figura 4) (Castro, 2006; De Moraes *et al.*, 2013; Jorge *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2007; Nogueira Júnior *et al.*, 2019).

Por outro lado, a ação indireta está associada ao desequilíbrio hemodinâmico (hipoperfusão renal), à isquemia renal, à precipitação de hemoglobina, à deposição de fibrina, a microtrombos nos glomérulos, à lesão celular inflamatória e ao estresse oxidativo, apresentando como achados histológicos: necrose tubular aguda e cortical bilateral, nefrite intersticial, glomérulo nefrite aguda com proliferação mesangial (Boer-Lima; Gontijo; Da Cruz-Höfling, 1999; Burdmann *et al.*, 1993; De Castro *et al.*, 2004; Linardi *et al.*, 2011; Martines *et al.*, 2014; Rodrigues Sgrignolli *et al.*, 2011).

Quando o veneno total ou toxinas isoladas entram em contato com o endotélio microvascular, lesam as células endoteliais e levam à ativação delas e à expressão de marcadores de superfície celular, promovendo, por exemplo, o aumento de proteínas quimiotáticas de monócito urinário-1 (MCP-1), lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e molécula de injúria renal (KIM-1). A presença de tais marcadores pode estar associada à inflamação renal, ao dano glomerular e à atrofia tubular, principalmente em túbulos contorcidos proximais e distais (Albuquerque *et al.*, 2019).

A KIM-1 é uma glicoproteína transmembrana, formada por uma imunoglobulina e um domínio de mucina, atuando como um receptor de fosfatidilserina, que é externalizado durante o dano ou a morte celular. Seu ectodomínio é clivado por metaloproteinases durante a formação de corpos apoptóticos e/ou lipídios oxidados relacionados ao estresse oxidativo. Ela pode também ser identificada como uma proteína altamente regulada na região do túbulo proximal renal após um processo de dano e lesão tubular, sendo liberada no lúmen do túbulo e expelida pela urina (Bonventre, 2014; Dantas *et al.*, 2018; Lahoud *et al.*, 2015).

Figura 4 – Associação entre envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* e os biomarcadores renais associados aos locais específicos da lesão



AA: Arteríola Aferente; AE: Arteríola Eferente; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGAL: Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos. Fonte: Adaptado de Albuquerque *et al.* (2019).

1.4 Soroterapia: tratamento para os acidentes envolvendo serpentes

O antiveneno ou soro é o tratamento indicado e o mais eficaz para prevenir ou reverter a maioria dos efeitos ocasionados pelos acidentes ofídicos. Eles estão incluídos na lista de medicamentos essenciais da OMS e devem fazer parte de qualquer pacote de cuidados de saúde primários em que ocorrem estes tipos de agravos (Who, 2021).

As serpentes peçonhentas podem causar um envenenamento acidental em humanos, e a única terapia validada cientificamente para o tratamento é baseada na administração parenteral de anticorpos que são substâncias ativas, imunoglobulinas inteiras ou fragmentos (F(ab')₂ e Fab), as quais têm a capacidade de se ligar às toxinas e neutralizar seus efeitos (Segura *et al.*, 2012). De maneira geral, o antiveneno é produzido por hiperimunização de animais de grande porte, a partir da utilização de venenos de serpentes, administrados nesses animais em doses subletais para estimulação da produção de anticorpos, os quais têm o plasma hiperimune fracionado para se obter preparações à base de imunoglobulinas G (IgG) (Gómez-Betancur *et al.*, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2005).

Os antivenenos são eficientes para neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento. Entretanto, os obstáculos terapêuticos relacionados aos efeitos locais podem estar associados ao início precoce dos efeitos, ao tempo entre a picada e administração do soro, bem como à má distribuição das imunoglobulinas e seus fragmentos nos tecidos locais em que o veneno é injetado. Observa-se ainda que esses antivenenos podem desencadear a ocorrência de reações adversas (precoce e tardias) relacionadas às proteínas heterólogas presentes (Gutiérrez *et al.*, 1998; León *et al.*, 2013).

A eficácia da imunoterapia depende de vários fatores, dentre eles está a potência e especificidade do soro, o tempo decorrido entre o envenenamento e o tratamento, a via de administração utilizada e a escolha correta do soro a ser utilizado (Brasil, 2001, 2017, 2019; Solano *et al.*, 2010). Os antivenenos devem neutralizar os efeitos tóxicos induzidos pelas peçonhas ofídicas. No entanto, como relatado anteriormente, a composição do veneno pode variar entre as espécies e até mesmo entre populações diferentes de uma mesma espécie (Figura 3) (Alape-Girón *et al.*, 2008; Barlow *et al.*, 2009; Jorge *et al.*, 2015, 2017).

O conhecimento das características clínicas dos envenenamentos é necessário, a fim de identificar os sintomas associados a determinadas espécies de serpentes, permitindo, assim, a seleção do soro adequado para o tratamento. Em outras palavras, o uso dos antivenenos monoespecíficos está indicado apenas quando a identificação das espécies causadoras do envenenamento é possível, do contrário, o antiveneno poliespecífico é o indicado e preferido (Brasil, 2017, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2009, 2011; León *et al.*, 2018).

A identidade dos antivenenos é determinada pelas espécies de animais usadas como fonte de imunoglobulinas e pelos venenos usados como imunógenos, assim sendo, os soros podem neutralizar apenas os venenos que estão relacionados antigenicamente ao veneno ou *pool* de venenos utilizados no processo de produção do antiveneno. Assim, existe a necessidade de se classificar cada tipo de acidente. No Brasil, os acidentes estão classificados da seguinte forma:

- **Botrópico:** causado por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararaca, jararacuçu, urutu, cruzeira). É o de maior importância e distribuição dentre os acidentes registrados.
- **Crotálico:** ocasionado por serpentes do gênero *Crotalus* (cascavel), representado pela espécie *Crotalus durissus ssp.*
- **Laquético:** provocado por serpentes do gênero *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca). Causados pela espécie *Lachesis muta*.
- **Elapídico:** causado por serpentes dos gêneros *Micrurus* (coral verdadeira) e *Leptomicrurus*.

O esquema soroterápico deve ser o mais específico possível de acordo com a espécie ou o gênero causador do acidente. Além disso, a quantidade de antiveneno administrado (número de ampolas) deve estar de acordo com a gravidade do acidente, sendo classificado como leve, moderado ou grave. Os Quadros 1 e 2 a seguir trazem a relação do tipo de acidente/soro/quantidade administrada adotados, no Brasil, conforme indicação do Ministério da Saúde (Brasil, 2001, 2009, 2023) e, para a América Central, conforme indicação do produtor (ICP, 2016).

Quadro 1 – Soro administrado de acordo com o tipo, a especificidade e a gravidade do acidente em nível de Brasil

Tipo de Acidente	Soro/Antiveneno Indicado	Nº de ampolas
Botrópico	- SABr: soro antibotrópico (pentavalente) - SABC: soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico - SABL: soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquéutico	Leve: 2 a 4
		Moderado: 4 a 8
		Grave: 12
Crotálico	- SACr: soro anticrotálico - SABC: soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico	Leve: 5
		Moderado: 10
		Grave: 20
Laquéutico	- SABL: soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquéutico	Moderado: 10
		Grave: 20
Elapídico	- SAEla: soro antielapídico (bivalente)	Moderado: 5
		Grave: 10

Fonte: Brasil (2001, 2009, 2023).

Quadro 2 – Soro administrado de acordo com o tipo, a especificidade e a gravidade do acidente em nível de América Central

Tipo de Acidente	Soro/Antiveneno Indicado	Nº de Ampolas
Botrópico, Crotálico ou Laquéutico	Soro Polivalente - antibotrópico, anticrotálico e antilaquésico	Leve: 05
		Moderado/Grave: 10
		Quando causado por <i>Lachesis stenophrys</i> : 15
Elapídico	Soro anticoral	10

Fonte: ICP (2016).

Os soros antiofídicos utilizados no tratamento de acidentes que ocorrem no Brasil e na América Latina são preparados à base de um *pool* de venenos que possui, em sua composição, espécies diferentes de serpentes (pertencentes ou não ao mesmo gênero), sendo capaz de neutralizar a maioria dos efeitos tóxicos sistêmicos causados, conforme mostram os Quadros 3 e 4 (Boechat *et al.*, 2001; SEGURA *et al.*, 2010). O critério de seleção para os venenos tem como base informações epidemiológicas e clínicas (espécies com alta importância médica), e também reatividade imunológica cruzada entre os venenos de diferentes espécies. Assim, os antivenenos oferecem proteção contra a maior parte dos efeitos tóxicos sistêmicos ocasionados, abrangendo, por vezes, outras espécies de serpentes que

não fazem parte do *pool* utilizado no processo de imunização (Fry *et al.*, 2003; Kalil; Fan, 2017; Segura *et al.*, 2010, 2012).

Quadro 3 – Composição e capacidade de neutralização dos antivenenos produzidos no Brasil, tomando como referência as espécies de maior letalidade

Antiveneno	Espécies utilizadas	Neutralização (mg de veneno/ml de soro)
SABr	<i>Bothrops jararaca</i> (50 %) <i>Bothrops jararacussu</i> (12,5%) <i>Bothrops alternatus</i> (12,5%) <i>Bothrops moojeni</i> (12,5%) <i>Bothrops neuwiedi</i> (12,5%)	5.0 mg/mL para veneno referência de <i>Bothrops jararaca</i>
SACr	<i>Crotalus durissus ssp</i>	1.5 mg/mL para o veneno referência de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
SAEla	<i>Micrurus frontalis</i> (50%) <i>Micrurus coralinus</i> (50%)	1.5 mg/mL para o veneno referência de <i>Micrurus frontalis</i>
SABC	<i>Crotalus durissus ssp</i> + <i>Bothrops jararaca</i> <i>Bothrops jararacussu</i> <i>Bothrops alternatus</i> <i>Bothrops moojeni</i> <i>Bothrops neuwiedi</i>	5.0 mg/mL para veneno referência de <i>Bothrops jararaca</i> e 1.5 mg/mL para o veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
SABL	<i>Lachesis muta</i> + <i>Bothrops jararaca</i> <i>Bothrops jararacussu</i> <i>Bothrops alternatus</i> <i>Bothrops moojeni</i> <i>Bothrops neuwiedi</i>	5.0 mg/mL para veneno referência de <i>Bothrops jararaca</i> e 3.0 mg/mL para o veneno referência de <i>Lachesis Muta</i>

Fonte: Adaptado de Kalil; Fan (2017); Theakston; Warrell (1991); Brasil (2001).

Quadro 4 – Composição e capacidade de neutralização dos antivenenos produzidos na América Central, tomando como referência as espécies de maior letalidade

Antiveneno Monovalente	Espécie utilizada	Neutralização (mg de veneno/mL de soro)
Soro Anticoral	<i>Micrurus nigrocinctus</i>	0.4 mg/mL do veneno referência de <i>Micrurus nigrocinctus</i>
Antiveneno Polivalente	Espécies utilizadas	Neutralização (mg de veneno/mL de soro)
Anti-botrópico, Anti-crotálico e Anti-laquéstico	<i>Bothrops asper</i> <i>Crotalus simus</i> <i>Lachesis stenophrys</i>	3.0 mg/mL do veneno referência de <i>Bothrops asper</i>

Fonte: ICP (2016).

1.5 Histórico e produção dos soros antiofídicos

Foi na França, no final do século XIX, que se deu a descoberta da soroterapia antiveneno. Os primeiros trabalhos foram apresentados por duas instituições de pesquisa parisiense à Sociedade Francesa de Biologia em 10 de fevereiro de 1894. Os autores eram Césaire Auguste Phisalix (1852-1906) e Gabriel Bertrand (1867-1962), representando o Museu Nacional de História Natural, e o Dr. Léon Charles Albert Calmette (1863-1933), representando o Instituto Pasteur (Bochner, 2016; Hawgood, 1999b).

Em 1894, Calmette apresentou seus resultados, mostrando que o soro produzido a partir de coelhos, previamente imunizados com doses subletais e crescentes do veneno de uma serpente comum no Vietnã, *Naja naja* (na época, *Naja tripudians*), fornecia resistência aos animais inoculados, o que permite concluir que o soro dos animais imunizados era capaz de neutralizar a toxicidade do veneno da serpente *in vitro* e *in vivo*. Simultaneamente, Phisalix e Bertrand apresentaram, em sua abordagem, que pequenas doses de veneno provocavam apenas uma familiaridade lenta e progressiva, não uma imunização genuína, postulando, assim, a presença de uma resposta imune primária presente no sangue de animais inoculados com veneno de víboras. Em virtude disso, os autores concluíram que a imunização não é produzida diretamente pelo material vacinal, ela, na verdade, resulta de uma reação dentro do organismo (Calmette, 1984; Hawgood, 1999b; Phisalix; Bertrand, 1894a,1894b).

Os estudos conduzidos por Calmette mostraram a indução de uma hiperimunização com a formação de imunoglobulina G que fornecia proteção *in vivo* contra o envenenamento. De outro modo, os trabalhos de Phisalix e Bertrand demonstravam a formação de uma reação primária que envolvia a formação de Imunoglobulina M, mostrando efeito apenas na neutralização do veneno *in vitro* (Bon, 1996). A partir deste ponto, com base em suas publicações seguintes, Calmette sugeriu que seu antiveneno (soro antiNaja) conferia proteção contra doses letais de venenos de outras espécies (Bochner, 2016; Hawgood, 1999a; Pucca *et al.*, 2019; Squaiella-Baptistão *et al.*, 2018).

Nas Américas Central e do Sul, duas das instituições com tradição nessas áreas são o Instituto Clodomiro Picado (ICP), pertencente à Universidade da Costa Rica, e o Instituto Butantan (IB), vinculado à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Ambas desempenham um papel de destaque promovendo pesquisas científicas e tecnológicas no desenvolvimento e na produção de antivenenos e na promoção de esforços para enfrentar os envenenamentos ofídicos (Franco; Kalil, 2014; Gutiérrez; Rojas Céspedes, 1999; Gutiérrez; Teixeira; Fan, 2021).

O IB foi criado em 1901 como laboratório de produção de antivenenos, tendo como primeiro diretor o renomado cientista brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha (1865-1950), que desenvolveu um pioneiro e notável esforço integrado para estudar o problema do envenenamento ofídico no Brasil e fornecer soluções para reduzir seu impacto. Dentre suas contribuições, Vital Brazil caracterizou os perfis clínicos e toxicológicos das peçonhas das serpentes brasileiras, preparou os primeiros antivenenos da América Latina, demonstrou o conceito de 'especificidade' desses antivenenos, introduzindo o caminho para o desenho de antivenenos específicos e testes de controle de qualidade, além de explorar as terapias alternativas para esses venenos. Esses acontecimentos, portanto, marcam o surgimento da terapia antiveneno (então conhecida como "soroterapia") de envenenamentos por picadas de serpentes na América Latina (Gutiérrez; Teixeira; Fan, 2021; Hawgood, 1992; Squaiella-Baptistão *et al.*, 2018).

Figura 5 – Vital Brazil Mineiro da Campanha (à esquerda) e Clodomiro Picado Twight (à direita)



Fonte: Instituto Vital Brazil.



Fonte: ICP – Universidad de Costa Rica.

Enquanto o Brasil desenvolvia tais estudos, um cientista costarriquenho, chamado Clodomiro Picado Twight (1887-1944), retornando à Costa Rica em 1913, após formação e estudos na La Sorbonne e no Institut Pasteur em Paris, observou a situação das pessoas que sofriam envenenamentos ofídicos. Em decorrência disso, Clodomiro decidiu constituir uma coleção de serpentes, estudar seus venenos e avaliar a eficácia das terapias preconizadas para o tratamento. Neste momento, ele estabelece contato com Vital Brazil por meio do IB. Com seu conhecimento sobre os venenos de serpentes da Costa Rica, Picado observa que esses venenos tinham fortes semelhanças com os venenos de serpentes brasileiras concluindo que os soros antiofídicos fabricados até então pelo IB poderiam ser eficazes contra os venenos de serpentes da Costa Rica.

Além disso, ele também enviou venenos de espécies de viperídeos nativos da região, especialmente *Bothrops asper* (então conhecida como *B. atrox*) ao IB para a produção de um soro específico para o seu país. Os estudos de Clodomiro Picado foram compilados no livro *Serpientes Venenosas de Costa Rica. Sus Venenos. Seroterapia Antiofídica*. Com isso, Clodomiro Picado marca o início da terapia antiofídica para envenenamento por picada de serpentes na Costa Rica (Gutiérrez, 2019; Gutiérrez; Teixeira; Fan, 2021; Picado, 1931).

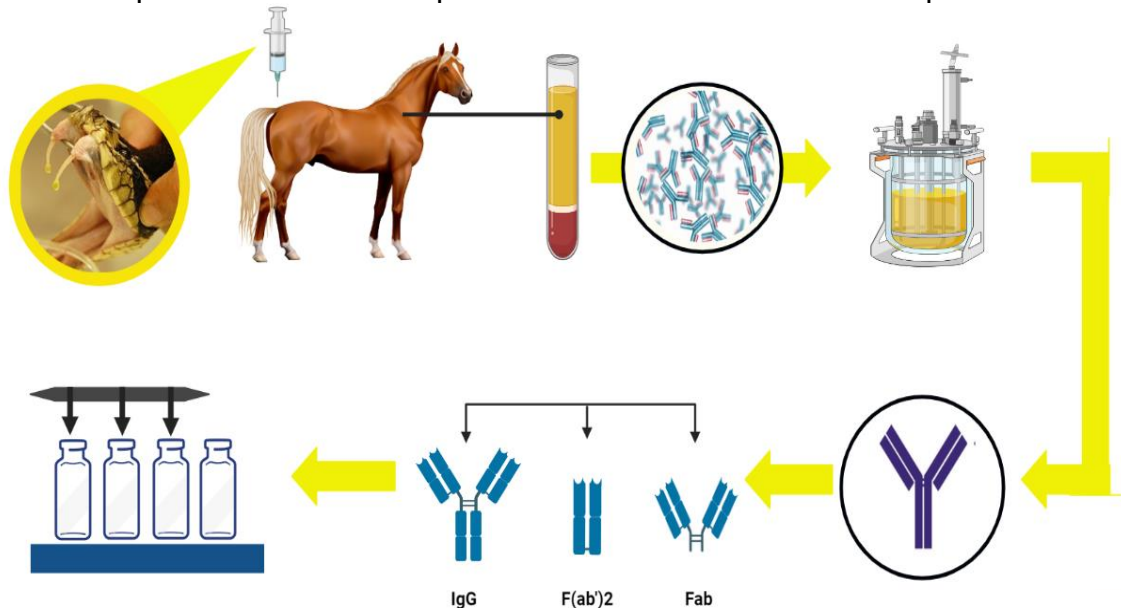
Desde então, a utilização parenteral dos derivados do plasma de origem animal hiperimunes tem sido a única opção específica para o tratamento de envenenamentos por picadas de serpentes. Portanto, a fabricação do antiveneno tem que seguir rígidos critérios de produção (Gutiérrez *et al.*, 2011; Gutiérrez; León; Burnouf, 2011; León *et al.*, 2018).

O esquema a seguir resume as etapas de produção dos antivenenos:

- 1) **Imunização de animais com veneno(s) de serpente(s):** injeção subcutânea do veneno referência, ou da mistura deles, em doses repetidas e não letais para indução da hiperimunização dos animais;
- 2) **Fracionamento do sangue para obtenção da substância ativa:** retirada do plasma por meio do processo de sangramento/autotransusão de células vermelhas para evitar anemia nos animais;
- 3) **Digestão enzimática para obtenção das frações das imunoglobulinas:** purificação das imunoglobulinas para a produção do antiveneno;
- 4) **Formulação, controle de qualidade e armazenamento do produto final.**

A imunização de animais, por meio da administração de um *pool* de venenos de serpentes relevantes, é o estágio inicial. Este *pool* que será utilizado para a produção dos soros é extraído de espécimes compostas tanto por animais coletados da natureza como por espécimes criados no local (Sasa; Arias Ortega; Bonilla-Murillo, 2017). Esta mistura de venenos também será utilizada para o posterior controle de qualidade dos anticorpos obtidos, devendo conservar suas propriedades antigênicas e tóxicas durante o armazenamento e também em longo prazo (Farias *et al.*, 2018; Hatakeyama *et al.*, 2018).

Figura 6 – Esquema resumido do processo utilizado para obtenção de anticorpos por meio do plasma de animais hiperimunizados com veneno de serpentes



Fonte: Elaborado pelo autor com base nos trabalhos de Gutiérrez *et al.* (2017a) e León *et al.* (2018).

Além do veneno bruto, existem outras formas de imunização para desenvolvimento de antivenenos, como: o uso de toxinas e peptídeos recombinantes ou sintéticos, além de vacinação de DNA para aumentar os anticorpos terapeuticamente relevantes por meio de procedimentos de imunização. Porém, mesmo removendo a necessidade de veneno para a produção do soro, ainda será necessária sua utilização para o controle de qualidade do antiveneno e a validação da eficácia das novas metodologias de obtenção dos soros (Bermúdez-Méndez *et al.*, 2018; De Castro *et al.*, 2019; Julve Parreño *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2016).

A seleção dos venenos a serem usados na imunização deve ser baseada em uma análise apoiada por dados epidemiológicos (frequência dos acidentes, gravidade, letalidade e espécies relevantes para cada região), aspectos clínicos, informações imunológicas e toxinológicas. Desta forma, o veneno utilizado para imunização, segundo Gutiérrez *et al.* (2011), deverá atender a vários fatores: a) a dose letal (DL50) deve ser estimada, para garantir que o soro, produzido a partir da imunização com esse material, terá um bom efeito protetor; b) a espécie de serpente deve estar associada ao maior número de envenenamentos em um país ou uma região; e c) as espécies com ampla distribuição territorial devem ter amostras também de diferentes localizações geográficas (variação intraespecífica). Isso

implica aspectos ligados à neutralização imunológica cruzada entre o antiveneno e os venenos de espécies heterólogas, ou seja, as espécies cujos venenos não são usados no processo de imunização (Alape-Girón *et al.*, 2008; Jorge *et al.*, 2015, 2017; Segura *et al.*, 2012).

Para o processo de produção de imunoglobulinas, são utilizados animais de grande e médio porte, pois estes são de fácil manejo e fornecem um grande volume de sangue em um ciclo de produção. As espécies utilizadas podem variar de acordo com o local de produção, podendo ser cavalos, asnos, carneiros ou lhamas (Gutiérrez *et al.*, 2011; Theakston; Warrell, 1991).

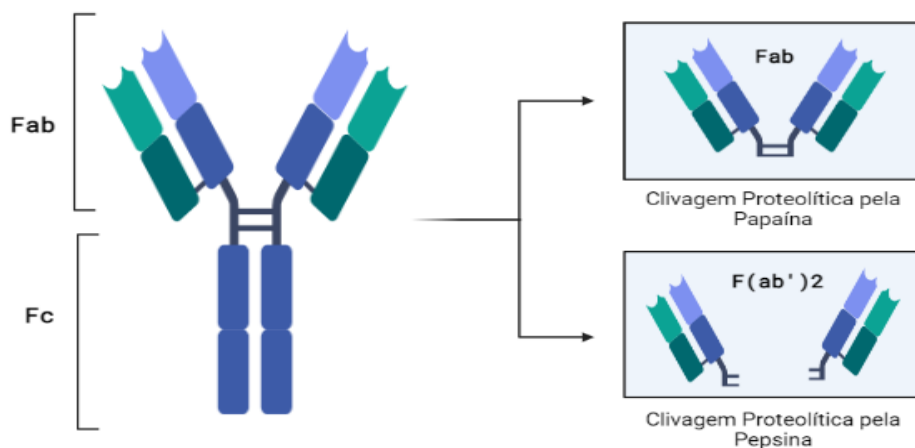
O processo de imunização ocorre com injeções repetidas de veneno nos animais, geralmente pela via subcutânea, induzindo, assim, a produção de anticorpos neutralizantes. Nesse processo, pode ser utilizado veneno de uma ou mais espécies de serpentes, para assim produzir antivenenos monoespecíficos ou poliespecíficos, respectivamente (Alfaro-Chinchilla *et al.*, 2021; Gutiérrez *et al.*, 2011; Solano *et al.*, 2018). Os antivenenos poliespecíficos podem ser produzidos tanto por imunização dos animais com uma mistura de venenos como por mistura dos plasmas obtidos de animais imunizados com venenos únicos ou por mistura de imunoglobulinas específicas purificadas (León *et al.*, 2011; Vllalita *et al.*, 2016).

Assim, o plasma dos animais previamente imunizados é então fracionado para obter os antivenenos que são compostos de moléculas de IgG (divalente) inteiras ou fragmentadas: F(ab')₂ (monovalente) ou Fab (divalente), frações obtidas por meio da digestão com pepsina ou papaína, respectivamente (Figura 7) (Gutiérrez *et al.*, 2014). Os mecanismos, as etapas e os métodos para a purificação de imunoglobulinas do plasma hiperimune em grande escala podem diferir, em algumas fases do processo, de acordo com o tipo de produto final que se deseja obter. Por isso, os processos podem mudar segundo o laboratório de produção, dentre eles é possível citar: a digestão com pepsina, *salting out* (adição de sais neutros), precipitação com ácido caprílico e cromatografia de troca aniônica ou ultrafiltração (León *et al.*, 2018; Who, 2018).

A necessidade de fracionamento dos anticorpos reside no fato de que, anteriormente, presumia-se que a presença do fragmento Fc era responsável pelas reações adversas induzidas pelos antivenenos, e aqueles à base de F(ab')₂ eram mais seguros. Posteriormente, observou-se que a agregação das proteínas do

antiveneno e não a ativação do complemento mediada por Fc seria a responsável pelas principais causas das reações. Desta forma, as características físico-químicas das formulações passaram a ser mais implicadas nas reações adversas encontradas (León *et al.*, 2013, 2018; Segura *et al.*, 2013; Who, 2018).

Figura 7 – Representação dos tipos de monômeros ativos que constituem os antivenenos



Fab: Fragmento de ligação ao antígeno; Fc: Fragmento cristalizável ou constante. Fonte: Elaborado pelo autor.

A obtenção de antivenenos à base de moléculas de IgG completas ou fragmentadas leva em consideração alguns fatores, como: a toxicocinética das principais moléculas dos venenos (relacionada ao tamanho), das massas moleculares dos fragmentos de IgG (150 kDa), F(ab')₂ (100 kDa) e Fab (50 kDa), que reflete em diferentes taxas de eliminação do antiveneno (Gutiérrez; León; Lomonte, 2003), dos números de paratopos e da capacidade de formar grandes complexos ou precipitados com antígenos portadores de vários epítomos (IgG e F(ab')₂ ou pequenos complexos reversíveis não precipitados (Fab) (Who, 2017, 2018).

Já antivenenos à base de fragmentos Fab monovalente possuem alto volume de distribuição, alcançando rapidamente os compartimentos extravasculares. No entanto, eles possuem eliminação rápida (por via renal, meia-vida 4-24 horas), o que acaba ocasionando a recorrência dos sintomas do envenenamento. Estes antivenenos são mais apropriados contra neurotoxinas que são rapidamente distribuídas e eliminadas do corpo do paciente (Ariaratnam *et al.*, 1999; Gutiérrez; León; Lomonte, 2003; Meyer *et al.*, 1997). Por outro lado, as moléculas bivalentes,

IgG e F(ab')₂, não são eliminadas por via renal, pois são fagocitadas e opsonizadas pelo sistema reticuloendotelial (meia-vida de 2 a 4 dias). Portanto, são as escolhas eficazes para antivenenos direcionados à neutralização completa e prolongada de toxinas intravasculares (por exemplo, enzimas pró-coagulantes) que têm uma meia-vida longa em pacientes envenenados (Gutiérrez; León; Lomonte, 2003; Ho *et al.*, 1990; Scherrmann, 1994; Who, 2017, 2018).

O antiveneno brasileiro é produzido por imunização equina, e a porção do anticorpo é a F(ab')₂, tendo como meio de precipitação o sulfato de amônia. Os locais de produção são o Instituto Butantan, a Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Vital Brazil (Kalil; Fan, 2017). Na América Central, o antiveneno poliespecífico é produzido por meio do método de imunização equina, com uma mistura dos venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus simus* e *Lachesis stenophrys*. Esse antiveneno tem a capacidade de neutralizar não apenas os venenos homólogos, ou seja, os que foram utilizados para a imunização, como também os não utilizados (heterólogos), ou seja, os que são de outros viperídeos de importância médica da América Central (Gutiérrez *et al.*, 1988, 2014; Solano *et al.*, 2018).

1.6 Formulações liofilizadas

Após a purificação e separação das imunoglobulinas e do ajuste da concentração de proteína total, a solução do antiveneno deve ser formulada. Nesta etapa, são adicionados adjuvantes, como cloreto de sódio, para conferir a força iônica necessária para manter as imunoglobulinas em solução; osmólitos, como sorbitol, manitol ou glicina, para proteger do estresse químico e térmico; e conservantes bactericidas, fenol 0,15-0,25% ou cresol 0,30-0,35% (León *et al.*, 2018; Segura *et al.*, 2009; Wang, 1999). Quando os antivenenos são liofilizados, lioprotetores, como sacarose (5,0% m/v), podem ser utilizados (HERRERA *et al.*, 2017a, 2017b).

