



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

**FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E RENAIIS PROMOVIDOS PELO**  
**VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus***

**FORTALEZA**  
**2017**

**FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E RENAIIS PROMOVIDOS PELO  
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus***

**Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Serra Azul Monteiro

**FORTALEZA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

- N712a Nogueira Júnior, Francisco Assis.  
Avaliação dos efeitos citotóxicos e renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* /  
Francisco Assis Nogueira Júnior. – 2017.  
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
1. *Bothrops alternatus*. 2. Efeitos Renais. 3. Morte Celular. 4. Perfusão Renal. I. Título.
- CDD 615.1
-

**FRANCISCO ASSIS NOGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E RENAIIS PROMOVIDOS PELO  
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus***

**Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Farmacologia.**

**Aprovado em 18 de janeiro de 2017.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

## AGRADECIMENTOS

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

Ao amado mestre **Jesus**, pela vinda do consolador prometido e tornar os dias na terra mais leves.

A minha **Família** terrena com quem compartilho laços de sangue e amor, por todo suporte e incondicional amor a mim dedicado.

À **Professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, por aceitar-me como orientando no desenvolvimento deste trabalho, mesmo sem me conhecer. Deixando claro minha admiração pela sua História de vida, lutas e conquistas. Muito obrigado!

Ao **Professor Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior**, por gentilmente ceder o veneno total da serpente *Bothrops alternatus*, e assim tornar este trabalho possível. À **professora Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista**, por fazer este contato e todo suporte nas análises histopatológicas.

À **Professora Dra. Renata de Sousa Alves**, pelo apoio, incentivo e conselhos.

À **Professora Dra. Alice Maria Costa Martins**, por disponibilizar o laboratório para parte dos experimentos em cultura de células.

À **Sílvia Helena, Rafael Jorge e Aline Marinho**, por toda ajuda e amizade na realização dos experimentos de perfusão renal e dos demais.

Aos Doutorandos, amigos e tutores, pelo apoio e contribuição intelectual, **Natacha Queiroz, Pedro Henrique e João Alison**.

Aos amigos da equipe do LFAVET, **Laura Lícia, Paula Priscila** e em especial a **Paula Letícia**. Aos alunos de Iniciação Científica: **Pedro Luiz, Paloma Araújo, Dayana Tavares e Davi Marinho**. Também a **Dânya Lima**, por ajuda na cultura de células.

Ao pessoal da entrada de **2014.2 e 2015.1**, melhores pessoas.  
E aos mais próximos do dia a dia **Amanda Aragão, Priscila Caracas, Pedro Everson, Lucas Brito, Ana Flávia, Alejandra Velasco, Dainesy Martins e Ludmila Araújo**.  
Também à **Venúcia e Kalline Barreto**.

Aos **Professores** do Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

À **FUNCAP** pelo apoio financeiro.

Aos demais que não foram citados, mas sabem de seu valor e estima.

## RESUMO

### AValiação DOS EFEITOS CITOTÓxicOS E RENais PROMOVIDOS PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

As serpentes do gênero *Bothrops sp.* são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde. A insuficiência renal aguda (IRA) é a complicação grave mais associada nestes tipos de acidentes. A serpente *Bothrops alternatus* (*Rhinocerophis alternatus*) é uma espécie de importância médica responsável por acidentes ofídicos, com predominância no Sul do Brasil. Desta forma, investigou-se alterações renais induzidas pelo veneno total de *Bothrops alternatus* (vBalt) em sistema de rim isolado de rato e em cultura de células de túbulo proximal renal das linhagens LLC-MK2 (Macaco) e HK-2 (Humanas). No sistema de perfusão renal, utilizou-se ratos Wistar (250 a 300g), com dois grupos experimentais (1 µg/mL e 3 µg/mL de vBalt; n=6). Foi verificada diminuição na pressão de perfusão (PP) na concentração de 1 µg/mL aos 90 e 120 min e na de 3 µg/mL aos 60, 90 e 120 min. Para ambas as concentrações, a resistência vascular renal (RVR) e o fluxo urinário (FU) diminuíram aos 90 e 120 minutos e o ritmo de filtração glomerular (RFG) mostrou-se reduzido a partir dos 60 min. Quando se analisou o percentual de transporte de eletrólitos, observou-se que o transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>) foi reduzido aos 120 min para concentração de 1 µg/mL, e aos 90 e 120 min para a de 3 µg/mL; o transporte tubular de cloreto (%TCl<sup>-</sup>) também foi reduzido aos 120 min para 1 µg/mL e aos 60, 90 e 120 min para a concentração de 3 µg/mL; quando analisou-se os transportes tubulares proximais foi visto que o transporte tubular proximal de sódio (%TpNa<sup>+</sup>) e o transporte tubular proximal de cloreto (%TpCl<sup>-</sup>) diminuíram a partir dos 60 min até o fim do experimento, para concentração de 1 µg/mL, e aos 60, 90 e 120 para a de 3 µg/mL. A análise histopatológica demonstrou presença de alterações morfológicas microscópicas significativas, tais como acúmulo de proteínas a nível tubular e glomerular, dano glomerular e degeneração hidrópica em ambas as concentrações estudadas. Na avaliação do perfil do estresse oxidativo, observou-se que os níveis de glutathiona reduzida (GSH) encontravam-se diminuídas em ambas as concentrações: 1 µg/mL (643,8 ± 36,31 µg/g de tecido) e 3 µg/mL (757,4 ± 126,7 µg/g de tecido), já os níveis de malondialdeído (MDA) se encontravam aumentados em ambas as concentrações: 1 µg/mL (16,42 ± 3,561 µg/g de tecido) e 3 µg/mL (15,37 ± 2,237 µg/g de tecido). Os níveis de nitrito também estavam aumentados em relação ao controle: 1 µg/mL (309,4 ± 25,29 nM/g de tecido) e 3 µg/mL (330,7 ± 29,19 nM/g de tecido). No cultivo de células LLC-MK2 e HK-2, o vBalt diminuiu a viabilidade celular em altas concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) apenas para a LLC-MK2, por outro lado, nas concentrações reduzidas (0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 µg/mL), observou-se um aumento na viabilidade celular, apresentando uma IC<sub>50</sub> de 221,3 µg/mL, para linhagem LLC-MK2. Na análise do tipo de morte celular induzida, utilizou-se a citometria de fluxo com Anexina V-PE e 7-AAD, foi observado que a morte celular ocorreu de forma predominante por necrose. Esses resultados demonstraram que o veneno de *Bothrops alternatus* alterou todos os parâmetros e funções renais avaliados no modelo de perfusão renal, demonstrando sua ação nefrotóxica direta e seus efeitos citotóxicos nos cultivos celulares estudados.

**Palavras-chaves:** *Bothrops alternatus*, efeitos renais, morte celular, perfusão renal.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND RENAL EFFECTS PROMOTED BY *Bothrops alternatus* SNAKE VENOM

The snakes of the genus *Bothrops* sp. are responsible for the highest number of ophidian accidents in Brazil, according to the Ministry of Health. Acute kidney injury (AKI) is the severe complication most associated in these types of accidents. The *Bothrops alternatus* snake is a species of medical importance responsible for ophidian accidents, predominantly in Southern Brazil. Thus, it was investigated renal changes induced by the total venom of *Bothrops alternatus* (Baltv) in isolated rat kidney system and kidney proximal tubule cells culture from LLC-MK2 (Monkey) and HK-2 (Human) lines. In the kidney perfusion system, Wistar rats (250 to 300 g) were used, with two experimental groups (1 µg/mL and 3 µg/mL vBalt; n = 6). There was a decrease in the perfusion pressure (PP) at the concentration of 1 µg/mL at 90 and 120 min and of 3 µg/mL at 60, 90 and 120 min. For both concentrations, renal vascular resistance (RVR) and urinary flow (UF) decreased at 90 and 120 minutes and the glomerular filtration rate (GFR) was reduced from 60 min. When the percentage of electrolyte transport was analyzed, it was observed that the tubular sodium transport (% TNa<sup>+</sup>) was reduced at 120 min in the concentration of 1 µg/mL, and at 90 and 120 min to 3 µg/ml; The tubular chloride transport (%TCl<sup>-</sup>) was also reduced at 120 min to 1µg/ml and at 60, 90 and 120 min for the concentration of 3 µg/mL; when the proximal tubular transport was analyzed, it was seen that the proximal tubular sodium transport (%TpNa<sup>+</sup>) and proximal tubular chloride transport (%TpCl<sup>-</sup>) decreased from 60 min until the end of the experiment to the concentration of 1 µg/mL, and at 60, 90 and 120 to 3 µg/mL. The histopathological analysis demonstrated the presence of significant microscopic morphological alterations, such as accumulation of proteins at the tubular and glomerular level, glomerular damage and hydropic degeneration at both concentrations studied. In the evaluation of the oxidative stress profile, it was observed that the levels of reduced glutathione (GSH) were decreased in concentrations: 1µg/mL (643.8 ± 36.31 µg/g tissue) and 3µg/mL (757.4 ± 126.7 µg/g tissue), with malondialdehyde levels (MDA) increased at concentrations of 1 µg/mL (16.42 ± 3.561 µg/g tissue) and 3 µg/mL (15.37 ± 2.237 mg /g tissue). Nitrite levels also increased in relation to the control: 1µg/mL (309.4 ± 25.29 nM /g tissue) and 3µg/mL (330.7 ± 29.19 nM/g tissue). In the culture of LLC-MK2 and HK-2 cells, the Baltv decreased cell viability at high concentrations (50, 100 and 200 µg / mL) only for LLC-MK2, on the other hand, in reduced concentrations (0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25µg/mL), an increase in cell viability was observed, presenting an IC 50 of 221.3 µg/mL to the LLC-MK2 line. In the analysis of type of induced cell death, flow cytometry was used with Annexin V-PE and 7-AAD, and it was observed that cell death occurred predominantly due to necrosis. These results demonstrated that the venom of *Bothrops alternatus* altered all renal parameters and functions evaluated in the kidney perfusion model, demonstrating its direct nephrotoxic action and its cytotoxic effects in the studied cell cultures.

**Keywords:** *Bothrops alternatus*, renal effects, cell death, kidney perfusion.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> -	Distribuição geográfica da espécie <i>Bothrops alternatus</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 02</b> -	Foto ilustrativa de um exemplar de <i>Bothrops alternatus</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 03</b> -	Composição proteica do veneno de <i>Bothrops alternatus</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 04</b> -	Fotografia Representando o Sistema de Perfusão de Rim Isolado..	<b>29</b>
<b>Figura 05</b> -	Esquema do Sistema de Perfusão de Rim Isolado.....	<b>29</b>
<b>Figura 06</b> -	Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	<b>36</b>
<b>Figura 07</b> -	Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	<b>36</b>
<b>Figura 08</b> -	Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6).....	<b>37</b>
<b>Figura 09</b> -	Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.....	<b>38</b>
<b>Figura 10</b> -	Representação fotográfica do rim acoplado ao sistema de perfusão.....	<b>39</b>
<b>Figura 11</b> -	Desenho esquemático de ensaio de toxicidade pelo MTT.....	<b>45</b>
<b>Figura 12</b> -	Desenho esquemático da determinação da integridade da membrana.....	<b>46</b>
<b>Figura 13</b> -	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> na pressão de perfusão.....	<b>49</b>
<b>Figura 14</b> -	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> na resistência vascular renal.....	<b>50</b>
<b>Figura 15</b> -	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> no Fluxo Urinário.....	<b>51</b>
<b>Figura 16</b> -	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> no Ritmo de Filtração Glomerular.....	<b>52</b>
<b>Figura 17</b> -	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa <sup>+</sup> ). .....	<b>54</b>

<b>Figura 18 -</b>	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa <sup>+</sup> ).....	<b>55</b>
<b>Figura 19 -</b>	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl <sup>-</sup> ).	<b>56</b>
<b>Figura 20 -</b>	Efeitos promovidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl <sup>-</sup> ).....	<b>57</b>
<b>Figura 21 -</b>	Fotomicrografias de rins de ratos perfundidos (RP) com solução de Krebs-Hanseleit modificada. Apresentando arquitetura renal normal. Hematoxilina-Eosina / 400x e 200x respectivamente. Microscópio Trinocular Nikon Eclipse Nis com Software Nis 4.0.	<b>58</b>
<b>Figura 22 -</b>	Fotomicrografias de rins esquerdos de ratos não perfundidos (RE). Apresentando arquitetura renal normal. Hematoxilina-Eosina/ 400x. Microscópio Trinocular Nikon Eclipse Nis com Software Nis 4.0.....	<b>58</b>
<b>Figura 23 -</b>	Fotomicrografias de rins direitos de ratos perfundidos (RD) com vBalt (1µg/mL e 3 µg/mL) demonstrando alterações renais. Hematoxilina-Eosina / 200x e 400x. Microscópio Trilocular Nikon Eclipse com Software Nis 4.0.....	<b>59</b>
<b>Figura 24 -</b>	Valores de GSH em tecido de rins de ratos perfundidos com veneno total da serpente <i>Bothrops alternatus</i> (1 e 3µg/mL).....	<b>61</b>
<b>Figura 25 -</b>	Valores de MDA em tecido de rins de ratos perfundidos com veneno total da serpente <i>Bothrops alternatus</i> (1 e 3µg/mL).....	<b>62</b>
<b>Figura 26 -</b>	Valores de Nitrito em tecido de rins de ratos perfundidos com vBalt (1 e 3µg/mL).....	<b>62</b>
<b>Figura 27 -</b>	Efeito do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> em diferentes concentrações sobre a viabilidade em células LLC-MK2.....	<b>63</b>
<b>Figura 28 -</b>	Efeito do veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> em diferentes concentrações sobre a viabilidade de células HK-2.....	<b>64</b>
<b>Figura 29 -</b>	Avaliação do tipo de morte celular causada pelo veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> sobre as células LLC-MK2.....	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).....	<b>49</b>
<b>Tabela 02</b> - Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).....	<b>50</b>
<b>Tabela 03</b> - Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).....	<b>51</b>
<b>Tabela 04</b> - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).....	<b>52</b>
<b>Tabela 05</b> - Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa <sup>+</sup> ) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL) .....	<b>54</b>
<b>Tabela 06</b> - Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa <sup>+</sup> ) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).....	<b>55</b>
<b>Tabela 07</b> - Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl <sup>-</sup> ) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL) .....	<b>56</b>
<b>Tabela 08</b> - Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl <sup>-</sup> ) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL) .....	<b>57</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01 -</b>	Composição Química dos Venenos Botrópicos.....	<b>18</b>
<b>Quadro 02 -</b>	Caracterização de atividades e componentes isolados do veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> .....	<b>23</b>
<b>Quadro 03 -</b>	Estudos com veneno total de espécies do gênero <i>Bothrops</i> em Perfusão de Rim Isolado.....	<b>31</b>
<b>Quadro 04 -</b>	Fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais.....	<b>40</b>
<b>Quadro 05 -</b>	Quadro do resumo das alterações encontradas na perfusão renal com veneno total de <i>Bothrops alternatus</i> nos diferentes parâmetros renais e concentrações estudadas .....	<b>60</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Aspectos Gerais .....	14
1.2 Gênero <i>Bothrops</i> .....	16
1.2.1 Composição Geral dos Venenos de <i>Bothrops</i> : Ações Locais, Sistêmicas e Renais.....	18
1.2.2. <i>Bothrops alternatus</i> ( <i>Rhinocerophis alternatus</i> ).....	21
1.3 Insuficiência Renal Aguda em Acidentes Botrópicos.....	24
1.3.3 Mecanismo de Morte Celular.....	26
1.4 Sistema de Perfusão Renal.....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
4.1 Veneno.....	35
4.2 Animais .....	35
4.3 Perfusão de Rim Isolado	
4.3.1 Calibração e Preparo do Sistema de Perfusão Renal.....	35
4.3.2 Solução Perfusora.....	37
4.3.3 Técnica Cirúrgica.....	37
4.3.4 Protocolo Experimental .....	39
4.3.5 Grupos Experimentais .....	40
4.3.6 Análises Bioquímicas .....	40
4.3.7 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais.....	40
4.3.8 Análise Histopatológica.....	41
4.4 Determinação de Parâmetros de Estresse Oxidativo	
4.4.1 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH).....	42
4.4.2 Determinação da Concentração de Malondialdeído (MDA).....	42
4.4.3 Determinação dos Níveis de Nitrito.....	42
4.5 Ensaios de Cultura e Viabilidade Celular	
4.5.1 Linhagens Celulares.....	43
4.5.2 Cultivo e Tratamento das Células LLC-MK2 e HK-2.....	43
4.5.3 Estudo da Viabilidade Celular <i>in vitro</i>	

4.5.3.1 Ensaio com MTT.....	44
4.5.3.2 Determinação da Integridade da Membrana.....	45
4.6 Análise Estatística.....	46
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Perfusão de Rim Isolado.....	48
Pressão de Perfusão (PP) .....	49
Resistência Vascular Renal (RVR) .....	50
Fluxo Urinário (FU) .....	51
Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) .....	52
Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa <sup>+</sup> ).....	54
Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa <sup>+</sup> ) .....	55
Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl <sup>-</sup> ) .....	56
Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl <sup>-</sup> ) .....	57
5.2 Análise Histológica dos Rins Perfundidos com vBalt.....	58
5.3 Perfil do Dano Oxidativo	
5.3.1 Avaliação dos Níveis de Glutathiona reduzida (GSH).....	61
5.3.2 Avaliação dos Níveis de Malondialdeído (MDA).....	61
5.3.3 Avaliação dos Níveis de Nitrito.....	62
5.4 Avaliação do Efeito do Veneno da Serpente <i>Bothrops alternatus</i> Sobre Células HK-2 e LLC-MK-2	
5.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular.....	63
5.4.2 Avaliação do Tipo de Morte Celular Causado Pelo Veneno da <i>Bothrops alternatus</i> .....	64
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Gerais.

Acidente ofídico ou ofidismo é um quadro de envenenamento decorrente da inoculação de toxinas através do aparelho inoculador (presas) de serpentes. No Brasil, as serpentes peçonhentas de interesse em Saúde Pública são representadas por quatro gêneros da família Viperidae: serpentes do grupo *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, combóia), o qual, atualmente, está dividido em dois gêneros – *Bothrops* e *Bothrocophias*; *Crotalus* (cascavel); *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca); *Micrurus* e *Leptomicrurus* (coral-verdadeira). O envenenamento ocorre quando a serpente consegue injetar o conteúdo de suas glândulas venenosas, o que significa que nem toda picada leva ao envenenamento. Há muitas espécies de serpentes que não possuem presas, mas, quando presentes, estão localizadas na porção posterior da boca, o que dificulta a injeção de veneno ou toxina (BÉRNILS, 2016; Brasil, 2016; 2001).