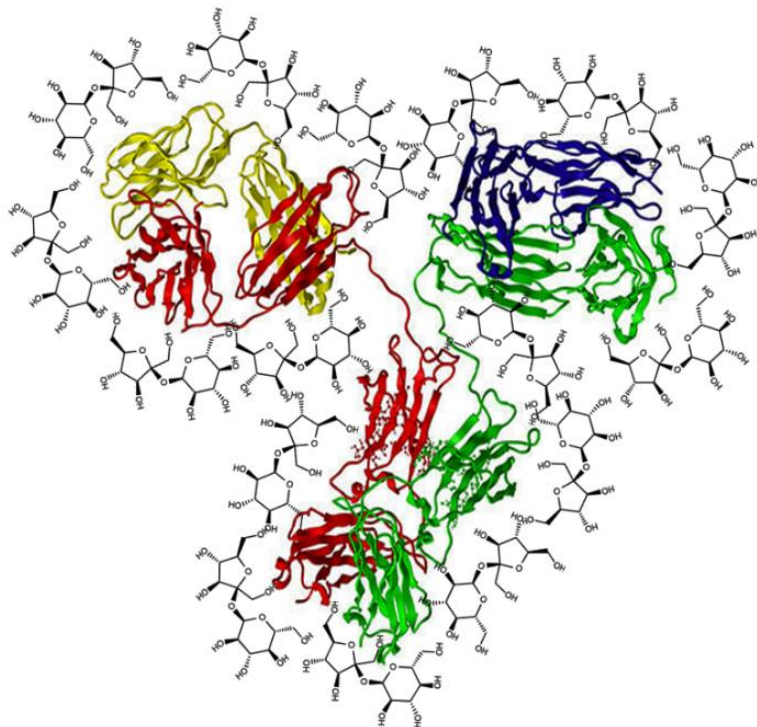
Por fim, os antivenenos podem ser apresentados como líquidos ou liofilizados. Os liofilizados podem ser armazenados a temperaturas superiores a 25°C e são geralmente distribuídos para regiões onde o armazenamento frio não pode ser garantido (como algumas regiões tropicais ou desérticas do mundo). Eles apresentam uma vida útil mais prolongada. No entanto, o processo de liofilização

incrementa o custo de produção e, assim, o preço final do produto (Gutiérrez *et al.*, 2011; Who, 2017).

A liofilização é um processo que confere estabilidade às proteínas, principalmente a altas temperaturas. A maioria das proteínas podem ser sensíveis à liofilização devido ao estresse de congelamento e à secagem que pode causar danos irreversíveis a sua estrutura e perda da sua atividade biológica (Heller; Carpenter; Randolph, 1999; Sarciaux *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2014; Maury *et al.*, 2005).

A agregação de anticorpos é a principal evidência de degradação. Esse processo pode ser evitado durante a liofilização pela adição de excipientes, que agem como estabilizadores, como açúcares ou polióis, e agentes de volume, como manitol e glicina (Herrera *et al.*, 2014, 2017a; Imamura *et al.*, 2003; Mahler *et al.*, 2009). Os dissacarídeos, então, atuam na prevenção da agregação ou inativação de proteínas durante a secagem, melhorando a estabilidade de armazenamento e preservando a conformação nativa da proteína durante a liofilização (Imamura *et al.*, 2003; Maury *et al.*, 2005).

Figura 8 – Representação do mecanismo proposto para ação protetora das moléculas de açúcar no processo de liofilização de proteínas



Fonte: Elaborado pelo autor.

A liofilização, na presença de açúcares, faz com que sejam formadas matrizes amorfas que incorporam as moléculas de proteína (Figura 8). Foi hipotetizado que esses açúcares podem substituir a água ao redor dos resíduos polares durante a secagem, evitando a desestabilização do arcabouço das montagens macromoleculares proteicas. Consequentemente, as proteínas preservam certa estabilidade, mesmo sem a presença de água. De maneira geral, a interação entre as proteínas e moléculas de açúcar consegue prevenir mudanças conformacionais proteicas durante a desidratação e o armazenamento (Carpenter; Crowe, 1988; Costantino *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2003; Mensink *et al.*, 2017). É importante enfatizar que a extensão do efeito de preservação pode variar com a quantidade e o tipo específico de lioprotetor utilizado (Herrera *et al.*, 2014; Imamura *et al.*, 2003).

1.7 Lesão renal associada ao uso de agentes estabilizadores

Embora seja a única terapia recomendada, alguns problemas relacionados a diferentes características do antiveneno podem ocorrer. As reações adversas de hipersensibilidade, que ocorrem com a utilização do antiveneno ou dos compostos à base de imunoglobulinas, podem ser imediatas ou tardias. Em relação às reações imediatas, na maioria dos casos, apresentam sintomatologia leve (urticária, náusea, vômito, dor de cabeça e febre). Nos casos graves, pode ocorrer anafilaxia sistêmica, hipotensão, cianose e alteração do nível de consciência (De Silva; Ryan; De Silva, 2016; Guo *et al.*, 2018). Já as reações tardias são observadas após 8 a 12 dias de tratamento. Estas são caracterizadas por erupções cutâneas, febre e alergias, entre outros efeitos (De Silva; Ryan; De Silva, 2016; Gómez-Betancur *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2018; León *et al.*, 2013).

Nos antivenenos liofilizados ou outros compostos à base de imunoglobulinas, os agregados de anticorpos já foram associados a possíveis reações adversas devido à sua capacidade de simular complexos e ativar o sistema complemento (Gutiérrez; León; Burnouf, 2011). Como já esclarecido anteriormente, para prevenir ou diminuir a formação de agregados de imunoglobulinas, agentes estabilizadores são utilizados, como os dissacarídeos, sacarose e maltose, e os monossacarídeos, como glicose, D-sorbitol, glicina e albumina. Estes açúcares podem ser metabolizados no fígado, exceto a sacarose, que é degradada

enzimaticamente pela sacarase presente no intestino delgado. Alguns antivenenos liofilizados e imunoglobulinas de uso intravenoso levam, em sua formulação, estes estabilizantes (Al-Abdulla *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2014, 2017a, 2017b; Mendonça-da-Silva *et al.*, 2017; Segura *et al.*, 2009; Villalta *et al.*, 2016).

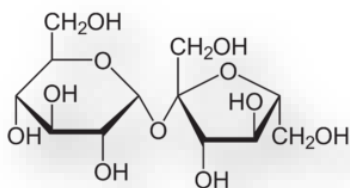
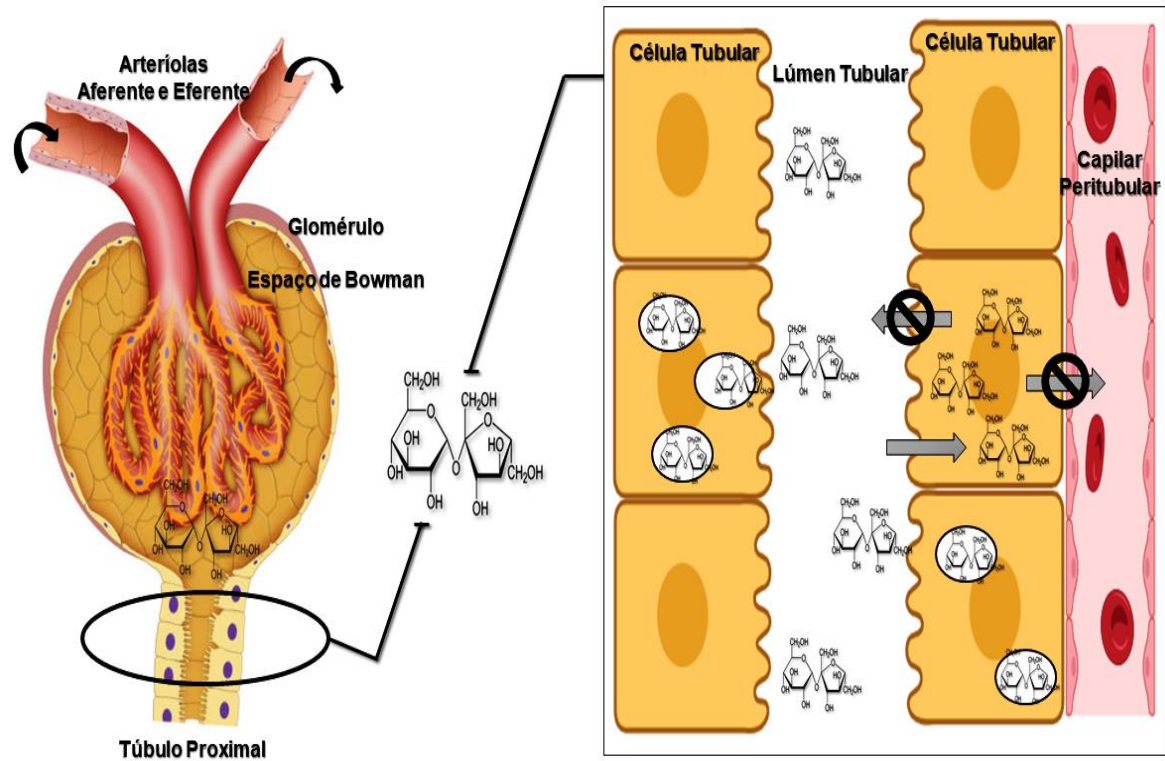
A nefrotoxicidade, associada a estes estabilizantes presentes na formulação de imunoglobulinas de uso intravenoso (IgIV), está bem descrita desde a década de noventa e tem sido explicada pela toxicidade tubular relacionada à nefrose osmótica. O seu uso se expandiu nos anos 80-90, e, desde então, estudos apontam um quadro de lesão renal aguda de moderada a grave associada à terapia com IgIV (Barton *et al.*, 1987; Cayco; Perazella; Hayslett, 1997; Luque *et al.*, 2016).

O termo nefrose de padrão osmótico foi introduzido por Allen, em 1951, e descreve uma morfologia caracterizada por vacuolização e edema das células tubulares proximais renais. Ela vem sendo descrita, desde a década de trinta, quando foi observada após a infusão intravenosa de sacarose hipertônica para a redução da pressão intracraniana. Já em 1933, Helmholtz observou degeneração vacuolar e encolhimento nuclear de células tubulares em coelhos, uma hora após a administração de uma solução de sacarose a 20%, e a persistência destes efeitos por uma semana. Em 1940, o mesmo padrão histológico foi descrito por Anderson e Bethea em autópsias humanas, cujos pacientes tinham sido previamente tratados com sacarose em concentrações hiperosmolares (Anderson; Bethea, 1940; Bullock; Gregersen; Kinney, 1935; Dickenmann; Oettl; Mihatsch, 2008).

Baseando-se no mecanismo proposto para indução da lesão renal pela sacarose intravenosa, parte-se do princípio que, para que os animais absorvam a sacarose, ela deve ser enzimaticamente hidrolisada em glicose e frutose no intestino delgado. No entanto, quando administrada por via intravenosa, a hidrólise não ocorre, toda a sacarose é filtrada por meio do glomérulo e sua eliminação ocorre exclusivamente, por via renal. Como os rins não produzem a enzima dissacaridase/sacarase, a sacarose não pode ser metabolizada, acumulando-se nos túbulos proximais (via pinocitose). Considerando que as células proximais não podem hidrolisar a sacarose, seu acúmulo resulta no aumento do gradiente osmótico (hiperosmolaridade – maior entrada de água), o que causa o inchaço celular, a vacuolização e a oclusão luminal tubular e leva à formação do processo de lesão renal e nefrose osmótica (Ahsan *et al.*, 1994, 1996; Chapman *et al.*, 2004; Dantal,

2013; Dickenmann; Oettl; Mihatsch, 2008; Lakshmanadoss; Balakrishnan; Disalle, 2010; Schwartz; Johnson, 1971; Siddiqui *et al.*, 2019).

Figura 9 – Mecanismo proposto para indução do processo de lesão renal causada por sacarose (nefrose osmótica ou nefrose por solutos exógenos)



Molécula de Sacarose

Fonte: Elaborado pelo autor.

2 JUSTIFICATIVA

Um dos pontos de estratégia da OMS, no que diz respeito aos acidentes ofídicos, se baseia no fornecimento de um tratamento seguro e eficaz, fundamentando-se na necessidade de acelerar o desenvolvimento, a otimização da produção e a distribuição dos antivenenos, de forma que cheguem às diversas partes do mundo onde os números de acidentes provocados por serpentes são elevados. Assim, as pesquisas atuais envolvendo venenos ofídicos consistem na busca do melhor entendimento dos aspectos clínicos do envenenamento humano e dos mecanismos de ação das peçonhas. O conhecimento destes mecanismos proporciona uma melhor compreensão para o desenvolvimento de antivenenos adequados e capazes de reverter todas as ações nocivas ocasionadas pelo envenenamento.

Neste contexto, novas formulações de antivenenos vêm sendo desenvolvidas buscando minimizar os problemas associados à conservação, ao armazenamento e à validade, de modo a obter-se um produto adequado às necessidades de cada região. As formulações liofilizadas se mostram capazes de suprir estes requisitos, pois apresentam um menor peso/volume, são estáveis em temperatura ambiente, fáceis de transportar e armazenar, visto que não necessitam de uma cadeia fria para isso. No processo de liofilização, é possível fazer uso de agentes estabilizantes, a exemplo da sacarose. Tais agentes são adicionados com o objetivo de prevenir a formação de agregados e conferir proteção estrutural à proteína perante o estresse térmico, gerado pelo processo de liofilização.

No entanto, a utilização de formulações contendo certos tipos de açúcares, quando administradas por via intravenosa, podem acabar ocasionando danos renais. Na literatura médica, são muitos os casos relatados de pacientes que receberam tratamento à base de produtos licenciados contendo sacarose e desenvolveram um quadro de lesão renal caracterizada por necrose tubular aguda e nefropatia tubular proximal. Os antivenenos não são de uso contínuo ou prolongado, e a maioria dos estudos citados abordam ou relatam os efeitos associados a várias infusões ao longo do tempo, enquanto as informações sobre a ação ocasionada após uma única infusão são escassas, devido a fatores limitantes ou interferentes,

como: diferenças nas preparações de imunoglobulina, diferenças individuais ou variações no desenho do estudo.

Diante do exposto, durante o processo de escolha da forma de estabilização de uma formulação à base de imunoglobulinas, alguns critérios devem ser levados em consideração. O principal deles é manter a sua eficácia de maneira que ela não interfira na ação protetora perante o envenenamento ou mesmo contribua com os seus efeitos danosos. O que poderia acabar na implicação de um esquema diferente de administração ou de quantidade necessária.

Estes pontos devem ser considerados para que as formulações, contendo estabilizantes, alcancem uma concentração ideal para garantir tanto a conservação do produto quanto a manutenção de suas atividades protetoras inalteradas. Assim, as alterações em componentes do soro requerem novamente uma análise de segurança e toxicidade para atestar a sua eficácia.

A utilização de metodologias *in vitro*, para analisar os efeitos de antivenenos, venenos e toxinas, ainda não é capaz de apresentar, isoladamente, resultados que reproduzam a patologia induzida no envenenamento por serpentes, sendo necessário, assim, um sistema biológico completo. Isso, então, implica a necessidade de modelos animais para a reprodução completa dos ensaios que atestem a segurança e eficácia do antiveneno na regressão dos sintomas desencadeados pelo envenenamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar a ação de um antiveneno liofilizado, formulado com sacarose, na função renal, por meio de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade de células tubulares renais da linhagem LLC-MK2 expostas ao antiveneno polivalente liofilizado, formulado sem sacarose e com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5%.
- Avaliar a capacidade neutralizante do antiveneno polivalente, formulado sem ou com sacarose (2,5 e 5%), perante os efeitos do veneno de *Bothrops asper*, em modelo *in vitro*.
- Avaliar os efeitos renais do antiveneno polivalente, formulado sem ou com sacarose (2,5 e 5%), por meio de análises bioquímica, morfológica e proteômica renal, em um modelo *in vivo*, utilizando camundongos *Swiss*.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e animais

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA - NPDM) e aprovado sob o N° 07150321-0. Foram seguidas todas as diretrizes de boas práticas exigidas pelas normas nacionais e internacionais.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, fêmeas, pesando entre 16 e 18 gramas, padrão sanitário SPF (Specific Pathogen Free), provenientes do Biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM - UFC). Os animais foram mantidos em temperatura constante ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração *ad libitum*.

4.2 Veneno

O veneno bruto liofilizado da serpente *Bothrops asper* (BaspV) foi fornecido pelo Instituto Clodomiro Picado (ICP) – Universidade de Costa Rica, San José, Costa Rica. Trata-se de um *pool* obtido de espécimes adultos coletados na região oeste do país, voltada ao Oceano Pacífico. O veneno foi reconstituído em salina tamponada com fosfato (PBS), em ambiente estéril, somente no momento de seu uso.

4.3 Antiveneno: produção e formulação

Como material de partida, foram utilizados 700 mL de um *pool* de plasma equino (cavalos), imunizados com uma mistura de venenos das serpentes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* e *Lachesis stenophrys*. As imunoglobulinas foram separadas por meio da precipitação com ácido caprílico a 5%, mediante agitação vigorosa por uma 01 hora. Posteriormente, foram submetidas a um processo de microfiltração com o auxílio de um papel filtro (retentivo) de 8 μm (Whatman N° 2, Kent, UK), dialisadas contra água destilada e concentradas até que fosse obtida a quantidade desejada. Foram adicionados 3g/dL de NaCl, e o pH foi ajustado para 7.0.

O antiveneno obtido foi dividido em três partes iguais: uma parte permaneceu inalterada, sem adição de sacarose, e as demais foram formuladas com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5% (Sigma S5016). Os antivenenos foram esterilizados por filtração com a ajuda de um filtro de 0,22 µm. Frascos de dez mililitros foram preenchidos com 5 mL de cada formulação, que foi, então, liofilizada em um liofilizador Benchmark 1100 (Virtis, EUA). O Quadro 5 traz a identificação das amostras após a finalização do processo de produção.

Quadro 5 – Identificação das formulações finalizadas

Produto	Antiveneno Polivalente Liofilizado
Forma Farmacêutica	Pó para reconstituição
Forma de Armazenamento	Recipiente de vidro para reconstituição com 5 mL
Fabricante	Instituto Clodomiro Picado Universidad de Costa Rica
Origem	Costa Rica, San José
Data de Fabricação	Junho de 2019
Data de Validade	Junho de 2024
Lotes	
01	Antiveneno sem sacarose
02	Antiveneno contendo 2,5% de sacarose
03	Antiveneno contendo 5% de sacarose.
Data da Análise	Junho de 2019

Fonte: Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

Após finalizado o processo de produção, foram realizadas as análises físico-químicas dos antivenenos na forma liofilizada e reconstituída.

4.3.1 Caracterização físico-química das formulações

4.3.1.1 Aspectos macroscópicos dos antivenenos liofilizados

Os antivenenos liofilizados e reconstituídos foram examinados visualmente quanto ao colapso macroscópico, encolhimento do bolo, homogeneidade de cor e aderências aos frascos. Para tanto, foram utilizados o Manual de Técnicas do Laboratório de Controle de Qualidade do Instituto Clodomiro

Picado (ICP), Farmacopeia dos Estados Unidos USP, NF 25, BP 2002 e IN-PP-06 de Inspeção Visual.

4.3.1.2 *Concentração total de proteínas*

A concentração de proteína total foi determinada pelo método Biureto (Gornall; Bardawill; David, 1949). Resumidamente, 50µL de antivenenos ou padrões de proteína foram misturados com 2,5 mL do reagente Biureto e incubados em temperatura ambiente por 30 min. As absorbâncias foram registradas a 540nm utilizando um espectrofotômetro, e a concentração de proteína foi calculada em uma curva de calibração obtida plotando a absorbância dos padrões como uma função de sua concentração de proteína.

4.3.1.3 *Quantificação de endotoxinas bacterianas*

A presença de endotoxinas bacterianas foi determinada por meio do *Limulus Amebocyte Lysate Test* (LAL), utilizando o Gel Clot Method, sensibilidade 0,03 UE / mL (Solano; Gómez; León, 2015).

4.3.1.4 *Concentração de monômeros*

O conteúdo de monômeros de anticorpos foi avaliado por filtração em gel de FPLC (Fast protein liquid chromatography) em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE, UK), usando NaCl 0,15 M, Tris 20 mM, pH 7,5 como eluente, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min (Segura *et al.*, 2013).

4.3.1.5 *Concentração de sacarose*

A quantificação se deu por cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de índice de refração (HPLC-RID), usando um ZORBAX NH2; 5 µm, coluna de 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies) e um sistema de gradiente de pressão Agilent Technologies 1220 LC equipado com um detector de índice de refração RID, um injetor manual e um sistema de gerenciamento de dados cromatográficos. A vazão foi ajustada em 1,0 mL/min a 40°C, e a coluna foi

desenvolvida com gradiente isocrático de 75% de acetonitrila e 25% de água destilada. Além disso, um padrão analítico de sacarose (Sigma 47289) foi utilizado.

4.4 Modelo Experimental: *in vitro*

4.4.1 Manutenção e cultivo das células LLC-MK2

As células do tipo LLC-MK2, uma linhagem imortalizada de células epiteliais obtidas de rim de macaco (*Macaca mulatta*), foram utilizadas neste estudo por se tratarem de células de túbulo proximal renal, região que está intimamente relacionada às atividades renais investigadas nesta pesquisa.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L). As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis de 75 cm² em estufa de CO₂, mantendo as culturas a 37±0,3°C e 5% de CO₂. O crescimento diário foi acompanhado por meio da observação por microscópio invertido. Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio nutritivo por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas e quantificadas.

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular por meio do MTT

A avaliação da viabilidade celular foi realizada para células LLC-MK2 tratadas com veneno total de *B. asper* ou com os antivenenos isolados (contendo ou não sacarose). Para isso, utilizou-se o método de redução do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), que é um sal de tetrazólio, de cor amarela, que, ao entrar em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado, produzindo um sal, de cor arroxeadada, chamado formazan. As células não viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. Dessa forma, a concentração de formazan produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, que é medida pela leitura da absorbância a 570 nm (Mosmann, 1983).

A concentração das células foi ajustada para 1×10^5 células/mL, em seguida, plaqueadas (placas de 96 poços), tratadas com concentrações crescentes de veneno (6, 25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) ou antiveneno (62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL) e incubadas, por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foram usadas células não tratadas, e o branco da reação foi composto apenas por meio de cultura, sem adição de células ou outras substâncias. Após as 24 horas, foi adicionado o MTT, e as placas foram incubadas, por 4 horas, a 37°C no escuro. Nesse ponto, foi adicionada uma solução de SDS (10 % p/v em HCl 0,1N) e, por fim, foi realizada leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas. A IC₅₀ para o BaspV (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por regressão não linear.

4.4.3 Ensaio de bloqueio do veneno total diante do antiveneno

Para avaliar o bloqueio dos antivenenos formulados, sem ou com 2,5% e 5% de sacarose, perante o veneno total de *B. asper*, foi estabelecida a concentração de 5 vezes a IC₅₀ estimada para o veneno.

O veneno de *B. asper* foi, então, pré-incubado com concentrações crescentes dos antivenenos (12,5, 25, 50, 100, 200 µg/mL), durante 30 minutos. Em seguida, a viabilidade foi avaliada pelo método do MTT como descrito anteriormente.

4.4.4 Produção de espécies reativas do oxigênio citoplasmáticas

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não fluorescente e lipofílica 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, que é transformado em um substrato oxidável 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH), por meio da desacetilação por enzimas citoplasmáticas esterásicas, as quais ficam confinadas ao citoplasma, devido a sua polaridade. As espécies reativas de oxigênio, geradas durante o processo respiratório, oxidam o DCFH, formando a 2',7'- diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com excitação em 488 nm e detecção em 515-545 nm pelo sensor FL1. A fluorescência verde, produzida pela formação de DCFoxi, é proporcional à capacidade oxidativa da célula (Aranda *et al.*, 2013).

Para o ensaio descrito a seguir, foram utilizadas a concentração de 5 vezes a IC50 do BaspV e as concentrações dos antivenenos de 2000 e 4000µg/mL. Inicialmente o veneno e os antivenenos foram pré-incubados juntos, durante 1 hora, a 37°C e, depois, adicionados às células. Para incorporação do DCFH no interior das células, 5µL (concentração final 20 µM) da solução estoque foram adicionadas a placas de 24 poços, contendo as células submetidas ao tratamento. Passado o período de 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD Biosciences). Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa, produzida durante a respiração celular pela oxidação do DCFH, foi analisada em citômetro de fluxo pelo detector FL1 (fluorescência verde, de 515 a 545 nm).

4.4.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas, a Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Por se tratar de um fluorocromo catiônico (positivo), ele é atraído pelo potencial elétrico negativo da membrana mitocondrial, incorporando-se ao seu interior e emitindo uma fluorescência vermelha. Alterações voltadas à integridade mitocondrial são detectadas por meio do aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, o que indica uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada por intermédio do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (Johnson; Walsh; Chen, 1980; O'Connor *et al.*, 1988).

Em relação ao ensaio descrito, foram utilizadas a concentração de 5 vezes a IC50 do BaspV e as concentrações de antiveneno de 2000 e 4000µg/mL. Inicialmente, ocorreu a pré-incubação do veneno com os antivenenos, durante 1 hora, a 37°C, em seguida, houve o tratamento das células, por 24 horas. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/mL) por 30min para, depois, ser processado em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD Biosciences) com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

Os resultados dos ensaios de DCFH-DA e da Rodamina foram expressos como intensidade relativa de fluorescência (IRF), obtida a partir dos valores absolutos de intensidade de fluorescência, que foram calculados como uma média geométrica e o valor 1,0 atribuído ao controle. As médias dos demais grupos receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples.

4.5 Modelo Experimental: *in vivo*

Buscando avaliar as possíveis alterações induzidas pelo antiveneno formulado ou não com sacarose e as vias que podem caracterizar sinais de toxicidade ou danos associados, foi utilizado o seguinte desenho experimental: Camundongos swiss fêmeas, pesando entre 16-18 gramas, foram divididas aleatoriamente em quatro grupos, com 10 animais cada, que foram avaliados nos tempos de 1, 3 e 6 horas (Quadro 6).

Em cada grupo, administrou-se, por via intravenosa (IV), o volume de soro necessário para neutralizar 4 vezes a DL50 estimada para o veneno referência da serpente *Bothrops asper* (73,2 μ g de veneno / camundongo de 16-18 gramas). Segundo as especificações de uso do antiveneno, 1 mL é capaz de neutralizar 3 mg de veneno referência da serpente *Bothrops asper* (BaspV). Desta forma, foi administrado um volume de 97,6 μ L de antiveneno sem sacarose ou com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5% e, para o grupo controle, administrou-se apenas solução salina. Após administração dos antivenenos, aguardou-se, para cada grupo específico, os intervalos de 1, 3 e 6 horas (Figura 10).

Por último, os animais foram anestesiados com Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (8mg/Kg), seguida das coletas de amostras biológicas: urina (punção direta da bexiga) e rim, que foram encaminhadas para as demais análises. O modelo experimental descrito foi baseado nos ensaios de neutralização da atividade letal de venenos com base nos antivenenos e teve como via de administração utilizada a IV (Araujo *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2014; Jorge; Ribeiro, 1997; Kohl *et al.*, 2020; Solano *et al.*, 2010).

Para realização de ensaios de toxicidade aguda, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation

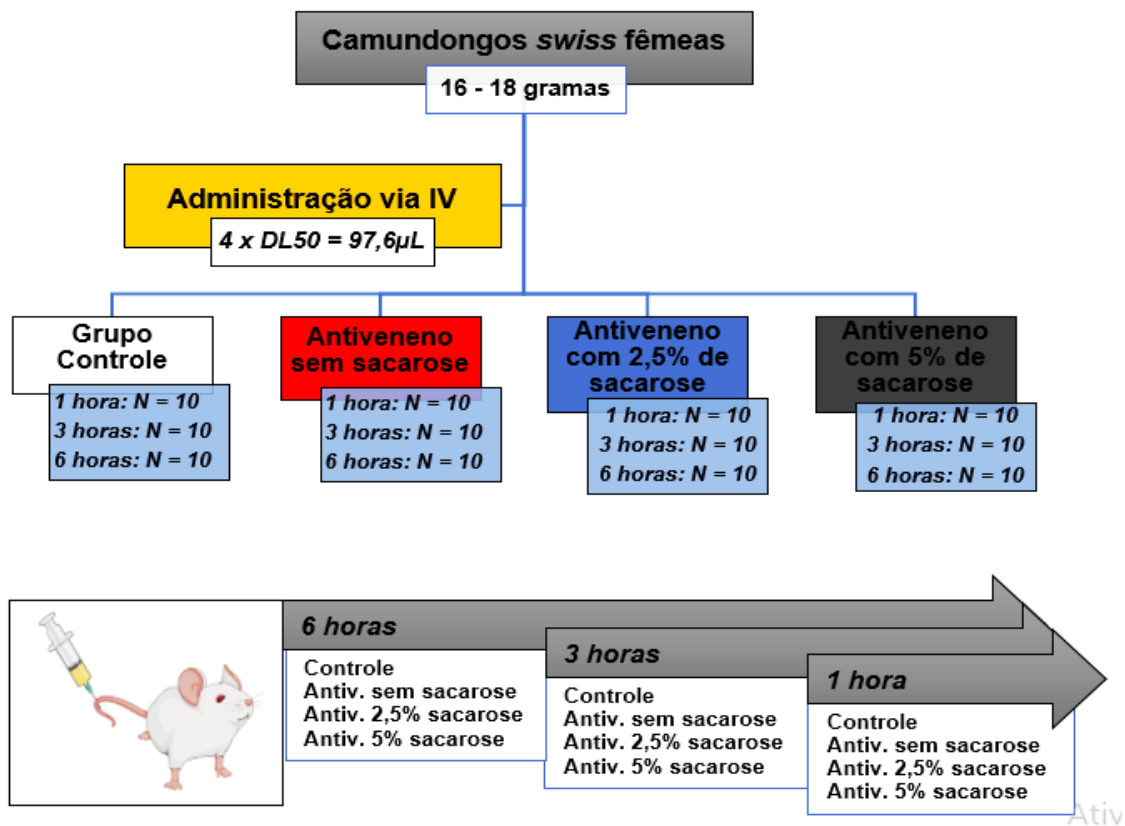
and Development; OECD) recomenda, em suas diretrizes, que sejam utilizados camundongos ou ratos fêmeas (OECD, 2000).

Quadro 6 – Grupos experimentais em função do tempo

Grupo Experimental (N=10)	Tempos Avaliados		
Controle Salina	1 hora	3 horas	6 horas
Antiveneno formulado sem sacarose	1 hora	3 horas	6 horas
Antiveneno formulado com 2,5% de sacarose	1 hora	3 horas	6 horas
Antiveneno formulado com 5% de sacarose	1 hora	3 horas	6 horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Desenho experimental utilizado no estudo no modelo *in vivo*



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1 Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo

Para as metodologias descritas a seguir, foram utilizadas amostras de rins coletados dos camundongos, como descrito na subseção 4.5. Para tanto, foi padronizado o rim direito de todos os animais.