Atualmente no mundo, existem aproximadamente 3.600 espécies de serpentes catalogadas (UETZ, 2016), das quais cerca de 530 espécies são peçonhentas (FRANCO, 2003). O Brasil possui 392 espécies, sendo cerca de 70 delas peçonhentas e divididas entre as famílias Elapidae e Viperidae (BÉRNILS, 2016).

Embora o número exato de picadas de serpentes ainda seja desconhecida, cerca de 5 milhões de pessoas são acometidas à cada ano, com até 2,5 milhões de envenenamentos. Pelo menos 100.000 pessoas morrem em decorrência destes acidentes, com cerca de três vezes o número de amputações e outras deficiências permanentes causadas por serpentes, sendo os trabalhadores agrícolas e as crianças os mais afetados. Acidentes com serpentes peçonhentas tornaram-se uma questão de saúde pública negligenciada em muitos países tropicais e subtropicais em desenvolvimento (CRUZ *et al.*, 2009; HARRISON *et al.*, 2009; WHO, 2016).

Os acidentes ofídicos são um grave problema de saúde, especialmente na América Latina, África e Ásia. Na Europa, Estados Unidos e Canadá, esses acidentes são relativamente raros. Na África, a frequência dos acidentes ofídicos é precariamente documentada. Na Ásia, principalmente no Paquistão, na Índia e na Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 óbitos por ano. No Japão, a incidência geral é de aproximadamente 1/100.000 habitantes e a letalidade é inferior a 1%. Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes com cerca de 20.000 casos por ano, seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500

a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013; ANTUNES *et al.*, 2010, CHIPPAUX, 1998; WARREL, 2004).

No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, foram registrados no ano de 2015, um total de 24.467 casos de acidentes ofídicos. Dados que podem alcançar a marca de 31 000 acidentes como foi registrado no ano de 2011. Ainda em 2015 foram registrados 107 óbitos, dos quais as regiões Nordeste, Norte e Sudeste, respectivamente, possuem os maiores números de mortes ocasionadas por acidentes por serpentes. Com incidência de 55,4 para a região Norte, 11,0 Nordeste, 7,1 Sudeste, 8,4, região Sul, 18,6 Centro-Oeste e apresentando neste ano 13,3 de incidência no País (SINAN, 2016).

Esses dados sobre acidentes por animais peçonhentos, no Brasil, são coletados através de sistemas de notificação como Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox/Fiocruz/MS), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde/MS e o Sistema de Informações sobre Mortalidade/MS (SIM). Apesar de todos esses sistemas, os dados epidemiológicos disponíveis não retratam a real magnitude do problema, provavelmente devido à subnotificação dos casos, tendo em vista, entre outros fatores, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde de muitos municípios brasileiros (LEMOS *et al.*, 2009).

Embora se trate de uma emergência médica frequente nas regiões rurais de países tropicais, a incidência dos envenenamentos é subestimada, pois a maior parte das vítimas é tratada por métodos de prática tradicional e, dessa forma, os casos não são notificados, pois raramente chegam a unidades hospitalares (WARREL, 2012).

A ocorrência dos acidentes ofídicos varia de acordo com a época do ano e, por muitas vezes, segue padrões, estando relacionada a fatores climáticos e ao aumento da atividade no campo, em geral, obedecem a sazonalidade de cada região do país (BOCHNER; STRUCHINER 2003; BRASIL, 2001). Com isso, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, observa-se incremento do número de acidentes no período de setembro a março, já na região Nordeste, os acidentes aumentam de janeiro a maio, enquanto na região Norte, não se observa sazonalidade marcante, ocorrendo os acidentes uniformemente durante todo o ano (BRASIL, 2001). Esses acidentes são mais comuns em áreas rurais, costumam ter as extremidades inferiores e superiores do corpo das vítimas como principal alvo do local da picada. A faixa etária está, na maioria dos casos, na idade adulta entre 20 – 49 anos, quanto ao sexo, o masculino

é o mais atingido (COSER *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2009). Os óbitos estão associados à demora na utilização da soroterapia, falência renal e outras complicações decorrentes do acidente. O gênero *Bothrops* é o responsável pela maior parte dos acidentes (GUTIÉRREZ, 2011; BRASIL, 2001).

A composição do veneno apresenta características particulares, tanto na intensidade como nos tipos de ações, para cada espécie de serpente. Os venenos são compostos por misturas complexas contendo aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos (glicoproteínas), lipídios, compostos inorgânicos, enzimas e polipeptídios farmacologicamente ativos, podendo apresentar variações destes compostos devido à diferença entre as famílias, gêneros e espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie. Diferenças intraespecíficas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais, mostrando assim, diferentes potenciais de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos e como esses fatores podem afetar a neutralização proporcionada pelo antiveneno, tornando pouco previsível o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos (CALVETE *et al.*, 2011; CHIPPAUX *et al.*, 1991; ROCHA & FURTADO, 2005).

A soroterapia é a forma mais indicada para o tratamento de acidentes ofídicos. O soro antiofídico é obtido através da hiperimunização de equinos com um *pool* de venenos, das espécies que apresentam maior relevância quanto a epidemiologia e acidentes ocasionados. Em se tratando dos acidentes causados pelo gênero *Bothrops*, o soro indicado é o antibotrópico, o antígeno para o gênero *Bothrops* inclui: 50 % de veneno de *Bothrops jararaca*, 12,5 % de cada um dos venenos *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*. Quando observada a qualidade do soro obtido frente às manifestações locais, não se observa regressão ou mudança dos efeitos inflamatórios, sendo que tais efeitos se instalam com grande rapidez após o acidente, o que compromete o restabelecimento da integridade tecidual, mesmo com a utilização do soro. Fatores esses que devem estar associados aos componentes do veneno que não são neutralizados pela ação do soro (BRASIL, 1996; GUTIERREZ *et al.*, 1986; ZAMMUNER *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2007).

## **1.2 Gênero *Bothrops*.**

Na América do Sul, as serpentes do gênero *Bothrops* foram bem estudadas por causa da sua predominância e importância médica em países como Brasil, Colômbia, Equador,

Venezuela, Bolívia e Peru (HIGUCHI *et al.*, 2007; ACOSTA, 2010). No Brasil, o gênero *Bothrops* compreende cerca de 30 espécies, pertencem à família *Viperidae* e são popularmente conhecidas como jararacas (BÉRNILS & COSTA, 2016). Essas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (ALBUQUERQUE; COSTA; CAVALCANTE, 2004; MELGAREJO, 2003).

O gênero *Bothrops* é responsável por mais de 90% dos acidentes registrados no Brasil, sua peçonha é bastante complexa e composta por uma mistura de enzimas e polipeptídios farmacologicamente ativos e responsáveis pelas alterações tóxicas locais e sistêmicas. A grande variedade de espécies agrupadas sob esse gênero mais as variações biológicas, locais, sazonais e até referentes a alimentação desses animais, comprovadamente causam variações na composição proteica dos venenos dessas espécies. Estudos relatam que espécies coletadas em diferentes regiões do Brasil apresentam diferentes potenciais de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos que podem afetar a neutralização proporcionada pelo antiveneno (soro), tornando pouco previsível o tratamento das vítimas de ofidismo (CALVETE *et al.*, 2011; JORGE *et al.*, 2017).

Acidentes por serpentes desse gênero causam alterações no local da inoculação que se desenvolvem rapidamente e não são neutralizadas pela soroterapia convencional, mesmo que precocemente, enquanto que parte dos efeitos sistêmicos conseguem ser corrigidos com o uso da soroterapia em tempo hábil (BRASIL, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a; 2009b).

Embora haja variação entre espécies, ainda existe a variação intraespecífica (na mesma espécie) na composição das peçonhas ofídicas, em especial do gênero *Bothrops*. É de suma importância a realização de estudos relacionados para a melhor compreensão deste fenômeno e sua aplicação na produção de anticorpos (soros) mais efetivos a fim de neutralizar efeitos tóxicos dos envenenamentos, principalmente dos efeitos locais que, muitas vezes, geram sequelas permanentes. Essas variações foram analisadas no estudo realizado com a espécie *Bothrops erythromelas*, endêmica da região Nordeste por JORGE *et al.*, (2015) que demonstraram variações sutis de componentes presentes na peçonha da serpente da mesma espécie, porém de regiões geográficas diferentes.

### 1.2.1 Composição Geral dos Venenos de *Bothrops*: Ações Locais, Sistêmicas e Renais.

O veneno das serpentes são uma mistura complexa de enzimas, glicoproteínas, polipeptídios e componentes não-proteicos, que apresentam atividades bem variadas (Quadro 01), são sintetizados e armazenados em pares de glândulas altamente especializadas, ligadas às presas por dutos. Os componentes dos venenos permitem que as serpentes possam confinar, imobilizar e digerir suas presas, além de ser um mecanismo de defesa contra predadores. Ao entrar em contato com a presa ou vítima, essa mistura acarreta uma grande variedade de ações biológicas, agindo como toxinas e atacando vários sistemas fisiológicos, levando muitas vezes à morte, debilitação da presa ou vítima e por vezes sequelas graves. Essa mistura de compostos, costumam exibir atividades farmacológicas, embora existam algumas proteínas que formam complexos, covalentes ou não covalentes, com outras proteínas para exibir atividade farmacológica mais potente, e podendo os tornar mais letais (MACKESSY; BAXTER, 2006; CALVETE *et al.*, 2009; DOLEY; KINI, 2009; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

**Quadro 01** - Composição química dos venenos botrópicos.

	<b>Função Proteica</b>	
	Com Atividade Enzimática	Fosfolipases (PLA2); Metaloproteinases; Serinoproteinases; L-aminoácido oxidase (LAAO);
	Sem Atividade Enzimática	Cardiotoxinas; Lectinas tipo C; Desintegrinas;
<b>Função Não Proteica</b>		
Carboidratos, Serotonina, Histamina, íons inorgânicos.		

**Fonte:** Adaptado de DE TONI *et al.*, (2015).

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade proteica e são essas proteínas as responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos (BON, 1997). Parte desses elementos proteicos possuem atividades enzimáticas (Quadro 01), como as fosfolipases isoladas de venenos de serpentes (svPLA2), que desempenham sua atividade catalítica e agem sobre substratos lipídicos, estando relacionadas à produção de derivados do ácido araquidônico (FERREIRA *et al.*, 2013). svPLA2s costumam ser muito tóxicas, em um único veneno podem ocorrer várias isoenzimas, cujos efeitos farmacológicos podem variar, incluindo ação hemolítica, neurotoxicidade, agregação de plaquetas, anticoagulante, edematogênica,

miotóxica, bactericida e pró-inflamatória, estão relacionadas à mionecrose local que pode provocar sequelas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (GHAZARYAN *et al.*, 2014).

As metaloproteinases isoladas de venenos de serpentes (svMPs) são um grupo de endopeptidases, dependentes de cálcio ou zinco ligados no sítio ativo para possuírem atividade, desempenham um papel central no envenenamento, sendo classificadas em cinco superfamílias sendo uma delas a família metzincinas, da qual fazem parte as metaloproteinases dos venenos de serpentes (DE PAULA *et al.*, 2014). Em geral, a ação das svMPs relaciona-se com a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, fator Von Willenbrand e pró-trombina) e das proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Estes efeitos promovem diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e gerar uma resposta inflamatória (BERNADONI *et al.*, 2014).

As serinoproteinases estão associadas aos distúrbios hemostáticos devido à sua atuação nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico (ZAQUEO *et al.*, 2014).

L-aminoácido oxidases isoladas dos venenos de serpentes (svLAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Nos venenos botrópicos pode chegar a 30% do teor total de proteína (TAN *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). O mecanismo pelo qual LAAO participa da toxicidade dos venenos é desconhecido, entretanto, essa enzima libera  $H_2O_2$ , o que provavelmente desempenha um importante papel na sua toxicidade, pois sua atividade antibacteriana, citotóxica e agregante plaquetária é inibida por catalase (STABELI *et al.*, 2007; NAUMAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

A fração do veneno que não possui atividade enzimática é composta, por exemplo, por lectinas, que se ligam à glicoproteínas e interfere na formação do coágulo e na agregação plaquetária (MONTEIRO *et al.*, 2003). Existem ainda constituintes não orgânicos que são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH e TU, 1971). O cálcio, o manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto

possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de componentes enzimáticos como metaloproteinases (Quadro 01) (BJARNASON e FOX, 1994).

O veneno botrópico desempenha três ações principais durante o envenenamento, são elas: hemorrágica, coagulante e proteolítica (BRASIL, 2001), no entanto, dentre todos os efeitos ocasionados pelo envenenamento botrópico, relacionado a ação isolada das frações ou mesmo a sinergia entre elas, destacam-se os efeitos locais - incluem dor, edema, hemorragia local e inflamação, podendo evoluir para um processo de necrose tecidual. Há ainda as manifestações ou efeitos sistêmicos que resultam em coagulopatia, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, hemólise intravascular, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, falência de múltiplos órgãos e hemorragias distantes dos locais da picada - hemorragia gengival, macrohematúria, hemorragia uterina e gastrintestinal (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KAMIGUTI *et al.*, 1996; WARRELL, 2005).

O envenenamento é responsável por desencadear respostas imunes, levando a liberação de citocinas e óxido nítrico. As citocinas iniciam uma cascata de eventos que conduzem as ações: febre, edema, vasodilatação, hipotensão e aumento da produção de óxido nítrico. O acúmulo destas citocinas desempenha um papel importante na mediação de recrutamento e ativação de células necessárias para a inflamação e a reparação de danos nos tecidos (SITPRIJA, 2006). O processo inflamatório é uma das principais características do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, esse processo é bem evidente nas ações locais ocasionadas pela picada da serpente (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Como parte dos mecanismos químicos e moleculares, estão as citocinas, responsáveis por mediar a resposta inflamatória, influenciando a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência das células imunológicas, podem atuar estimulando (pró-inflamatórias, ex: IL-1, 2, 6, 7 e FNT - fator de necrose tumoral) ou atenuando (anti-inflamatórias, ex: (IL-4, 10, 13 e FTC  $\beta$  – fator transformador de crescimento  $\beta$ ) a resposta inflamatória (CURFS *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outro aspecto importante na distribuição das peçonhas botrópicas no organismo fisiológico de animais ou vítimas envenenadas mostra que os rins são um importante alvo de acumulação do veneno, possivelmente devido ao seu papel na excreção de proteínas ofídicas (MELLO *et al.*, 2010). A acumulação do veneno no tecido renal pode causar danos morfológicos e funcionais que podem interferir na eliminação do veneno, tais como: glomerulonefrite, arterite e necrose tubular, glomerulite e nefrite intersticial, necrose cortical

(SITPRIJA, 2012), que por vezes acaba evoluindo para insuficiência renal, quando há demora no atendimento ou mesmo quando este se dá de forma inadequada. A evolução desses envenenamentos para a insuficiência renal aguda (IRA) é a principal causa de morte por ofidismo, ocorrendo secundariamente aos processos anteriormente descritos mesmo após o tratamento com soro antiofídico (AIRD, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1998; SITPRIJA, 2012).

### 1.2.2 *Bothrops alternatus* (*Rhinocerothis alternatus*).

A espécie *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854, atualmente denominada *Rhinocerothis alternatus* (WALLACH *et al.*, 2014), também conhecida como urutu, urutu-cruzeiro, cruzeiro e cruzeira, é uma serpente de importância em Saúde Pública, com ampla distribuição geográfica. Ocorre no Mato Grosso do Sul e Goiás até a região central da Argentina e limite meridional do Uruguai, ocupando desde florestas tropicais, subtropicais e decíduas temperadas, até plantações de cana-de-açúcar e áreas pantanosas. Possivelmente, essa espécie é encontrada em uma variedade de habitats que dependem de latitude, mas parece estar ausente em áreas secas. Essa serpente é terrestre, possui o corpo robusto e pode atingir cerca de 1.7 m de comprimento e tem a cauda relativamente curta. Em algumas áreas de ocorrência, destacando-se o Rio Grande do Sul, possui importância médica, sendo responsável por acidentes em humanos (CAMPBELL & LAMAR 1989; ROCHA & FURTADO, 2005; SANTOS-COSTA *et al.*, 2001).

**Figura 01:** Distribuição geográfica da espécie *Bothrops alternatus*



**Fonte:** The Reptile Database.

Esta espécie, assim como as demais do gênero *Bothrops*, apresenta veneno de ação proteolítica, coagulante e hemorrágica e pode causar acidentes fatais, ou com sequelas, quando as vítimas não são corretamente tratadas com soro antiofídico. Cerca de 80% dos acidentes registrados no Rio Grande do Sul são por serpentes do gênero *Bothrops*. Sua ocorrência no litoral externo é pouco frequente, mas tem sido registrada eventualmente em locais de dunas muito próximos a habitações humanas (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007).

**Figura 02:** Foto ilustrativa de um exemplar de *Bothrops alternatus*.



**Fonte:** Borges-Martins *et al.*, (2007).

A toxicidade do veneno da *Bothrops alternatus* é semelhante ao de outras espécies do gênero *Bothrops*, apresenta uma DL50 de 2,2-11,5 mg/kg (intraperitonealmente, em ratos) (FURTADO *et al.*, 1991, SANCHEZ *et al.*, 1992). O envenenamento por esta espécie também produz alterações locais e sistêmicas características de outras espécies do mesmo gênero: ação proteolítica, coagulante e hemorrágica (BAUAB *et al.*, 1994), mostrou-se citotóxico a nível renal, demonstrado através de cultura de células de rim da linhagem Vero (macaco verde africano) (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e células do tipo MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Segundo Rocha & Furtado (2005), estudos indicaram que o veneno dessa serpente foi pouco ativo quanto às atividades enzimáticas, o trabalho ainda listou uma série de outros

estudos que caracterizaram a peçonha desta espécie, sendo alguns deles, distribuídos no quadro 02, abaixo:

**Quadro 02** – Caracterização de atividades e componentes isolados do veneno da serpente *Bothrops alternatus*.

Atividade e/ou fração responsável	Referência
Não apresentou ação amidolítica.	FURTADO <i>et al.</i> , 1991b
Baixa atividade caseinolítica e fibrinolítica.	FURTADO <i>et al.</i> , 1991b LEITE <i>et al.</i> , 1992 SANCHEZ <i>et al.</i> , 1992
Ação moderada sobre o plasma total, ação tipo trombina, sobre fibrinogênio, Fator X e II.	FURTADO <i>et al.</i> , 1991b SANCHEZ <i>et al.</i> , 1992 NAHAS <i>et al.</i> , 1979
Presença de uma enzima tipo-trombina a Balterobin.	SMOLKA <i>et al.</i> , 1998
Bothroalternin (Lectina tipo C) que inibe a agregação plaquetária e coagulação do fibrinogênio.	CASTRO <i>et al.</i> , 1998
Baixa atividade hemorrágica e necrosante.	FURTADO <i>et al.</i> , 1991a SANCHEZ <i>et al.</i> , 1992 ACOSTA PÉREZ <i>et al.</i> , 1998
Não apresentou componentes miotóxicos específicos.	LOMONTE <i>et al.</i> , 1990 MOURA-DA-SILVA <i>et al.</i> , 1990a
Mionecrose do tipo coagulativa.	QUEIROZ & PETTA, 1984
PLA2 com ação miotóxica	NIENBON <i>et al.</i> , 1986
Alternagina C (desintegrina-like)	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
Baltergin (metaloproteinase)	GAY <i>et al.</i> , 2005
Bth $\alpha$ TL (Trombina-like)	VITORINO-CARDOSO <i>et al.</i> , 2006
Balt-LAAO (L-aminoácido oxidase)	STÁBELI <i>et al.</i> , 2004
BaltTX-I Lys49 e BaltTX-I Asp49 (PLA2)	SETÚBAL <i>et al.</i> , 2013
Bhalternin (Trombina-like)	COSTA <i>et al.</i> , 2010
BaTX (PLA2) com atividade neuromuscular	PONCE-SOTO <i>et al.</i> , 2009
Fosfodiesterase	VALÉRIO <i>et al.</i> , 2002

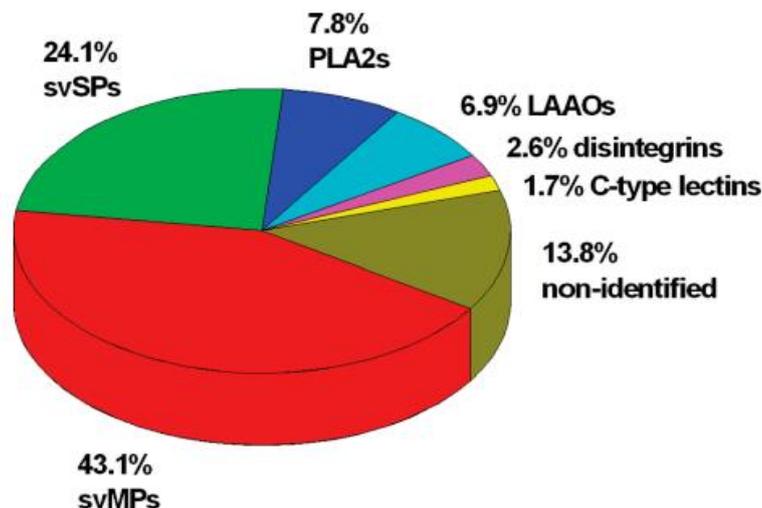
**Fonte:** Adaptado de Rocha & Furtado (2005).

A análise proteômica do veneno de *Bothrops alternatus*, realizada por ÖHLER *et al.*, (2010), identificou aproximadamente 100 componentes com massas de 10 a 100 kDa pertencente a seis famílias de proteínas: metaloproteinases, serinoproteinases/trombina-like, fosfolipases A2, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e inibidores de trombina (Figura 03). As

metaloproteinases e serinoproteinases representam 78% das proteínas identificadas. As metaloproteinases predominam e representam aproximadamente 50% dos componentes identificados, pertencem exclusivamente a classe P-III que possui um domínio rico em cisteína (*Cys-rich*) em adição aos domínios metaloproteinase e tipo desintegrina (*Disintegrin-like*), grupo esse que inclui as toxinas hemorrágicas mais potentes.

A serinoproteinases formam o segundo grande grupo de toxinas como é demonstrado na figura 03, As svSPs exercem atividades coagulantes e fibrinogenolíticas, são menos tóxicos do que svMP. O estudo mostrou ainda que as frações: metaloproteinases e serinoproteinases desempenham papéis primários na patogenia do envenenamento por esta serpente, sendo um veneno altamente proteolítico (ÖHLER *et al.*, 2010).

**Figura 03** – Composição proteica do veneno de *Bothrops alternatus*



Fonte: ÖHLER *et al.*, (2010).

Onde: **svMPs**: Metaloproteinases; **PLA2**: Fosfolipases A2; **LAAOs**: L-aminoácido oxidase  
**svSPs**: Serinoproteinases; **C-type lectins**: Lectinas tipo C.

### 1.3 Insuficiência Renal Aguda em Acidentes Botrópicos.

As toxinas ofídicas manifestam suas ações através de lesões glomerulares, tubulares, intersticiais e vasculares. Funcionalmente, a IRA induzida por nefrotoxinas geralmente acarreta

queda na filtração glomerular, aumento da proteinúria, bem como alterações hidroeletrólíticas (CHAIYABUTR; SITPRIJA, 1999).

Devido ao fluxo sanguíneo elevado, capacidade e função de concentrar substâncias na urina e por ser considerado como a principal rota de excreção de venenos, o rim se torna um órgão vulnerável à ação de toxinas, sendo a IRA a causa mais comum de morte em acidentes botrópicos, estando associada tanto a fatores diretos como indiretos (SITPRIJA, 2006; PINHO, 2008; RIBEIRO *et al.*, 1998; MELLO *et al.*, 2010).

A Sociedade Brasileira de Nefrologia define IRA como sendo a redução aguda da função renal em horas ou dias, refere-se principalmente a diminuição do ritmo de filtração glomerular e/ou do volume urinário, porém, ocorrem também distúrbios no controle do equilíbrio hidro-eletrólítico e ácido-básico. Classificando clinicamente em causas pré-renais, renais e pós-renais.

As causas pré-renais, do ponto de vista dos acidentes ofídicos, incluem as alterações hemodinâmicas: hipotensão, aumento da resistência vascular renal, diminuição do fluxo sanguíneo renal, hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada (podendo levar à isquemia), mioglobínúria (ação do veneno sobre a musculatura esquelética), rabdomiólise, ativação de fatores do complemento e ação de mediadores inflamatórios endógenos liberados através da ação das enzimas do veneno, que chegando até o rim podem prejudicar seu funcionamento (AMARAL *et al.*, 1986; PINHO *et al.*, 2008; SITPRIJA, 2006; 2012).

As causas renais, ou seja, a ação direta da peçonha botrópica sobre a arquitetura renal pode ser observada nos achados histológicos de rins perfundidos com venenos e já demonstrada através de ensaios com cultura celular (células de túbulos proximais e distais) (Quadro 03). Nesse sentido, estudos já demonstram que frações específicas dos venenos são responsáveis pela injúria as células renais, como por exemplo, metaloproteinases, PLA2 e L-aminoácido oxidase, hialuronidases (CASTRO *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2007; MORAIS *et al.*, 2015; HAVT *et al.*, 2005). Essas frações geralmente apresentam ações citotóxicas diretas sobre o epitélio renal, são enzimas com atividade proteolítica, que atuam sobre diferentes substratos, causando destruição de estruturas teciduais renais através da formação de radicais livres, ativação/liberação de mediadores celulares e moleculares do processo inflamatório como prostaglandinas, citocinas e fatores do complemento (DENNIS *et al.*, 2011; GUTIERREZ; RUCAVO, 2000).

Atualmente, não se encontram bem elucidados os mecanismos pelos quais se instala a IRA, entretanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação direta e indireta do veneno sobre o rim. Esses fatores podem ser desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo, que acabam levando ao rim matérias que lhe são prejudiciais, por exemplo: grupo heme (hemólise), mioglobina (ação miotóxica sobre a musculatura esquelética), e outros (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008). Baseado nesses dois tipos de ação, Cruz-Höfling *et al.*, (2001), fala de três teorias propostas para explicar a patogênese da lesão glomerular, a presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente do processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica.

### **1.3.1 Mecanismos de Morte Celular.**

Necrose tubular aguda é a lesão renal mais frequente observada após o acidente botrópico, porém casos de necrose cortical também são descritos, bem como nefrite intersticial aguda, alterações glomerulares, vasculite e necrose de papila em menor frequência (SITPRIJA, SITPRIJA, 2012). O efeito nefrotóxico direto dos venenos botrópicos e suas frações já foram relatados como fatores envolvidos na IRA. Segundo Sitprija e Sitprija (2012), os estudos clínicos e histopatológicos não são conclusivos sobre a nefrotoxicidade direta de venenos e toxinas. Evidência convincente é fornecida a partir de estudos com cultura de células renais e perfusão de rim isolado (MORAIS, 2015). Alguns estudos demonstraram que diferentes componentes dos venenos estão envolvidos na indução de morte celular por necrose e/ou apoptose (ARAKI *et al.*, 2002; MORA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2007; NAUMAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2015; DE MORAIS *et al.*, 2013).

As espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROs) e os radicais livres, também estão envolvidos em processos degenerativos, já que podem atacar qualquer biomolécula, estando também envolvidos no processo de morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O estresse oxidativo é gerado pelo desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, tendo o predomínio dos oxidantes, apresentando prejuízo consequente incluindo lesão endotelial, degradação da matriz extracelular pela ativação das proteases, lesão celular e morte por apoptose ou necrose (SCHAFER; BUETTNER, 2001, VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para evitar os danos causados pelos EROS, existem mecanismos fisiológicos próprios para esse controle, que são os antioxidantes, dentre os antioxidantes que são responsáveis por estas ações tem-se a enzima glutathiona reduzida (GSH) que está presente na maioria das células em concentrações mais elevadas na matriz mitocondrial, é considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante, seu baixo nível pode estar diretamente relacionado com o aumento de EROS, peroxidação lipídica e presença de radicais hidroxilas (LEITE *et al.*, 2003; PAGLIUSO *et al.*, 2006; SAID, 2011).

O processo de morte celular corresponde à perda de funções celulares, provenientes de alterações morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares, ocorrendo através de motivos acidentais (passivo, sem uso de energia) ou programado (ativo, com uso energia). Esse processo se dá como uma resposta a uma lesão celular, a qual chega a um ponto em que os danos causados são irreversíveis; sendo classificada em três tipos: apoptose, necrose e autofagia (KROEMER *et al.*, 2009; SLOVITER, 2002).

O tipo de morte celular denominado necrose é um processo passivo de morte celular de caráter degenerativo, decorrente de eventos como a lesão celular, por exemplo, levando a alterações na integridade de membrana citoplasmática, aumento do volume celular, colapso da produção de ATP, hipóxia e outros. Durante o processo de necrose, ocorre condensação da cromatina, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, devido a depleção de ATP, ocorre alteração na permeabilidade da membrana, com comprometimento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Ocorre rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local, que causa danos locais significativos, podendo levar a morte das células vizinhas, ou seja, um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo, causando alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004; YU; CHOI, 2000; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015).

Já o processo denominado apoptose (processo de morte celular programada) é caracterizado principalmente pela retração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA cromossômico, inchaço mitocondrial com alterações no potencial de membrana e permeabilidade, exposição de resíduos de fosfatidilserina (PS) na parte externa da membrana plasmática, ativação das caspases, formação de protuberâncias da membrana plasmática seguido do encapsulamento dos constituintes intracelulares em vesículas apoptóticas (que serão fagocitados por macrófago sem causar inflamação). Apresenta ainda como principais características ausência da liberação de conteúdo celular, a ausência de reação inflamatória

local e redução do volume celular, assim sendo, esse se torna um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular tecidual regulada por proteínas que são expressas pelas próprias células durante o processo de injúria (KERR; WYLLIE; DURRIE, 1972; ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; SLOVITER, 2002).

Estudos mostram a nefrotoxicidade direta de venenos botrópicos, associado a morte celular por necrose e apoptose. De Morais *et al.*, (2013), observaram que o veneno total de *Bothrops leucurus* causou morte celular por necrose e apoptose, em células do tipo MDCK (célula epitelial renal tubular distal), Marinho *et al.*, (2015) utilizando a mesma linhagem celular, observou que o veneno total de *Bothropoides pauloensis* causou morte celular por apoptose. Castro *et al.*, (2004) demonstraram que o veneno de *B. jararaca* causou toxicidade direta para túbulos proximais via estresse oxidativo. *Bothrops insulares* induziu citotoxicidade em células tubulares renais através de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (MELLO *et al.*, 2014). Nascimento *et al.*, (2007) e Colares Buzato *et al.*, (2002) avaliaram a citotoxicidade das peçonhas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* em cultura de células tubulares renais, e ao estudarem o mecanismo de morte celular, verificaram morte predominantemente por necrose e possivelmente através da ação das espécies reativas de oxigênio.

#### **1.4 Sistema de Perfusão Renal.**

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolver a técnica de perfusão de rim isolado, pois este método permite o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas, como os mecanismos neuro-humorais. O método de perfusão de rim isolado consiste em acoplar um rim a um sistema desenvolvido para simular as condições encontradas por esse órgão no organismo vivo. Dessa forma, pode-se observar a atividade renal de substâncias sem que haja qualquer interferência endógena. Nos últimos 40 anos, essa técnica tem sido utilizada para investigar os aspectos da fisiologia, farmacologia e farmacocinética renais (EVANGELISTA, 2008; SILVEIRA, 2015; NIZET, 1975; WANG, 2004).

As primeiras perfusões foram realizadas por Löbell em 1849. Desde então, várias alterações foram efetuadas no sistema, à medida que os avanços da fisiologia renal e da descoberta de novas substâncias tornava possível as melhorias (BOWMAN, 1970; COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; FONTELES, 1980; FONTELES *et al.*, 1983; ROSS *et al.*, 1973).

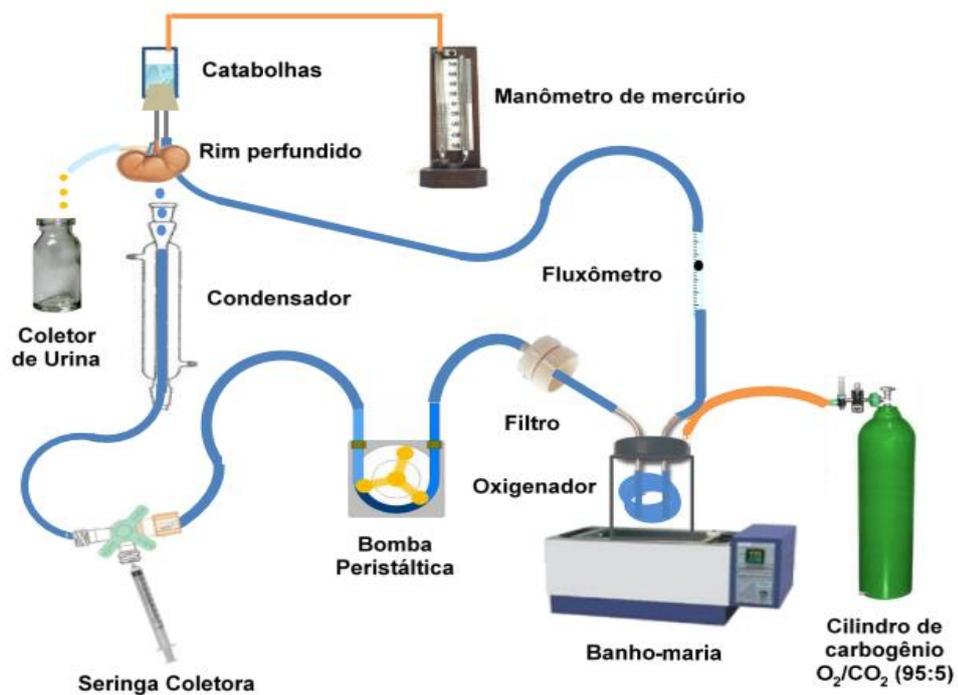
O sistema consiste na perfusão de rim isolado (Figura 04 e 05) com recirculação e dois subsistemas, um *in situ* e outro com circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos a uma temperatura de 37°C.

**Figura 04:** Fotografia representando o sistema de perfusão de rim isolado



Fonte: LFAVET – UFC

**Figura 05:** Esquema do sistema de perfusão de rim isolado.



O sistema de perfusão de rim isolado com recirculação é composto por um conjunto de equipamentos cada um deles desempenha uma determinada função:

- 1) Banho-maria – Manutenção de uma temperatura constante entre 36-37 °C.
- 2) Bomba peristáltica – Bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema (coração artificial).
- 3) Catabolhas – Evita a entrada de bolhas nos rins.
- 4) Cilindro de carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).
- 5) Coletor de urina – Frasco que coleta a urina. É trocado a cada 10 min.
- 6) Condensador – Mantém a solução aquecida na temperatura de 37 °C;
- 7) Filtro (Millipore 5 µm) – Promove a filtração da solução perfusora.
- 8) Fluxômetro – Medida do fluxo de perfusão (L/h).
- 9) Manômetro – Medida da pressão de perfusão (mmHg).
- 10) Oxigenador – Pulmão artificial para promoção das trocas gasosas (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).
- 11) Seringa coletora – Seringa coletora de perfusato. Realizada coleta a cada 10 min.

Este sistema apresenta a vantagem de manutenção constante de parâmetros funcionais renais, com utilização da albumina (fração V, 6g%) na solução perfusora, oxigenação adaptada ao sistema feita através de uma mistura carbogênica de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) e o perfusato que recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Hanseleit modificada (EVANGELISTA, 2008; FONTELES *et al.*, 1983; MONTEIRO, 1990).

Esse sistema é mais econômico, já que o perfusato liberado pela veia renal é reutilizado, portanto, menos albumina é utilizada, diminuindo o custo do projeto (SILVEIRA, 2015). Este sistema foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978), modificado pela adição de um pulmão artificial para melhorar a oxigenação (HAMILTON *et al.*, 1974) e pela utilização de um filtro miliporo de 1,2 µm (PEGG, 1971).

Assim sendo com o intuito de se investigar os mecanismos através dos quais as toxinas ofídicas alteram a função renal (podendo assim induzir um quadro de IRA), utiliza-se o sistema de perfusão renal, pois o rim isolado permite o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas.

Alguns estudos já foram conduzidos com venenos botrópicos e frações isoladas utilizando o modelo de perfusão de rim isolado de rato. Nestes estudos foram observadas

alterações nos parâmetros renais, hemodinâmicos e hidroeletrólíticos, conforme mostrado no quadro 03.

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* alteram os parâmetros fisiológicos da função renal, aumentando ou diminuindo a pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e as porcentagens de transportes hidroeletrólíticos: percentual de transporte total (%T) e percentual de transporte proximal (%Tp) dos íons: sódio (%TNa<sup>+</sup>; %TpNa<sup>+</sup>), cloreto (%TCl<sup>-</sup>; %TpCl<sup>-</sup>) e potássio (%TK<sup>+</sup>; %TpK<sup>+</sup>). Demonstrando dessa forma a ação direta das toxinas sobre o sistema renal, excluindo as causas pré-renais (fatores sistêmicos), esclarecendo dessa forma, como o sistema se comporta de forma isolado frente ação direta das toxinas ofídicas.