4.5.1.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram avaliados para estimar as defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método, descrito a seguir, é baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzóico)) com grupos tiol livres, o qual é usado para analisar a atividade da GSH em amostras teciduais. Assim, o DTNB reage com GSH formando o 2-nitro-5-mercaptop-benzoico (TNB) de cor amarela. Em primeiro lugar, os homogenatos de rim foram homogenizados com tampão fosfato (10% v/v) e adicionados (65,5µL) a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (5000 rpm/15 min/4°C), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e misturado com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Os níveis de GSH foram determinados usando um espectrofotômetro em 412 nm e calculados com base em uma curva padrão de glutathiona e expressos como µg de GSH/g de tecido (Sedlak; Lindsay, 1968).

4.5.1.2 Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dos principais componentes celulares afetados pelo estresse oxidativo é a membrana celular, que sofre um processo de peroxidação lipídica. O método, a seguir, se baseia na mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos homogenatos. Em primeiro lugar, as amostras de tecido renal foram homogenizadas com tampão fosfato (10% v/v), depois, 63µL desse homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, para, em seguida, as amostras serem centrifugadas (11000 rpm/15 min/4°C). Logo depois, 150 µL do sobrenadante foi recuperado e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que foi, então, aquecido em um banho a temperatura de 95°C, por 30 min. Após esse intervalo de tempo, as amostras foram resfriadas imediatamente em banho de gelo. A peroxidação lipídica foi determinada, utilizando um espectrofotômetro em 535 nm, e foi expressa como µmol de TBARS/g de tecido (Ohkawa; Ohishi; Yagi, 1979).

4.5.1.3 Determinação dos níveis de nitrito

A molécula de óxido nítrico (NO) é extremamente tóxica e danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA. De forma indireta, a dosagem dos metabólitos dióxido de nitrogênio/nitrato (NO₂/NO₃) possibilita a quantificação da síntese de NO gerada. O homogenato foi preparado com tampão fosfato (10% v/v) e depois centrifugado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, e a produção de nitrito foi determinada com base na reação de Griess (Green; Tannenbaum; Goldman, 1981). Para isso, 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado aos 100µL do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado em temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 1,56 µmol a 100 µmol) sob as mesmas condições, e os brancos foram preparados pela adição de 100µL do reativo de Griess a 100µL do tampão usado para o homogenato. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro em 540 nm e foi expressa em µmol de nitrito/g de tecido úmido.

4.5.2 Determinação dos níveis urinários de KIM-1 e GGT

A determinação dos níveis de KIM-1 urinário foi feita utilizando um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) comercial (R&D Systems, Inc - Cat. DY1750, Minneapolis, MN). Assim, as placas foram sensibilizadas com o 100 µL/poço de anticorpo de captura (400 ng/mL) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Em seguida, cada placa foi lavada duas vezes com 400 µL de tampão de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS) e bloqueadas com 300 µL de BSA 1% em PBS durante 2 horas. Depois disso, 100 µL de padrão de KIM-1 recombinante humano (na faixa de 0-20 ng/mL) ou amostras de urina foram adicionados aos seus respectivos poços e incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

A placa foi lavada novamente, e 100 µL do anticorpo caprino anti-KIM-1 (400 ng/mL) foram adicionados a cada poço, com a placa sendo novamente incubada durante 2 horas em temperatura ambiente. O passo de lavagem foi repetido, e, após isso, 100 µL de estreptavidina-HRP foram adicionados a cada poço

e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. depois da lavagem, 100 µL da solução de substrato (TMB Peroxidase ELISA Substrate, BIORAD) foram adicionados e incubados em temperatura ambiente durante 7 minutos. A reação foi parada com adição de 100 µL de solução de parada (H₂SO₄ 0,1 N) em todos os poços. A absorbância foi medida a 450 nm com correção de absorbância a 540 nm. A concentração de KIM-1 foi calculada com base na curva padrão e expressa em termos absolutos em pg/mL.

Já os níveis de γ -glutamil transferase (γ -GT ou GGT) foram realizados utilizando kits comerciais (BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

4.5.3 Análise histológica

Ao final de cada experimentação, utilizando o modelo *in vivo*, foi retirado um fragmento longitudinal de rim direito, o qual foi armazenado inicialmente em formol 10% por 24h, seguido de armazenamento em álcool 70% até o processamento e a análise histológica.

Depois da fixação dos tecidos em formol tamponado a 10% de 24 a 48 horas, os fragmentos dos tecidos foram processados para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe®, modelo PT09 (histotécnico) e, então, desidratados em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, o material foi incluído em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi, então, cortado em espessura de 5 µm e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração.

Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram ainda coradas com hematoxilina e eosina (HE), e a análise histopatológica foi realizada de forma cega e, posteriormente, registrada por meio de fotomicrografias com o auxílio de um microscópio óptico vertical motorizado com epifluorescência Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0.

4.5.4 Análise proteômica do tecido renal

Para a metodologia descrita a seguir, foram utilizadas apenas as amostras obtidas para o tempo de 6 horas e as análises executadas, comparando os grupos tratados com antiveneno, contendo ou não sacarose, ao grupo controle não tratado.

4.5.4.1 Extração, quantificação e digestão das proteínas

Foram preparados *pools* amostrais, contendo fragmentos de rins de camundongo em cada grupo experimental, com cerca de 4 x 4 mm. Assim, a cada 20 mg de rim foram adicionados duzentos microlitros (200 μ L) do tampão de lise (Ureia 8 M, NaCl 75 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, MgCl₂ 2 mM, Inibidor de Protease Roche 1x, Benzonase 1 U). Então, as amostras foram submetidas ao equipamento Sonics Vibra-Cell VCX-600 Ultrasonic Processor, utilizando 5 pulsos de 1 minuto (25 kHz de potência/20% amplitude) com intervalo de 1 minuto entre os pulsos. Ao final deste processo de extração mecânica, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos e os sobrenadantes foram coletados.

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o kit BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA) como proteína padrão. Em seguida, foram realizadas análises eletroforéticas em condições redutoras e desnaturantes (SDS-PAGE) a fim de observar a qualidade/viabilidade das amostras proteicas. Esse procedimento foi realizado de acordo com Laemmli (1970).

Posteriormente, 50 μ g de proteínas totais de cada amostra foram diluídas em 60 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e, em seguida, 25 μ L do surfactante Padrão RapiGest SF (código 186001861, Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Depois disso, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima: amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10 μ L de ácido fórmico 5% (v/v).

As amostras foram encubadas por 90 minutos em temperatura ambiente, e, posteriormente, centrifugadas a 14.000xg a 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos trípticos, contidos em cada amostra, foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (código 5188-2750 Agilent Technologies), segundo as recomendações do fabricante.

4.5.4.2 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado a um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: a) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e b), ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30µm x 5mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e dessalinizados em um gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos a um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur (C18-AQ, 3µm, 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando sequencialmente um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% a 90%B por 1 min, mantido a 90%B por 5 minutos e reequilibrado a 4%B por 20 minutos a um fluxo de 300 nL/min.

A ionização foi obtida a partir de uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi a ionização positiva com base no método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 a m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

4.5.4.3 Análise dos dados

Os dados brutos de espectrometria de massas, no formato RAW, foram submetidos ao software PatternLab [versão 4.0.0.84] (Carvalho *et al.*, 2016) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nessa ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (Taxonomy *Mus musculus*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (False Discovery Rate) máxima foi considerada de $\leq 1\%$.

Uma matriz compatível com o programa MetaboAnalyst 4.0® (<https://www.metaboanalyst.ca/>) foi construída a partir dos dados proteômicos utilizando as contagens espectrais de cada proteína identificada, as quais foram normalizadas para cada proteína pela média ponderada das triplicatas técnicas de cada amostra (Chong *et al.*, 2018). Proteínas que foram identificadas em menos de 40% das amostras foram excluídas da análise. Análises de *Partial Least Squares* (PLS) foram utilizadas como o principal método de análise multivariada. Apenas os sinais presentes em 80% das amostras foram considerados para a geração dos modelos estatísticos. Assim, para cada amostra (grupo) comparada ao controle, foram calculados o *fold change* (FC / \log_2 -Fc) com base nos resultados obtidos pelo software MetaboAnalyst, utilizando o teste t ($p \leq 0,05$) para comparar as abundâncias médias de proteínas entre cada dois grupos experimentais analisados.

As proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento por meio da classificação de Ontologia Genética (*Gene Ontology* - GO), tais como: “função molecular”, “processo biológico” e “componente celular” utilizando a ferramenta de bioinformática Panther.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química das formulações finalizadas

Tabela 2 – Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado sem sacarose

Antiveneno sem sacarose	
Produto em pó	
Aparência	Branco, compacto, homogêneo, cristalino e conserva seu volume original.
Produto Reconstituído	
pH	7.04 ± 0.04
Sacarose	-
Total de Proteínas	3,88 ± 0,05 g/dL
Cloreto de Sódio	0,355 ± 0,000 g/dL
Endotoxinas Bacterianas	≤3 UE/ml
Aparência	Líquido Translúcido
Porcentagem de Monômeros	91.82%

Fonte: Elaborado pelo autor, com base nos resultados fornecidos pelo ICP.

Tabela 3 – Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado com 2,5% de sacarose

Antiveneno com 2,5% de sacarose	
Produto em pó	
Aparência	Branco, compacto, homogêneo, cristalino e conserva seu volume original.
Produto Reconstituído	
pH	7,06 ± 0,02
Sacarose	2,5%
Total de Proteínas	3,78 ± 0,09 g/dL
Cloreto de Sódio	0,337 ± 0,000g/dL
Endotoxinas Bacterianas	≤3 UE/ml
Aparência	Líquido Translúcido
Porcentagem de Monômeros	91.94 %

Fonte: Elaborado pelo autor, com base nos resultados fornecidos pelo ICP.

Tabela 4 – Perfil físico-químico da formulação liofilizada e reconstituída do antiveneno formulado com 5% de sacarose

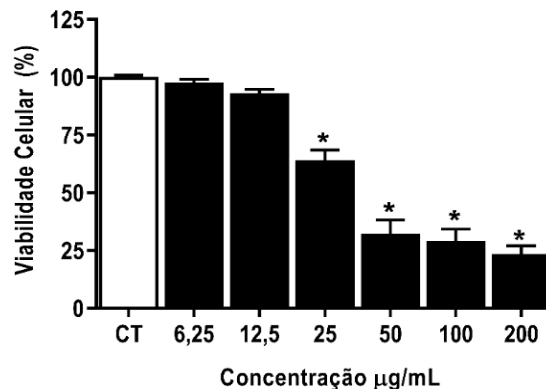
Antiveneno com 5% de sacarose	
Produto em pó	
Aparência	Branco, compacto, homogêneo, cristalino e conserva seu volume original.
Produto Reconstituído	
pH	7,15 ± 0,02
Sacarose	5%
Total de Proteínas	3,73 ± 0,03 g/dL
Cloreto de Sódio	0,331 ± 0,000 g/dL
Endotoxinas Bacterianas	≤3 UE/ml
Aparência	Líquido Translúcido
Porcentagem de Monômeros	90.25%

Fonte: Elaborado pelo autor, com base nos resultados fornecidos pelo ICP.

5.2 Viabilidade celular para linhagem LLC-MK2

Quando submetidas a concentrações crescentes do veneno total de *Bothrops asper*, a viabilidade das células LLC-MK2 diminuiu a partir da concentração de 25µg/mL, com uma IC50 estimada em 42,76µg/mL.

Figura 11 – Viabilidade de células LLC-MK2 após tratamento com veneno de *B. asper*, relação concentração-resposta da citotoxicidade e determinação da IC50 para esta linhagem celular



Os resultados são mostrados como média ± EPM. *p < 0,05 comparado ao grupo controle (CT) células viáveis não tratadas com veneno. Foi utilizado one-away - ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Percentual de viabilidade em células tubulares renais LLC-MK2 diante do veneno total de *B. asper*

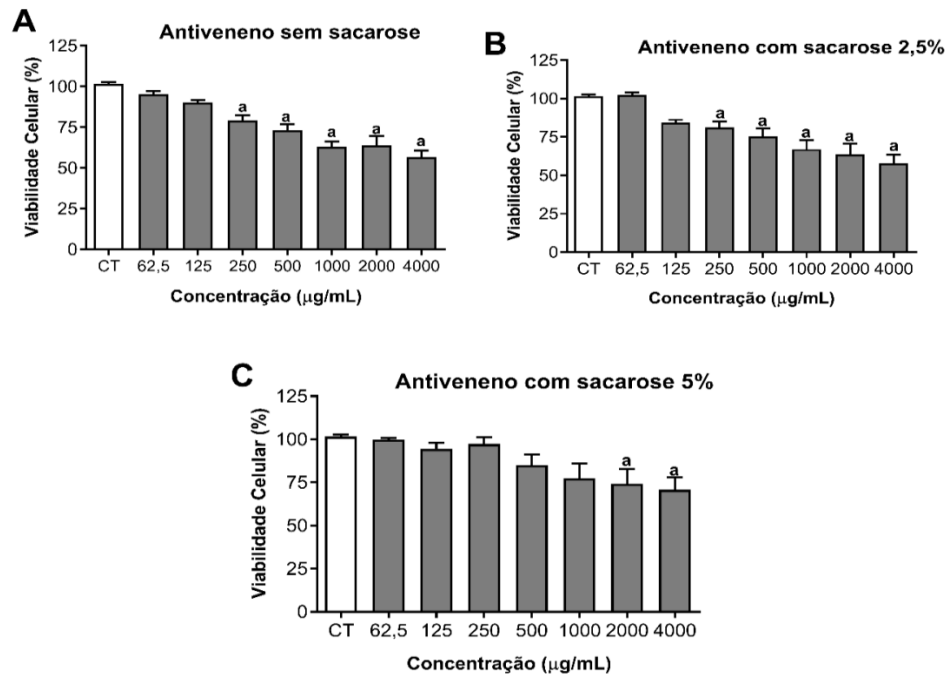
Porcentagem de Viabilidade Celular (%) – Concentração µg/mL						
CT *	6,25	12,5	25	50	100	200
100,0 ± 0,86	97,62 ± 1,48	93,16 ± 1,62	63,96 ± 4,54*	32,22 ± 6,0*	29,27 ± 5,04*	23,35 ± 3,68*

Os resultados são mostrados como média ± EPM. * p < 0,05 comparado ao grupo controle (CT) células viáveis não tratadas com veneno. Foi utilizado one-away - ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet. Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de encontrar concentrações que demonstrassem toxicidade dos antivenenos, células tubulares do tipo LLC-MK2 foram expostas a concentrações maiores de antiveneno (62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000µg/mL) e avaliadas em relação à viabilidade celular valendo-se do ensaio do MTT. Assim, para o antiveneno sem sacarose e com sacarose 2,5%, a viabilidade diminuiu a partir das concentrações de 250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL, conforme mostra, na Figura 12, A e B, respectivamente. Quando se analisou o antiveneno contendo

sacarose na concentração de 5%, a viabilidade reduziu-se nas duas últimas concentrações 2000 e 4000 µg/mL (ver C na Figura 12).

Figura 12 – Avaliação da viabilidade das células tubulares renais LLC-MK2 diante de antivenenos formulados com ou sem sacarose



Os resultados são mostrados como média ± EPM. "a" $p < 0,05$ comparado aos grupos controle (CT) células viáveis não tratadas com antiveneno. Para análise estatística, foi utilizado one-away - ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Percentual de viabilidade das células tubulares renais LLC-MK2 diante de antivenenos formulados com ou sem sacarose

%Viabilidade Celular – Concentração (µg/mL)							
Antiveneno formulado sem sacarose							
CT ^a	62,5	125	250	500	1000	2000	4000
101,7± 1,02	95,32± 1,98	90,03± 1,75	79,33± 3,03 a	73,06± 4,02 a	62,97± 3,49 a	63,79± 5,97 a	56,73± 3,89 a
Antiveneno formulado com 2,5% de sacarose							
CT ^a	62,5	125	250	500	1000	2000	4000
101,7± 1,02	102,4± 1,50	84,21± 1,94	81,13± 4,00 a	75,33± 5,31 a	67,01± 5,98 a	63,77± 6,83 a	57,91± 5,71 a
Antiveneno formulado com 5% de sacarose							
CT ^a	62,5	125	250	500	1000	2000	4000
101,7± 1,02	99,81± 0,84	94,42± 3,56	97,26± 3,93	85,15± 6,09	77,21± 8,71	74,20± 8,68 a	70,76± 7,10 a

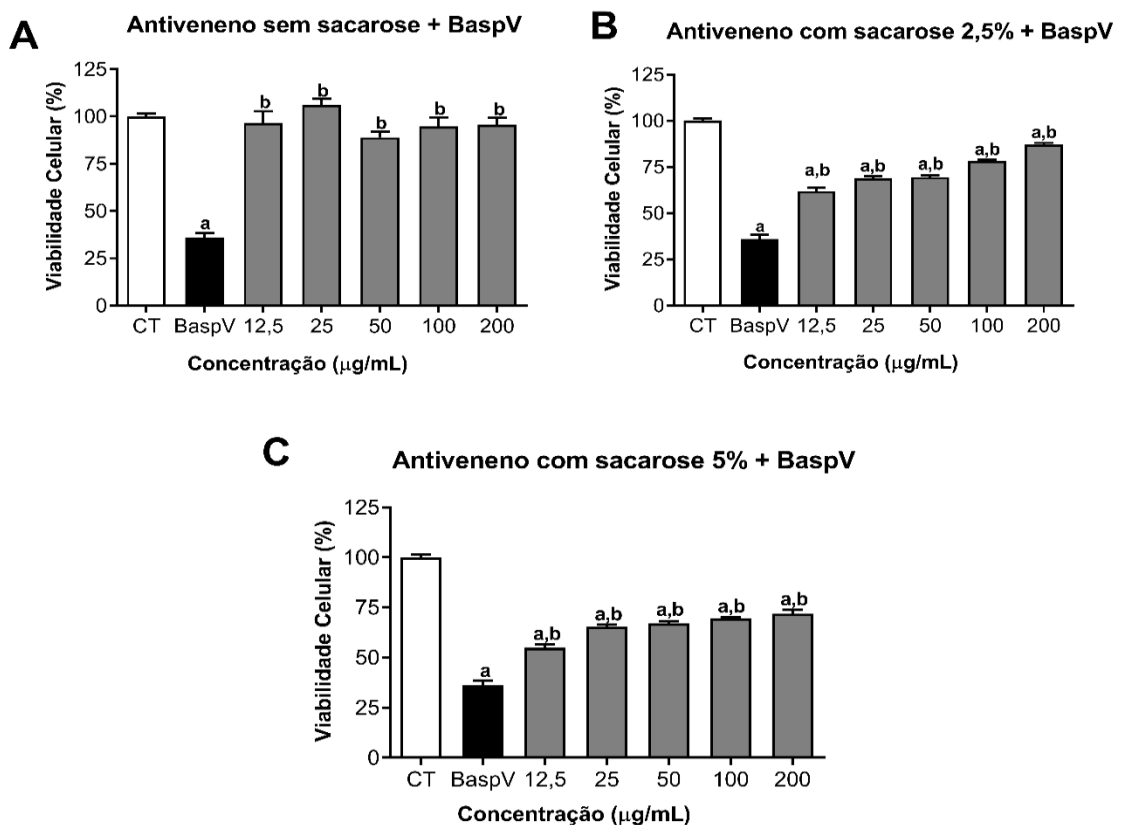
Os resultados são mostrados como média ± SEM. "a" $p < 0,05$ comparado aos grupos controle (CT) células viáveis não tratadas com antiveneno. Para análise estatística, foi utilizado one-away - ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Bloqueio do veneno total diante dos antivenenos

Para o ensaio de bloqueio do veneno total de *B. asper* (BaspV), empregou-se uma concentração estimada de 5 x IC50, que foi previamente incubada com os antivenenos formulados com ou sem sacarose, em células do tipo LLC-MK2.

Assim, observou-se que o antiveneno sem sacarose foi capaz de manter a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (ver A na Figura 13). Quando se analisa os grupos antiveneno formulados com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5%, incubados com veneno total de *B. asper*, é possível observar que foram capazes também de aumentar a viabilidade perante o veneno total, ainda que não se comparem ao grupo controle (ver B e C na Figura 13).

Figura 13 – Ensaio de viabilidade celular, diante do bloqueio do veneno total de *B. asper* (5 x IC50) utilizando os antivenenos formulados com 2,5% e 5% de sacarose



Os resultados são mostrados como média \pm SEM. "a" $p < 0,05$ comparado aos grupos controle (CT) células viáveis não tratadas. "b" $p < 0,05$ quando comparadas ao grupo BaspV (5 x IC50). Para análise estatística, foi utilizado one-way - ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Percentual de viabilidade celular, diante do bloqueio do veneno total de *B. asper* (5xIC50) utilizando os antivenenos formulados sem ou com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5%

% Viabilidade celular diante do bloqueio - Concentração (µg/mL)						
Antiveneno formulado sem sacarose						
CT^a	BaspV^b	12,5	25	50	100	200
99,97 ± 1,46	36,05 ± 2,44 a	96,39 ± 6,26 b	106,0 ± 3,53 b	88,92 ± 2,86 b	94,90 ± 4,617 b	95,58 ± 3,60 b
Antiveneno formulado com 2,5% de sacarose						
CT^a	BaspV^b	12,5	25	50	100	200
99,97 ± 1,46	36,05 ± 2,44 a	61,98 ± 1,94 a,b	68,76 ± 1,38 a,b	69,51 ± 1,10 a,b	78,37 ± 0,49 a,b	87,22 ± 0,90 a,b
Antiveneno formulado com 5% de sacarose						
CT^a	BaspV^b	12,5	25	50	100	200
99,97 ± 1,47	36,05 ± 2,44 a	54,90 ± 1,64 a,b	65,53 ± 0,74 a,b	66,88 ± 1,25 a,b	69,66 ± 0,43 a,b	71,84 ± 2,06 a,b

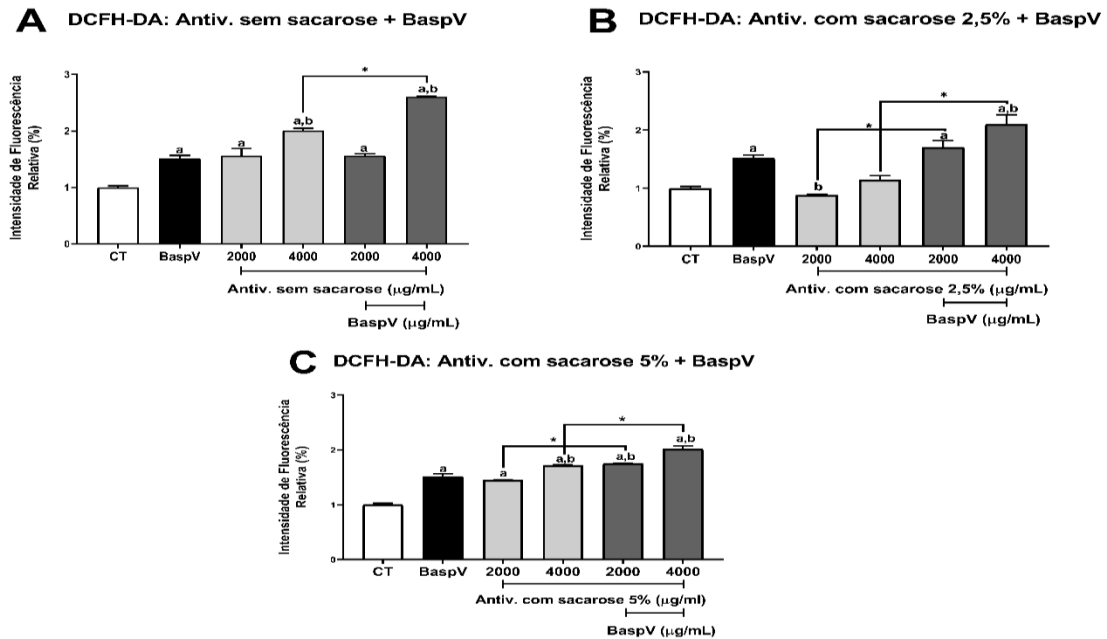
Os resultados são mostrados como média ± EPM. “a” p < 0,05 comparado aos grupos controle (CT) células viáveis não tratadas. “b” p < 0,05 quando comparadas ao grupo BaspV (5 x IC50). Para análise estatística, foi utilizado one-away - ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Produção de espécies reativas do oxigênio citoplasmáticas por meio do DCFH-DA

Ao serem analisados os três antivenenos separados, foi observado que, em termos de Intensidade de Fluorescência Relativa (IFR), quando comparados ao grupo controle, o grupo BaspV (5 x IC50) foi capaz de aumentar a produção de ERO em média 50% no interior da célula, para os três ensaios, utilizando os antivenenos sem sacarose e com sacarose nas concentrações de 2,5% e 5% (ver A, B e C na Figura 14).

Para o antiveneno sem sacarose em relação ao controle, nas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, a produção de ERO aumentou em média 55 e 100% respectivamente. Para os grupos bloqueio, antiveneno sem sacarose mais BaspV, nas concentrações de 2000 e 4000µg/mL, os aumentos foram em média de 56 e 160%, respectivamente. Quando comparados ao grupo BaspV, o antiveneno sem sacarose não apresentou diferença significativa na concentração de 2000 µg/mL, aumentando em média 50% para a concentração de 4000 µg/mL. No grupo bloqueio, antiveneno sem sacarose + BaspV, não houve diferença significativa em relação ao BaspV para 2000 µg/mL, mas, para 4000 µg/mL, o aumento foi em média de 110% (ver A na Figura 14).

Figura 14 – Produção de ERO citoplasmáticas em células renais tubulares do tipo LLC-MK2 por meio do ensaio utilizando o DCFH-DA, para o veneno total de *Bothrops asper* e os antivenenos formulados com ou sem sacarose



Os dados são expressos como intensidade de fluorescência relativa (IRF) ao controle \pm EPM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. “a” $p < 0,05$ em relação ao controle (CT). “b” $p < 0,05$ em relação ao grupo BaspV. “*” $p < 0,05$ mostra diferença entre as mesmas concentrações em grupos diferentes (Antiv. e Antiv+BaspV). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Percentual de ERO citoplasmáticas em células renais tubulares do tipo LLC-MK2 por meio do ensaio utilizando o DCFH-DA, para o veneno total de *Bothrops asper* e antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose

Intensidade de Fluorescência Relativa (IRF)					
		2000 $\mu\text{g/mL}$	4000 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$	4000 $\mu\text{g/mL}$
Controle^a	BaspV^b	Antiv. sem sacarose		Antiv. sem sacarose + BaspV	
1,00 \pm	1,514 \pm	1,555 \pm	2,005 \pm	1,563 \pm	2,603 \pm
0,027	0,053 a	0,131 ^a	0,043 a,b,*	0,035 a	0,013 a,b*
Controle^a	BaspV^b	Antiv. com sacarose 2,5%		Antiv. com sacarose 2,5% + BaspV	
1,00 \pm	1,514 \pm	0,885 \pm	1,143 \pm	1,706 \pm	2,097 \pm
0,027	0,054 a	0,010 b,*	0,075 *	0,110 a,*	0,163 a,b*
Controle^a	BaspV^b	Antiv. com sacarose 5%		Antiv. com sacarose 5% + BaspV	
1,00 \pm	1,514 \pm	1,448 \pm	1,718 \pm	1,754 \pm	2,107 \pm
0,027	0,053 a	0,004 a,*	0,010 a,b*	0,006 a,b*	0,054 a,b*

Os dados são expressos como intensidade de fluorescência relativa (IRF) ao controle \pm EPM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. “a” $p < 0,05$ em relação ao controle (CT). “b” $p < 0,05$ em relação ao grupo BaspV. “*” $p < 0,05$ mostra diferença entre as mesmas concentrações em grupos diferentes (Antiv. e Antiv+BaspV). Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o antiveneno com 2,5% de sacarose em relação ao controle, nas concentrações de 2000 e 4000 $\mu\text{g/mL}$, a produção diminuiu em média 12% e aumentou 15%, respectivamente, os níveis de ERO. Quando comparados ao grupo

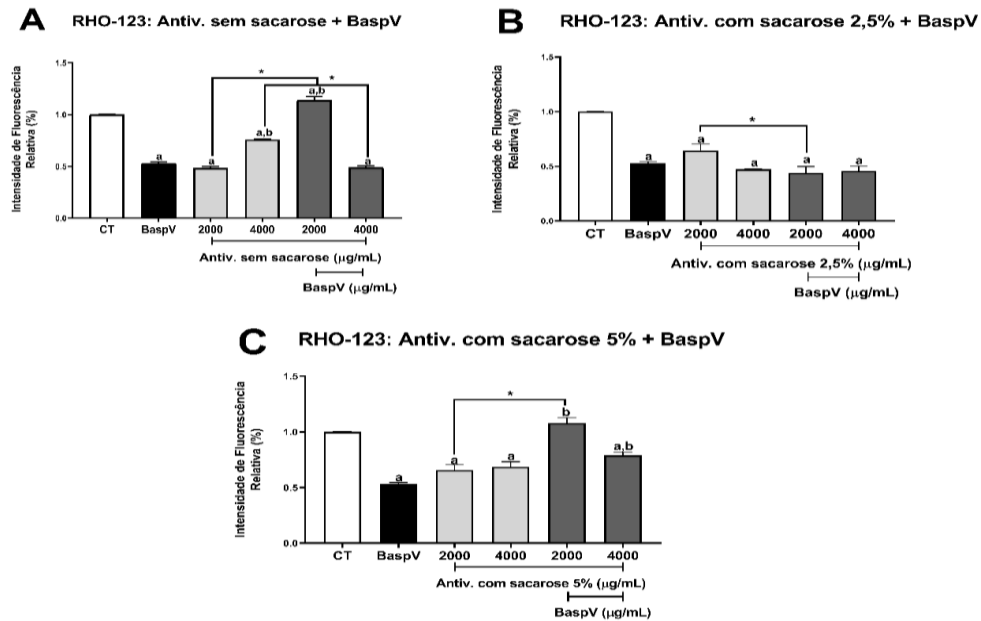
BaspV, o antiveneno com 2,5% de sacarose, nas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, provoca uma diminuição na produção de ERO de 142% e 37%, respectivamente. No grupo bloqueio, antiveneno com 2,5% de sacarose + BaspV, para as concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, houve um aumento de 20 e 58%, respectivamente, na produção de ERO em relação ao BaspV isolado (ver B na Figura 14).