O quadro 03 abaixo, relaciona alguns estudos realizados utilizando o modelo de perfusão de rim de rato isolado, mostrando as alterações encontradas em alguns parâmetros da função renal causados pelo veneno total de algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*.

**Quadro 03:** Estudos com veneno total de espécies de serpentes do gênero *Bothrops* no modelo de perfusão de rim de rato isolado.

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

<b>Espécie</b>	<b>PP</b>	<b>RVR</b>	<b>FU</b>	<b>RFG</b>	<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<b>%TK<sup>+</sup></b>	<b>Referência</b>
<i>B. moojeni</i>	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos	Redução aos 90 e 120 minutos.	(BARBOSA <i>et al.</i> , 2002).
<i>B. insularis</i>	Redução aos 120 minutos	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60,90 e 120 minutos	Não alterou.	(BRAGA, 2006)
<i>B. leucurus</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza aos 120 minutos.	Redução aos 90 minutos	Redução aos 60 e 90 minutos	Não alterou.	(MORAIS <i>et al.</i> , 2013).
<i>B. atrox</i>	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos	Redução aos 120 minutos	Redução aos 120 minutos	Não alterou.	(NORÕES, 2009).
<i>B. pauloensis</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos	Redução aos 60, 90 e 120 minutos	(MARINHO <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Adaptado de Marinho (2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os venenos de serpentes são compostos por uma mistura complexa de substâncias ativas, principalmente peptídeos e proteínas, capazes de interferir em vários processos biológicos. Durante o processo evolutivo, as serpentes desenvolveram uma ampla quantidade de toxinas peptídicas para defesa e captura de presas. Estes peptídeos são direcionados a uma grande variedade de alvos farmacológicos, tornando-os uma inestimável fonte de ligantes. Sendo desta forma importantes alvos de estudo no sentido de buscar compreender a patogênese dos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento e trazer a possibilidade de identificação de novos fármacos (GARCIA & LEWIS, 2003; MORAIS, 2011).

Sendo o envenenamento botrópico responsável por efeitos locais e sistêmicos bem evidentes, que quando não tratados efetivamente podem evoluir com sequelas físicas ou óbito, sendo esse último associado por vezes a IRA. Assim sendo o rim, por ser rota de excreção das toxinas, sofre grande parte das ações ocasionadas pelo envenenamento, onde parte dos mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos.

No contexto da importância do estudo dos alvos de componentes de venenos, com o intuito de se conhecer as alterações causadas a nível renal, possibilitando o desenvolvimento de estratégias efetivas para o tratamento da insuficiência renal, resolvemos estudar o veneno total da serpente *Bothrops alternatus*. Pretende-se então, através do modelo de perfusão renal, compreender melhor os mecanismos de ação deste veneno sobre os parâmetros funcionais renais, através da comparação entre os resultados encontrados com os achados dos efeitos renais do veneno de outras espécies e subespécies do mesmo gênero, assim como de informações presentes na literatura científica.

Desta forma o estudo do veneno total sobre o rim, do mecanismo molecular e de morte celular envolvido nas alterações renais causadas por envenenamentos ofídicos tem como finalidade melhorar o entendimento de como agem os venenos e seus componentes, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos de nefrotoxicidade e de como se instala a insuficiência renal aguda induzida pelo envenenamento botrópico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

- Avaliar os efeitos citotóxicos e renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus*.

#### 3.2 Específicos:

- Avaliar os efeitos do veneno total da serpente *Bothrops alternatus* em rim isolado de rato;
- Investigar possíveis alterações histológicas dos rins perfundidos com veneno de *Bothrops alterntaus*;
- Avaliar o perfil oxidativo no tecido renal gerado pela ação do veneno total de *Bothrops alternatus*;
- Estudar os efeitos do veneno total de *Bothrops alternatus* sobre a viabilidade de células do tipo HK-2 e LLC-MK2 (Células epiteliais renais tubulares proximal de humano e macaco, respectivamente);
- Analisar o tipo de morte celular promovido pelo veneno de *Bothrops alternatus* através dos marcadores de apoptose e necrose, Anexina V-PE e 7AAD, respectivamente.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Veneno.**

O veneno total da espécie *Bothrops alternatus* (vBalt) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, coordenador executivo do CEVAP – Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP - Universidade Estadual Paulista.

### **4.2 Animais.**

Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300g), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  com acesso a alimento e água *ad libitum*.

Esses animais receberam ração padrão (Biotec®) e água “*ad libitum*”, com exceção das 04h que precederam os experimentos de perfusão renal, nas quais foram mantidos em jejum alimentar e água “*ad libitum*”. Toda a metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo 02/2016.

### **4.3 Perfusão de Rim Isolado**

#### **4.3.1 Calibração e Preparo do Sistema de Perfusão Renal.**

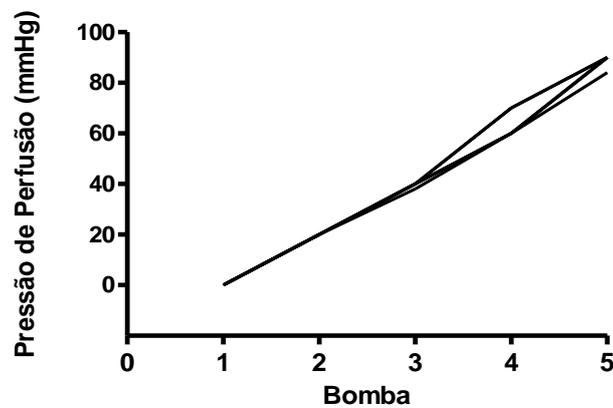
Antes do início de cada experimento, o sistema foi limpo, montado e calibrado. A calibração foi sempre feita com o sistema em funcionamento e com solução de cloreto de sódio à 0,9%, aquecida na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , durante a calibração foi averiguada a presença de qualquer vazamento ou obstrução no fluxo.

A calibração ocorre da seguinte forma: a solução de cloreto de sódio a 0,9% á  $37^{\circ}\text{C}$ , circulando pelo sistema e coletada por um minuto em proveta milimetrada. O objetivo deste procedimento é verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema (cânula arterial). Foi avaliado em cada uma das bombas (1, 2, 3, 4 e 5) a Pressão de Perfusão (mmHg), o Volume de NaCl 0,9% (mL/min) e o valor Registrado pelo Fluxômetro (L/h). Tais resultados

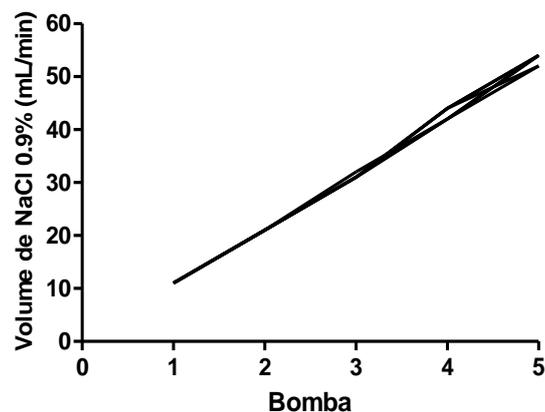
foram então compilados em curvas, e plotada a velocidade da bomba no eixo das abscissas (x) em relação às demais variáveis já citadas no eixo das ordenadas (y). Entre cada coleta (mudança na velocidade da bomba) se aguardava 2 minutos para a estabilização das novas condições, então se realizava novamente as medidas.

As figuras 06, 07 e 08 trazem as plotagens das curvas de calibração.

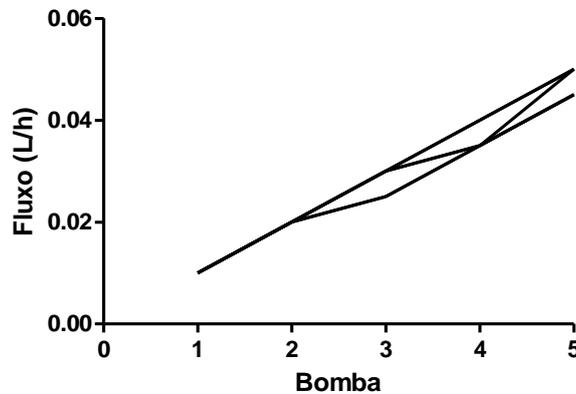
**Figura 06** – Valores de Pressão de Perfusão (mmHg), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 07** – Valores de Volume de NaCl 0,9% (mL/min), relacionados à velocidade da bomba, registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 08** – Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h), relacionados à velocidade da bomba, durante a calibração do sistema (n=6).



#### 4.3.2 Solução Perfusora.

A solução empregada no sistema de perfusão renal é a de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES *et al.*, 1998), concentrada 20 vezes, cuja composição é: NaCl = 138 g; KCl = 7 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 3,2 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 5,8 g e Ureia = 10 g.

Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO<sub>3</sub> = 4,2 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,74 g; Glicose = 2 g e Penicilina G potássica cristalina = 0,05 g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina fração V (6 g%) (LIMA; MONTEIRO; FONTELES, 1992; MONTEIRO, 1990). Esta solução final foi dialisada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK; LITTLE, 1977; HANSON; BALLARD, 1968; ROSS, 1978). A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24h. No final, após 48h de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15 g de inulina. E por fim o pH foi ajustado entre os valores de 7,3 a 7,4.

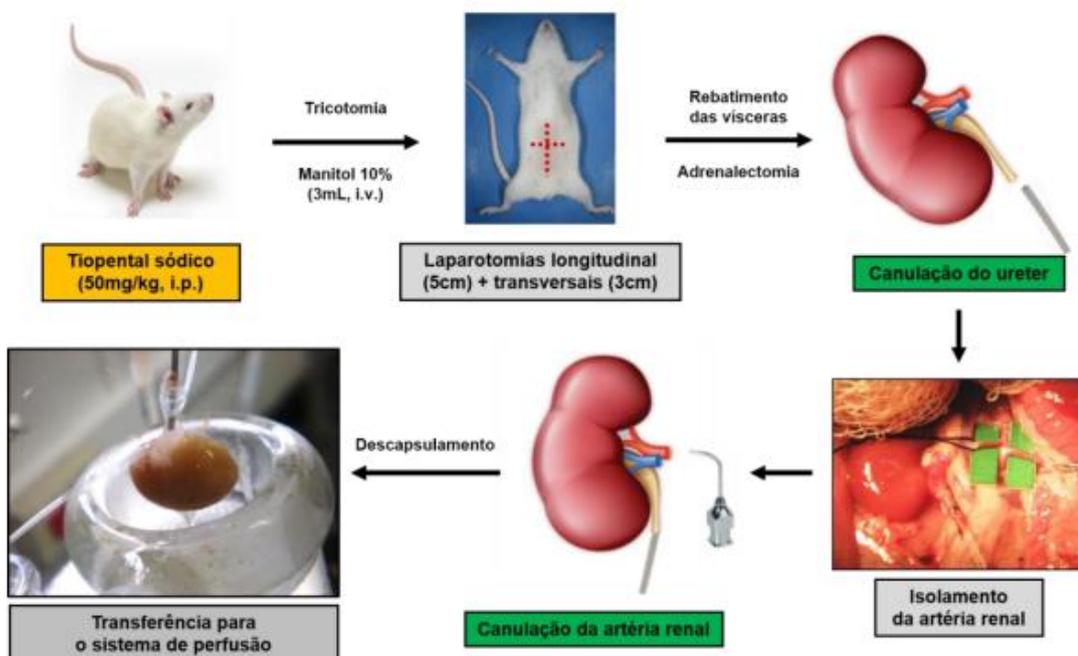
#### 4.3.3 Técnica Cirúrgica.

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thiopentax, Cristália®) na dose de 50 mg/Kg de massa corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o

método descrito por Bahlmann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Ross (1978), Fonteles e colaboradores (1983). A figura 09 ilustra resumidamente o protocolo descrito abaixo.

Inicialmente, a veia femoral foi isolada e 3 mL de manitol à 10% (p/v) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter. Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se com uma incisão mediana de aproximadamente 5 cm, seguida de duas incisões perpendiculares à linha alba de aproximadamente 3 cm para uma melhor observação das estruturas anatômicas. As vísceras foram rebatidas para a esquerda, permitindo a visualização do rim direito e amarrou-se e retirou-se a glândula suprarrenal a fim de que nenhum de seus hormônios viesse a influenciar os resultados do experimento. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30. A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica anterior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Por fim, o rim foi acoplado ao sistema de perfusão *ex vivo*, sem a interrupção do fluxo (Figura 10).

**Figura 09** – Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado em ratos.



Fonte: Silveira (2015)

**Figura 10** – Rim acoplado ao sistema de perfusão



**Fonte:** Morais (2011)

#### **4.3.4 Protocolo Experimental.**

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. A pressão de perfusão e o fluxo foram mantidos constantes durante os 30min iniciais, período considerado como controle interno. Após o controle inicial, foi adicionada a substância teste (vBalt) e observadas as mudanças nos parâmetros renais até os 120min.

A cada 05 min foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min. Amostras do perfusato (1,5 mL) e da urina foram coletadas a cada 10min durante os 120min totais e depois congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG), *clearance* osmolar (COsm) e transporte tubular total e proximal de sódio ( $\% \text{TNa}^+$  e  $\% \text{pTNa}^+$ ), potássio ( $\% \text{TK}^+$  e  $\% \text{pTK}^+$ ) e cloreto ( $\% \text{TCl}^-$  e  $\% \text{pTCl}^-$ ).

#### 4.3.5 Grupos Experimentais.

O estudo dos efeitos do veneno total da espécie *Bothrops alternatus* sobre a função renal foi iniciado após o período de controle interno de 30min e as observações foram feitas durante os 90min seguintes. Os três grupos analisados foram os seguintes (n=06):

- a) Grupo Controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit;
- b) Grupo 1  $\mu\text{g/mL}$ : rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e vBalt na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ , após os 30 min;
- c) Grupo 3  $\mu\text{g/mL}$ : rins perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e vBalt na concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ , após os 30 min;

#### 4.3.6 Análises Bioquímicas.

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos-seletivos (RapidChem 744, Bayer® Diagnostica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles e colaboradores (1983) com modificações. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – Vapro 5520, WESCOR®).

#### 4.3.7 Determinação dos Parâmetros Funcionais Renais.

As fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais são apresentadas no quadro 04, abaixo (FONTELES, 1980; MARTINEZ-MALDONADO; OPAVAS-TITZER, 1978).

Parâmetros Renais	Fórmula
<b>PP (mmHg):</b> Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
<b>FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Fluxo Urinário	<b>FU</b> = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
<b>RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Ritmo de Filtração Glomerular	<b>RFG</b> = (DOU <sub>in</sub> /DOP <sub>in</sub> ) x FU, onde DOU <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina na urina e DOP <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina no perfusato
<b>FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Fluxo de Perfusão Renal	Registrado a cada 10min/peso do rim/intervalo de tempo

<b>RVR (mmHg/mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Resistência Vascular Renal	<b>RVR = PP (mmHg) / FPR</b>
<b>FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Sódio Filtrado	<b>FNa<sup>+</sup> = RFG x PNa<sup>+</sup></b>
<b>ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Sódio Excretado	<b>ENa<sup>+</sup> = FU x UNa<sup>+</sup></b>
<b>TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Sódio Transportado	<b>TNa<sup>+</sup> = FNa<sup>+</sup> - ENa<sup>+</sup></b>
<b>%TNa<sup>+</sup>:</b> Percentual de Sódio Transportado	<b>%TNa<sup>+</sup> = TNa<sup>+</sup>/FNa<sup>+</sup> x 100</b>
<b>%TpNa<sup>+</sup>:</b> Percentual Proximal de Sódio Transportado	<b>%TpNa<sup>+</sup> = pTNa<sup>+</sup>/FNa<sup>+</sup> x 100</b>
<b>FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Potássio Filtrado	<b>FKa<sup>+</sup> = RFG x PKa<sup>+</sup></b>
<b>EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Potássio Excretado	<b>EK<sup>+</sup> = FU x UKa<sup>+</sup></b>
<b>TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Potássio Transportado	<b>TK<sup>+</sup> = FK<sup>+</sup> - EK</b>
<b>%TK<sup>+</sup>:</b> Percentual de Potássio Transportado	<b>%TK<sup>+</sup> = TK<sup>+</sup>/FK<sup>+</sup> x 100</b>
<b>%TpK<sup>+</sup>:</b> Percentual Proximal de Potássio Transportado	<b>%TpK<sup>+</sup> = pTK<sup>+</sup>/FK<sup>+</sup> x 100</b>
<b>FCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Cloreto Filtrado	<b>FCl<sup>-</sup> = RFG x PCl</b>
<b>ECl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Cloreto Excretado	<b>ECl<sup>-</sup> = FU x UCl</b>
<b>TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Cloreto Transportado	<b>TCl<sup>-</sup> = FCl<sup>-</sup> - ECl<sup>-</sup></b>
<b>%TCl<sup>-</sup>:</b> Percentual de Cloreto Transportado	<b>%TCl<sup>-</sup> = TCl<sup>-</sup>/FCl<sup>-</sup> x 100</b>
<b>%TpCl<sup>-</sup>:</b> Percentual Proximal de Cloreto Transportado	<b>%TpCl<sup>-</sup> = pTCl<sup>-</sup>/FCl<sup>-</sup> x 100</b>
<b>COsm (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b> Clearance osmolar	<b>COsm = (Uosm / Posm) x FU, onde UOsm = osmolaridade urinária e POsm = osmolaridade do perfusato</b>

Fonte: LAFAVET – UFC

#### 4.3.8 Análise Histopatológica.

Ao final de cada experimento de perfusão renal foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados inicialmente em formol 10% por 24h, seguido de armazenamento em álcool 70% até o exame histológico.

Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 4 μm. Foi realizada coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico vertical motorizado com epifluorescência Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0. Todas as lâminas dos rins submetidos à perfusão foram confeccionadas e avaliadas no Laboratório de Histologia Veterinária, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, sob supervisão da Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.

#### **4.4 Determinação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Tecido Renal.**

Para as metodologias descritas a seguir foram utilizados os rins controles (rins esquerdos não perfundidos; n=06) e os rins direitos perfundidos com vBalt (concentração de 1 e 3 µg/mL; n=06).