Para o grupo antiveneno com 5% de sacarose, nas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, houve um aumento em média de 44 e 15%, respectivamente, na produção de ERO em relação ao controle. Já para os grupos bloqueio, antiveneno com 5% de sacarose mais BaspV, nas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, os aumentos foram em média de 75 e 110%, respectivamente. Quando comparados ao grupo BaspV, o antiveneno com sacarose 5%, nas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, promove uma diminuição na produção de ERO de 7% e um aumento de 20%, respectivamente. No grupo bloqueio antiveneno com 5% de sacarose + BaspV, para as concentrações de 2000 e 4000 µg/mL, houve um aumento de 24 e 59% na produção de ERO em relação ao BaspV isolado (ver C na Figura 14).

5.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A presença do BaspV incubado com as células LLC-MK2 ocasiona uma diminuição do potencial mitocondrial em mais de 50%, quando comparados ao grupo controle. As concentrações de antiveneno isolados também causam a diminuição do potencial nos três grupos em estudo, com porcentagem IRF variando tanto com a concentração (2000 ou 4000 µg/mL) quanto com o tipo de antiveneno. Quando se analisa os grupos em que foram incubados veneno mais antiveneno, é possível notar que, para os grupos antiveneno sem sacarose e com 5% de sacarose (A e C na Figura 15, respectivamente), a concentração de 2000 µg/mL para o antiveneno incubados com BaspV aproximou ou igualou os valores do potencial de membrana aos valores encontrados para o grupo controle. O mesmo efeito foi observado para a grupo antiveneno com 5% de sacarose, concentração de 4000 µg/mL incubado com o BaspV (ver C na Figura 15).

Figura 15 – Potencial transmembrânico mitocondrial em células tubulares renais LLC-MK2, submetidas à ação do veneno total de *Bothrops asper* e do antiveneno formulado com ou sem sacarose



Os dados são expressos como intensidade de fluorescência relativa (IRF) ao controle \pm EPM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. "a" $p < 0,05$ em relação ao controle (CT). "b" $p < 0,05$ em relação ao grupo BaspV. "*" $p < 0,05$ em relação à mesma concentração, porém em grupos diferentes (Antiv. e Antiv. + BaspV). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Potencial transmembrânico mitocondrial em células tubulares renais LLC-MK2, submetidas à ação do veneno total de *Bothrops asper* e do antiveneno formulado com ou sem sacarose

Intensidade de Fluorescência Relativa (IRF)					
		2000 $\mu\text{g/mL}$	4000 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$	4000 $\mu\text{g/mL}$
Controle ^a	BaspV ^b	Antiv. sem sacarose		Antiv. sem sacarose + BaspV	
1,00 \pm 0,002	0,531 \pm 0,014 a	0,485 \pm 0,013 a,*	0,758 \pm 0,006 a,b,*	1,140 \pm 0,036 a,b,*	0,489 \pm 0,014 a,*
Controle ^a	BaspV ^b	Antiv. com sacarose 2,5%		Antiv. com sacarose 2,5% + BaspV	
1,00 \pm 0,002	0,531 \pm 0,014 a	0,645 \pm 0,060 a,*	0,472 \pm 0,005 a	0,440 \pm 0,058 a,*	0,457 \pm 0,045 a
Controle ^a	BaspV ^b	Antiv. com sacarose 5%		Antiv. com sacarose 5% + BaspV	
1,00 \pm 0,002	0,531 \pm 0,014 a	0,656 \pm 0,049 a,*	0,685 \pm 0,046 a	1,080 \pm 0,05 b,*	0,788 \pm 0,030 a,b

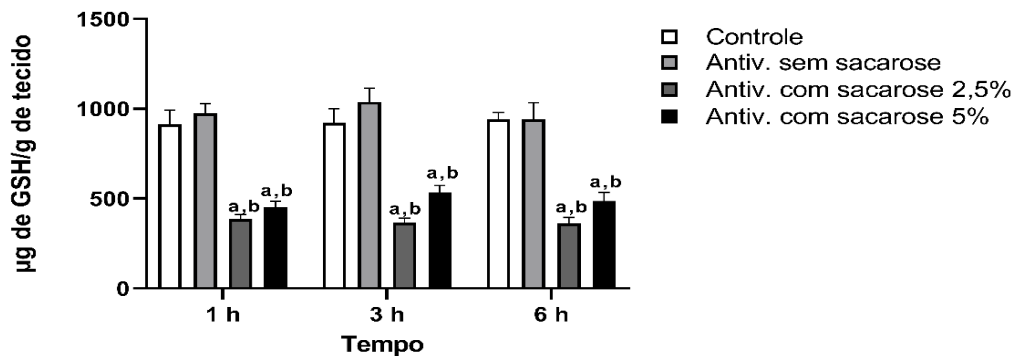
Os dados são expressos como intensidade de fluorescência relativa (IRF) ao controle \pm EPM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. "a" $p < 0,05$ em relação ao controle (CT). "b" $p < 0,05$ em relação ao grupo BaspV. "*" $p < 0,05$ em relação à mesma concentração, porém em grupos diferentes (Antiv. e Antiv. + BaspV). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo *in vivo*

5.6.1 Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

O ensaio de dosagem do GSH é uma ferramenta utilizada para avaliar o desequilíbrio redox em tecidos vivos. De acordo com a Figura 16, os níveis de GSH foram reduzidos, no tecido renal, nos grupos tratados com o antiveneno formulado com sacarose (2,5% e 5%), nos três tempos observados, quando comparados ao grupo controle (salina) e ao grupo antiveneno formulado sem sacarose.

Figura 16 – Níveis de glutathiona reduzida em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose



Os dados são expressos em μg de GSH por grama de tecido \pm EPM (N = 10). Para análise, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo Antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$). "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Níveis de GSH em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com sacarose ou sem sacarose

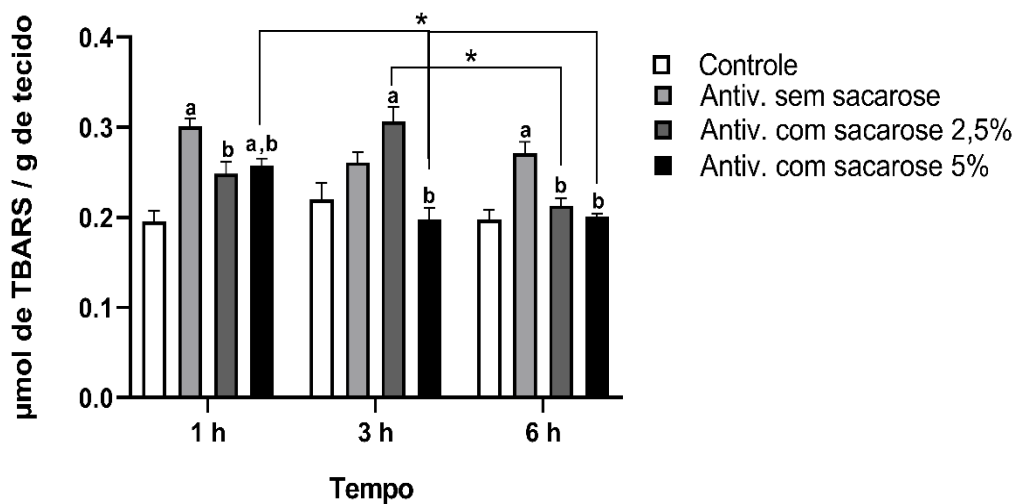
Tempo	GSH - $\mu\text{g/g}$ de tecido renal			
	Controle ^a	Antiv. sem sacarose ^b	Antiv. com sacarose 2,5%	Antiv. com sacarose 5%
1 Hora	914,62 \pm 78,35	974,61 \pm 54,57	386,74 \pm 25,53 a,b	452,36 \pm 32,06 a,b
3 Horas	920,78 \pm 79,89	1038,08 \pm 74,89	367,47 \pm 22,55 a,b	533,31 \pm 39,97 a,b
6 Horas	941,14 \pm 37,52	940,08 \pm 94,30	362,00 \pm 33,24 a,b	487,08 \pm 47,58 a,b

Os dados são expressos em μg de GSH por grama de tecido \pm EPM. Para análise, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$). "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

De acordo com a Figura 17, é possível observar que os níveis de TBARS em tecido renal aumentaram de forma significativa, quando comparados ao grupo controle, para os grupos: antiveneno formulado sem sacarose em 1 e 6 horas; antiveneno formulado com 5% de sacarose em 1 hora; e antiveneno formulado com 2,5% de sacarose em 3 horas.

Figura 17 – Níveis de TBARS em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno polivalente formulado com ou sem sacarose



Os dados são expressos em μmol de TBARS por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$); "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 – Níveis de TBARS em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com ou sem sacarose

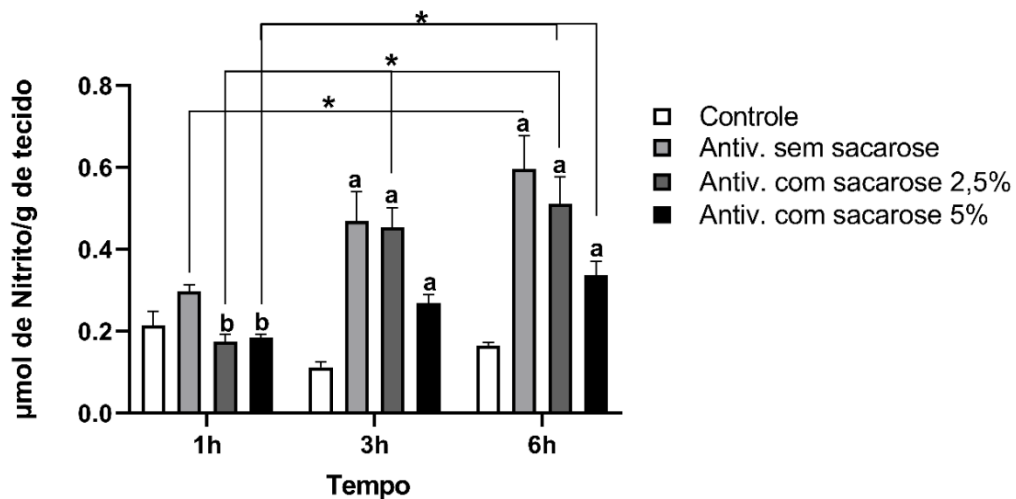
TBARS - $\mu\text{mol/g}$ de tecido renal				
Tempo	Controle ^a	Antiv. sem sacarose ^b	Antiv. com sacarose 2,5%	Antiv. com sacarose 5%
1 Hora	0,196 \pm 0,012	0,301 \pm 0,009 a	0,249 \pm 0,013 b	0,257 \pm 0,008 a,b,*
3 Horas	0,220 \pm 0,018	0,261 \pm 0,011	0,307 \pm 0,016 a,*	0,198 \pm 0,013 b,*
6 Horas	0,198 \pm 0,011	0,271 \pm 0,013 a	0,213 \pm 0,008 b,*	0,201 \pm 0,003 b,*

Os dados são expressos em μmol de TBARS por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$); "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.3 Níveis de nitrito

De acordo com a Figura 18, os níveis de nitrito, em tecido renal, aumentaram nos tempos de 3 e 6 horas para os três grupos de antivenenos, quando comparados ao grupo controle. Quando observados em função do tempo, houve alteração para os grupos tratados com antiveneno formulado sem sacarose de 1 a 6 horas e para os grupos tratados com antiveneno formulado com 2,5% e 5% de sacarose de 1 a 3 horas e 1 a 6 horas.

Figura 18 – Níveis de nitrito em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com ou sem sacarose



Os dados são expressos em μmol de nitrito por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$); "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 – Níveis de nitrito em tecido renal de camundongos tratados com antiveneno formulado com sacarose

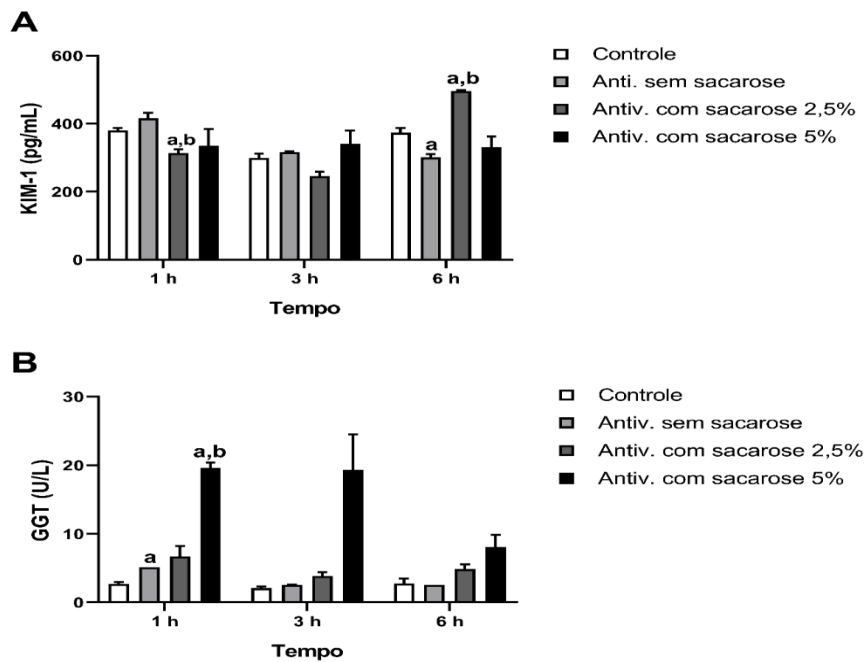
Tempo	Nitrito - $\mu\text{mol/g}$ de tecido renal			
	Controle ^a	Antiveneno sem sacarose	Antiveneno sacarose 2,5%	Antiveneno sacarose 5%
1 Hora	0,214 \pm 0,035	0,298 \pm 0,017 *	0,174 \pm 0,019 b,*	0,185 \pm 0,008 b,*
3 Horas	0,113 \pm 0,013	0,469 \pm 0,072 a	0,454 \pm 0,047 a,*	0,269 \pm 0,020 a,*
6 Horas	0,165 \pm 0,007	0,596 \pm 0,081a,*	0,511 \pm 0,066 a,*	0,337 \pm 0,033 a,*

Os dados são expressos em μmol de nitrito por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$); "*" está relacionado ao mesmo grupo em diferentes horas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Determinação dos marcadores bioquímicos

5.7.1 Molécula de injúria renal aguda (KIM-1) e gama glutamil transpeptidase urinária (GGT)

Figura 19 – KIM-1 (A) e GGT (B) urinário, em camundongos, administrados, por via endovenosa, com antiveneno polivalente formulado com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13 – Valores de KIM-1 e GGT urinário, em camundongos, administrados por via endovenosa com antiveneno polivalente estabilizado ou não com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo

Tempo	Controle	Antiv. sem sacarose	Antiv. com sacarose 2,5%	Antiv. com sacarose 5%
KIM -1 (pg/mL de urina)				
1 Hora	380,48 ± 6,79	415,54 ± 16,32*	313,53 ± 11,40 _{a,*}	335,92 ± 48,57
3 Horas	298,59 ± 12,93	316,02 ± 2,49	246,34 ± 12,93	340,90 ± 39,11
6 Horas	373,68 ± 13,59	301,09 ± 8,97 _a	496,41 ± 2,16 _a	330,95 ± 31,18
GGT (U/L de urina)				
1 Hora	2,695 ± 0,263	5,139 ± 0,010 _{a,*}	6,700 ± 1,546*	19,649 ± 0,749 _a
3 Horas	2,081 ± 0,249	2,562 ± 0,015	3,865 ± 0,576	19,327 ± 5,186
6 Horas	2,771 ± 0,688	2,570 ± 0,004	4,896 ± 0,631	8,053 ± 1,839

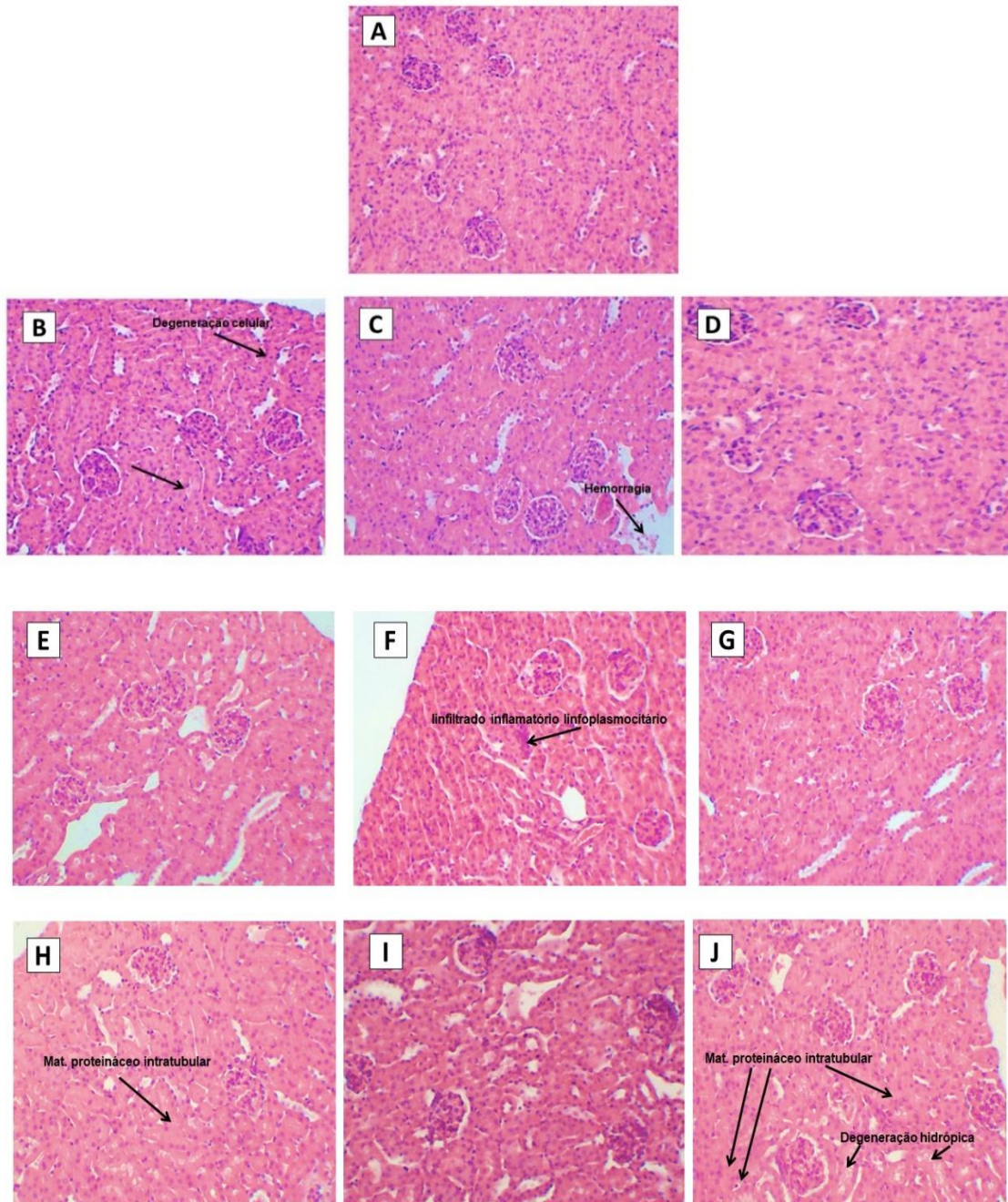
Os dados são expressos em pg/mL (KIM-1) e U/L (GGT) ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. "a" está relacionado ao grupo controle ($p < 0,05$); e "b" está relacionado ao grupo antiveneno sem sacarose ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Análise histológica

Os cortes histológicos de rim de camundongos, tratados com antiveneno formulados ou não com sacarose (2,5% e 5%) e o grupo controle (salina), foram observados no aumento de 200X utilizando um Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software 4.0, coloração Hematoxilina-Eosina.

As análises do tecido renal apresentaram, para todos os grupos, as arquiteturas teciduais preservadas. Para o grupo controle (salina), observou-se apenas degeneração hidrópica do epitélio tubular no córtex, de forma discreta. O grupo referente ao antiveneno sem sacarose apresentou presença discreta de degeneração hidrópica epitelial nos túbulos corticais, hemorragia e descolamento celular da membrana basal, possivelmente devido a uma má preservação tecidual durante a fixação. Já o grupo referente ao antiveneno com 2,5% de sacarose apresentou presença de material proteináceo intratubular no tempo de 1 hora e focos inflamatórios linfoplasmocitários discretos na medula nos tempos de 3 e 6 horas. O grupo antiveneno com 5% de sacarose apresentou degeneração hidrópica, variando de discreta à moderada no epitélio tubular em todos os tempos avaliados, e focos inflamatórios linfoplasmocitários na pelve associados a focos de hemorragia discretos no tempo de 6 horas.

Figura 20 – Fotomicrografias de rim de camundongos tratados, por via endovenosa, com antiveneno polivalente estabilizado ou não com sacarose, avaliados em diferentes intervalos de tempo



Grupo Controle (A), antiveneno formulado sem sacarose nos tempos de 1 hora (B), 3 horas (C) e 6 horas (D) apresentaram discreta de degeneração hidrópica epitelial nos túbulos corticais, hemorragia e descolamento celular da membrana basal; Grupo antiveneno formulado com 2,5% de sacarose nos tempos de 1 hora (E), 3 horas (F) e 6 horas (G) apresentaram presença de material proteináceo intratubular. Nos tempos de 3 e 6 horas, evidenciou-se focos inflamatórios linfoplasmocitários discretos na medula. Grupo antiveneno formulado com 5% de sacarose nos tempos de 1 hora (H), 3 horas (I) e 6 horas (J) apresentaram degeneração hidrópica variando de discreta à moderada no epitélio tubular e focos inflamatórios linfoplasmocitários na pelve associados à focos de hemorragia discretas (6 horas). Coloração Hematoxilina-Eosina, aumento de 200X. Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software 4.0. Fonte: Elaborado pelo autor.

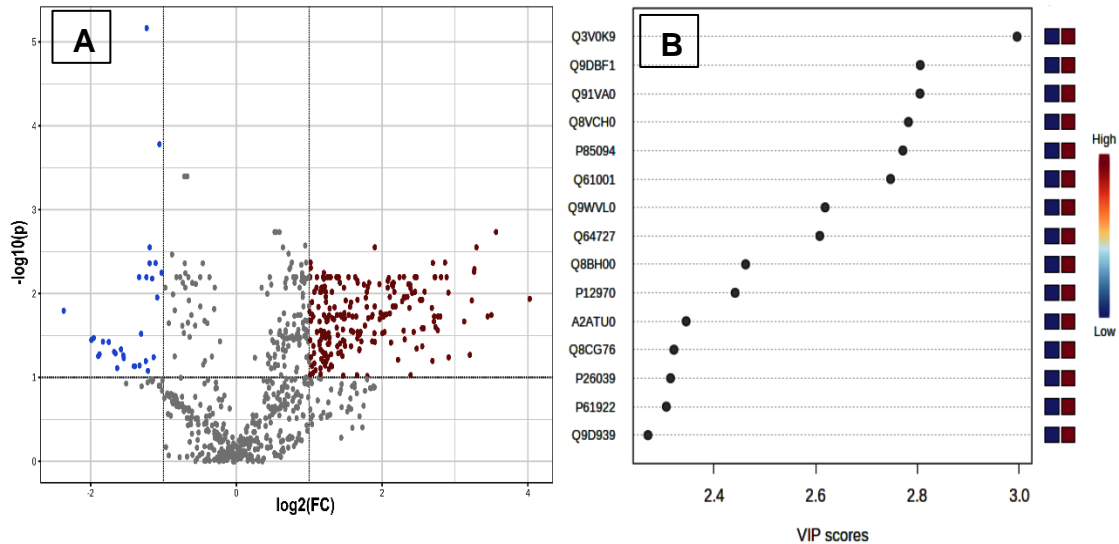
5.9 Análise proteômica do tecido renal

Para os dados proteômicos, as proteínas de cada grupo foram identificadas e quantificadas. A análise foi realizada para todos os grupos em estudo do modelo *in vivo* (controle e antivenenos, para o tempo de 6 horas). Após as análises, foram identificadas as proteínas correspondentes de cada grupo. Ao aplicar o filtro máxima parcimônia, foram detectadas, aproximadamente, 640 proteínas para o grupo controle, 1660 para o grupo antiveneno formulado sem sacarose, 1600 para o grupo antiveneno formulado com 2,5% de sacarose e 1490 para o antiveneno formulado com 5% de sacarose.

As análises univariadas foram realizadas aos pares (antivenenos vs. controle). Os valores de foldchange ($FC > 2$) e os valores de p foram calculados usando o teste t ($p \leq 0,05$), que foi utilizado para comparar as abundâncias médias de proteínas entre cada dois grupos experimentais. Com isso, foram selecionadas, para o grupo antiveneno sem sacarose vs. controle, 247 proteínas, para o grupo antiveneno com 2,5% de sacarose vs. controle, 211 proteínas e, para o grupo antiveneno com 5% de sacarose vs. controle, 150 proteínas. Para as análises multivariadas, proteínas comuns a dois grupos foram analisadas por PLS-DA para identificar as proteínas responsáveis pela diferença/semelhança entre esses grupos.

Amostras biológicas, tais como as oriundas de tecidos, podem ser muito complexas. Em muitos casos, uma simples inspeção visual dos dados revela apenas uma pequena quantidade de informação. Por meio de métodos estatísticos computadorizados, é possível extrair mais informações destes dados. Um método utilizado é o de reconhecimento de padrões, o qual se destina a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais, que, por sua vez, poderão vir a formar outro grupo, como, por exemplo, a análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e o VIPscore, uma medida da importância de uma variável no modelo PLS-DA, resumindo a contribuição que uma variável faz ao modelo.

Figura 21 – VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno sem sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho), e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$.



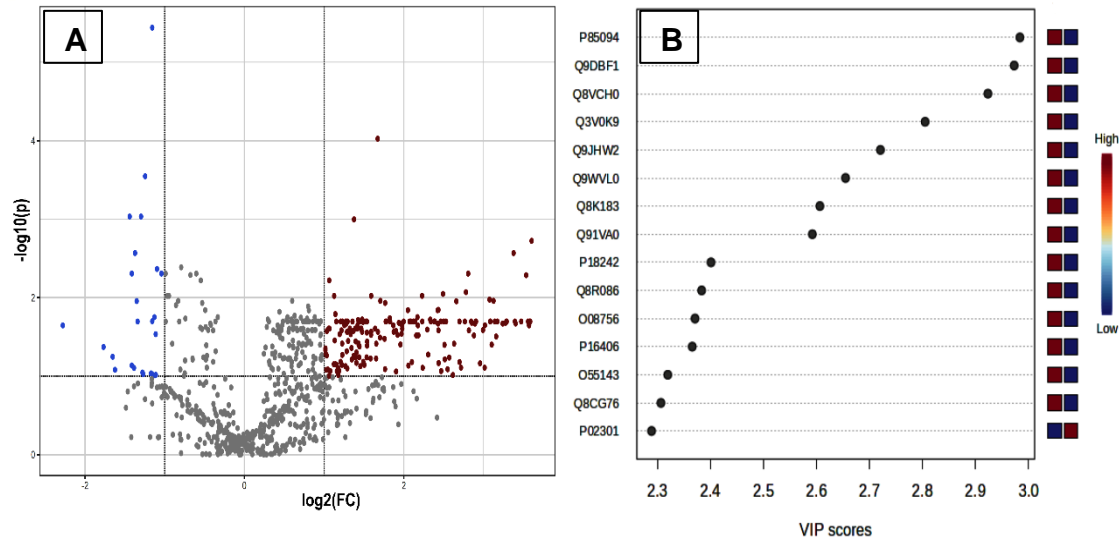
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado sem sacarose, comparado ao grupo controle

Código	Proteína
Q3V0K9	<i>Plastin-1</i>
Q9DBF1	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase</i>
Q91VA0	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1 (mitochondrial)</i>
Q8VCH0	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase B (peroxisomal)</i>
P85094	<i>Isochorismatase domain-containing protein 2A</i>
Q61001	<i>Laminin subunit alpha-5</i>
Q9WVL0	<i>Maleylacetoacetate isomerase</i>
Q64727	<i>Vinculin</i>
Q8BH00	<i>2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase</i>
P12970	<i>Large ribosomal subunit protein eL8</i>
A2ATU0	<i>2-oxoadipate dehydrogenase complex component E1</i>
Q8CG76	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>
P26039	<i>Talin-1</i>
P61922	<i>4-aminobutyrate aminotransferase (mitochondrial)</i>
Q9D939	<i>Sulfotransferase 1C2</i>

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado no banco de dados UNiProt (*Mus musculus*).

Figura 22 – VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno formulado com 2,5% de sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho) e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$



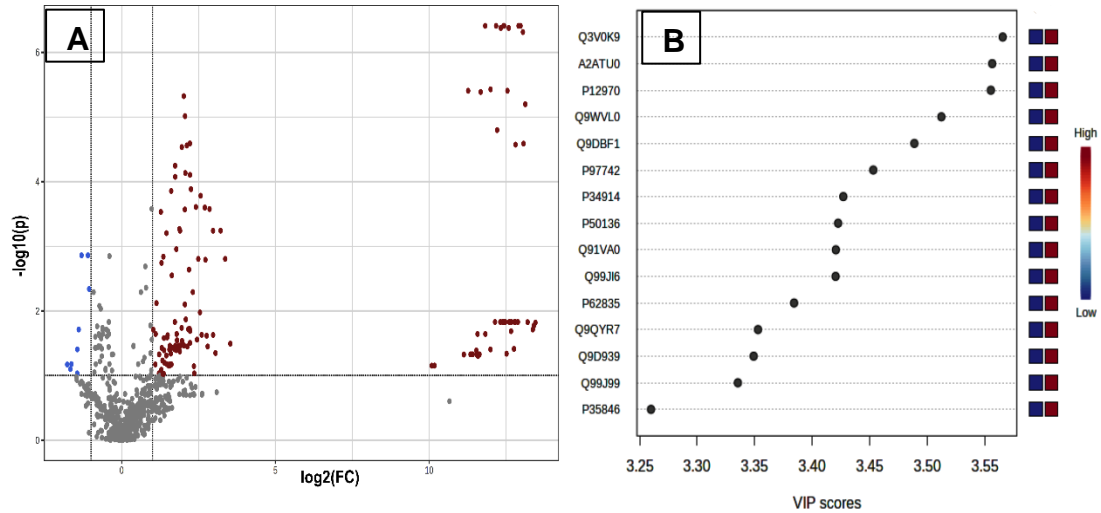
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 15 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado com 2,5% de sacarose, comparado ao grupo controle

Código	Proteína
P85094	<i>Isochorismatase domain-containing protein 2^a</i>
Q9DBF1	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase</i>
Q8VCH0	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal</i>
Q3V0K9	<i>Plastin-1</i>
Q9JHW2	<i>Omega-amidase NIT2</i>
Q9WVL0	<i>Maleylacetoacetate isomerase</i>
Q8K183	<i>Pyridoxal kinase</i>
Q91VA0	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial</i>
P18242	<i>Cathepsin D</i>
Q8R086	<i>Sulfite oxidase (mitochondrial)</i>
O08756	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>
P16406	<i>Glutamyl aminopeptidase</i>
O55143	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>
Q8CG76	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>
P02301	<i>Histone H3.3C</i>

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado no banco de dados UNiProt (*Mus musculus*).

Figura 23 – VolcanoPlot (A) e vipscore (B) para proteínas de origem renal, que se expressam com abundância, significativamente diferentes no grupo tratado com antiveneno formulado com 5% de sacarose, comparado ao grupo controle. Os níveis aumentados de proteína são apresentados no eixo X positivo (vermelho) e os níveis diminuídos são apresentados no eixo X negativo (azul). As proteínas diferencialmente expressas tomam como base o valor $p < 0,05$



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 16 – Discriminação das proteínas com base na análise do PSL-DA / vipscore, para o grupo antiveneno formulado com 5% de sacarose, comparado ao grupo controle

Código	Proteína
Q3V0K9	<i>Plastin-1</i>
A2ATU0	<i>2-oxoadipate dehydrogenase complex component E1</i>
P12970	<i>Large ribosomal subunit protein eL8</i>
Q9WVL0	<i>Maleylacetoacetate isomerase</i>
Q9DBF1	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase</i>
P97742	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1 (liver isoform)</i>
P34914	<i>Bifunctional epoxide hydrolase 2</i>
P50136	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial</i>
Q91VA0	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1 (mitochondrial)</i>
Q99JI6	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>
P62835	<i>Ras-related protein Rap-1A</i>
Q9QYR7	<i>Acyl-coenzyme A thioesterase 3</i>
Q9D939	<i>Sulfotransferase 1C2</i>
Q99J99	<i>3-mercaptopyruvate sulfurtransferase</i>
P35846	<i>Folate receptor alpha</i>

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado no banco de dados UNiProt (*Mus musculus*).

Como panorama geral, é possível destacar que a análise de (A) mostra que, tomando sempre os grupos antivenenos como base, os pontos, marcados em vermelho, representam as proteínas com abundância aumentada e, em azul, as com abundância diminuída, ambas em relação ao grupo controle. A análise de (B) mostra que essas proteínas têm comportamentos sinérgicos. Elas estão aumentadas ou diminuídas perante a problemática biológica, podendo ou não serem proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, mas que oscilam/se comportam como as demais.

Observando a identificação do Quadro 7 a seguir, de um modo geral, o grupo antiveneno sem sacarose tem maior presença de proteínas estruturais (Q3V0K9, Q61001, Q64727, P26039) e de proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos (Q9DBF1, Q91VA0, Q8VCH0, Q8BH00); algumas delas se repetem nos dois outros grupos de antivenenos com sacarose. No grupo antiveneno com 2,5% de sacarose, proteínas distintas possuem relação com atividades envolvidas na remoção de intermediários tóxicos (Q9JHW2, P18242), oxidação (Q8R086, O08756) e autofagia (O55143). O grupo antiveneno com 5% de sacarose aponta a presença de proteínas relacionadas à função mitocondrial (P97742) e envolvidas no estabelecimento da função de barreira endotelial basal (Q99JI6, P62835).

Quadro 7 – Proteínas comuns e exclusivas entre os grupos analisados, que têm como base a análise do PLS-DA / vipscore

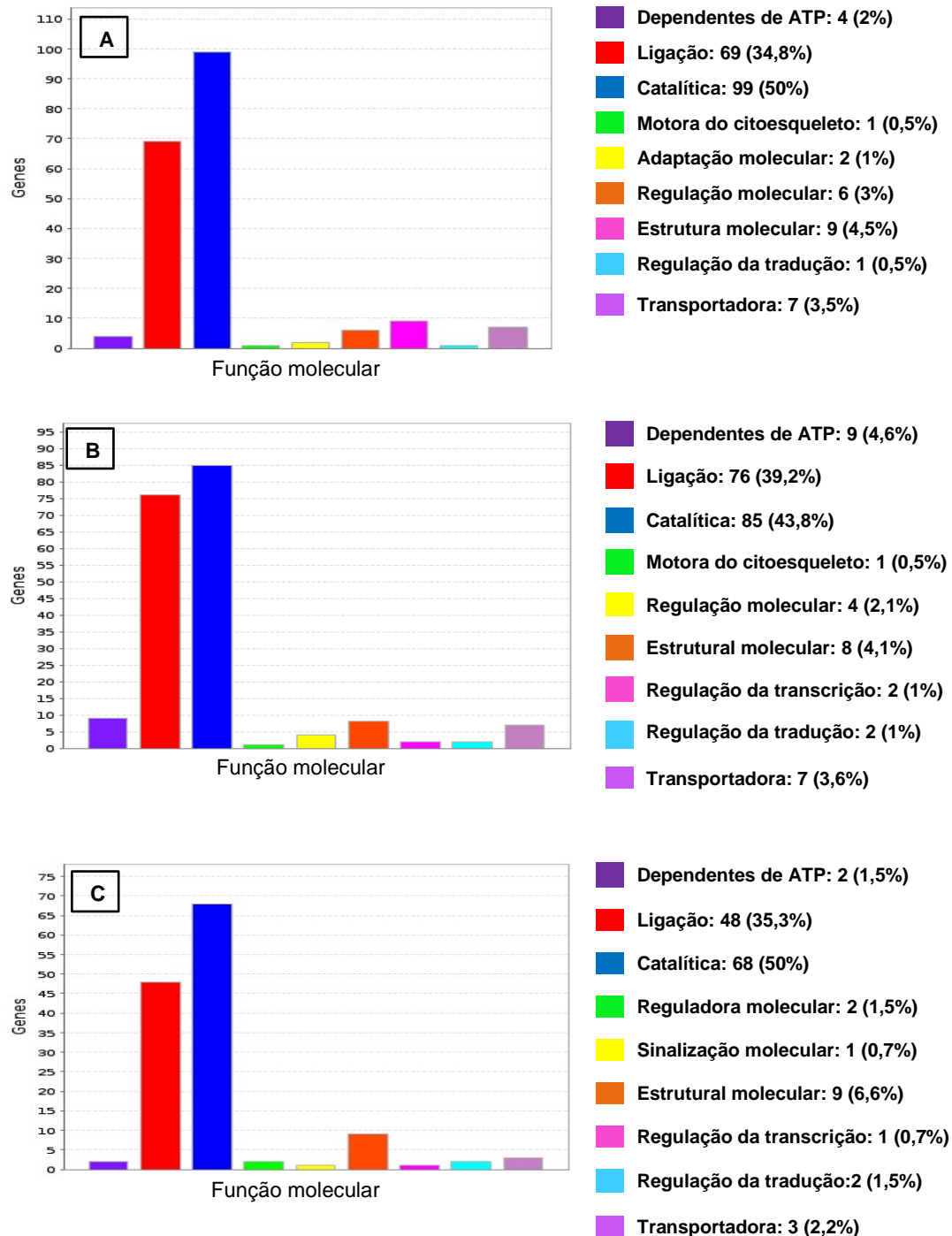
Antiveneno		
Sem sacarose	2,5% de sacarose	5% de sacarose
Q3V0K9	P85094	Q3V0K9
Q9DBF1	Q9DBF1	A2ATU0
Q91VA0	Q8VCH0	P12970
Q8VCH0	Q3V0K9	Q9WVL0
P85094	Q9JHW2	Q9DBF1
Q61001	Q9WVL0	P97742
Q9WVL0	Q8K183	P34914
Q64727	Q91VA0	P50136
Q8BH00	P18242	Q91VA0
P12970	Q8R086	Q99JI6
A2ATU0	O08756	P62835
Q8CG76	P16406	Q9QYR7
P26039	O55143	Q9D939
P61922	Q8CG76	Q99J99
Q9D939	P02301	P35846

Nota: Os códigos de acesso das proteínas que são comuns a mais de um grupo estão destacados com as mesmas cores. Por outro lado, os que são únicos ao grupo se encontram não destacados.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando o sistema de classificação fornecido pela ferramenta Panther (pantherdb.org), foram classificadas as proteínas elencadas por meio do VulcanoPlot quanto às suas funções moleculares, aos seus processos biológicos e à sua classe. Para isso, foram utilizadas as 247 proteínas, referentes ao grupo antiveneno sem sacarose vs. controle, as 211 proteínas, relacionadas ao grupo antiveneno com 2,5% de sacarose vs. controle, e as 150 proteínas, referentes ao grupo antiveneno com 5% de sacarose vs. controle.

As proteínas, classificadas quanto à função molecular (Figura 24), mostram o mesmo padrão para os três grupos analisados, predominando as atividades ligadas à função catalítica e de ligação. A estratificação quanto à atividade catalítica mostra que as proteínas mais abundantes foram as hidrolases (A – 33,3%, B – 35,4%, C – 28,8%); as oxidoreduções (A – 22,5%, B – 23,2%, C – 23,8%); as transferases (A – 18,9%, B – 18,2%, C – 27,5%); as isomerases (A – 6,3%, B – 5,1%, C – 5%); as ligases (A – 4,5%, B – 3%, C – 2,5%); e as liases (A – 6,3%, B – 4%, C – 1,3%).

Figura 24 – Classificação das proteínas quanto à função molecular. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle

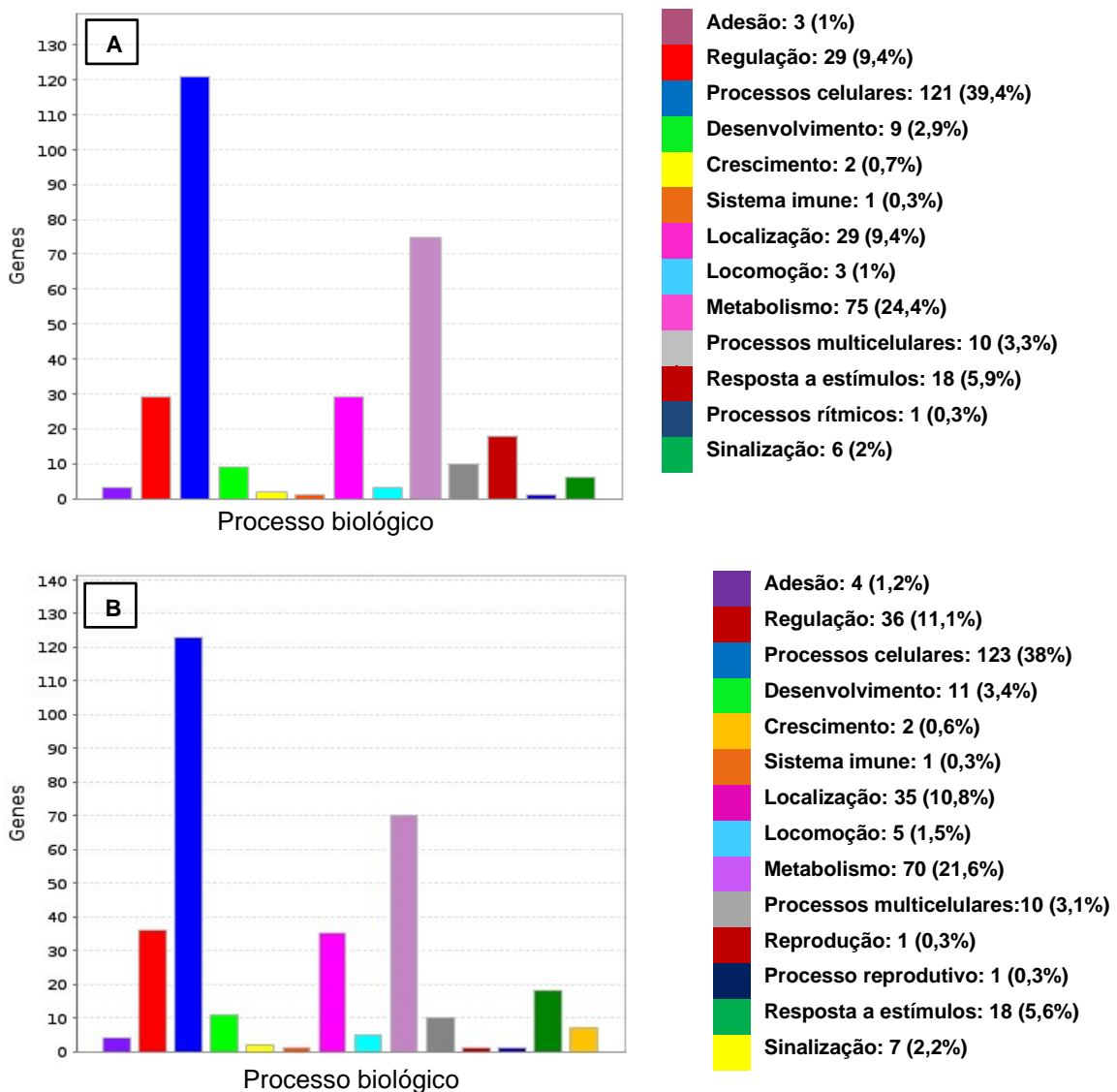


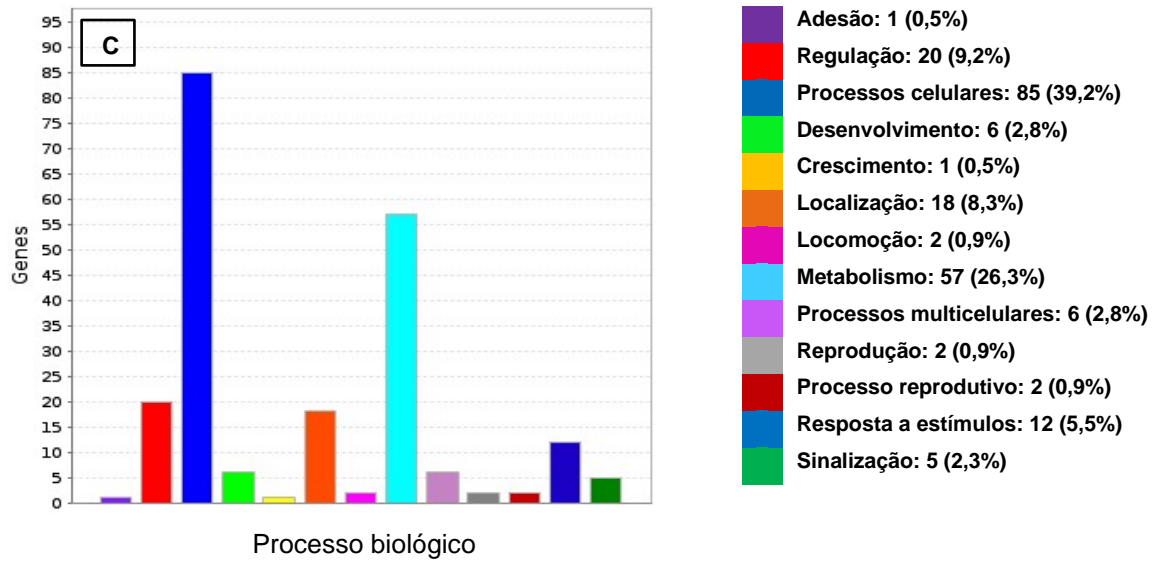
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na classificação quanto aos processos biológicos relacionados (Figura 25), foi observado que a atividade dos processos celulares se destaca e apresenta mesma proporção para os três grupos analisados. A estratificação desse item denota as atividades ligadas à homeostase celular, o ciclo celular, a divisão celular,

a organização de componentes celulares ou biogênese, a resposta celular ao estímulo, a transdução de sinal, o transporte transmembranar, o direcionamento e transporte de vesículas.

Figura 25 – Classificação das proteínas quanto aos processos biológicos. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle

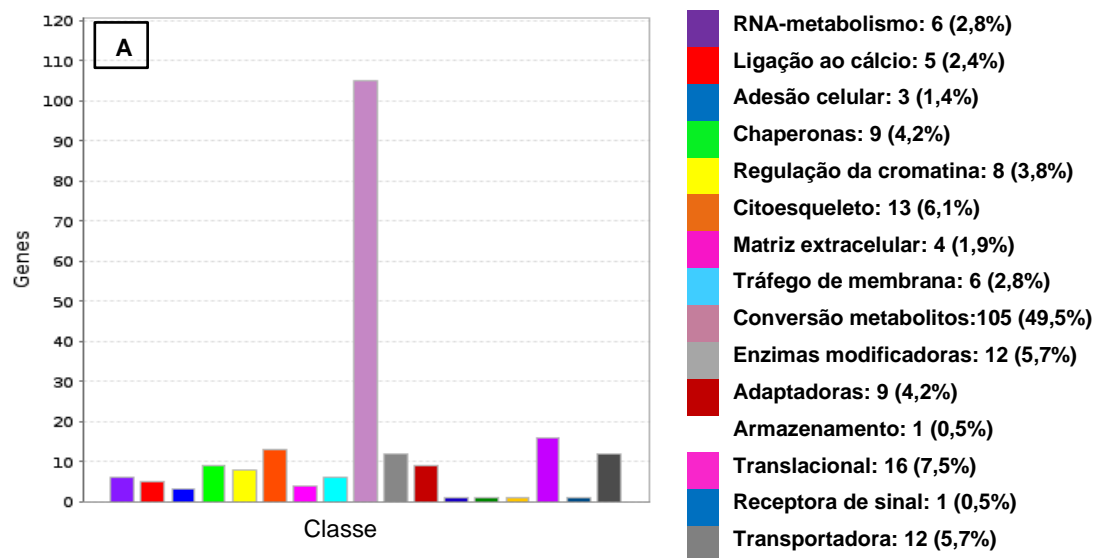


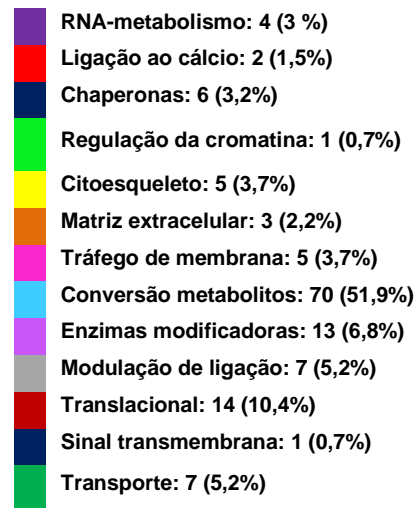
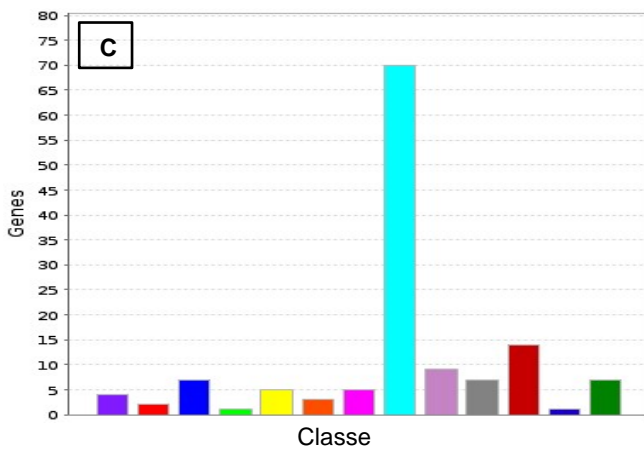
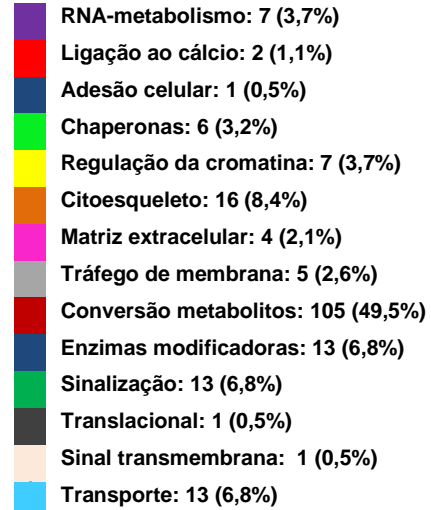
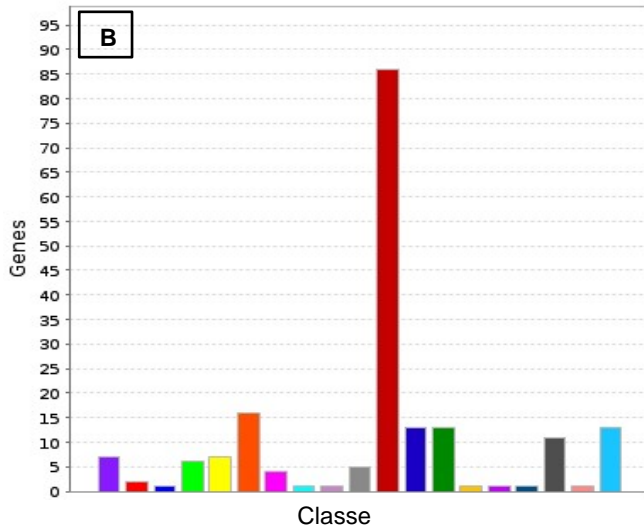


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na classificação quanto à classe das proteínas (Figura 26), destaca-se o item conversão de metabólitos, que apresenta mesma proporção para os três grupos analisados. A estratificação desse item denota as atividades enzimáticas de hidrolases, isomerase, ligase, liase e oxidoreduases (predominates).

Figura 26 – Classificação das proteínas quanto a sua classe. Grupo antiveneno formulado sem sacarose (A), antiveneno formulado com 2,5% de sacarose (B) e antiveneno formulado com 5% de sacarose (C), comparados em relação ao controle





Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Antivenenos ou soros antiofídicos são formulações à base de imunoglobulinas animais utilizados no tratamento do envenenamento por picada de serpentes. O esquema para a sua produção sofreu poucas mudanças desde seu desenvolvimento há mais de um século. Com o decorrer do tempo e a necessidade de adequação mediante as problemáticas atuais, inovações tecnológicas foram introduzidas no seu processo de fabricação. Em decorrência do padrão de segurança e qualidade, esses medicamentos devem atender aos perfis de identidade, pureza, segurança e eficácia, conforme exigido pelo manual recente de Boas Práticas de Fabricação (BPF) aplicadas aos biofarmacêuticos modernos (Herrera *et al.*, 2017a; León *et al.*, 2013, 2018; Segura *et al.*, 2013; Who, 2018).

Em relação à liofilização, este é um processo que confere estabilidade às proteínas, especialmente sob temperaturas elevadas. No entanto, durante este procedimento, os anticorpos podem sofrer modificações físicas e químicas, que podem causar alterações irreversíveis e ter um impacto negativo na sua atividade e eficácia. Dessa forma, a análise físico-química dos antivenenos é o primeiro parâmetro a ser observado no seu controle de qualidade, garantindo, assim, que uma liofilização bem-sucedida manterá a conservação da potência neutralizante dos anticorpos, bem como a estabilidade físico-química da proteína. Os antivenenos utilizados neste estudo encontram-se de acordo com os parâmetros que preconizam a qualidade destas formulações na forma liofilizada, os resultados e as características semelhantes aos observados em ensaios de controle de qualidade para estes tipos de produtos (Gerring; King; Branton, 2013; Herrera *et al.*, 2014, 2017b, 2017b; Mendonça-Da-Silva *et al.*, 2017).

Além disso, é preciso destacar que a administração de imunoglobulinas, por via intravenosa, também funciona como terapia ou tratamento para outras indicações médicas, sendo utilizada, por exemplo, para certos tipos de deficiências imunológicas, distúrbios autoimunes e inflamatórios. Até 40% das infusões intravenosas de imunoglobulinas podem estar associadas a efeitos adversos, os quais, em sua maioria, são leves e transitórios. Parte desses efeitos estão associados ao uso de produtos que contêm, em suas formulações, estabilizantes como a sacarose. Acredita-se que o mecanismo de dano renal após o tratamento,

prolongado ou não, com IgIV seja o resultado de uma lesão osmótica, uma vez que a sacarose não é metabolizada nos túbulos renais (Ahsan *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 2004; Haskin; Warner; Blank, 1999; Lakshmanadoss; Balakrishnan; Disalle, 2010; Orbach *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2019; Zhang; Szerlip, 2000).

Buscando inicialmente avaliar as ações do veneno e antiveneno *in vitro*, foi estimada a IC50 para o BaspV (Figura 11) e a viabilidade das células LLC-MK2 diante dos antivenenos (Figura 12). A análise da viabilidade das linhagens celulares expostas aos antivenenos isolados, preparados em concentrações crescentes, foi realizada no sentido de avaliar a partir de quais valores seria possível verificar uma diminuição na atividade celular. De acordo com a Figura 12, as células tubulares renais expostas ao antiveneno formulado com 5% de sacarose foi o que apresentou melhor viabilidade, causando uma diminuição a partir de 2000 µg/mL de concentração, em comparação aos antivenenos formulados sem sacarose e com 2,5% de sacarose, que reduziram a viabilidade celular a partir da concentração de 250 µg/mL.

Tendo em vista a faixa de concentrações em que os antivenenos isolados diminuem a viabilidade da linhagem celular em estudo, seguiu-se com o ensaio de bloqueio diante do veneno total. Para isso, utilizou-se uma concentração aproximada de 5 vezes a IC50 estimada para o veneno de *B. asper* (42,76µg/mL – Figura 11) e, para os antivenenos, concentrações inferiores a 250 µg/mL (com base no ensaio descrito anteriormente). De acordo com a Figura 13, é possível observar que, mesmo em presença da sacarose como estabilizante nas formulações, os antivenenos são capazes de conferir uma gradativa proteção às células submetidas à ação do veneno. Apesar de a potência neutralizante dos antivenenos estabilizados estar reduzida quando comparada ao soro sem sacarose, todas as concentrações não tóxicas dos três antivenenos mostraram diferentes níveis de ação protetora perante o veneno.

Em outros estudos *in vivo* e *in vitro*, em que foram observadas as atividades neutralizantes de antivenenos estabilizados com sacarose ou outros polióis, a ação neutralizante foi mantida. Segura *et al.* (2009) utilizaram sorbitol 2M (modelo *in vivo*). Já Mendonça-da-Silva *et al.* (2017), em um ensaio clínico randomizado controlado, aberto de fase IIb, utilizando um soro trivalente liofilizado, com 1g de sacarose em sua formulação, e outro soro sem sacarose, observaram

que ambos os antivenenos apresentaram a mesma eficácia contra acidentes envolvendo serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Isso ocorreu porque os dois antivenenos apresentaram resultados clinicamente relevantes com apenas algumas reações adversas precoces leves. Mendonça-da-Silva *et al.* (2017) ainda acrescentam que estas formulações liofilizadas podem se tornar uma boa opção para a produção de antivenenos mais estáveis para regiões como a Amazônica onde as altas temperaturas são comuns. Em continuidade aos estudos de Mendonça-da-Silva *et al.* (2017), Muniz *et al.* (2021) demonstraram a eficácia do mesmo antiveneno trivalente liofilizado perante a neutralização das atividades letais, coagulantes, desfibrinantes e hemorrágicas induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* (originárias do Brasil e Colômbia) avaliadas por meio de um protocolo baseado na pré-incubação do veneno e antiveneno antes de serem avaliados no sistema experimental, utilizando um modelo *in vivo*.

Em outro ensaio em que foram observadas a eficácia de diferentes estabilizadores, dentre eles, a sacarose na concentração de 2% e 5%, Herrera *et al.* (2014, 2017b) concluíram, em seus estudos, que o uso da sacarose na formulação de antivenenos liofilizados foi o melhor estabilizador, mantendo a mesma potência de neutralização do efeito letal do veneno da serpente *Bothrops asper*. Além disso, destacaram que a formulação contendo 5% de sacarose exibiu melhor estabilidade entre as amostras testadas.

Buscando avaliar a existência de disfunção mitocondrial e dano celular induzidos por ERO, foram utilizadas, para o bloqueio do veneno de *B. asper* ($5 \times IC_{50}$), as concentrações de antivenenos de 2000 e 4000 $\mu\text{g/mL}$, que foram as concentrações mais elevadas capazes de reduzir a viabilidade celular (Figura 14). Quando utilizadas essas concentrações de antivenenos com ou sem sacarose, incubados ou não com veneno, houve uma potencialização da formação de ERO produzidas. Os aumentos desses níveis foram acompanhados da redução ou piora do potencial mitocondrial transmembranar (Figura 15). No entanto, a concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ de antiveneno com ou sem sacarose e a produção de ERO foram similares com o grupo combinado com veneno de *B. asper* ou somente veneno, não havendo, portanto, piora do quadro de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo e o acúmulo citoplasmático de ERO levam à oxidação dos lipídios de membrana, degradação do DNA, formação de corpos

apoptóticos e, conseqüentemente, apoptose. Danos celulares, hipóxia ou acúmulo de ERO podem levar à disfunção mitocondrial e, com isso, interferir no processo de respiração celular. Tais alterações podem ser observadas por meio das mudanças do potencial elétrico de membrana mitocondrial (De Castro *et al.*, 2004). Esse potencial foi medido com o auxílio de um marcador/uma sonda com atividade fluorescente denominada Rhodamina-123. De acordo com a Figura 15, é possível observar que o antiveneno sem sacarose e com 5% de sacarose juntos ao veneno de *B. asper*, na concentração de 2000 e 4000µg/mL, foram capazes de impedir a diminuição do potencial mitocondrial se equiparando ao grupo controle, evidenciando, assim, uma ação protetiva.