##### **4.4.1 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH).**

O método é baseado na reação com reagente de Ellman (DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) com grupos tiol livres, que é usado para analisar a atividade da GSH em amostra tecidos. O DTNB reage com GSH formando o 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotometria. O homogenato do rim, foi diluído em tampão de 0,02 M de EDTA (10% v/v) e adicionados a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB e os níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

##### **4.4.2 Determinação da Concentração de Malondialdeído (MDA)**

Para verificar o dano direto no tecido renal, o grau de lipoperoxidação foi avaliado por meio da determinação dos níveis de MDA através substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras de tecido renal foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4; 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada, utilizando um leitor de microplacas em 535 nm e foi expressa como µg de MDA /g de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

##### **4.4.3 Determinação dos Níveis de Nitrito**

Para avaliar os efeitos do vBalt sobre a produção de NO, foram determinados os níveis de nitrito em homogenatos de rins dos ratos perfundidos com veneno e nos rins esquerdos não

perfundidos (controle). O homogenato foi preparado com tampão fosfato de sódio e depois centrifugado. Após a centrifugação ( $800 \times g/10 \text{ min}$ ), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção foi determinada com base na reação de Griess (GREEN; GOLDMAN, 1981). Para tal, 100  $\mu\text{L}$  do reativo 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 a 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de  $\text{NaNO}_2$  (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições e os brancos foram preparados pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do reativo de Griess a 100  $\mu\text{L}$  do tampão usado para o homogenato. A absorvância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm e foi expressa em nM de nitrito /g de tecido úmido.

## **4.5 Ensaios de Cultura e Viabilidade Celular**

### **4.5.1 Linhagens Celulares.**

Duas linhagens celulares foram utilizadas: células epiteliais de túbulo proximal humanas HK2 (Human Kidney) e de macaco LLC-MK2 (Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells) e os procedimentos experimentais realizados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LCC – UFC) sob supervisão da Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

### **4.5.2 Cultivo e Tratamento das Células HK-2 e LLC-MK2.**

As células HK2 e LLC-MK2 foram cultivadas em frascos plásticos com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , com atmosfera de 95% e umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foi realizada a observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24h.

Estas linhagens celulares são aderentes e formam uma monocamada sobre a superfície da garrafa de cultivo. Após confluência, onde toda a superfície de cultivo foi preenchida, as células foram deslocadas utilizando tripsina-EDTA (0,05%/0,02%) e a suspensão celular foi redistribuída para outras garrafas de cultivo, expandindo a cultura celular. As alíquotas de

células para estoque foram mantidas em meio de cultura DMEN acrescido de SFB a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENEY, 2010).

As células HK-2 e LLC-MK2 foram deslocadas das garrafas de cultivo por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 5 min em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5min a 4000 rpm.

Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas a  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24h do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do vBalt (0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Após esse período, foi realizado ensaio de viabilidade celular descrito a seguir.

#### **4.5.3 Estudo da Viabilidade Celular *in vitro***

##### **4.5.3.1 Ensaio com MTT.**

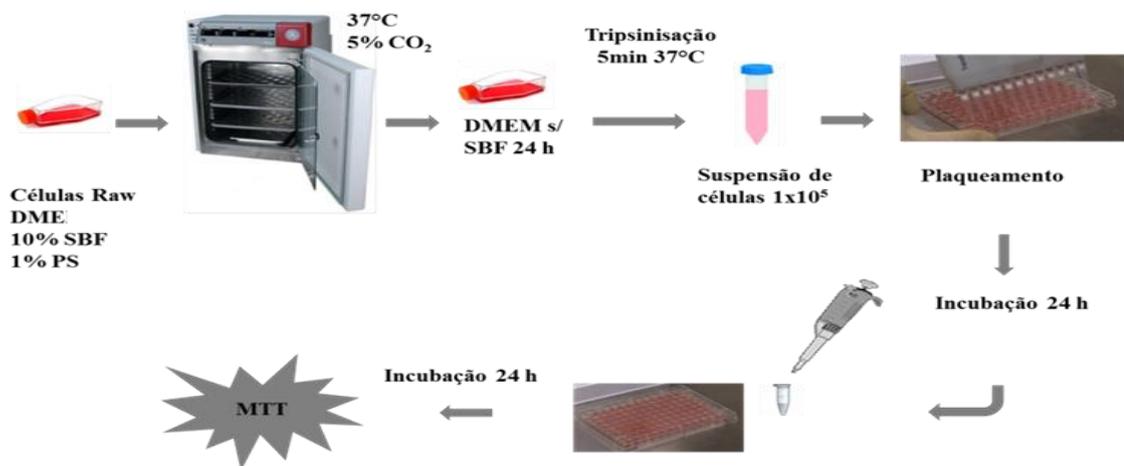
Este ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossômicas. A figura 11 ilustra o protocolo.

O MTT não interage diretamente com as desidrogenases, mas com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570nm de absorbância. A intensidade da coloração do produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH *et al.*, 2005).

Ambas as linhagens celulares foram adicionadas às placas de 96 poços com densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL e tratadas com diferentes concentrações do vBalt descritas anteriormente no item 4.5.2. Após 24h deste tratamento, foi removido 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do meio de cultura e adicionado 10 $\mu\text{L}$  da solução do MTT (Sigma®) dissolvido em PBS.

Após incubação por 4h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, foi adicionado 90 µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C e após 17h foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. O controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência das células HK-2 e LLC-MK2 tratadas apenas com o veículo de diluição do vBalt e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com o vBalt (MOSMANN, 1983).

**Figura 11** – Desenho esquemático de ensaio de toxicidade pelo MTT.



**Fonte:** Lima (2014)

#### 4.5.3.2 Determinação da Integridade da Membrana.

Através das propriedades de dispersão de luz em um citômetro de fluxo, aliado às diferenças morfológicas exibidas pelas células nesses dois processos (necrose e apoptose) é possível através de marcadores específicos identificar em qual estágio elas se encontram. Células marcadas com o corante vital 7-AAD (*7-aminoactinomycin D* – se liga ao DNA, quando há comprometimento da membrana celular) e emite alta fluorescência quando excitado pelo *laser*, indicando células em possível processo necrótico. A detecção de células apoptóticas, onde a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização e a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada, ligando-se a Anexina V (proteína que possui

alta afinidade por PS na presença íons de cálcio), conjugada ao fluoróculo PE pode ser detectada. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-PE e com o corante 7-AAD, permite a diferenciação de células intactas, viáveis (AxVPE – 7AAD -), no início de apoptose (AxVPE + 7-AAD -) e células tardiamente apoptóticas ou necróticas (AxVPE + 7-AAD +) (KRYSKO *et al.*, 2006; LIMA, 2015).

Desta forma, as células LLC-MK2 na concentração de  $10^5$  células/mL foram plaqueadas e incubadas com a IC50 de vBalt e PBS (controle negativo) durante 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida as células foram centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos. O precipitado obtido foi lavado 2 vezes e ressuspensão em 490  $\mu$ L de tampão de ligação (Hepes/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, pH 7,4). As suspensões foram tratadas com 5  $\mu$ L de solução de Anexina V-PE e 5  $\mu$ L de solução de 7AAD (BD Pharmigen®, ambos na concentração final de 5  $\mu$ g/mL) por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em 500  $\mu$ L de tampão de ligação e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) para contagem de células não-marcadas, marcadas unicamente com 7AAD ou anexina V-PE ou marcadas duplamente.

**Figura 12** - Desenho esquemático da determinação da integridade da membrana.



Fonte: Lima (2014)

#### 4.6 Análise Estatística.

Para análise de dados foi utilizado o software estatístico GraphPad® Prism v6.0. Nos ensaios de perfusão renal, os resultados foram apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da

Média (E.P.M.), sempre considerando estatisticamente significativos aqueles que alcançaram a probabilidade de ocorrência da hipótese nula inferior a 5% ( $P < 0,05$ ). Nos ensaios de perfusão renal, todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo e os dados compilados em intervalos de 30min (30, 60, 90 e 120). As diferenças entre os tempos de um mesmo grupo foram comparadas utilizando teste t de Student. Já as diferenças entre tempos iguais entre os grupos foram comparadas por Análise de Variância Fator Duplo (Two-Way ANOVA), seguida de pós teste de Bonferroni.

Para os ensaios de viabilidade celular, os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular *versus* concentração do vBalt. Esses foram comparados por Análise de Variância Fator Único (One-Way ANOVA), seguida de pós-teste de Dunett.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Perfusão de Rim Isolado.

O veneno da serpente *Bothrops alternatus* foi administrado ao sistema de perfusão renal aos 30 minutos após o início dos experimentos. Os grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit modificada. Após aplicação do veneno do vBalt, foram observadas alterações na fisiologia renal em todos os parâmetros estudados em pelo menos uma das concentrações testadas.

Com relação aos parâmetros vasculares, verificou-se redução na pressão de perfusão renal (PP) para as concentrações de 1 µg/mL e 3 µg/mL nos tempos de 90 e 120 min. Alterações no tempo de 60 min só foram observadas somente na maior concentração (3 µg/mL) (Tabela 01; Figura 13).

A resistência vascular renal (RVR) também diminuiu significativamente para ambas as concentrações nos tempos de 90 e 120 min (Tabela 02; Figura 14).

Adicionalmente, o fluxo urinário (FU) foi reduzido em ambas concentrações nos tempos de 90 e 120 min, quando comparados ao controle externo, e quando comparadas entre as concentrações na mesma faixa de tempo, observa-se diferença no tempo de 60 min para as duas concentrações (1 e 3 µg/mL), (Tabela 03; Figura 15).

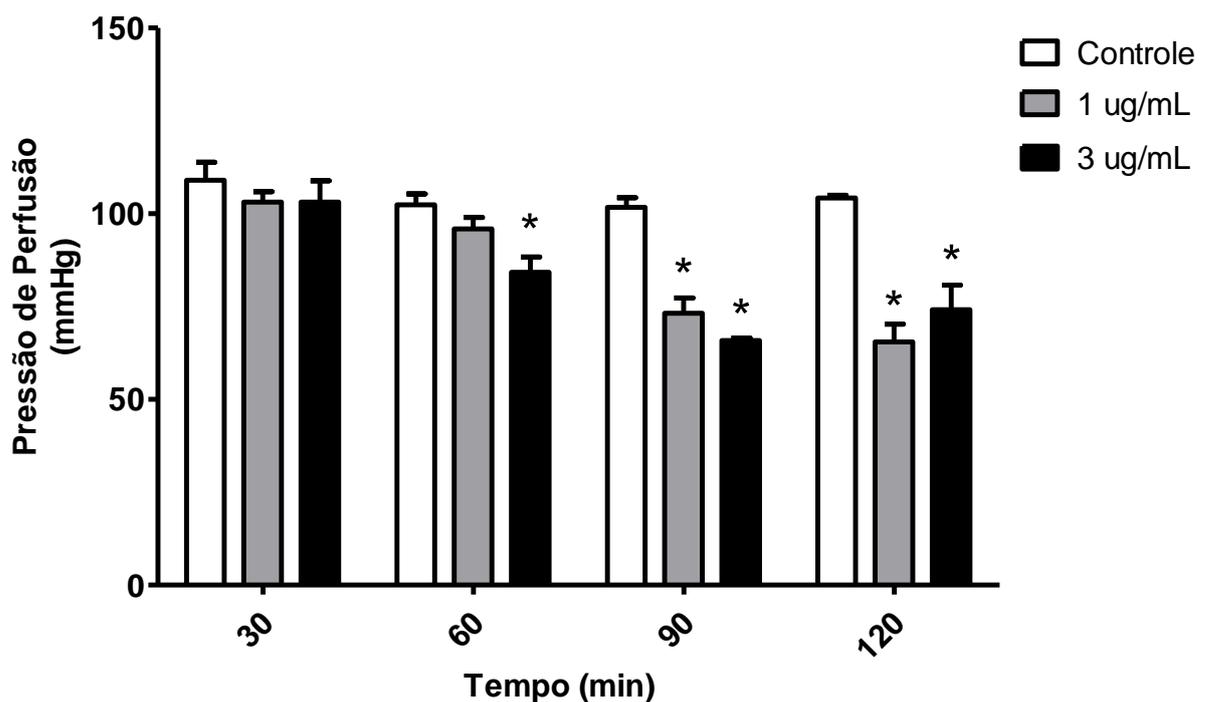
Já o ritmo de filtração glomerular (RFG), apresentou diminuição significativa a partir dos 60 min até o fim do experimento em ambas as concentrações estudadas, quando comparadas entre as concentrações na mesma faixa de tempo, observa-se diferença no tempo de 60 min para as duas concentrações (1 e 3 µg/mL), (Tabela 04; Figura 16).

**Tabela 01** – Pressão de Perfusão (PP) em rim isolado de rato em presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).

PP (mmHg)			
Tempo	Controle	1 µg/mL	3 µg/mL
30 min	109,0 ± 4,860	103,10 ± 2,84	103,10 ± 5,7330
60 min	102,4 ± 2,940	95,90 ± 3,092	84,21 ± 4,1350 *
90 min	101,7 ± 2,6370	73,23 ± 4,067*	65,88 ± 0,6590*
120 min	104,2 ± 0,7467	65,48 ± 4,786*	74,14 ± 6,6350*

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo do grupo.

**Figura 13** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* na pressão de perfusão.



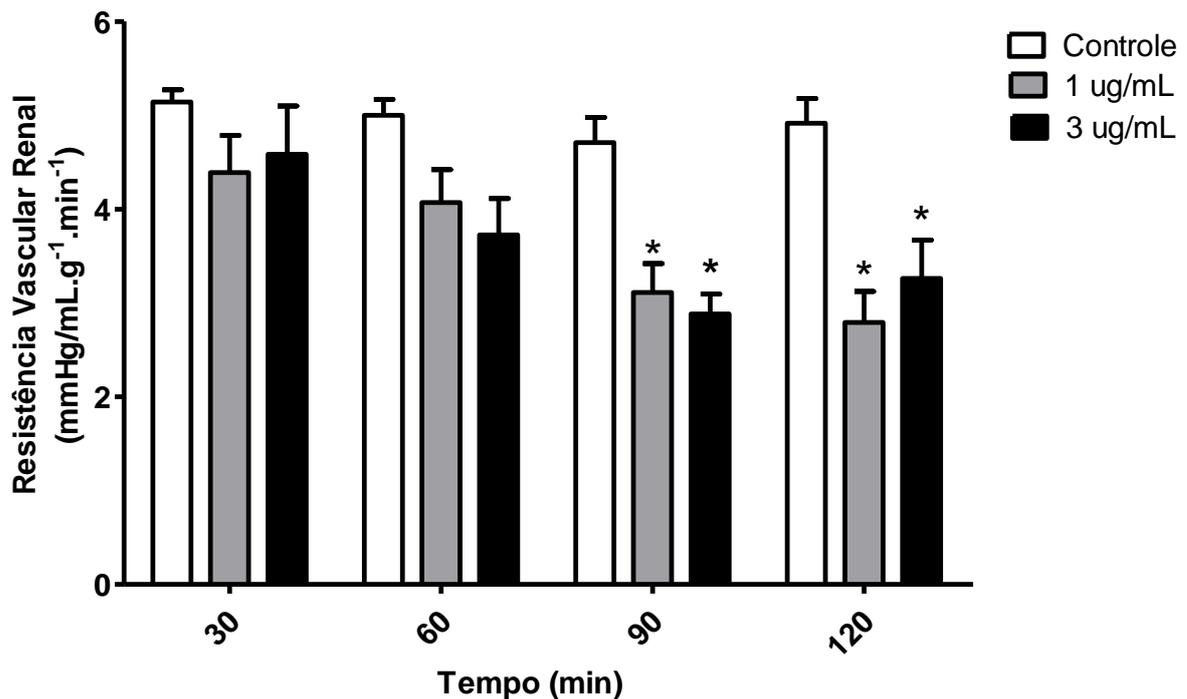
Pressão de Perfusão rim isolado de rato, na concentração de 1µg/mL e 3µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). \* p<0,05 relacionando a concentração de 1µg/mL e 3µg/mL com o controle externo.

**Tabela 02** – Resistência Vascular Renal (RVR) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$ ).

RVR ( $\text{mmHg/mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )			
Tempo	Controle	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$
30 min	5,143 $\pm$ 0,1291	4,390 $\pm$ 0,3951	4,5840 $\pm$ 0,5161
60 min	5,000 $\pm$ 0,1704	4,070 $\pm$ 0,3507	3,7240 $\pm$ 0,3881
90 min	4,710 $\pm$ 0,2689	3,113 $\pm$ 0,3055*	2,8840 $\pm$ 0,2109*
120 min	4,917 $\pm$ 0,2612	2,793 $\pm$ 0,3298*	3,2620 $\pm$ 0,4099*

Os dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$ , comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo do grupo.

**Figura 14** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* na resistência vascular renal.



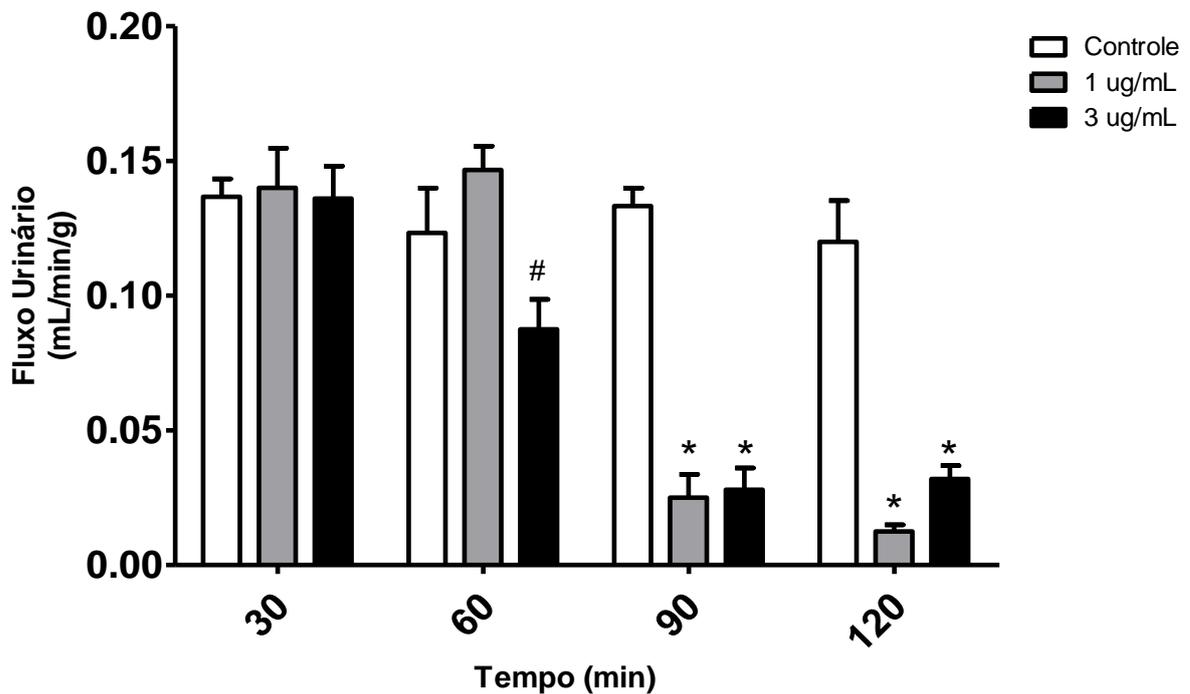
Resistência vascular renal em rim isolado de rato, na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). \*  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$  com o controle externo.

**Tabela 03** – Fluxo Urinário (FU) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$ ).

FU ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )			
Tempo	Controle	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$
30 min	0,1367 $\pm$ 0,006667	0,1400 $\pm$ 0,014720	0,1360 $\pm$ 0,012080
60 min	0,1233 $\pm$ 0,016670	0,1467 $\pm$ 0,00882	0,0875 $\pm$ 0,01109#
90 min	0,1333 $\pm$ 0,006667	0,0250 $\pm$ 0,008660*	0,0280 $\pm$ 0,00800*
120 min	0,1200 $\pm$ 0,015280	0,0125 $\pm$ 0,002500*	0,0320 $\pm$ 0,00489*

Os dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$ , comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo; # $P < 0,05$ , comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Figura 15** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* no Fluxo Urinário.



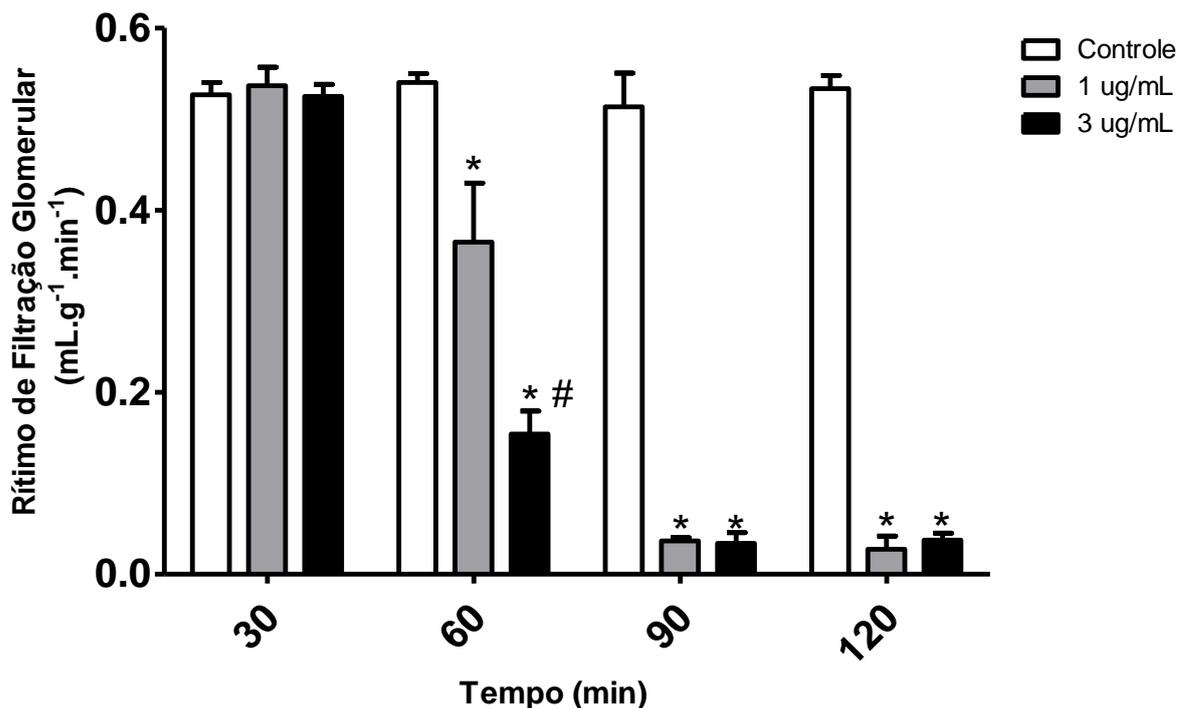
Fluxo Urinário em rim isolado de rato, na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$  (n=06). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). \*  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{g/mL}$  com o controle externo. # $P < 0,05$ , comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Tabela 04** – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

RFG ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )			
Tempo	Controle	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
30 min	0,5267 $\pm$ 0,01333	0,53670 $\pm$ 0,020280	0,5250 $\pm$ 0,01323
60 min	0,5400 $\pm$ 0,01000	0,36500 $\pm$ 0,0646*	0,1540 $\pm$ 0,0252*#
90 min	0,5133 $\pm$ 0,03712	0,03667 $\pm$ 0,00333*	0,0340 $\pm$ 0,0117*
120 min	0,5333 $\pm$ 0,01453	0,02750 $\pm$ 0,01436*	0,0375 $\pm$ 0,007*

Os dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$ , comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo; # $P < 0,05$ , comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Figura 16** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* no Ritmo de Filtração Glomerular.



Ritmo de Filtração Glomerular em rim isolado de rato, na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (n=06). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M). \*  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com o controle externo. # $P < 0,05$ , comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

Quando se analisou o transporte de eletrólitos, foi observado que o Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa<sup>+</sup>) diminuiu significativamente aos 90 e 120 min, para a concentração de 3 µg/mL de veneno total de *Bothrops alternatus*, e para a concentração de 1µg/mL houve diminuição apenas nos 120 min de experimento (Tabela 05 – Figura 17).

O percentual de transporte proximal de sódio (%TpNa<sup>+</sup>) também diminuiu significativamente para as duas concentrações analisadas, nos tempos de 60, 90 e 120 min (Tabela 06 – Figura 18).

Para o íon cloreto foi observado os seguintes valores, o percentual de transporte total cloro (%TCl<sup>-</sup>) (%TpCl<sup>-</sup>) diminuiu nas duas concentrações analisadas, houve diminuição significativa aos 60, 90 e 120 min para concentração de 3µg/mL e aos 120 min para concentração de 1µg/mL (Tabela 07 – Figura 19).

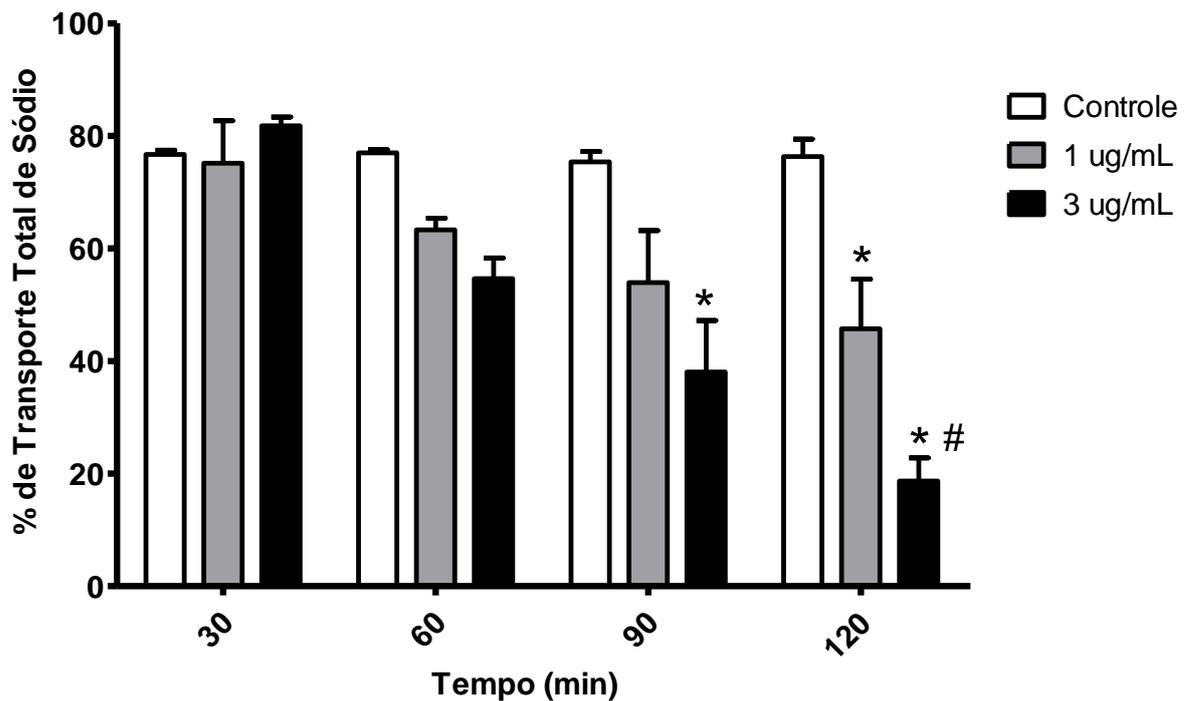
Já para o percentual de transporte proximal de cloro (%TpCl<sup>-</sup>) houve diminuição significativa na concentração de 3µg/mL para os tempos de 60, 90 e 120 min, e para concentração de 1µg/mL para os tempos de 60 e 120 min (Tabela 08 – Figura 20).

**Tabela 05** – Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa<sup>+</sup>) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).

Tempo	%TNa <sup>+</sup>		
	Controle	1 µg/mL	3 µg/mL
30 min	76,700 ± 0,7304	75,160 ± 7,5050	81,7700 ± 1,5930
60 min	77,000 ± 0,5414	63,320 ± 2,0550	54,6500 ± 3,6490
90 min	75,380 ± 1,8190	53,950 ± 9,2440	38,0500 ± 9,1500*
120 min	76,330 ± 3,1230	45,730 ± 8,800*	18,6800 ± 4,1230*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo. #P<0,05, comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Figura 17** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio (%TNa<sup>+</sup>).



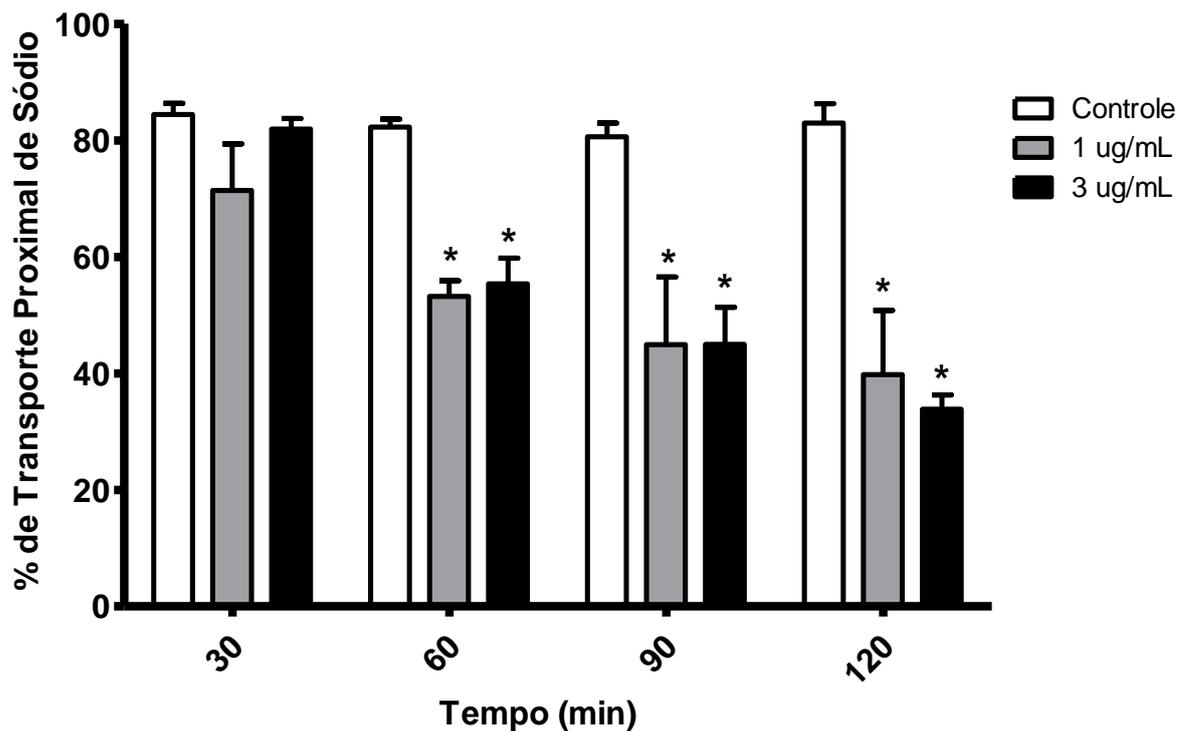
Percentual de Transporte Tubular Total de Sódio em rim isolado de rato, na concentração de 1 µg/mL e 3 µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M). \* p<0,05 relacionando a concentração de 1 µg/mL e 3 µg/mL com o controle externo. #P<0,05, comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Tabela 06** – Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa<sup>+</sup>) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).

Tempo	%TpNa <sup>+</sup>		
	Controle	1 µg/mL	3 µg/mL
30 min	84,4500 ± 1,8810	71,4100 ± 7.97900	81,9500 ± 1.7910
60 min	82,2900 ± 1,3410	53,2300 ± 2.66100*	55,3500 ± 4.4150*
90 min	80,5900 ± 2,3600	44,9100 ± 11.6200*	44,9800 ± 6.3490*
120 min	82,9900 ± 3,2870	39,7700 ± 11.0600*	33,8400 ± 2.4740*

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo.

**Figura 18** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre Percentual de Transporte Proximal de Sódio (%TpNa<sup>+</sup>).



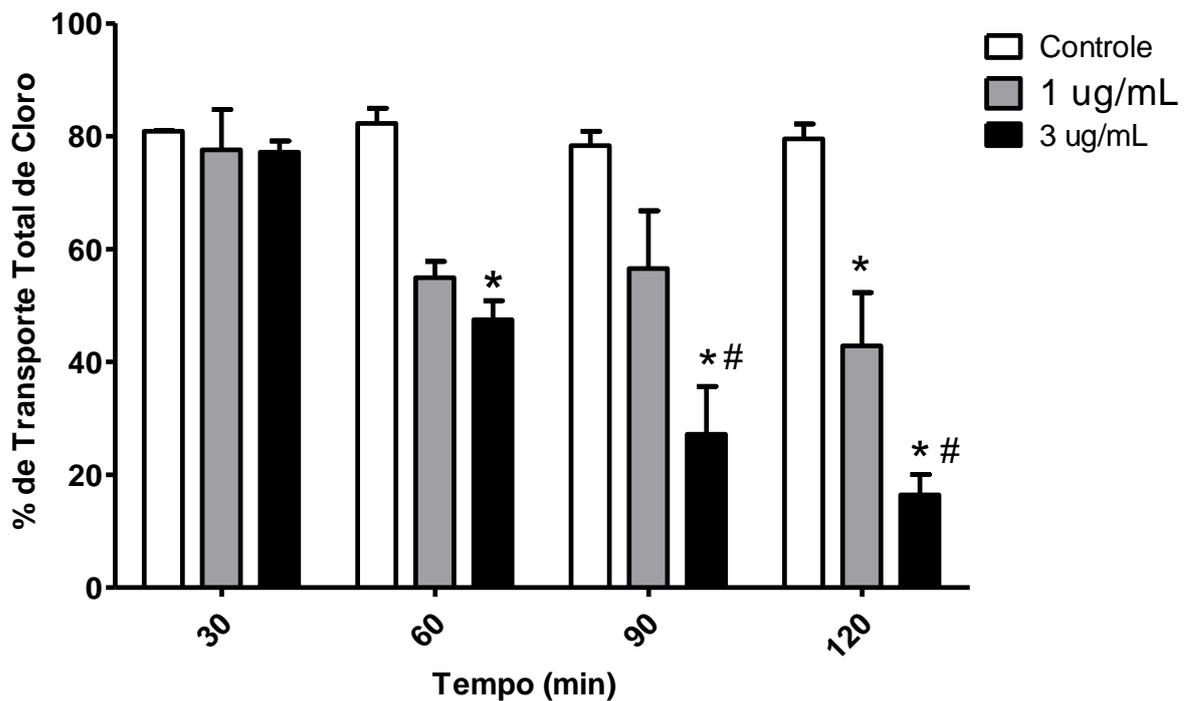
Percentual de Transporte Proximal de Sódio em rim isolado de rato, na concentração de 1µg/mL e 3µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M). \* p<0,05 relacionando a concentração de 1µg/mL e 3µg/mL com o controle externo.

**Tabela 07** – Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl<sup>-</sup>) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).

%TCl <sup>-</sup>			
Tempo	Controle	1 µg/mL	3 µg/mL
30 min	80,900 ± 0,1450	77,580 ± 7,1480	77,190 ± 1,9920
60 min	82,260 ± 2,7250	54,940 ± 2,8550	47,470 ± 3,4000*
90 min	78,330 ± 2,5450	56,560 ± 10,220	27,170 ± 8,5030*#
120 min	79,530 ± 2,6700	42,850 ± 9,4440 *	16,450 ± 3,6000*#

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo. #P<0,05, comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo

**Figura 19** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto (%TCl<sup>-</sup>).



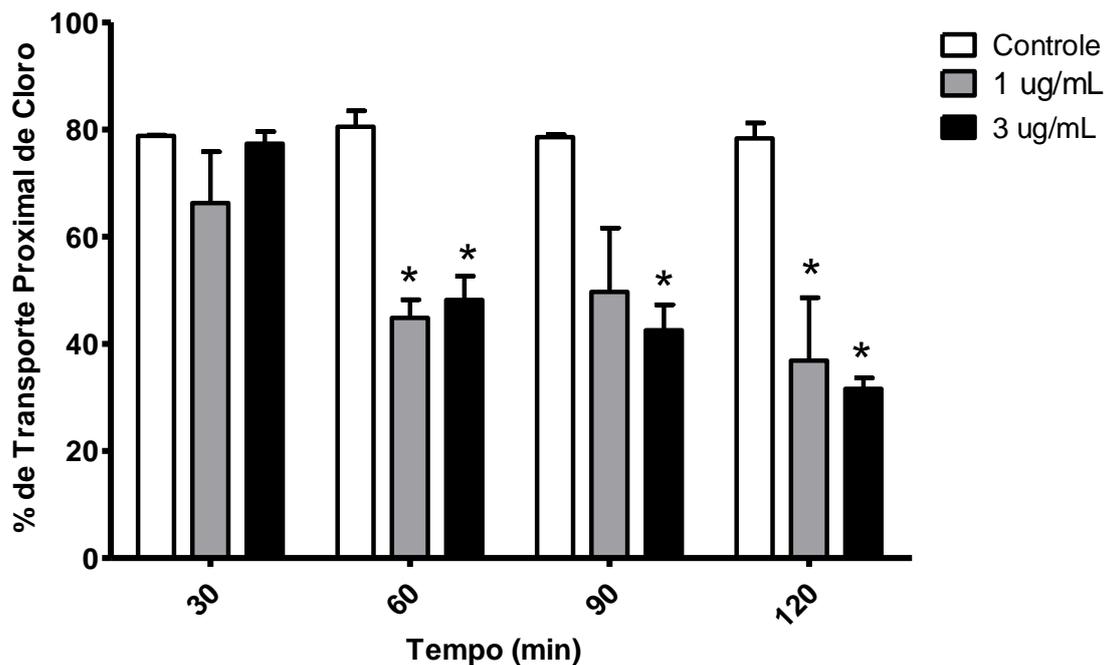
Percentual de Transporte Tubular Total de Cloreto em rim isolado de rato, na concentração de 1 µg/mL e 3 µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M). \* p<0,05 relacionando a concentração de 1 µg/mL e 3 µg/mL com o controle externo. #P<0,05, comparação entre as concentrações na mesma faixa de tempo.