Em relação às células tubulares proximais renais, dadas suas características e funções fisiológicas, é importante mencionar que elas possuem um alto consumo de energia e oxigênio, o que permite dizer que o seu equilíbrio redox é regulado pelas mitocôndrias. Logo, o acúmulo de ERO, ou hipóxia, ocasiona atividades que culminam em ações voltadas à disfunção da ação mitocondrial, diretamente ligadas à atividade do potencial elétrico de sua membrana, que é essencial para os transportes e os processos de respiração (Emma *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 2022).

As toxinas ofídicas são excretas por via predominantemente renal. Em decorrência disso, os mecanismos de concentração e transporte tubular acabam favorecendo a ocorrência de toxicidade celular direta afetando principalmente as células tubulares renais. Rahmy (2001) observou que, no processo de lesão tubular, ocorre a diminuição da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, gerando uma disfunção no processo de respiração, agravada ainda pela ação da enzima fosfolipase A2 (presente nas toxinas ofídicas) que degrada a membrana plasmática e mitocondrial, comprometendo, assim, sua permeabilidade e suas reservas energéticas e acarretando a formação de peróxidos como subproduto oxidativo.

De maneira geral, é possível avaliar os achados desta pesquisa a partir de dois pontos: do veneno isolado e dos antivenenos isolados. No que concerne ao veneno isolado, é possível perceber que o dano oxidativo e mitocondrial desencadeado, em âmbito renal, está associado a diversos fatores, dentre eles, a ação citotóxica direta da peçonha no epitélio tubular renal, que causa disfunção mitocondrial, desencadeando aumento no estresse oxidativo, deficiência nos

transportes hidroeletrolíticos e morte celular. Convém mencionar que resultados semelhantes a esses já foram observados em estudos anteriores envolvendo venenos ofídicos (Albuquerque *et al.*, 2019; De Castro *et al.*, 2004; Gutiérrez; Escalante; Rucavado, 2009; Marinho *et al.*, 2021; Nogueira Júnior *et al.*, 2019; O'Connor *et al.*, 1988; Resiere; Mehdaoui; Neviere, 2022; Sgrignolli *et al.*, 2011; Sitprija; Sitprija, 2012).

Os resultados acima descritos fornecem uma base de entendimento para os efeitos encontrados nos ensaios de produção de ERO e do potencial mitocondrial. A não regressão dos efeitos nos grupos tratados com antiveneno pode estar associada à presença da sacarose e de um possível estresse osmótico nas células tubulares renais. Estudos envolvendo outros compostos associados à sacarose apontam que a natureza desse carboidrato usado nas diferentes formulações pode afetar a gravidade da lesão celular sofrida. Assim, a ordem de classificação dessa toxicidade, sacarose > gluconato > dextrano, foi observada, independentemente dos modelos de sistemas *in vivo* ou *in vitro* (Zager, 2005; Zager *et al.*, 2002; Zager; Johnson; Hanson, 2004).

Em continuação aos resultados observados nos ensaios *in vitro*, utilizando células tubulares renais, avaliou-se os efeitos, em âmbito renal, em camundongos tratados com os antivenenos isolados. Os resultados obtidos assemelham-se aos que foram observados nos ensaios *in vitro*, anteriormente discutidos. Dessa forma, o estudo *in vivo* mostrou diminuição nos níveis de GSH e aumentos pontuais nos níveis de TBARS junto a uma expressiva variação do nitrito em âmbito renal.

Sendo o rim um órgão altamente dependente de energia, a atividade mitocondrial, produzindo ATP, é essencial para sua função celular. Uma alteração na fosforilação oxidativa, que gera vazamento de elétrons dos centros redox dos complexos respiratórios e culmina na perda do potencial de membrana, resulta em subsequente aumento da produção de ERO, que, por sua vez, é neutralizado pela catalase peroxissomal e pela glutatona peroxidase (Ruiz-Ramírez *et al.*, 2020). O mesmo mecanismo se processa em condições *in vitro*. Assim, a cadeia respiratória da mitocôndria é capaz de produzir H₂O₂ diretamente pela redução bivalente do oxigênio (Boveris; Oshino; Chance, 1972; Brand, 2016; Che *et al.*, 2014; Ruiz-Ramírez *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2016).

Dessa forma, a diminuição do potencial mitocondrial observado nos grupos tratados com os antivenenos isolados, em conjunto com aumento da produção de ERO citoplasmática, se reproduzem e justificam o consumo de GSH (antioxidante) e o aumento nos níveis de nitrito (oxidantes) observados no modelo *in vivo*. Algumas das espécies reativas formadas podem atacar lipídios e proteínas, justificando, então, os aumentos pontuais nos níveis de TABARS observados. Assim, excluindo a ação do veneno e observando apenas a ação isolada dos antivenenos, é possível notar padrões semelhantes no modelo *in vitro* e *in vivo*. Esses achados podem estar associados à ação da sacarose contida nas formulações, uma vez que estudos já relatam os mecanismos associados à sua ação no túbulo renal.

No que concerne aos antivenenos isolados e aos compostos associados à sacarose, como alguns tratamentos à base de IgIV e outras associações, por exemplo, alguns estudos examinaram a segurança de formulações intravenosas de ferro associado à sacarose, ao dextrano e ao gluconato, em termos de peroxidação lipídica e lesão celular em sistemas *in vitro*, usando culturas de células tubulares renais proximais humanas. Tais estudos mostraram que, após exposição às formulações, a sacarose de ferro é a mais tóxica, promovendo um aumento considerável na peroxidação lipídica. É preciso destacar, nesse ponto, que o mesmo resultado foi observado em estudos com animais (Bishu; Agarwal, 2006; Lim; Vaziri, 2004a, 2004b; Zager *et al.*, 2002). Em concordância ainda com o que já foi colocado, em um estudo, envolvendo humanos, foram observados altos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) após a infusão de sacarose de ferro, o que sugere um efeito direto no estresse oxidativo e na instalação do quadro de lesão renal aguda e inflamação, apontadas pelo aumento da excreção urinária de albumina, da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Lim *et al.*, 1999; Roob *et al.*, 2000; Zager *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que a sacarose está presente nesses compostos como adjuvante às formulações, uma vez que isolada já acarreta mecanismos de danos renal; quando associada a outros compostos, nesse caso, o ferro, dado os padrões nos achados desta tese, pode-se associar parte dos efeitos à presença da sacarose, visto que estudos experimentais, em modelos animais (Kohl *et al.*, 2020; Maunsbach; Madden; Latta, 1962; Racz *et al.*, 2010), e estudos

observacionais/relatos de casos (Chapman *et al.*, 2004; Dantal, 2013; Dickenmann; Oetli; Mihatsch, 2008; Lakshmanadoss; Balakrishnan; Disalle, 2010; Luque *et al.*, 2016; Orbach *et al.*, 2005; Orbach; Tishler; Shoenfeld, 2004; Racz *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2019) descrevem a presença de algum tipo de alteração ou dano renal associados à administração de imunoglobulinas intravenosas, isoladas ou associadas à sacarose. Estudos experimentais mostram também que a sacarose, não somente associada à administração intravenosa, como também administrada por via oral, apresenta semelhantes resultados no que concerne aos processos inerentes ao estresse oxidativo e aos danos renais (Li *et al.*, 1986; Ruiz-Ramírez *et al.*, 2020).

Ao serem analisadas as amostras de urina dos grupos experimentais do modelo *in vivo*, observaram-se alterações significativas para os níveis da molécula de KIM-1 apenas no tempo de 6h (antiveneno formulado com 2,5% de sacarose), enquanto, para GGT, só houve alterações significativas no tempo de 1h (antiveneno formulado com 5% de sacarose). A molécula KIM-1 é liberada no lúmen tubular, principalmente nas células do túbulo proximal, após lesão isquêmica e tóxica, enquanto a GGT tem sua concentração máxima nas bordas em escova dos túbulos renais proximais e alça de Henle (Griffin; Faubel; Edelstein, 2019; Han *et al.*, 2002). No estudo de revisão sobre as alterações morfológicas renais, após administração de solutos exógenos, não foram observadas alterações na borda em escova e no labirinto basal (Dickenmann; Oetli; Mihatsch, 2008).

Em um estudo realizado por Kohl *et al.* (2020), foram investigadas as alterações renais após administração de diferentes soluções hiperosmolares de manitol, sacarose, meio de contraste e sacarose de ferro (administrados por via intravenosa), com o objetivo de avaliar alguns biomarcadores urinários para lesão renal, dentre eles, a KIM-1. Para sacarose, foram testadas três concentrações: alta dose (38%), média dose (19%) e baixa dose (7,6%). Como resultados, observou-se que a excreção urinária dos biomarcadores, após o tratamento, no curso do tempo, seguiu um padrão semelhante, atingiu o pico entre 0-2h, com menores aumentos em 0-6h e retornou aos valores basais em aproximadamente 24h após a administração. O tratamento com sacarose 7,6% não resultou em alterações nos níveis de KIM-1, no entanto, o tratamento com sacarose de ferro causou um aumento de até 1,5 vezes na excreção de KIM-1 em 6-24 h (provavelmente relacionadas à alta

quantidade de ferro da solução, visto que a formulação possui 7,6% de sacarose) (Kohl *et al.*, 2020).

Esses resultados se mostram compatíveis com os achados deste estudo no que concerne ao aumento dos níveis de KIM-1, assim como ao tempo de 6h (ver A na Figura 19). Os níveis de peroxidação lipídica renal também corroboram esses achados, tomando como base os intervalos de tempo citados no estudo, como uma possível explicação para a elevação dos níveis de KIM-1, para o antiveneno com 2,5% de sacarose no tempo de 6h (ver A na Figura 19). Vale ainda ressaltar que as discrepâncias pontuais, nos intervalos de tempo analisados, podem ser atribuídas ao volume de urina coletado, que variou entre os animais do mesmo grupo e que, neste estudo, se realizou com camundongos em vez de ratos.

A análise morfológica renal realizada em roedores utilizados em modelos experimentais de infusão de sacarose, assim como os relatos de casos em que ocorreram alterações renais após utilização de compostos contendo sacarose em sua formulação mostraram edema das células epiteliais, degeneração e vacuolização citoplasmática, estreitamento do lúmen tubular das células proximais e necrose tubular aguda, com lesões iniciando-se com microvacúolos apicais, culminando na formação de macrovacúolos (lisossomos) e de um quadro de nefrose osmótica (Chapman *et al.*, 2004; Dantal, 2013; Dickenmann; Oettl; Mihatsch, 2008). Nesta pesquisa, podem-se observar resultados que se assemelham aos anteriormente citados, como a presença de alterações microscópicas renais em todos os três tempos de estudo (1, 3 e 6 horas) quando comparados ao grupo controle do antiveneno formulado sem sacarose. A maioria das alterações encontradas foram as seguintes: degeneração hidrópica no epitélio tubular, focos inflamatórios linfoplasmocitários e deposição de proteína nos túbulos.

Assim, esses dados podem ser associados à condição de que a sacarose, não metabolizável nas células renais, mesmo em pequenas quantidades, é pinocitada nas células tubulares renais e incorporada aos fagolisossomos e seu acúmulo causa um gradiente osmótico, levando à retenção de água que causa inchaço celular e formação de vacúolos. Resultados semelhantes foram observados em estudos experimentais e relatos de casos envolvendo formulações contendo solutos exógenos, como a sacarose (Bishu; Agarwal, 2006; Chapman *et al.*, 2004; Dickenmann; Oettl; Mihatsch, 2008; Orbach *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Kohl *et al.* (2020), a análise histológica renal, realizada em ratos que foram tratados com soluções hiperosmolares de sacarose, por via intravenosa, foi observada quanto ao grupo controle (salina 0,9%) e também foi observado o inchaço das células tubulares proximais. Os resultados foram considerados como antecedentes histopatológicos normais. Em relação às alterações, anteriormente descritas, pode-se dizer que elas são reversíveis desde que o agente causador dessas alterações não seja utilizado por um grande período de tempo.

Uma vez que as alterações associadas a formulações contendo sacarose possuem uma natureza reversível (quando não utilizadas por um longo período de tempo), uma preocupação com o uso de antivenenos estabilizados com sacarose tem sido latente, pois existe a possibilidade de complicar ou produzir algum dano renal associado ao envenenamento (Mendonça-da-Silva *et al.*, 2017). Isso ocorreria, portanto, tendo em vista o intervalo de tempo entre o acidente, envolvendo o envenenamento, até a administração do antiveneno (tratamento).

De maneira geral, a quantidade de soluto que sofre pinocitose para o interior da célula irá depender da quantidade administrada. Se o agente sofrer uma digestão lisossomal lenta, ele irá permanecer nas células tubulares por cerca de 24 horas causando retenção vacuolar. Sob condições de uma administração rápida, por um período considerável de tempo, maior será a quantidade armazenada nas células tubulares (dada a variação do gradiente osmótico). Assim, qualquer processo que cause um dano renal preexistente (funcional ou estrutural), que prejudique a digestão lisossômica, atrasa ainda mais a degradação. Logo, a alteração vacuolar observada na nefrose osmótica é um sinal precoce do dano celular, podendo ser um primeiro passo no desenvolvimento de lesões celulares irreversíveis nos túbulos (Chapman *et al.*, 2004; Dickenmann; Oettl; Mihatsch, 2008; Engberg; Ericsson, 1969; Schwartz; Johnson, 1971).

Nos estudos clínicos conduzidos por Mendonça-da-Silva *et al.* (2009), utilizando um antiveneno liofilizado no tratamento para picadas de *B. atrox*, a função renal foi normalizada para todos os pacientes após 24 horas de acompanhamento, o que funcionou como indicativo de que a dosagem empregada foi segura, não sendo necessária uma segunda dose de antiveneno. Em observação a alguns casos, Itkin e Trujillo (2005) descreveram quatro pacientes que apresentaram insuficiência renal

aguda após administração de IgIV contendo, em suas formulações, concentrações significativas de sacarose. Somente após a descontinuação da terapia, a função renal dos pacientes voltou à linha de base. Diante desses resultados, os autores sugerem que, para cada paciente, a função renal deve ser avaliada antes de iniciar a terapia com IgIV. Assim, diminuir a concentração intratubular de solutos osmóticos, como a sacarose, pode prevenir ainda mais a ocorrência de danos renais (Itkin; Trujillo, 2005).

Alguns estudos relatam que a sacarose pode produzir lesões renais em humanos sadios/normais em uma dose de 6 g/kg de peso corporal administrada por até uma semana. O limiar para a lesão é muito menor em pacientes que sofrem com disfunção renal preexistente ou que fazem uso em conjunto de algum agente nefrotóxico, visto que é suficiente apenas 1 g/kg de sacarose para desencadear uma LRA (Al-Abdulla *et al.*, 2003; Bishu; Agarwal, 2006; Chapman *et al.*, 2004; Pierce; Jain, 2003). Sendo assim, a quantidade de antiveneno (ampolas/frascos) utilizada depende da gravidade do acidente, uma vez que pode ser necessária apenas uma única administração ou, às vezes, pode ser necessária a repetição da dose 24 horas após o início do tratamento (situações em que não há regressão dos sintomas). Assim, é possível correlacionar a quantidade de sacarose administrada ao agravamento do acidente, pois, quando combinada com a ação lesiva do veneno, eleva o risco de lesão renal (Mendonça-da-Silva *et al.*, 2017).

A formulação liofilizada final, então, não deve interferir na atividade biológica dos antivenenos. Ademais, o fator tempo, no processo de reconstituição no ambiente clínico, deve ser observado devido à importância de fornecer uma terapia antiveneno rápida e adequada para o tratamento (Herrera *et al.*, 2017a; Iiyasu *et al.*, 2015; Otero *et al.*, 2002). Como demonstrado por Herrera *et al.* (2014), que avaliaram a estabilidade de antivenenos liofilizados, a utilização de sacarose funciona melhor como estabilizante do que manitol ou sorbitol, sugerindo que essa formulação pode se tornar uma boa alternativa para a produção de antivenenos mais estáveis para regiões onde as altas temperaturas são comuns. Em outro trabalho envolvendo a caracterização físico-química de sete antivenenos liofilizados comerciais, observou-se que, apesar das pequenas variações encontradas para alguns produtos, as condições de formulação e liofilização escolhidas pelos

fabricantes são adequadas para evitar agregação e gerar, em termos físico-químicos, antivenenos liofilizados de qualidade aceitável (Herrera *et al.*, 2017a).

Na análise proteômica do tecido renal quando observado por meio dos grupos elencados pelo vipscore (Quadro 7), é possível observar a presença de proteínas que estão *up* ou *down* reguladas. Tomando como referência as que foram selecionadas com pontuações elevadas de expressão diante da problemática avaliada, é importante citar que a maioria delas constituem proteínas com funções estruturais, do metabolismo de ácidos graxos, e ligadas à atividade mitocondrial.

A proteína *Plastina-1* (Q3V0K9), que se encontra presente nos três grupos, tem sua expressão restrita ao intestino e rim e desempenha um papel vital na função dos epitélios de absorção nesses órgãos. Em um estudo utilizando camundongos com ruptura do gene da *plastina-1*, observou-se que a sua ausência resulta na diminuição da resistência do epitélio e no aumento de sua fragilidade, o que sugere que a *plastina-1* é um importante regulador da morfologia da borda em escova (Grimm-Günter *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 1994; Shinomiya, 2012). Assim, é possível dizer que os níveis aumentados de *plastina-1* nos grupos experimentais demonstram que as células tubulares renais são as principais afetadas em decorrência do processo de interação com a sacarose.

Outra proteína comum aos três grupos analisados, que se apresentou de forma aumentada, foi a alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase (Q9DBF1), uma enzima multifuncional expressa em múltiplos compartimentos subcelulares com ação protetora perante o estresse oxidativo. Ela age, então, metabolizando vários aldeídos derivados da peroxidação lipídica. Assim, foi demonstrado, pela primeira vez por Brocker *et al.* (2010), que esta enzima possui uma atividade de proteção contra o estresse hiperosmótico, gerando osmólitos e metabolizando aldeídos tóxicos. Além disso, a sua expressão em células de ovário de hamster chinês atenuou a apoptose induzida por estresse osmótico causada por concentrações extracelulares aumentadas de sacarose ou cloreto de sódio (Brocker *et al.*, 2010). Também comum aos três grupos tem-se a acyl-coenzyme A synthetase (Q91VA0) e maleylacetoacetate isomerase (Q9WVLO), ligadas ao metabolismo de ácidos graxos e à atividade redutora, respectivamente.

As proteínas mostradas no grupo antiveneno com 2,5% de sacarose possuem relação com o aumento de atividades envolvidas na remoção de

intermediários tóxicos e degradação de proteínas – *omega-amidase NIT2* (Q9JHW2) e *cathepsin D* (P18242) – a oxidação e integridade mitocondrial – *sulfite oxidase* (Q8R086), *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2* (O08756) – e a autofagia – *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (O55143). O Ca^{2+} regula inúmeras funções celulares incluindo metabolismo, motilidade e transporte, logo, a perda da sua homeostase é um componente importante das vias de morte celular, incluindo a autofagia. O retículo sarcoplasmático/endoplasmático é o depósito mais abundante de Ca^{2+} intracelular. O seu papel na lesão renal induzida por substâncias tóxicas, embora já descrito, não está bem esclarecido (Eaddy; Schnellmann, 2011; Lemasters *et al.*, 1998; Schnellmann, 1991; Waters; Wong; Schnellmann, 1997). Apesar de o antiveneno com 2,5% de sacarose não induzir o aumento de ERO (ver B na Figura 14), é evidente sua ação no âmbito mitocondrial (ver B na Figura 15), uma vez que as células tubulares proximais renais são altamente aeróbicas, gliconeogênicas e com grande capacidade de transporte. Assim, uma disfunção no seu meio de respiração e na obtenção de energia pode estar associada a mecanismos de apoptose e morte celular (Tran *et al.*, 2016).

A presença da *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase* (O08756) está associada aos peroxissomos; eles são particularmente densos nos túbulos proximais e pouco presentes nos glomérulos, túbulos distais e ductos coletores. Os túbulos proximais exibem uma baixa taxa de glicólise e dependem criticamente da oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia. Portanto, não só as mitocôndrias possuem atividade oxidativa, como também os peroxissomos, com uma capacidade semelhante à das células do fígado. Distúrbios no ciclo mitocondrial e/ou peroxissomal levam a um aumento de ácidos graxos não metabolizados e simultaneamente à diminuição da produção de energia (falha direta). Altos níveis teciduais de ácidos graxos livres inibem a bomba de Na^+/K^+ -ATPase do túbulo proximal, desestabilizam o potencial da membrana mitocondrial e estimulam a resposta inflamatória e autofagia (Feldkamp *et al.*, 2006; Le Hir; Dubach, 1982; Litwin *et al.*, 1988a, 1988b; Portilla, 1999; Vasko, 2016). Convém mencionar que esses fatos podem explicar os focos de infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários observados na análise histológica renal referente ao grupo antiveneno com 2,5% de sacarose.

No que diz respeito ao grupo antiveneno com 5% de sacarose, destaca-se o aumento de proteínas relacionadas à função mitocondrial. Observa-se também a presença de proteínas envolvidas no estabelecimento da função de barreira endotelial basal – *Ras-related protein Rap-1b* (Q99JI6) e *Ras-related protein Rap-1A* (P62835); elas exercem um controle específico e seletivo sobre a passagem de água e solutos, permitindo, assim, a formação e manutenção de compartimentos que diferem na composição de fluidos e solutos (Boettner; Van Aelst, 2009; UniProt, 2023). Em relação à atividade mitocondrial, a concentração de 2000µg/mL de antiveneno com 5% de sacarose (ver C na Figura 15) não alterou o potencial membranar das organelas, resultado semelhante ao apresentado pelo grupo antiveneno sem sacarose.

A classificação ontológica quanto à função molecular (ver A, B e C na Figura 24), aos processos biológicos (ver A, B e C na Figura 25) e à classe (ver A, B e C na Figura 26), relativas às proteínas *up* e *down* reguladas para cada grupo experimental, não mostraram diferenças e mantiveram a mesma proporção dentro dos grupos analisados, não diferindo qualitativamente. As proteínas, quando classificadas quanto à classe e função molecular (estratificadas pelas mais abundantes por grupo), denotam as mesmas proteínas elencadas pela análise PSL-DA / VipScore. De maneira geral, não foi observada nenhuma alteração que impactasse as vias e funções de forma a alterar a proporção de proteínas encontradas para cada grupo analisado, demonstrando, assim, que não houve grandes desvios da atividade renal.

✓ Resumo dos resultados:

- O veneno total da serpente *Bothrops asper* diminuiu a viabilidade das células LLC-MK2 a partir da concentração de 25 µg/mL com uma IC50 estimada em 42,76µg/mL;
- Os antivenenos formulados sem sacarose e com 2,5% de sacarose diminuíram a viabilidade celular a partir das concentrações de 250 µg/mL e, para o antiveneno com 5% de sacarose, a viabilidade foi reduzida nas duas últimas concentrações de 2000 e 4000 µg/mL;

- Os antivenenos formulados com sacarose 2,5% e 5% foram capazes de bloquear os efeitos do veneno de *B. asper* (5 x IC50) de maneira gradativa e crescente (dose dependente);
- Os três antivenenos, nas concentrações de 2000 e 4000µg/mL, quando comparados ao grupo BaspV (5 x IC50), aumentaram a produção de ERO em média 50% no interior da célula. Nos grupos bloqueio antiveneno sem sacarose e BaspV, o aumento de ERO foi maior do que nos grupos bloqueios antiveneno com 2,5% e 5% de sacarose;
- O potencial transmembrânico mitocondrial foi diminuído em pelo menos 50% em todos os grupos de antivenenos isolados. Já o antiveneno com 5% de sacarose na concentração de 2000µg/mL não alterou o potencial membranar;
- Os níveis de GSH diminuíram nos grupos contendo sacarose. Além disso, o aumento nos níveis de TBARS foi significativo apenas na 1ª hora, e o aumento na concentração de nitrito foi tempo dependente para os três grupos;
- A análise morfológica renal revelou alterações em todos os grupos e tempos analisados, revelando degeneração hidrópica e aumento do volume celular;
- A análise proteômica mostrou que o grupo sem sacarose tem a maior presença de proteínas estruturais e do metabolismo de ácidos graxos. Já o grupo sacarose 2,5% possui proteínas envolvidas na remoção de intermediários tóxicos, oxidação e autofagia. Para o grupo com 5% de sacarose, a presença de proteínas relacionadas à função mitocondrial é mais evidente assim como a presença de proteínas envolvidas na função de barreira.

7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos permitiram concluir que os antivenenos utilizados, neste estudo, encontram-se de acordo com os parâmetros que preconizam a qualidade dessas formulações na forma liofilizada (aspectos físico-químicos e macroscópicos). Os antivenenos formulados sem e com sacarose (2,5 e 5%) foram capazes de neutralizar o veneno da serpente *Bothrops asper* e reverter algumas de suas atividades tóxicas, observados através dos ensaios em *in vitro*. Apresentaram também algumas alterações renais mais evidentes quando associadas ao antiveneno contendo 2,5% de sacarose. No entanto, a formulação com 5% de sacarose mostrou uma ação semelhante à do antiveneno formulado sem sacarose, sem muitos danos associados, podendo assim, ser considerado nesta concentração como um possível estabilizante para formulações liofilizadas. Como perspectivas futuras seria necessária ainda a complementação do estudo por meio de ensaios de neutralização *in vivo*, para atestar a sua completa eficiência e segurança.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. C. Diseases of the tubules. *In*: GRUNE, S. I. (eds.). **The Kidney: Medical and Surgical Diseases**. New York, NY: Grune & Stratton, 1951. p 207-298.
- AHSAN, N. *et al.* Intravenous immunoglobulin-induced osmotic nephrosis. **Archives of Internal Medicine**, v. 154, n. 17, p. 1985-1987, 12 set. 1994.
- AHSAN, N. *et al.* Acute renal failure following immunoglobulin therapy. **American Journal of Nephrology**, v. 16, n. 6, p. 532-536, 1996.
- AL-ABDULLA, I. *et al.* Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 399-404, 1 set. 2003.
- ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3556-3571, ago. 2008.
- ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. **Toxicon**. v. 54, n. 7, p. 938-948, 1 dez. 2009.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 55, n. 5, p. 295-301, out. 2013.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute kidney injury after snakebite accident treated in a Brazilian tertiary care centre. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 19, n. 12, p. 764-770, dez. 2014.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute Kidney Injury Induced by *Bothrops* Venom: Insights into the Pathogenic Mechanisms. **Toxins**, v. 11, n. 3, 5 mar. 2019.
- ALFARO-CHINCHILLA, A. *et al.* Expanding the neutralization scope of the Central American antivenom (PoliVal-ICP) to include the venom of *Crotalus durissus pifanorum*. **Journal of Proteomics**, v. 246, p. 104-315, 30 ago. 2021.
- ALVES, E. C. *et al.* Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. **PloS One**, v. 13, n. 8, p. 1-16, 2018.
- ANDERSON, W. A. D.; BETHEA, W. R., Jr. Renal lesions following administration of hypertonic solutions of sucrose: report of six cases. **Journal of the American Medical Association**, v. 114, n. 20, p. 1983-1987, 18 maio 1940.

ARANDA, A. *et al.* Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 2, p. 954-963, mar. 2013.

ARAUJO, H. P. *et al.* Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 502-514, 15 mar. 2008.

ARIARATNAM, C. A. *et al.* A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for treatment of envenoming by the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii russelii*): a preliminary dose-finding and pharmacokinetic study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 259-265, ago. 1999.

BARLOW, A. *et al.* Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the royal society B. Biological Sciences**, v. 276, n. 1666, p. 2443-2449, 7 jul. 2009.

BARTON, J. C. *et al.* Acute cryoglobulinemic renal failure after intravenous infusion of gamma globulin. **The American Journal of Medicine**, v. 82, n. 3, p. 624-629, 23 mar. 1987.

BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E. *et al.* Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, v. 10, n. 11, 2 nov. 2018.

BISHU, K.; AGARWAL, R. Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 1 Suppl 1, p. 19-23, set. 2006.

BOCHNER, R. Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, p. 1-7, 2016.

BOECHAT, A. L. R. *et al.* Associação de heparina e antiveneno: eficácia da neutralização dos venenos de *Bothrops atrox* e *Bothrops erythromelas*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 07-14, 1 fev. 2001.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 698-706, nov. 1999.

BOETTNER, B.; VAN AELST, L. Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 684-693, 1 out. 2009.

BON, C. The serum-therapie was discovered 100 years ago. **Toxicon**, v. 2, n. 34, p. 142-143, 1996.

BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1: a translational journey. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 125, p. 293-299, 2014.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **The Biochemical Journal**, v. 128, n. 3, p. 617-630, jul. 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 7 maio 1976.

BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 100, p. 14-31, nov. 2016.

BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 76, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf. Acesso em: 15 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Acidentes ofídicos: tratamento. **Gov.br**. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-ofidicos/tratamento>. Acesso em: 03 out. 2023.

BRASIL, M. da S. Acidentes de trabalho por animais peçonhentos entre trabalhadores do campo, floresta e águas Brasil 2007 a 2017. **Boletim epidemiológico 11**, v. 50, mar. 2019.

BROCKER, C. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18452-18463, 11 jun. 2010.

BULLOCK, L. T.; GREGERSEN, M. I.; KINNEY, R. The use of hypertonic sucrose solution intravenously to reduce cerebrospinal fluid pressure without a secondary rise. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 112, n. 1, p. 82-96, 30 abr. 1935.

BURDMANN, E. A. *et al.* Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 1, p. 82-88, jan. 1993.

CALMETTE, A. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 8, p. 275-291, 1894.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, 2004.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. **Cryobiology**, v. 25, n. 5, p. 459-470, 1 out. 1988.