**Tabela 08** – Percentual de Transporte Proximal de Cloro (%TpCl<sup>-</sup>) em rim isolado de rato na presença do vBalt (1 µg/mL e 3 µg/mL).

%TpCl <sup>-</sup>			
Tempo	Controle	1 µg/mL	3 µg/mL
30 min	78,820 ± 0,1550	66,290 ± 9.5570	77,3700 ± 2.2270
60 min	80,500 ± 3,0050	44,860 ± 3.3960*	48,1700 ± 4.4570*
90 min	78,580 ± 0,4800	49,680 ± 11.9500	42,5500 ± 4.7550*
120 min	78,360 ± 2,8700	36,890 ± 11.7200*	31,6100 ± 2.0070*

Os dados são expressos em média ± E.P.M. com análise por teste t de Student ou Two-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05, comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle externo.

**Figura 20** – Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre Percentual de Transporte Proximal de Cloreto (%TpCl<sup>-</sup>).

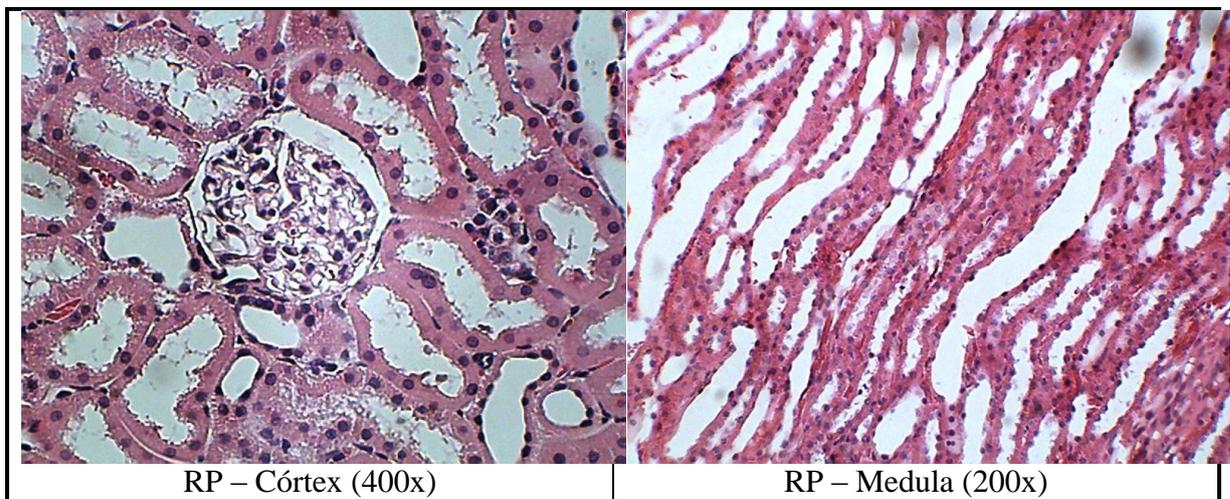


Percentual de Transporte Proximal de Cloreto em rim isolado de rato, na concentração de 1µg/mL e 3µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M). \* p<0,05 relacionando a concentração de 1µg/mL e 3µg/mL com o controle externo.

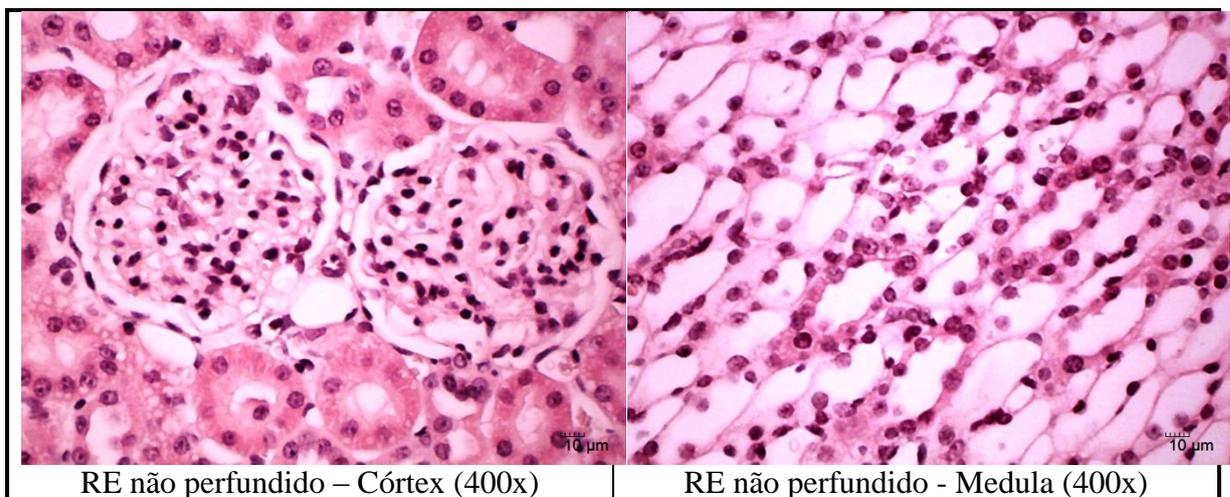
## 5.2 Análise Histológica dos Rins Perfundidos com vBalt.

Nos rins do grupo controle externo (rins direitos perfundidos apenas com solução Krebs-Henseleit) e rins esquerdos dos grupos teste (não perfundidos) não foram observadas alterações de arquitetura e nenhum dos rins apresentou qualquer outra alteração importante.

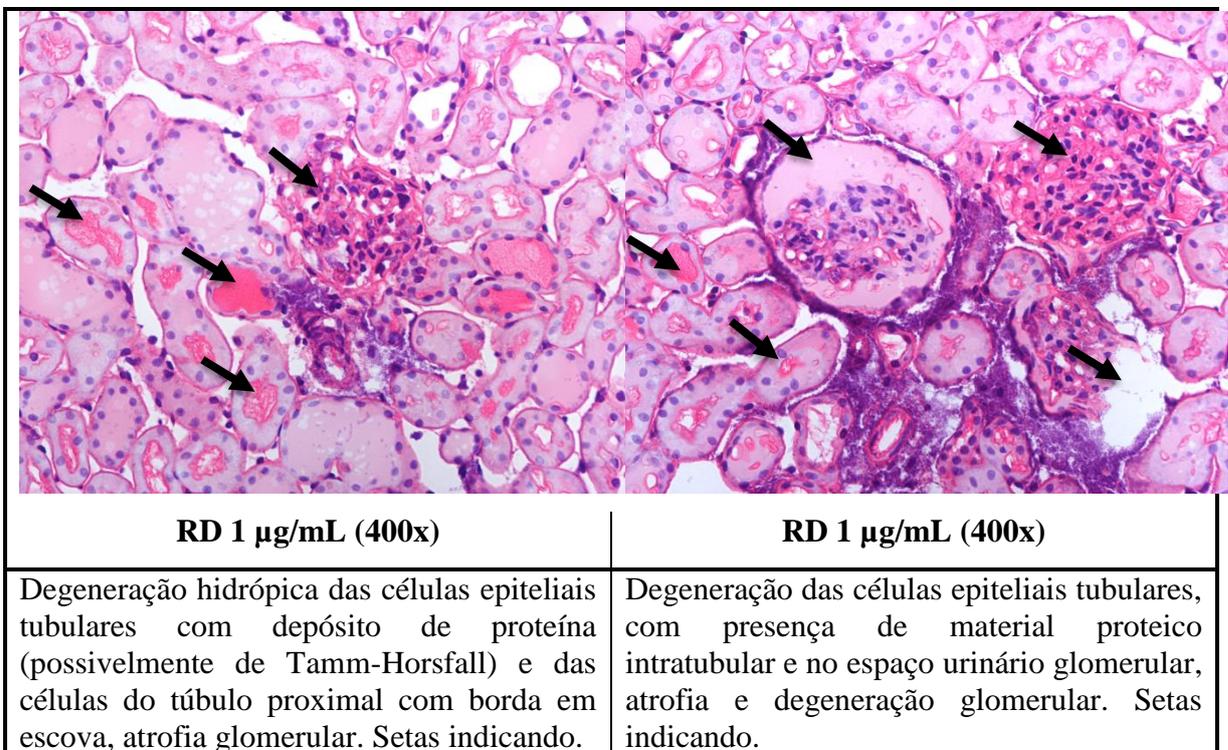
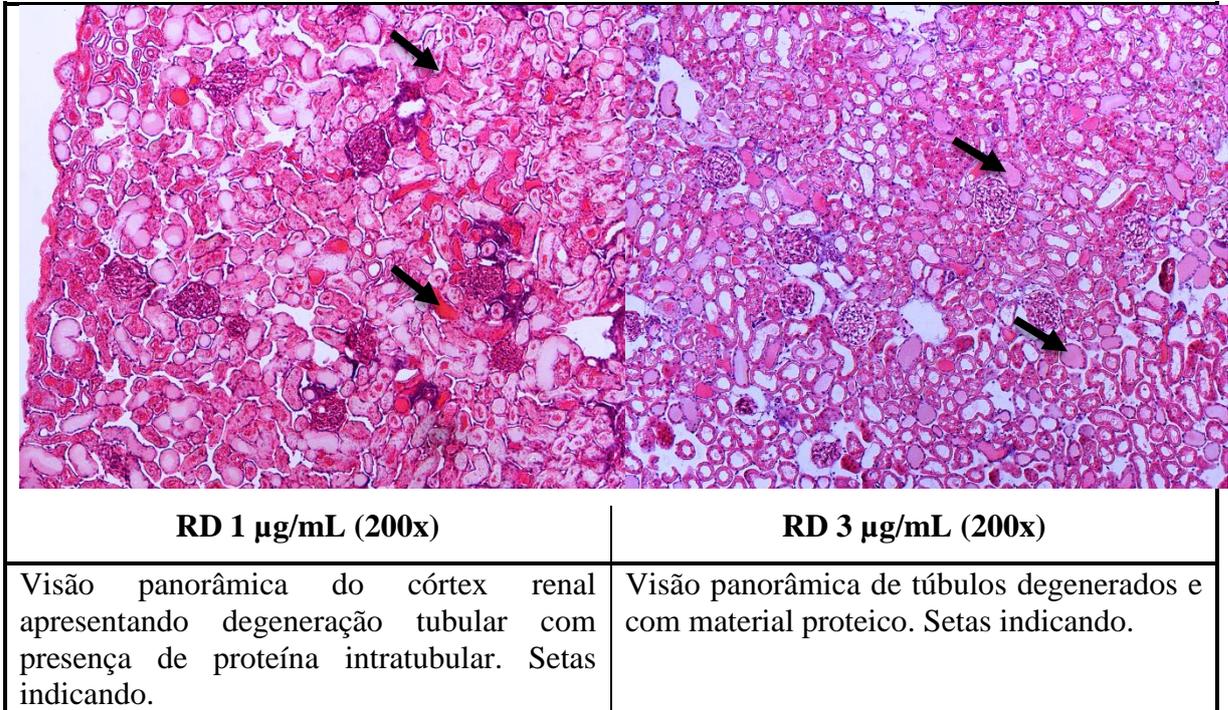
**Figura 21:** Fotomicrografias de rins de ratos perfundidos (RP) com solução de Krebs-Hanseleit modificada. Apresentando arquitetura renal normal. Hematoxilina-Eosina / 400x e 200x respectivamente. Microscópio Trinocular Nikon Eclipse Nis com Software Nis 4.0.

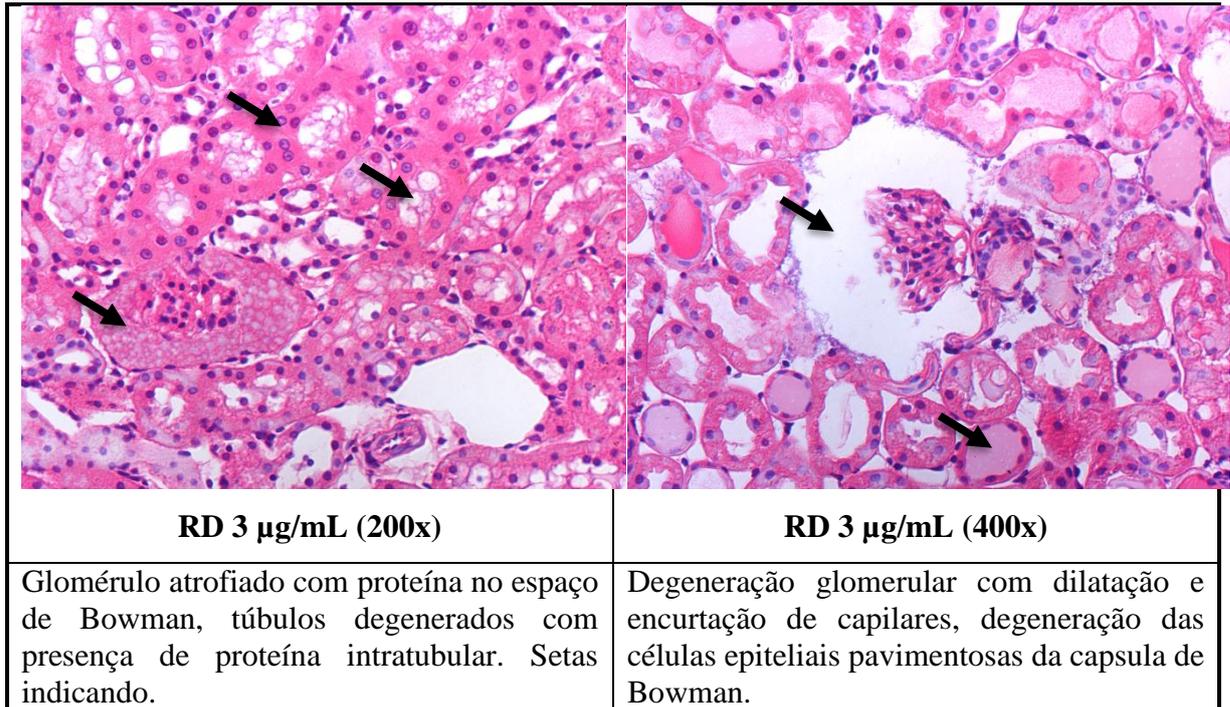


**Figura 22:** Fotomicrografias de rins esquerdos de ratos não perfundidos (RE). Apresentando arquitetura renal normal. Hematoxilina-Eosina/ 400x. Microscópio Trinocular Nikon Eclipse Nis com Software Nis 4.0.



**Figura 23:** Fotomicrografias de rins direitos de ratos perfundidos (RD) com vBalt (1 $\mu$ g/mL e 3  $\mu$ g/mL) demonstrando alterações renais. Hematoxilina-Eosina / 200x e 400x. Microscópio Trinocular Nikon Eclipse Nis com Software Nis 4.0.





Os rins direitos dos grupos tratados com vBalt em ambas concentrações, apresentaram presença de material proteico nos glomérulos e túbulos renais, presença de degeneração hidrópico vacuolar das células epiteliais tubulares, degeneração da cápsula de Bowman, tumefação das células epiteliais pavimentosas glomerulares, degeneração e atrofia glomerular bem como possível presença de proteína de Tamm Horsfall intratubular.

**Quadro 05** – Quadro resumo das alterações encontradas na perfusão renal com veneno total de *Bothrops alternatus* nos diferentes parâmetros renais e concentrações.

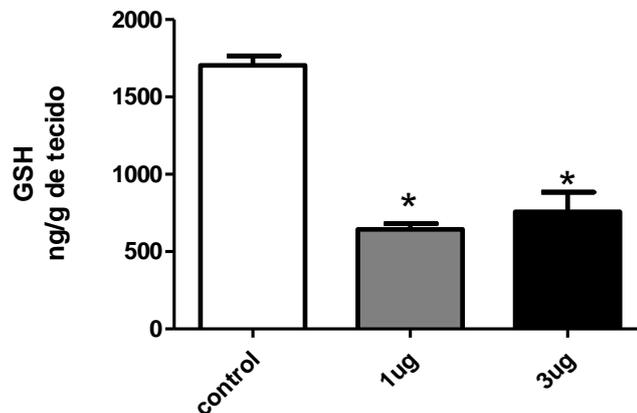
	PP	RVR	FU	RFG	%TNa <sup>+</sup>	%TpNa <sup>+</sup>	%TCl <sup>-</sup>	%TpCl <sup>-</sup>
<b>1 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	↓ 90, 120	↓ 90, 120	↓ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓120	↓ 60, 90, 120	↓120	↓60, 120
<b>3 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	↓ 60, 90, 120	↓ 90, 120	↓ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120	↓ 60, 90, 120

### 5.3 Perfil do Dano Oxidativo

#### 5.3.1 Avaliação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).

A figura 24 mostra que os valores de GSH no tecido renal dos dois grupos perfundidos com vBalt nas concentrações de 1µg/mL ( $643,8 \pm 36,31$  ng/g de tecido) e 3µg/mL ( $757,4 \pm 126,7$  ng/g de tecido) estavam significativamente menores quando comparados com os valores de GSH do grupo controle, rins esquerdos não perfundidos ( $1704 \pm 62,25$  ng/g de tecido) ( $P < 0,05$ ).

**Figura 24** – Valores de GSH em tecido de rins de ratos perfundidos com vBalt (1 e 3µg/mL).

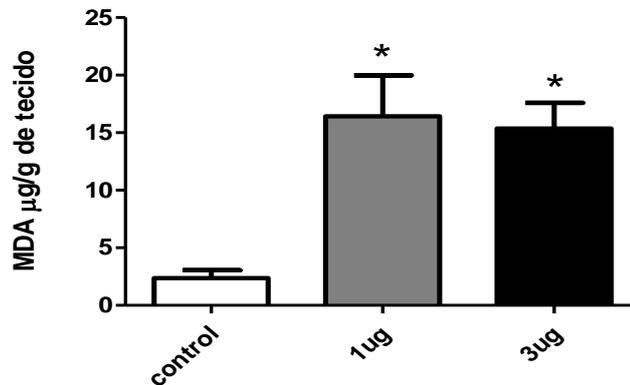


Os valores da figura representam média  $\pm$  E.P.M. Valores de GSH em tecido renal, após 90 min de perfusão de rim direito isolado com vBalt nas concentrações de 1 e 3µg/mL, grupo controle: rins esquerdos não perfundidos. Anova e teste T de Tukey \* $P < 0,05$ .