CARVALHO, P. C. *et al.* PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 102-117, jan. 2016.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 5 dez. 2006.

CAYCO, A. V.; PERAZELLA, M. A.; HAYSLETT, J. P. Renal insufficiency after intravenous immune globulin therapy: a report of two cases and an analysis of the literature. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 8, n. 11, p. 1788-1794, nov. 1997.

CHAPMAN, S. A. *et al.* Acute renal failure and intravenous immune globulin: occurs with sucrose-stabilized, but not with D-sorbitol-stabilized, formulation. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 12, p. 2059-2067, dez. 2004.

CHARVAT, R. A. *et al.* Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 150, p. 151-167, ago. 2018.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 1099-1109, set. 1992.

CHE, R. *et al.* Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 306, n. 4, p. 367-378, 15 fev. 2014.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; DIALLO, A. Evaluation of snake bite incidence in the Sahelian zone of Senegal, example of Niakhar. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)**, v. 95, n. 3, p. 151-153, ago. 2002.

CHIPPAUX, J. P.; KAMBEWASSO, A. Snake bites and antivenom availability in the urban community of Niamey, Niger. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)**, v. 95, n. 3, p. 181-183, ago. 2002.

CHONG, J. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 486-494, 2 jul. 2018.

COSTANTINO, H. R. *et al.* Water sorption behavior of lyophilized protein–sugar systems and implications for solid-state interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 2, p. 211-221, 18 maio 1998.

DANTAL, J. Intravenous immunoglobulins: in-depth review of excipients and acute kidney injury risk. **American Journal of Nephrology**, v. 38, n. 4, p. 275-284, 2013.

DANTAS, R. T. *et al.* Evaluation of KIM-1 as an early biomarker of snakebite-induced AKI in mice. **Toxicon**, v. 151, p. 24-28, 1 set. 2018.

DE CASTRO, I. *et al.* *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 833-839, 1 jun. 2004.

DE CASTRO, K. L. P. *et al.* A Combined strategy to improve the development of a coral antivenom against *Micrurus spp.* **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-13, 2019.

DE MORAIS, I. C. O. *et al.* *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, jan. 2013.

DE SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; DE SILVA, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 446-452, mar. 2016.

DICKENMANN, M.; OETTL, T.; MIHATSCH, M. J. Osmotic nephrosis: acute kidney injury with accumulation of proximal tubular lysosomes due to administration of exogenous solutes. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 3, p. 491-503, mar. 2008.

EADDY, A. C.; SCHNELLMANN, R. G. Visualization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺ in renal cells using confocal microscopy and Fluo5F. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 1, p. 424-427, 7 jan. 2011.

EMMA, F. *et al.* Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 267-280, maio 2016.

ENGBERG, A.; ERICSSON, J. L. Effects of dextran-40 on proximal renal tubule. Electron microscopic and cytochemical studies in the mouse. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 135, n. 3, p. 263-274, 1969.

ENWERE, G. C.; OBU, H. A.; JOBARTEH, A. Snake bites in children in the Gambia. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 20, n. 2, p. 121-124, jun. 2000.

FARIAS, I. B. DE *et al.* Functional and proteomic comparison of *Bothrops jararaca* venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. **Journal of Proteomics**, v. 174, p. 36-46, 1 mar. 2018.

FELDKAMP, T. *et al.* Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 290, n. 2, p. 465-477, fev. 2006.

PHISALIX, C.; BERTRAND, G. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. **Comptes Rendus de la Société de Biologie**, v. 46, p. 111-113, 1894a.

PHISALIX, C.; BERTRAND, G. S. Propriétés antitoxique du sang des animaux vaccinée contre le venin de vipère. Contribution a l'étude du mécanisme de la vaccination contre ce venin. **Archives de Physiologie**, 6, pp. 611-619. 1984b.

FRANCO, M. D.; KALIL, J. The Butantan Institute: History and Future Perspectives. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 2862, 3 jul. 2014.

FRY, B. G. *et al.* Effectiveness of snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 22, n. 1, p. 23-34, 5 dez. 2003.

GERRING, D.; KING, T. R.; BRANTON, R. Validating a faster method for reconstitution of Crotalidae Polyvalent Immune Fab (ovine). **Toxicon**, v. 69, p. 42-49, jul. 2013.

GÓMEZ-BETANCUR, I. *et al.* Perspective on the Therapeutics of anti-snake venom. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 18, 9 set. 2019.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751-766, fev. 1949.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 3 abr. 1981.

GRIFFIN, B. R.; FAUBEL, S.; EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of drug-induced kidney toxicity. **Therapeutic drug monitoring**, v. 41, n. 2, p. 213-226, abr. 2019.

GRIMM-GÜNTNER, E.M. S. *et al.* Plastin 1 Binds to keratin and is required for terminal web assembly in the intestinal epithelium. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 10, p. 2549-2562, 15 maio 2009.

GUO, Y. *et al.* Adverse effects of immunoglobulin therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1299, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. **Revista De Biología Tropical**, v. 36, n. 2B, p. 511-517, nov. 1988.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1529-1538, nov. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an alternative to the antivenom crisis in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 468-475, jun. 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 165-182, 6 mar. 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Antivenoms for snakebite envenomings. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 369-380, out. 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Immunological profile of antivenoms: preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 340-350, 13 jun. 2014.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-Art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 13 maio 2017a.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 14 set. 2017b.

GUTIÉRREZ, J. M. Reflexiones desde la academia: universidad, ciencia y sociedad. **Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica**. San José, Costa Rica: Editorial Arlekin, 2019.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976-987, 1 dez. 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129-142, maio 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 8, p. 721-741, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, nov. 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS CÉSPEDES, G. Instituto Clodomiro Picado: Ciencia y Tecnología Endógenas en la Solución de un Problema de la Salud Pública en Centroamérica. **Interciencia**, v. 24, n. 3, p. 182-186, maio 1999.

GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; FAN, H. W. Instituto Butantan and Instituto Clodomiro Picado: A long-standing partnership in science, technology, and public health. **Toxicon**, v. 202, p. 75-81, 30 out. 2021.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS medicine**, v. 3, n. 6, p. 150, jun. 2006.

HABIB, A. G. *et al.* Envenoming after carpet viper (*Echis ocellatus*) bite during pregnancy: timely use of effective antivenom improves maternal and foetal outcomes. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 13, n. 9, p. 1172-1175, set. 2008.

HAN, W. K. *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 237-244, 1 jul. 2002.

HARRISON, R. A. *et al.* Snake envenoming: A disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, 22 dez. 2009.

HASKIN, J. A.; WARNER, D. J.; BLANK, D. U. Acute renal failure after large doses of intravenous immune globulin. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 7-8, p. 800-803, 1999.

HATAKEYAMA, D. M. *et al.* 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, jan. 2018.

HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, n. 5-6, p. 573-579, 1992.

HAWGOOD, B. J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1241-1258, set. 1999.

HELLER, M. C.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Protein formulation and lyophilization cycle design: prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 2, p. 166-174, 20 abr. 1999.

HERRERA, M. *et al.* Freeze-dried snake antivenoms formulated with sorbitol, sucrose or mannitol: Comparison of their stability in an accelerated test. **Toxicon**, v. 90, p. 56-63, 1 nov. 2014.

HERRERA, M. *et al.* Physicochemical characterization of commercial freeze-dried snake antivenoms. **Toxicon**, v. 126, p. 32-37, 1 fev. 2017a.

HERRERA, M. *et al.* Freeze-dried EchiTAB+ICP antivenom formulated with sucrose is more resistant to thermal stress than the liquid formulation stabilized with sorbitol. **Toxicon**, v. 133, p. 123-126, 1 jul. 2017b.

HO, M. *et al.* Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 260-266, mar. 1990.

ICP. Instituto Clodomiro Picado. **El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica**. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología, 2016. Disponível em: https://icp.ucr.ac.cr/sites/default/files/paragraphs-img/El_envenenamiento_por_mordedura_en_Centroamerica_2016_0.pdf. Acesso em: 03 out. 2023.

ICP. Instituto Clodomiro Picado. **Serpientes venenosas de Costa Rica - *Bothrops asper***, 2022. Disponível em: <http://www.icp.ucr.ac.cr/es/informacion-y-materiales/serpientes-venenosas-de-costa-rica/bothrops-asper>. Acesso em: 11 jun. 2022.

ILIYASU, G. *et al.* Effect of distance and delay in access to care on outcome of snakebite in rural north-eastern Nigeria. **Rural and Remote Health**, v. 15, n. 4, p. 1-6, 2015.

IMAMURA, K. *et al.* Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 2, p. 266-274, 1 fev. 2003.

ITKIN, Y. M.; TRUJILLO, T. C. Intravenous immunoglobulin-associated acute renal failure: case series and literature review. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 6, p. 886-892, jun. 2005.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 2, p. 990-994, fev. 1980.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 74-76, mar. 1997.

JORGE, R. J. B. *et al.* Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93-114, 30 jan. 2015.

JORGE, R. J. B. *et al.* Differences between renal effects of venom from two *Bothrops jararaca* populations from southeastern and southern Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 125, p. 84-90, jan. 2017.

JULVE PARREÑO, J. M. *et al.* A synthetic biology approach for consistent production of plant-made recombinant polyclonal antibodies against snake venom toxins. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 3, p. 727-736, mar. 2018.

KALIL, J.; FAN, H. W. Production and Utilization of Snake Antivenoms in South America. *In*: Cruz, L., Luo, S. (eds.). **Toxins and Drug Discovery**. Toxinology. EUA: Springer, Dordrecht, 2017.

KASTURIRATNE, A. *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. 218, 4 nov. 2008.

KOHL, K. *et al.* Evaluation of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury in a rat nephropathy model. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 105, p. 1-16, 1 set. 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 15 ago. 1970.

LAHOUD, Y. *et al.* Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor on ischemic kidney injury during nephron sparing surgery: quantitative assessment by NGAL and KIM-1. **World Journal of Urology**, v. 33, n. 12, p. 2053-2062, dez. 2015.

LAKSHMANADOSS, U.; BALAKRISHNAN, E.; DISALLE, M. R. Sucrose nephropathy following IV immunoglobulin. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 125-127, mar. 2010.

LE HIR, M.; DUBACH, U. C. Peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation in the rat kidney: distribution of fatty acyl-coenzyme A oxidase and 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase activities along the nephron. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 441-444, maio 1982.

LEMASTERS, J. J. *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1366, n. 1-2, p. 177-196, 10 ago. 1998.

LEMOS, J. de C. *et al.* Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, n. 1, p. 50-59, mar. 2009.

LEÓN, G. *et al.* Immune response towards snake venoms. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 381-398, out. 2011.

LEÓN, G. *et al.* Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63-76, 15 dez. 2013.

LEÓN, G. *et al.* Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 151, p. 63-73, 1 set. 2018.

LI, M. K. *et al.* Does sucrose damage kidneys? **British Journal of Urology**, v. 58, n. 4, p. 353-357, ago. 1986.

LIM, C. S.; VAZIRI, N. D. Iron and oxidative stress in renal insufficiency. **American Journal of Nephrology**, v. 24, n. 6, p. 569-575, 2004a.

LIM, C. S.; VAZIRI, N. D. The effects of iron dextran on the oxidative stress in cardiovascular tissues of rats with chronic renal failure. **Kidney International**, v. 65, n. 5, p. 1802-1809, maio 2004b.

LIM, P. S. *et al.* Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 14, n. 11, p. 2680-2687, nov. 1999.

LIN, C. S. *et al.* Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 4, p. 2457-2467, abr. 1994.

LINARDI, A. *et al.* Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 9, p. 895-906, set. 2011.

LITWIN, J. A. *et al.* Immunocytochemical demonstration of peroxisomal enzymes in human kidney biopsies. **Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 54, n. 4, p. 207-213, 1988a.

LITWIN, J. A. *et al.* Detection of peroxisomes in human liver and kidney fixed with formalin and embedded in paraffin: the use of catalase and lipid beta-oxidation enzymes as immunocytochemical markers. **The Histochemical Journal**, v. 20, n. 3, p. 165-173, mar. 1988b.

LOMONTE, B. *et al.* Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 323-339, 13 jun. 2014.

LOPES-DE-SOUZA, L. *et al.* Development of a cell-based in vitro assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. **Toxicon**, v. 170, p. 68-76, dez. 2019.

LUQUE, Y. *et al.* Renal safety of high-dose, sucrose-free intravenous immunoglobulin in kidney transplant recipients: an observational study. **Transplant International**, v. 29, n. 11, p. 1205-1215, nov. 2016.

MAGALHÃES, E. P. *et al.* (-)- α -Bisabolol as a protective agent against epithelial renal cytotoxicity induced by amphotericin B. **Life Sciences**, v. 291, p. 120271, 15 fev. 2022.

MAHLER, H. C. *et al.* Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 9, p. 2909-2934, 1 set. 2009.

MARINHO, A. D. *et al.* *Bothropoides pauloensis* venom effects on isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelial cells. **Toxicon**, v. 108, p. 126-133, 15 dez. 2015.

MARINHO, A. D. *et al.* *Bothrops pauloensis* snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2 mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 190, p. 31-38, 30 jan. 2021.

MARTINES, M. S. *et al.* Effects of *Schizolobium parahyba* extract on experimental *Bothrops* venom-induced acute kidney injury. **PloS One**, v. 9, n. 2, 2014.

MATOS, R. R.; IGNOTTI, E. Incidence of venomous snakebite accidents by snake species in Brazilian biomes. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2837-2846, 8 jul. 2020.

MAUNSBACH, A. B.; MADDEN, S. C.; LATTA, H. Light and electron microscopic changes in proximal tubules of rats after administration of glucose, mannitol, sucrose, or dextran. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 11, p. 421-432, jun. 1962.

MAURY, M. *et al.* Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 2, p. 251-261, 1 fev. 2005.

MENDONÇA-DA-SILVA, I. *et al.* Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, 27 nov. 2017.

MENSINK, M. A. *et al.* How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288-295, 1 maio 2017.

MEYER, W. P. *et al.* First clinical experiences with a new ovine *Echis ocellatus* snake bite antivenom in Nigeria: randomized comparative trial with Institut Pasteur Serum (Ipser) Africa antivenom. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 3, p. 291-300, mar. 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 16 dez. 1983.

MUNIZ, E. G. *et al.* Use of freeze-dried trivalent antivenom to neutralize the toxic activities of *Bothrops atrox* snake venoms from the Amazon. **Toxicon**, v. 200, p. 19-22, 1 set. 2021.

NASCIMENTO, J. M. *et al.* Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 85, n. 5, p. 591-605, out. 2007.

NOGUEIRA JÚNIOR, F. A. N. *et al.* *Bothrops alternatus* Snake venom induces cytokine expression and oxidative stress on renal function. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 2058-2068, 2019.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, 2000. Disponível em:
<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>.
Acesso em: 22 out. 2022.

O'CONNOR, J. E. *et al.* Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 151, n. 1, p. 568-573, 29 fev. 1988.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979.

ORBACH, H. *et al.* Intravenous immunoglobulin: adverse effects and safe administration. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 29, n. 3, p. 173-184, dez. 2005.

ORBACH, H.; TISHLER, M.; SHOENFELD, Y. Intravenous immunoglobulin and the kidney--a two-edged sword. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 34, n. 3, p. 593-601, dez. 2004.

OTERO, R. *et al.* Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 1 ago. 2002.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 998-1011, 1 dez. 2009.

PICADO, C. T. Serpientes venenosas de Costa Rica: sus venenos, seroterapia anti-ofídica. *In: Serpientes venenosas de Costa Rica: sus venenos, seroterapia anti-ofídica.* San José da Costa Rica: Imprenta Alsina, 1931. p. 219-219.

PIERCE, L. R.; JAIN, N. Risks associated with the use of intravenous immunoglobulin. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 17, n. 4, p. 241-251, out. 2003.

PIERINI, S. V. *et al.* High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 225-236, fev. 1996.

PINHO, F. M. O.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 354-362, jul. 2008.

PORTILLA, D. Role of fatty acid beta-oxidation and calcium-independent phospholipase A2 in ischemic acute renal failure. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 473-477, jul. 1999.

PUCCA, M. B. *et al.* History of envenoming therapy and current perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

RACZ, Z. *et al.* Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. **Lupus**, v. 19, n. 5, p. 599-612, abr. 2010.

RAHMY, T. R. Action of cobra venom on the renal cortical tissues: electron microscopic studies. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 1, p. 85-112, 2001.

RAMOS, H. R. *et al.* A heterologous multiepitope DNA prime/recombinant protein boost immunisation strategy for the development of an antiserum against *Micrurus corallinus* (Coral Snake) Venom. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, mar. 2016.

RESIERE, D.; MEHDAOUI, H.; NEVIERE, R. Inflammation and oxidative stress in snakebite envenomation: a brief descriptive review and clinical implications. **Toxins**, v. 14, n. 11, p. 802, 18 nov. 2022.

RODRIGUES SGRIGNOLLI, L. *et al.* Acute kidney injury caused by bothrops snake venom. **Nephron. Clinical Practice**, v. 119, n. 2, p. 131-136; 2011.

ROOB, J. M. *et al.* Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 11, n. 3, p. 539-549, mar. 2000.

RUIZ-RAMÍREZ, A. *et al.* Kidney dysfunction induced by a sucrose-rich diet in rat involves mitochondria ROS generation, cardiolipin changes, and the decline of autophagy protein markers. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 318, n. 1, p. 53-66, jan. 2020.

SARCIAUX, J. M. *et al.* Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 12, p. 1354-1361, dez. 1999.

SASA, M.; ARIAS ORTEGA, J.; BONILLA-MURILLO, F. Assessing survival of wild-caught snakes in open venom production systems. **Toxicon**, v. 138, p. 49-52, nov. 2017.

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 904-922, 1 dez. 2009.

SCHERRMANN, J. M. Antibody treatment of toxin poisoning: recent advances. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 363-375, 1994.

SCHNELLMANN, R. G. Intracellular calcium chelators and oxidant-induced renal proximal tubule cell death. **Journal of Biochemical Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 299-303, 1991.

SCHWARTZ, S. L.; JOHNSON, C. B. Pinocytosis as the cause of sucrose nephrosis. **Nephron**, v. 8, n. 3, p. 246-254, 1971.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 24 out. 1968.

SEGURA, Á. *et al.* Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 609-615, 1 maio 2009.

SEGURA, A. *et al.* Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, nov. 2010.

SEGURA, A. *et al.* Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 158-162, jan. 2012.

SEGURA, A. *et al.* Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. **Biologicals**, v. 41, n. 2, p. 93-97, mar. 2013.

SGRIGNOLLI, L. R. *et al.* Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. **Nephron Clinical Practice**, v. 119, n. 2, p. 131-137, 2011.

SHINOMIYA, H. Plastin family of actin-bundling proteins: Its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012.

SIDDIQUI, W. *et al.* Acute kidney injury due to sucrose-containing intravenous immunoglobulins. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 30, n. 3, p. 732-737, jun. 2019.

SINAN. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Doenças e Agravos de Notificação. **Datasus**, 2007. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>. Acesso em 12 jul. 2023.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 943-953, 1 out. 2012.

SOLANO, G. *et al.* Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. **Biologicals** v. 38, n. 5, p. 577-585, set. 2010.

SOLANO, G. *et al.* Contributions of the snake venoms of *Bothrops asper*, *Crotalus simus* and *Lachesis stenophrys* to the paraspecificity of the Central American polyspecific antivenom (PoliVal-ICP). **Toxicon**, v. 144, p. 1-6, 15 mar. 2018.

SOLANO, G.; GÓMEZ, A.; LEÓN, G. Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the *Limulus Amoebocyte* Lysate assay (LAL). **Toxicon**. v. 105, p. 13-18, out. 2015.

SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C. *et al.* The history of antivenoms development: Beyond Calmette and Vital Brazil. **Toxicon**. v. 150, p. 86-95, ago. 2018.

STAHEL, E. Epidemiological aspects of snake bites on a Liberian rubber plantation. **Acta Tropica**, v. 37, n. 4, p. 367-374, dez. 1980.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, 18 set. 2017. Disponível em:

THE LANCET. Snakebite-emerging from the shadows of neglect. **Lancet (London, England)**, v. 393, n. 10187, p. 2175, 1 jun. 2019.

THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 29, n. 12, p. 1419-1470, 1991.

TRAN, M. T. *et al.* PGC1 α drives NAD biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 528-532, 24 mar. 2016.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, J. **The reptile database**, 2021. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 21 maio 2021.

UNIPROT, 2023. Disponível em: <https://www.uniprot.org/> . Acesso em: 23 jul. 2023.

VASKO, R. Peroxisomes and Kidney Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 4, p. 217-231, 1 ago. 2016.

VILLALTA, M. *et al.* Development of a new polyspecific antivenom for snakebite envenoming in Sri Lanka: Analysis of its preclinical efficacy as compared to a currently available antivenom. **Toxicon**, v. 122, p. 152-159, 1 nov. 2016.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, n. 2, p. 129-188, 20 ago. 1999.

WARRELL, D. A. *et al.* Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 6, p. 1235-1247, nov. 1986.

WATERS, S. L.; WONG, J. K.; SCHNELLMANN, R. G. Depletion of endoplasmic reticulum calcium stores protects against hypoxia- and mitochondrial inhibitor-

induced cellular injury and death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, n. 1, p. 57-60, 7 nov. 1997.

WHO. **WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-seventh report**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241210133>. Acesso em: 10 maio 2023.

WHO. **WHO | WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**, 2018 Disponível em: http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/. Acesso em: 25 maio 2021.

WHO. **Snakebite envenoming**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>. Acesso em: 21 maio 2021.

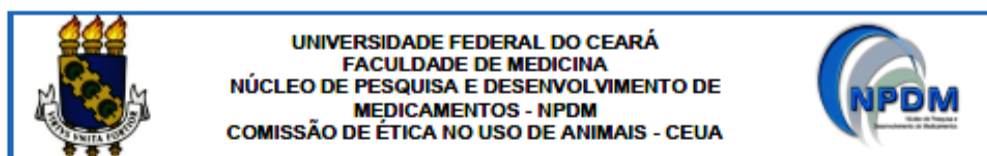
ZAGER, R. A. *et al.* Parenteral iron formulations: a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 1, p. 90-103, jul. 2002.

ZAGER, R. A. Parenteral iron treatment induces MCP-1 accumulation in plasma, normal kidneys, and in experimental nephropathy. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1533-1542, out. 2005.

ZAGER, R. A.; JOHNSON, A. C. M.; HANSON, S. Y. Parenteral iron nephrotoxicity: potential mechanisms and consequences. **Kidney International**, v. 66, n. 1, p. 144-156, jul. 2004.

ZHANG, R.; SZERLIP, H. M. Reemergence of sucrose nephropathy: acute renal failure caused by high-dose intravenous immune globulin therapy. **Southern Medical Journal**, v. 93, n. 9, p. 901-904, set. 2000.

ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA – UFC



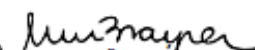
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA CINÉTICA E TOXICIDADE DO SORO ANTIOFÍDICO POLIVALENTE ESTABILIZADO COM SACAROSE EM CAMUNDONGOS SWISS", registrada com o protocolo 07150321-0, sob a responsabilidade de Helena Serra Azul Monteiro e Francisco Assis Nogueira Junior, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 18 / 03 / 2021.

We hereby certify that the project entitled "EVALUATION OF THE KINETICS AND TOXICITY OF SUCROSE-STABILIZED POLYVALENT ANTIOPHIDIC SERUM IN SWISS MICE", identified by the protocol number 07150321-0, and conducted by Helena Serra Azul Monteiro and Francisco Assis Nogueira Junior which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 03 / 18 / 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: ABRIL/2021 Fim: ABRIL/2022
Espécie	Camundongo isogênico
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	480
Peso	18 a 20g
Idade	6 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 26 de março de 2021


Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
E-mail: ceua-npdm@ufc.br

ANEXO II – Código das proteínas selecionadas com base no valor do foldchange ≥ 2 .

- Proteínas selecionadas para o grupo antiveneno sem sacarose vs. grupo controle.

	FC	log2(FC)	p.adjusted	-log10(p)
P08249	42.586	-12.315	6,83E-03	5.1654
P45952	48.099	-10.559	16.574	3.7806
Q3V0K9	11.826	3.5639	18.461	2.7337
P85094	9.8115	3.2945	28.086	2.5515
P97449	3.7308	1.8995	28.086	2.5515
P35700	43.848	-11.894	28.086	2.5515
P12970	7.2773	2.8634	42.633	2.3703
O88338	2.0253	1.0182	42.633	2.3703
Q8CG76	6.4822	2.6965	43.169	2.3648
Q01768	46.369	-11.088	43.169	2.3648
P02301	43.816	-11.905	43.527	2.3612
Q8R0Y6	2.0284	1.0204	49.421	2.3061
Q91VA0	9.6272	3.2671	51.007	2.2924
Q9DBF1	9.5959	3.2624	54.901	2.2604
P62897	49.113	-10.258	56.432	2.2485
Q9CWS0	2.2985	1.2007	56.773	2.2459
Q9QZQ8	4.9226	2.2994	6.327	2.1988
Q64727	7.388	2.8852	63.717	2.1957
Q8BH00	7.1956	2.8085	63.717	2.1957
P97742	6.6303	2.7291	63.717	2.1957
O08638	6.5992	2.7223	63.717	2.1957
Q99J16	5.5493	2.4723	63.717	2.1957
P50136	5.4588	2.4486	63.717	2.1957
Q99JY9	4.7226	2.2396	63.717	2.1957
P18242	3.0975	1.6311	63.717	2.1957
Q9DBL1	2.9057	1.5389	63.717	2.1957
O70251	2.6463	1.404	63.717	2.1957
O55022	2.5907	1.3733	63.717	2.1957
O88990	39.651	-13.346	63.717	2.1957
O70475	2.453	1.2945	63.717	2.1957
Q99M87	2.4389	1.2862	63.717	2.1957
Q6ZWV3	2.3812	1.2517	63.717	2.1957
Q9CQ69	42.495	-12.346	63.717	2.1957
O35459	2.2813	1.1899	63.717	2.1957
O08553	2.1516	1.1054	63.717	2.1957
Q8VC12	2.0169	1.0121	63.717	2.1957

P52825	4.2635	2.092	65.191	2.1858
O88958	2.6393	1.4002	65.191	2.1858
P84228	44.901	-11.552	66.226	2.179
Q9R112	2.2996	1.2014	66.683	2.176
P62141	4.2222	2.078	70.307	2.153
Q9R1P0	3.1649	1.6622	70.307	2.153
Q8K010	4.4369	2.1496	74.428	2.1283
Q99KR7	3.1693	1.6642	74.428	2.1283
Q78JN3	2.6795	1.4219	74.428	2.1283
P97384	4.4634	2.1581	74.452	2.1281
Q6URW6	3.5345	1.8215	74.498	2.1279
P62835	5.135	2.3604	77.263	2.112
Q9DBG6	3.8993	1.9632	77.263	2.112
Q8BVE3	5.2214	2.3844	78.142	2.1071
P16406	4.3859	2.1329	78.142	2.1071
O35855	3.3656	1.7508	78.142	2.1071
Q78IK4	4.4292	2.1471	81.496	2.0889
Q9DC51	2.3177	1.2127	82.516	2.0835
P60766	3.4956	1.8055	83.424	2.0787
Q3UNZ8	2.2913	1.1962	83.581	2.0779
Q8BTM8	4.2186	2.0768	84.995	2.0706
Q9Z218	2.2488	1.1692	84.995	2.0706
P03921	2.144	1.1003	85.101	2.0701
Q9D3D9	2.7811	1.4757	85.123	02.07
P47740	5.2443	2.3908	86.574	2.0626
P61922	5.9934	2.5834	94.793	2.0232
Q8K370	2.2453	1.1669	94.793	2.0232
P34914	5.4731	2.4524	95.313	2.0208
A2AKK5	4.4949	2.1683	95.313	2.0208
Q6P069	3.4595	1.7906	95.313	2.0208
P97429	2.4812	1.311	95.313	2.0208
Q5SWY8	2.3392	1.226	95.313	2.0208
Q99K67	2.2182	1.1494	95.313	2.0208
Q9QUM9	2.0998	1.0703	95.313	2.0208
Q8JZN5	7.5154	2.9099	97.364	2.0116
P26231	5.33	2.4141	98.587	2.1962
Q8R519	2.3423	1.2279	10.913	1.962

P56565	5.084	2.346	10.949	1.9606
Q99KQ4	4.3037	2.1056	10.976	1.9596
O35643	4.9194	2.2985	1.101	1.9582
A2ASQ1	4.9847	2.3175	11.137	1.9532
P02104	47.093	-10.864	11.137	1.9532
Q9QYR7	3.424	1.7757	11.231	1.9496
Q61001	16.287	4.0256	11.558	1.9371
Q9DD20	5.8543	2.5495	11.873	1.9255
Q9D939	5.8046	2.5372	11.873	1.9255
Q05793	3.1654	1.6624	11.873	1.9255
P17225	5.7431	2.5218	11.907	1.9242
Q8CC88	9.392	3.2314	12.072	1.9182
Q6PB66	2.828	1.4998	12.088	1.9176
Q9JKF1	4.8379	2.2744	12.351	1.9083
P00796	2.347	1.2308	12.579	1.9004
Q9D0F9	2.0536	1.0382	12.645	1.8981
Q3TLP5	2.9752	1.573	12.746	1.8946
Q9DB29	4.5463	2.1847	14.231	1.8468
Q9CPY7	4.5306	2.1797	14.231	1.8468
Q99MN9	4.4303	2.1474	14.231	1.8468
Q9D8E6	3.7284	1.8986	14.231	1.8468
Q9D7B6	2.9475	1.5595	1.436	1.8428
Q3ULD5	3.4585	1.7901	14.421	1.841
P62814	2.1825	1.126	14.421	1.841
Q9EQH3	2.5448	1.3476	14.571	1.8365
Q8VCH0	6.4195	2.6825	14.822	1.8291
Q99MR8	5.1869	2.3749	14.822	1.8291
P16331	2.429	1.2804	15.067	1.822
P0C0S6	1.935	-23.696	16.001	1.7959
P24527	2.1958	1.1942	16.402	1.7851
Q61598	3.9436	1.9795	17.011	1.7693
Q9Z2Y8	2.7929	1.4818	17.067	1.7678
Q99NB1	4.306	2.1063	17.241	1.7634
P51863	4.1654	2.0584	17.682	1.7525
Q6P1B1	2.054	1.0384	17.841	1.7486
Q9WVL0	11.31	3.4995	18.002	1.7447
Q6P3A8	4.0656	2.0235	18.002	1.7447
P08003	3.6512	1.8684	18.002	1.7447
Q99L47	2.9147	1.5433	18.002	1.7447
P37040	2.7571	1.4632	18.002	1.7447
Q9WUU7	2.6877	1.4264	18.002	1.7447
P39061	2.6039	1.3807	18.002	1.7447
Q9DBT9	2.2991	1.2011	18.002	1.7447

P49312	2.4159	1.2726	18.152	1.7411
O55143	6.9549	2.798	18.741	1.7272
Q61767	6.8051	2.7666	18.741	1.7272
P50396	6.5619	2.7141	18.741	1.7272
P97447	2.0764	1.0541	18.741	1.7272
P26039	10.916	3.4484	18.748	1.7271
P35979	3.1264	1.6445	18.748	1.7271
O70492	3.6304	1.8601	18.798	1.7259
Q9D7N9	3.0201	1.5946	18.798	1.7259
Q9R0H0	4.0538	2.0193	18.878	1.724
O88451	2.723	1.4452	18.878	1.724
Q9DBL7	2.3462	1.2303	19.582	1.7081
Q80W22	3.5062	1.8099	19.655	1.7065
Q01730	2.8053	1.4882	19.655	1.7065
P23953	2.49	1.3162	19.655	1.7065
Q8VDK1	2.7771	1.4736	19.866	1.7019
Q8R0F8	3.9081	1.9665	2.013	1.6962
P00375	2.5324	1.3405	20.291	1.6927
O55142	2.3843	1.2536	20.878	1.6803
Q8QZS1	2.0321	1.023	21.133	1.675
A2ATU0	8.7294	3.1259	21.507	1.6674
Q80X90	6.5544	2.7125	21.507	1.6674
P41105	2.3623	1.2402	21.507	1.6674
O09174	2.205	1.1408	21.507	1.6674
O35737	3.3987	1.765	24.097	1.618
Q8R086	6.65	2.7333	25.136	1.5997
Q9DCD0	2.5973	1.377	25.509	1.5933
Q61316	5.938	2.57	2.592	1.5864
Q3TC72	5.845	2.5472	2.592	1.5864
P17751	2.7555	1.4623	2.683	1.5714
Q78JT3	6.7917	2.7638	27.403	1.5622
P80314	4.9106	2.2959	27.655	1.5582
Q80XL6	2.9856	1.578	27.655	1.5582
O54909	2.2319	1.1583	27.655	1.5582
Q9EQ20	2.9779	1.5743	27.807	1.5559
P23492	5.4013	2.4333	28.669	1.5426
P19157	3.2573	1.7037	28.669	1.5426
Q9D172	3.1653	1.6624	28.669	1.5426
Q61391	3.0355	1.6019	28.669	1.5426
Q71RI9	2.3096	1.2077	28.669	1.5426
P14733	2.2785	1.1881	28.669	1.5426
Q8CFA2	2.1517	1.1055	28.669	1.5426
O08585	4.0941	2.0335	28.786	1.5408

P63276	4.1998	2.1935	29.661	1.5278
Q8R4N0	3.716	1.8938	29.661	1.5278
P14824	2.4074	1.2675	29.661	1.5278
P15864	40.416	-1.307	30.114	1.5212
P11930	3.1858	1.6717	30.661	1.5134
Q9DCN2	2.3736	1.2471	30.693	1.513
P57776	3.2311	1.692	307	1.5129
P42208	2.6239	1.3917	31.185	1.5061
P40124	2.2614	1.1772	31.297	1.5045
Q9Z0S1	2.2789	1.1883	32.052	1.4941
Q9ESG4	2.4281	1.2798	33.504	1.4749
Q9CPV4	2.3367	1.2245	33.606	1.4736
P62984	25.733	-19.583	33.802	1.4711
Q921H8	3.1634	1.6615	34.148	1.4666
Q9JHU4	4.9589	2.31	3.515	1.4541
P47911	2.2382	1.1623	3.515	1.4541
P15532	2.517	-19.902	3.573	1.447
Q9CQ60	2.0179	1.0129	35.971	1.444
Q9DCV7	2.754	1.4615	36.151	1.4419
P28798	3.6432	1.8652	37.141	1.4301
Q9DBG3	3.2819	1.7145	37.141	1.4301
Q8BWF0	2.7941	1.4824	37.141	1.4301
P68433	28.101	-18.313	3.742	1.4269
P11679	2.2039	1.14	37.502	1.426
P58281	3.7347	1.901	37.761	1.423
Q9CPQ1	2.971	-1.751	37.761	1.423
P08752	4.3517	2.1216	38.365	1.4161
Q8QZW3	2.4191	1.2745	38.639	1.413
Q9Z2X1	2.6797	1.4221	3.927	1.4059
Q922Q1	2.388	1.2558	39.902	1.399
Q9CQX2	2.4053	1.2662	40.051	1.3974
P62843	2.2033	1.1397	40.676	1.3907
Q9CXN7	2.8132	1.4922	42.081	1.3759
Q9DCJ9	2.0788	1.0558	42.089	1.3758
Q9JHW2	5.8577	2.5503	42.479	1.3718
P52196	2.9764	1.5736	42.479	1.3718
Q9DCG6	2.6134	1.3859	42.479	1.3718
Q99J99	5.5565	2.4742	45.252	1.3444
P99029	33.377	-15.831	46.237	1.335
P53395	3.2245	1.6891	46.256	1.3348
Q92511	2.2289	1.1564	46.489	1.3327
Q01149	3.2192	1.6867	47.299	1.3251
Q9D687	2.2693	1.1822	49.407	1.3062

P61458	31.273	-1.677	49.533	1.3051
P80317	2.7015	1.4338	49.766	1.3031
O70577	2.093	1.0656	51.272	1.2901
P29391	2.637	1.3989	51.471	1.2884
P62631	31.667	-16.589	51.773	1.2859
P29341	2.332	1.2216	518	1.2857
P56395	27.198	-18.784	52.866	1.2768
P62855	2.4634	1.3007	52.866	1.2768
P01027	9.2176	3.2044	53.822	1.269
P43274	34.085	-15.528	54.282	1.2653
O88322	2.3131	1.2098	54.328	1.265
P30115	2.744	1.4563	55.563	1.2552
Q64433	26.892	-18.947	55.662	1.2544
P70349	45.526	-11.352	57.339	1.2416
Q9CZX8	2.0325	1.0233	57.339	1.2416
P97351	2.3879	1.2558	57.597	1.2396
Q8K183	7.5351	2.9136	57.601	1.2396
Q64436	34.263	-15.453	5.884	1.2303
P31001	2.2436	1.1658	60.136	1.2209
O70435	2.3704	1.2451	60.771	1.2163
O08756	4.6519	2.2178	61.612	1.2103
Q9JLB4	6.4581	2.6911	6.345	1.1976
P43024	42.253	-12.429	6.383	1.195
P97823	2.2802	1.1891	64.312	1.1917
Q9R069	2.35	1.2326	64.632	1.1896
Q9D1K2	2.0982	1.0692	67.876	1.1683
Q8VDD5	2.4602	1.2988	7.127	1.1471
P24369	39.818	-13.285	71.941	1.143
P62889	2.3263	1.2181	72.053	1.1423
Q80Y14	2.0534	1.038	73.153	1.1358
A2AQ07	37.718	-14.067	73.361	1.1345
Q64478	38.094	-13.924	73.479	1.1338
O55125	2.483	1.3121	73.626	1.133
Q62425	32.181	-16.357	77.467	1.1109
Q9QYR9	2.2246	1.1536	77.825	1.1089
Q9QYB1	2.4098	1.2689	79.272	1.1009
P62320	2.1241	1.0868	8.211	1.0856
Q62452	43.128	-12.133	83.422	1.0787
Q9Z2V4	2.0694	1.0492	88.495	1.0531
Q9CR62	2.2292	1.1565	91.104	1.0405
Q8K3J1	2.0193	1.0139	92.298	1.0348
Q6IRU2	5.2476	2.3916	93.838	1.0276
P37804	3.1502	1.6554	93.838	1.0276

P17427	2.7642	1.4669	95.024	1.0222
---------------	--------	--------	--------	--------

Q922R8	3.4748	1.7969	96.159	1.017
---------------	--------	--------	--------	-------

- Proteínas seleccionadas para o grupo antiveneno formulado com 2,5% de sacarose vs. grupo controle.

	FC	log2(FC)	p.adjusted	-log10(p)
P45952	44.844	-1.157	3,63E-02	5.4396
Q62261	3.1869	1.6722	9,46E-01	4.0243
P99029	42.167	-12.458	28.424	3.5463
P10639	36.861	-14.398	927	3.0329
P62631	40.697	-1.297	927	3.0329
P05201	2.5943	1.3754	10.073	2.9968
P85094	12.161	3.6041	18.919	2.7231
Q3V0K9	10.395	3.3778	27.059	2.5677
P0C0S6	38.638	-13.719	27.059	2.5677
P35700	4.676	-10.967	43.209	2.3644
O08756	7.2022	2.8078	49.439	2.3059
P68433	37.553	-1.413	49.439	2.3059
Q9WV27	48.594	-10.411	49.439	2.3059
Q9DBF1	11.597	3.5356	51.861	2.2852
Q8R0Y6	2.0903	1.0637	6.036	2.2193
Q8CG76	6.8696	2.7802	85.229	2.0694
P50136	5.6273	2.4924	89.665	2.0474
Q922R8	4.6901	2.2296	95.047	2.0221
P97449	3.0123	1.5908	95.047	2.0221
Q8VC30	2.1827	1.1261	95.047	2.0221
Q91VA0	8.4316	3.0758	10.609	1.9743
Q9JHW2	8.7276	3.1256	11.005	1.9584
P16546	3.2625	1.706	11.005	1.9584
Q64436	39.177	-13.519	11.075	1.9557
A2ATU0	6.3175	2.6593	11.132	1.9534
Q9D3D9	3.4017	1.7663	11.697	1.9319
Q99J16	5.405	2.4343	14.345	1.8433
P62835	5.3711	2.4252	14.459	1.8399
O88342	4.147	2.0521	14.459	1.8399
Q62433	2.2062	1.1416	16.225	1.7898
Q9QZQ8	4.5032	2.171	17.745	1.7509
Q9CQH3	45.719	-11.291	17.745	1.7509
P00329	3.5436	1.8252	18.295	1.7377
Q6P3A8	2.786	1.4782	18.986	1.7216
Q3TNA1	5.0323	2.3312	19.064	1.7198

Q8BFZ9	2.6875	1.4263	19.236	1.7159
O88990	44.852	-11.568	20.032	1.6983
P18242	12.009	3.5861	20.175	1.6952
Q9WVL0	11.965	3.5807	20.175	1.6952
Q8R086	11.792	3.5598	20.175	1.6952
Q8K183	11.108	3.4735	20.175	1.6952
Q923D2	10.518	3.3948	20.175	1.6952
Q8CGK3	9.7872	3.2909	20.175	1.6952
G5E8K5	9.7627	3.2873	20.175	1.6952
Q9DCU9	9.0303	3.1748	20.175	1.6952
Q61001	8.834	3.1431	20.175	1.6952
P49312	8.4982	3.0872	20.175	1.6952
Q8R146	8.4783	3.0838	20.175	1.6952
Q8VCH0	7.4958	2.9061	20.175	1.6952
Q62167	7.4836	2.9037	20.175	1.6952
P47754	7.1873	2.8454	20.175	1.6952
Q99KQ4	6.8018	2.7659	20.175	1.6952
Q78JT3	6.4894	2.6981	20.175	1.6952
Q80XL6	5.774	2.5296	20.175	1.6952
Q8R0N6	5.6612	2.5011	20.175	1.6952
Q9WVE8	5.5175	2.464	20.175	1.6952
P55264	5.2391	2.3893	20.175	1.6952
Q01730	5.2177	2.3834	20.175	1.6952
Q99J99	5.2133	2.3822	20.175	1.6952
O35643	5.0654	2.3407	20.175	1.6952
Q9CPY7	4.6978	2.232	20.175	1.6952
Q99MN9	4.414	2.1421	20.175	1.6952
Q9JKF1	4.3478	2.1203	20.175	1.6952
Q9Z1P6	4.2559	2.0895	20.175	1.6952
P52825	4.2045	2.0719	20.175	1.6952
Q61391	3.9959	1.9985	20.175	1.6952
Q9DC69	3.5509	1.8282	20.175	1.6952
O55029	3.4332	1.7796	20.175	1.6952
Q9D8E6	3.4189	1.7736	20.175	1.6952
Q91Y10	2.9027	1.5374	20.175	1.6952
Q8R404	2.8737	1.5229	20.175	1.6952

Q8CC88	2.7997	1.4853	20.175	1.6952
P61161	2.7296	1.4487	20.175	1.6952
P16675	2.5602	1.3563	20.175	1.6952
P56395	39.482	-13.407	20.175	1.6952
P16331	2.4526	1.2943	20.175	1.6952
Q9DBG6	2.4189	1.2743	20.175	1.6952
P39061	2.4158	1.2725	20.175	1.6952
Q9D819	2.3465	1.2305	20.175	1.6952
P97429	2.3116	1.2089	20.175	1.6952
Q64669	2.2238	1.153	20.175	1.6952
Q3TLP5	2.8062	1.4886	20.494	1.6884
P63276	9.6996	3.2779	2.094	1.679
O09174	7.2326	2.8545	2.094	1.679
P80317	3.8318	1.938	2.094	1.679
P47962	2.3733	1.2469	2.094	1.679
P23953	10.58	3.4033	21.415	1.6693
P60766	7.4317	2.8937	21.415	1.6693
Q61767	5.3853	2.429	21.415	1.6693
Q61598	3.8998	1.9634	21.415	1.6693
P50431	9.4545	3.241	21.424	1.6691
Q9QUM9	2.424	1.2774	21.453	1.6685
Q9Z1N5	3.9382	1.9775	22.325	1.6512
Q9Z210	2.3873	1.2554	22.454	1.6487
P63028	8.0995	3.0178	2.254	1.647
P62827	2.6763	1.4203	2.254	1.647
O55143	11.889	3.5716	226	1.6459
P02301	20.606	-22.788	226	1.6459
P19157	3.6521	1.8687	226	1.6459
Q9R0H0	4.5199	2.1763	22.604	1.6458
P09055	3.947	1.9807	2.485	1.6047
Q8K0E8	3.1169	1.6401	2.485	1.6047
Q8K2I3	2.7633	1.4664	2.485	1.6047
P02469	2.751	1.46	2.485	1.6047
Q9CPV4	2.6717	1.4177	2.485	1.6047
Q9Z0S1	2.6215	1.3904	2.485	1.6047
P47740	2.5021	1.3231	2.485	1.6047
Q8R519	2.0961	1.0677	2.485	1.6047
Q9WUM4	02.08	1.0566	2.485	1.6047
Q9CZ42	4.9057	2.2945	25.556	1.5925
Q9CQN1	7.965	2.9937	25.928	1.5862
Q8VEK3	7.0461	2.8168	26.136	1.5828
P03921	5.4069	2.4348	26.136	1.5828
Q80XN0	2.5181	1.3323	26.136	1.5828

P80315	2.3268	1.2184	26.136	1.5828
Q9CQX2	2.5825	1.3688	26.578	1.5755
Q9CXN7	3.7374	1.902	26.662	1.5741
O88986	2.048	1.0342	26.662	1.5741
O08709	3.1994	1.5895	27.193	1.5655
Q9DBG3	3.6651	1.8739	27.314	1.5636
O55125	3.1939	1.6753	27.314	1.5636
P17751	2.7828	1.4766	27.314	1.5636
Q9DD20	2.4422	1.2882	27.314	1.5636
P49429	2.9011	1.5366	2.787	1.5549
P13707	3.9224	1.9717	28.934	1.5386
Q9CZ7	2.521	1.334	29.236	1.5341
Q9DCD0	2.2897	1.1951	29.236	1.5341
P56135	46.233	-1.113	29.236	1.5341
Q8BWF0	3.7906	1.9224	29.823	1.5255
Q99L47	3.008	1.5888	29.823	1.5255
P01027	4.5411	2.183	30.262	1.5191
P68037	7.36	2.8797	30.361	1.5177
Q8K4Z3	4.4573	2.1562	30.361	1.5177
P42669	8.9327	3.1591	31.309	1.5043
P11276	3.2549	1.7026	32.345	1.4902
Q64442	3.3833	1.7584	33.522	1.4747
Q99KB8	2.1934	1.1332	35.135	1.4543
P10493	2.4647	1.3014	35.741	1.4468
Q9DCN2	2.6313	1.3958	36.102	1.4425
P57776	2.908	1.54	36.349	1.4395
Q3ULJ0	2.698	1.4319	38.342	1.4163
Q9Z2Y8	2.3402	1.2266	38.541	1.4141
Q5SWY8	6.1953	2.6312	38.671	1.4126
Q9Z1Q5	3.1474	1.6542	38.671	1.4126
Q9CZ44	3.8844	1.9577	39.625	1.402
Q6IRU2	8.5932	3.1032	39.727	1.4009
Q9JLB4	5.6982	2.5105	39.987	1.3981
Q9DCG6	2.702	1.434	40.064	1.3972
P29341	2.9069	1.5395	41.022	1.387
Q9JHU4	2.7214	1.4444	41.945	1.3773
Q6GSS7	29.365	-17.679	42.578	1.3708
O35381	2.5395	1.3445	43.815	1.3584
Q9WUZ9	2.023	1.0165	44.418	1.3524
Q9EQH3	2.023	1.0165	46.939	1.3285
Q8K010	2.4354	1.2841	48.314	1.3159
P50544	2.6496	1.4058	50.037	1.3007
Q99L13	2.0303	1.0217	52.383	1.2808

P12970	4.9448	2.3059	53.196	1.2741
Q8QZW3	2.3431	1.2284	53.771	1.2694
Q9ESG4	2.0447	1.0319	54.681	1.2622
Q9D172	2.5855	1.3705	55.184	1.2582
P68134	31.787	-16.535	56.742	1.2461
Q99PT1	2.714	1.4404	57.649	1.2392
Q9CQJ8	2.8948	1.5335	57.765	1.2383
Q91VI7	2.6338	1.3971	57.765	1.2383
Q64727	5.9369	2.5697	58.114	1.2357
Q9QXD1	3.1436	1.6524	59.698	1.224
P09528	2.9948	1.5824	59.698	1.224
Q8BH00	5.7149	2.5147	612	1.2132
P62889	2.5461	1.3483	61.431	1.2116
P62320	2.3081	1.2067	65.786	1.1819
Q91YH6	2.8101	1.4906	65.806	1.1817
P58281	6.493	2.6989	66.198	1.1792
Q99JY9	4.2928	2.1019	66.198	1.1792
Q9WU79	2.6489	1.4054	67.953	1.1678
Q8BVE3	5.4158	2.4372	68.289	1.1656
P26039	7.7651	2.957	68.777	1.1626
P62821	2.2079	1.1427	70.608	1.1511
Q921F2	2.1776	1.1228	70.608	1.1511
Q60604	2.8377	1.5047	71.918	1.1432
P70333	2.3347	1.2233	71.918	1.1432
P62855	2.2305	1.1574	71.918	1.1432
P48771	37.557	-14.129	73.283	1.135
Q9QYR7	4.1652	2.0584	73.418	1.1342

P30115	2.742	1.4552	74.803	1.1261
Q99JR1	2.4069	1.2672	74.803	1.1261
Q8R4N0	8.0821	3.0147	78.088	1.1074
Q9CZX8	6.5806	2.7182	78.088	1.1074
P61922	4.7158	2.2375	78.454	1.1054
Q9CQ69	38.281	-13.853	7.879	1.1035
P62267	2.4469	1.2909	79.774	1.0981
Q9CR51	2.2672	1.1809	80.221	1.0957
P26040	3.3977	1.7646	81.532	1.0887
P16406	5.8539	2.5494	81.829	1.0871
Q92511	2.0642	1.0456	82.479	1.0837
P15864	32.449	-16.238	83.084	1.0805
Q9D1G1	2.038	1.0271	8.337	1.079
Q01853	2.2785	1.1881	85.925	1.0659
Q9D939	5.5369	2.4691	86.386	1.0636
Q9D0M3	2.2356	1.1606	86.386	1.0636
P53994	2.1094	1.0769	86.386	1.0636
Q9DCM2	3.7412	1.9035	87.437	1.0583
Q62452	41.209	-1.279	90.212	1.0447
P48036	44.398	-11.714	92.383	1.0344
P62897	41.496	-1.269	9.452	1.0245
P02088	44.777	-11.592	9.452	1.0245
P16627	46.293	-11.111	96.441	1.0157
P10605	6.1292	2.6157	96.916	1.0136
P42932	2.2648	1.1794	96.916	1.0136
Q8R164	45.922	-11.227	97.558	1.0107
P62702	2.0901	1.0635	99.316	1.003

- Proteínas seleccionadas para o grupo antiveneno formulado com 5% de sacarose vs. grupo controle.

	FC	log2(FC)	p.adjusted	-log10(p)
A2ATU0	8041.8	12.973	3,88E-03	6.4108
P12970	7698.7	12.91	3,88E-03	6.4108
Q99JI6	5553.3	12.439	3,88E-03	6.4108
P50136	5488.8	12.422	3,88E-03	6.4108
Q9QYR7	4633	12.178	3,88E-03	6.4108
P35846	3628.7	11.825	3,88E-03	6.4108
P97742	6160.2	12.589	4,19E-03	6.3779
P62835	5153.6	12.331	4,19E-03	6.3779
Q3V0K9	8485.7	13.051	4,84E-03	6.3147
Q9D939	4091.9	11.999	3,73E-02	5.4288

P34914	5984.9	12.547	3,93E-03	5.4061
P62855	2467.7	11.269	3,93E-03	5.4061
Q8BWF0	3274.3	11.677	4,10E-02	5.3869
Q99LB7	4.0484	2.0173	4,75E-02	5.3231
Q9WVLO	8954.5	13.128	6,34E-02	5.1979
Q91VM9	4.1639	2.0579	9,68E-02	5.014
Q99J99	4747.5	12.213	1,59E-02	4.7975
Q78JN3	4.6471	2.2163	2,56E-01	4.5912
Q9DBF1	8604.5	13.071	2,58E-01	4.5884
Q91VA0	7178.8	12.81	2,67E-01	4.5728
Q6P1B1	4.3378	2.117	2,76E-01	4.5598

Q9D7B6	3.8713	1.9528	2,92E-01	4.5342
Q9WUR2	3.3305	1.7358	5,67E-01	4.2463
Q99KR7	4.1926	2.0679	7,36E-01	4.1332
Q9CQN1	4.6608	2.2206	7,85E-01	4.1051
Q80XL6	3.3363	1.7383	8,43E-01	4.0743
Q9CWS0	4.7593	2.2507	13.073	3.8836
P03921	3.0473	1.6075	13.947	3.8555
P60766	5.9213	2.5659	16.527	3.7818
Q62167	5.3221	2.412	24.675	3.6077
Q78JT3	6.5054	2.7016	25.196	3.5987
P18242	7.2423	2.8564	26.497	3.5768
P37040	4.1466	2.0519	26.912	3.57
P35564	2.4132	1.271	29.376	3.532
P97449	3.6666	1.8744	54.111	3.2667
Q8VCT4	9.2854	3.215	57.409	3.241
Q61001	7.8353	2.97	57.409	3.241
P84091	3.7236	1.8967	57.409	3.241
Q61391	2.7391	1.4537	62.624	3.2033
Q99K67	3.4213	1.7745	11.086	2.9552
P15532	40.385	-13.081	13.801	2.8601
Q01768	46.595	-11.017	13.801	2.8601
Q923D2	2.5545	1.3531	14.479	2.8393
P01027	10.301	3.3648	15.688	2.8044
Q9DBT9	5.6144	2.4891	15.688	2.8044
Q8CG76	6.5977	2.722	16.171	2.7913
P10605	2.4518	1.2938	18.068	2.7431
P63242	4.5558	2.1877	22.988	2.6385
Q61990	3.0924	1.6287	28.231	2.5493
P62631	4.788	-10.625	45.751	2.3396
P16406	4.966	2.3121	51.165	2.291
Q8BH59	2.1856	1.128	75.869	2.1199
Q922R8	4.1467	2.052	79.581	2.0992
Q99MR8	5.8313	2.5438	10.563	1.9762
P00329	4.2335	2.0818	13.521	1.869
Q3TW96	7582.3	12.888	14.839	1.8286
Q8VEK3	7157.4	12.805	14.839	1.8286
Q3U4I7	7010.1	12.775	14.839	1.8286
O09174	6524.8	12.672	14.839	1.8286
P55264	6498.6	12.666	14.839	1.8286
Q8JZN5	6247.6	12.609	14.839	1.8286
O88587	5693	12.475	14.839	1.8286
P62754	5510.6	12.428	14.839	1.8286
P47962	5362.9	12.389	14.839	1.8286

Q9DD20	5095.8	12.315	14.839	1.8286
Q8R0N6	4523.6	12.143	14.839	1.8286
Q9DCM2	3.3107	1.7271	14.839	1.8286
O55022	9435.7	13.204	14.934	1.8258
P97429	11254	13.458	15.192	1.8184
P56389	10881	13.41	16.804	1.7746
P52825	3.8595	1.9484	1.832	1.7371
Q99MN9	4.623	2.2088	18.994	1.7214
Q7TNG8	4.4818	2.1641	19.173	1.7173
Q8K183	10608	13.373	19.398	1.7122
Q64433	37.878	-14.006	19.398	1.7122
Q8VDD5	2.0356	1.0255	19.581	1.7082
Q3TNA1	4.6658	2.2221	2.048	1.6887
P85094	6494.9	12.665	20.602	1.6861
Q9DB29	3638.6	11.829	2.277	1.6426
P51863	3050	11.575	2.277	1.6426
P35979	3.4499	1.7866	2.277	1.6426
P05201	2.1476	1.1027	2.277	1.6426
Q8R086	6.0634	2.6001	23.462	1.6296
Q9CXN7	7.8457	2.9719	23.561	1.6278
Q9ESG4	2.8134	1.4923	23.829	1.6229
Q9D826	6.7803	2.7613	24.227	1.6157
Q05793	2.7861	1.4783	25.719	1.5898
Q9CPV4	2.5907	1.3733	26.282	1.5803
P52196	5.4612	2.4492	27.797	1.556
P62889	5.4613	2.4492	2.784	1.5553
P63087	3.4753	1.7971	28.515	1.5449
Q9R0H0	3.8934	1.961	29.238	1.534
Q9CR51	4.6573	2.2195	31.296	1.5045
Q921G7	11.559	3.5309	32.148	1.4928
P42932	4.0579	2.0207	34.244	1.4654
Q9WU79	3.7064	1.89	34.547	1.4616
Q3UIU2	3.6367	1.8626	34.547	1.4616
Q9DAS9	3.3497	1.744	34.547	1.4616
P17751	2.9587	1.565	34.547	1.4616
Q921H8	3.7286	1.8986	35.257	1.4528
Q8VCH0	6.9371	2.7943	35.529	1.4494
Q9CQJ8	4.3888	2.1338	35.529	1.4494
Q8K1Z0	3.1007	1.6326	37.118	1.4304
Q8CFZ5	3.5013	1.8079	37.341	1.4278
Q3TLP5	2.4659	1.3021	37.341	1.4278
Q61767	6936.7	12.76	38.732	1.4119
Q9D8E6	2.976	1.5734	38.732	1.4119

P19157	3.2944	1.72	39.237	1.4063
Q99JY9	4084.7	11.996	39.441	1.4041
Q9DB77	2.9256	1.5487	39.441	1.4041
P70349	36.704	-1.446	39.441	1.4041
P21981	3.4213	1.7746	40.486	1.3927
Q9CQD1	2.5953	1.3759	40.683	1.3906
Q8C165	2969	11.536	41.068	1.3865
Q9QXD1	3.7017	1.8882	42.455	1.3721
Q9JLB4	8.2727	3.0484	44.903	1.3477
Q9DCG6	3.0232	1.5961	45.814	1.339
Q9JHW2	5864.4	12.518	45.919	1.338
Q8R0F8	3185.4	11.637	47.058	1.3274
O35643	3181.9	11.636	47.058	1.3274
Q9JKF1	3032.8	11.566	47.058	1.3274
O08585	2987.4	11.545	47.058	1.3274
Q9DBG3	2727.6	11.413	47.058	1.3274
P80317	2676.5	11.386	47.058	1.3274
P62320	2605.1	11.347	47.058	1.3274
P47911	2.3209	1.2147	47.158	1.3264
P57776	2239.1	11.129	4.731	1.325
Q9D0K2	2.7323	1.4501	49.052	1.3093
P17225	3077.7	11.588	4.999	1.3011

P14869	2.505	1.3248	5.868	1.2315
O55125	2.6302	1.3952	63.761	1.1954
P67778	32.161	-16.366	66.476	1.1773
P13707	2.9882	1.5793	66.582	1.1766
P62137	2.7594	1.4644	66.582	1.1766
P14824	3.0647	1.6158	67.329	1.1718
Q9D687	2.1315	1.0919	67.329	1.1718
P08228	29.183	-17.768	67.516	1.1706
P62918	1156.6	10.176	70.152	1.154
Q91YH6	2.9367	1.5542	70.152	1.154
P16045	1086.1	10.085	70.292	1.1531
Q9Z1Q5	2.8797	1.5259	70.292	1.1531
Q64727	5.0852	2.3463	71.792	1.1439
P43274	31.389	-16.717	79.351	1.1004
P62702	2.4389	1.2862	81.522	1.0887
P18894	2.4448	1.2897	83.009	1.0809
P53395	5.1305	2.3591	92.568	1.0335
Q9CWF2	36.601	-1.45	92.568	1.0335
Q9Z2Y8	2.3129	1.2097	92.568	1.0335
P57780	2.5146	1.3303	93.915	1.0273
P17710	2.5751	1.3647	94.329	1.0254