#### 5.3.2 Avaliação dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

A figura 25 mostra que os valores de MDA no tecido renal dos dois grupos perfundidos com vBalt nas concentrações de 1µg/mL ( $16,42 \pm 3,561$  µg/g de tecido) e 3µg/mL ( $15,37 \pm 2,237$  µg/g de tecido) estavam significativamente aumentados quando comparados com os valores de MDA do grupo controle, rins esquerdos não perfundidos ( $2,370 \pm 0,6874$  µg/g de tecido) ( $P < 0,05$ ).

**Figura 25** – Valores de MDA em tecido de rins de ratos perfundidos vBalt (1 e 3µg/mL).

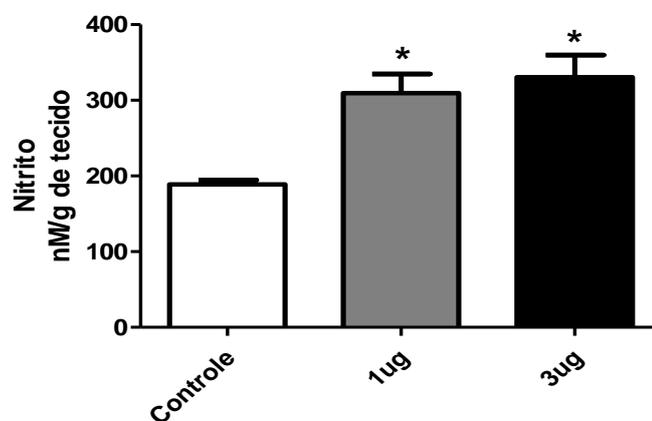


Os valores da figura representam média  $\pm$  E.P.M. Valores de MDA em tecido renal, após 90 min de perfusão de rim direito isolado com vBalt nas concentrações de 1 e 3µg/mL, grupo controle: rins esquerdos não perfundidos. Anova e teste T de Tukey \*P<0,05.

### 5.3.3 Avaliação dos Níveis de Nitrito.

A figura 26 mostra que os valores de nitrito no tecido renal dos dois grupos perfundidos com vBalt nas concentrações de 1µg/mL (309,4  $\pm$  25,29 nM/g de tecido) e 3µg/mL (330,7  $\pm$  29,19 nM/g de tecido) estavam significativamente aumentados quando comparados com os valores de nitrito do grupo controle, rins esquerdos não perfundidos (188,9  $\pm$  5,620 nM/g de tecido) (P < 0,05).

**Figura 26** – Valores de Nitrito em tecido de rins de ratos perfundidos com vBalt (1 e 3µg/mL).



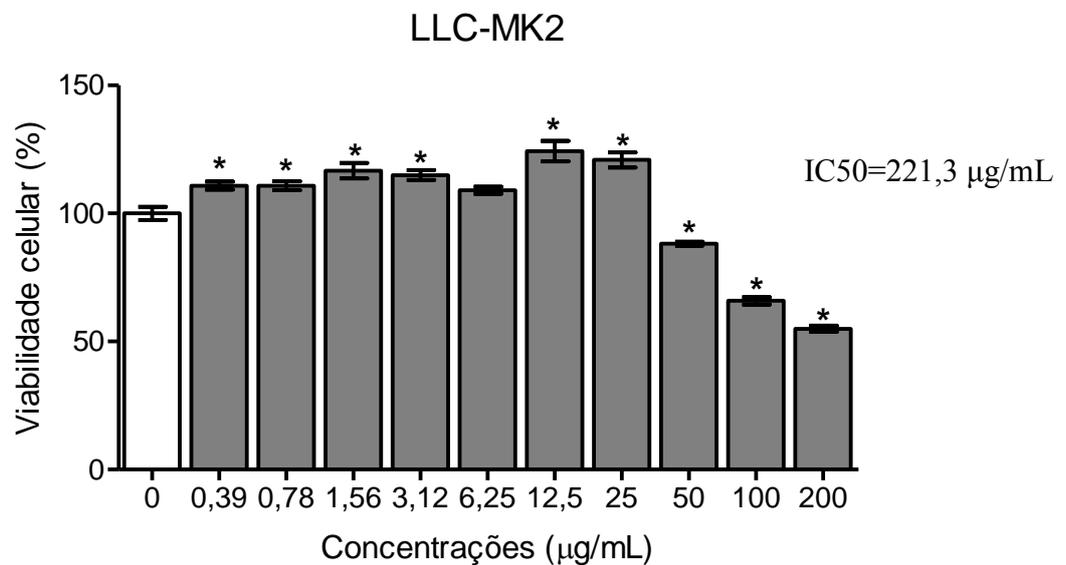
Os valores da figura representam média  $\pm$  E.P.M. Valores de Nitrito em tecido renal, após 90 min de perfusão de rim direito isolado com vBalt nas concentrações de 1 e 3µg/mL, grupo controle: rins esquerdos não perfundidos. Anova e teste T de Tukey \*P<0,05

## 5.4 Avaliação do Efeito do Veneno da Serpente *Bothrops alternatus* Sobre Células HK-2 e LLC-MK-2.

### 5.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular.

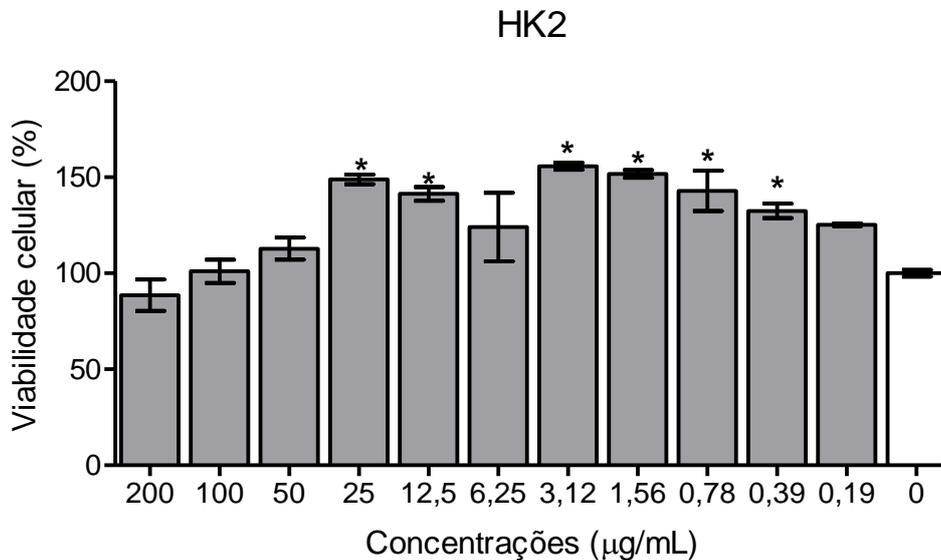
A citotoxicidade do veneno da *Bothrops alternatus* foi avaliada em células de túbulos proximais, humanos e de macaco (HK-2 e LLC-MK2) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que para a linhagem de células LLC-MK2 o veneno apresentou aumento da viabilidade celular nas concentrações mais baixas (até 25  $\mu\text{g/mL}$ ) e causou citotoxicidade em concentrações mais altas (a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$ ), apresentando uma  $\text{IC}_{50}=221,3 \mu\text{g/mL}$  (Figura 27). Quando se analisou as HK-2 houve aumento da viabilidade nas concentrações usadas com diminuição de viabilidade nas concentrações 50, 100 e 200, no entanto sem significância estatística (Figura 28).

**Figura 27:** Efeito do Veneno Total de *Bothrops alternatus* em diferentes concentrações sobre a viabilidade em células LLC-MK2.



Os dados são expressos por média  $\pm$  EPM do percentual de células viáveis. Considerando  $p < 0,05^*$ .

**Figura 28:** Efeito do Veneno Total de *Bothrops alternatus* em diferentes concentrações sobre a viabilidade de células HK-2.

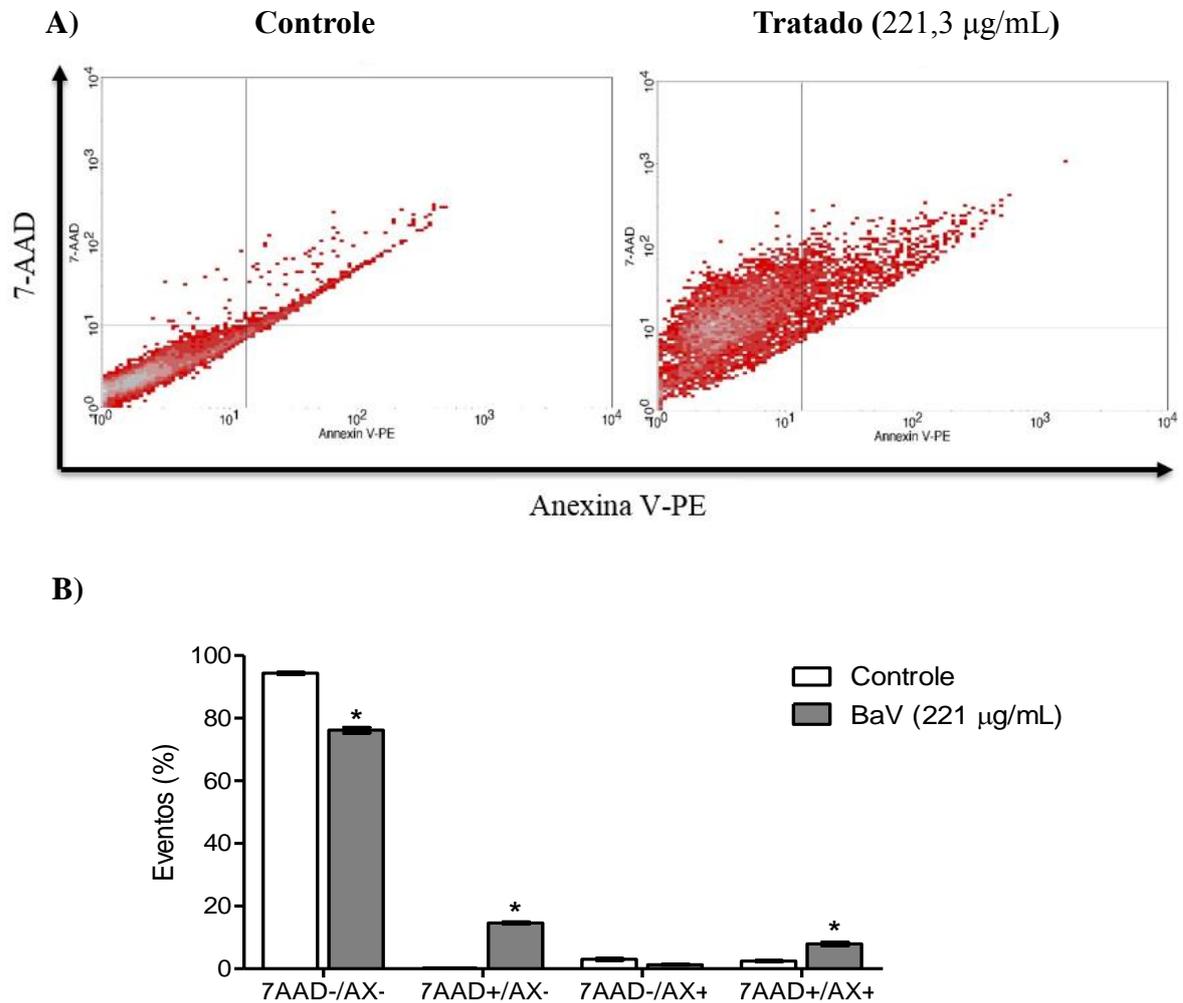


Os dados são expressos por média  $\pm$  EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Considerando  $p < 0,05^*$ .

#### 5.4.2 Avaliação do Tipo de Morte Celular Causado pelo Veneno da *Bothrops alternatus*.

No ensaio realizado com vBalt, os resultados encontrados indicaram a ocorrência de eventos necróticos e apoptóticos em fase tardia, conforme demonstrado a seguir. Na figura 29B, observou-se que a percentagem de células marcadas com 7-AAD foi predominante, evidenciando o processo de necrose na concentração de 221,3µg/mL, seguido pela dupla marcação com AX e 7-AAD, processo de apoptose secundária. A marcação por Anexina (que evidencia células em processo de apoptose) não foi significativa com relação ao controle. O processo de morte celular por necrose secundária (ou apoptose tardia) também foi observado, podendo representar evidências de um processo de morte celular por apoptose incompleto que culminou em necrose (Figura 29).

**Figura 29:** Avaliação do tipo de morte celular causada pelo veneno total de *Bothrops alternatus* sobre as células LLC-MK2.



(A) Gráficos de dispersão representativos do perfil de marcação simultânea de células LLC-MK2 com AnexinaV-PE (quadrante inferior direito das plotagens – início de apoptose), 7-AAD (quadrante superior esquerdo – início de necrose). No quadrante inferior esquerdo, estão representadas as células sem marcação (células que demonstram estar viáveis). No quadrante superior direito estão representadas as células com dupla marcação (início de apoptose secundária).

(B) Quantificação do tipo de morte celular (Apoptose/Necrose) utilizando marcação de fluorescência com Anexina V-PE (AX) e 7-AAD nas células LLC-MK2 expostas a uma única concentração do veneno da *Bothrops alternatus* por um período de 12h. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e os dados expressos como porcentagens de eventos±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA,  $p < 0,05$ .

\*BaV = veneno total da *Bothrops alternatus*.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, a administração do veneno total da *Bothrops alternatus* (1 e 3 µg/mL) no sistema de perfusão renal alterou os parâmetros hemodinâmicos e tubulares, causando redução na pressão de perfusão (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG). O percentual de transporte total de sódio (%TNa<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>) também foram reduzidos pela ação do veneno, assim como os percentuais de transporte proximal de sódio (%TpNa<sup>+</sup>) e cloreto (%TpCl<sup>-</sup>). Não foi observado alterações significativas nos percentuais de transporte total e proximal de potássio (%TK<sup>+</sup>) quando comparados ao controle.

Os resultados supracitados corroboraram os achados de efeitos de outros venenos em rim isolado, Monteiro e Fonteles (1990), Braga (2006), De Moraes *et al.*, (2013), Evangelista *et al.*, (2010) e Marinho *et al.*, (2015) estudando, respectivamente, o veneno das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops marajoensis* e *Bothropoides pauloensis*, nas mesmas condições experimentais, onde observaram uma queda nos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal; nos parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular; e nos parâmetros eletrolíticos relativos ao sódio e cloreto, sem alteração significativa no percentual de transporte tubular de potássio (alguns casos). Achados semelhantes também foram encontrados em estudos *in vivo*, Linard *et al.*, (2011), estudando as alterações renais (histológicas e funcionais) após o envenenamento experimental em ratos com veneno da espécie *Bothrops alternatus*, também observaram que houve um decréscimo na taxa de filtração glomerular após o envenenamento, em relação aos transportes de eletrólitos houve aumento da excreção de sódio e potássio, e redução da reabsorção proximal de sódio. Mello *et al.*, (2010), também no envenenamento *in vivo*, observaram oligúria 3h após o envenenamento.

Como neste experimento se utilizou o veneno total da *Bothrops alternatus*, e considerando que se trata de um complexo de diferentes substâncias bioativas, não podemos afirmar que o efeito observado na PP esteja associado a ação de uma fração em particular do veneno, mas podemos sugerir, com base na liberação de mediadores como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), interleucinas (IL): 1, 6 e 10, intérferon-gama (INF-γ) (CRUZ *et al.*, 2009) podem estar envolvidos com o processo de diminuição da PP. A IL-1β produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de prostaglandinas E2

(PGE<sub>2</sub>) (OLIVEIRA *et al.*, 2011), que atua como vasodilatador intrínseco através de ações sinérgicas com vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina, sendo as prostaglandinas importantes na manutenção do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular (RANG *et al.*, 2004). As prostaglandinas podem ainda ser liberadas através da ação da fração enzimática do tipo PLA<sub>2</sub> contida nos venenos botrópicos, que desempenham sua atividade catalítica e agem sobre substratos lipídicos, estando relacionadas à produção de derivados do ácido araquidônico (FERREIRA *et al.*, 2013), contribuindo assim para o aumento da resposta inflamatória local em acidentes ofídicos.

A bradicinina, conforme demonstrada por Guimarães *et al.*, (1986), causou diminuição na resistência vascular renal através da ativação do receptor B<sub>2</sub> em rim isolado de rato. A bradicinina é um peptídeo vasoativo gerado tanto no plasma como na parede vascular, pode ativar receptores do tipo B<sub>2</sub> estimulando a liberação de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular, a vasodilatação induzida tem sido atribuída a fatores de relaxamento derivados do endotélio, como o óxido nítrico (NO) (BAYDOUN *et al.*, 1991; WELCH *et al.*, 1991). Essa ação vasodilatadora, pode estar relacionado com efeito encontrado, de redução da PP e da RVR tanto para concentração de 1 µg/mL como na de 3 µg/mL. Algumas substâncias que aumentam a potência da bradicinina já foram isoladas dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedii* e *Bothrops jararacussu* (FERREIRA *et al.*, 1970, 1992, 1998).

Substâncias vasoativas como histamina, serotonina e fator de ativação plaquetária (PAF), podem ser liberados pelo rim isolado (PIROTZKY *et al.*, 1984). O PAF em doses baixas causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, elevadas doses induzem atividades espasmogênicas da musculatura lisa pela liberação de tromboxano A<sub>2</sub> e leucotrienos. Associado a outros fatores dependentes da ciclooxigenase, como prostaglandinas e tromboxanos, os leucotrienos promovem uma diminuição nos parâmetros fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, sem alteração na pressão de perfusão e transporte de íons (RANG *et al.*, 2004; MONTEIRO; FONTELES, 1999; BARRAVIERA; LOMONTE e TARKOWISKI, 1995).

Outro agente importante na vasodilatação é o óxido nítrico (NO), nos dois grupos de concentrações estudados (1 e 3 µg/mL) houve aumento de nitrito em relação ao controle, demonstrando assim que houve aumento na produção de NO, o que de fato contribui para a ação vasodilatadora refletida na diminuição da PP e RVR, implicando assim na consequente diminuição do RFG. O óxido nítrico tem como função diminuir a resistência vascular periférica renal, sua produção a nível basal atua no sentido de evitar a vasoconstrição excessiva dos rins,

permitindo uma boa excreção de sódio e água. Nos rins já foram isoladas duas isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a isoforma I (nNOS): na mácula densa e nas arteríolas glomerulares e a isoforma III (eNOS): nos ramos aferentes e eferentes, com maior concentração nas arteríolas eferentes (BACHMANN; MUNDEL, 1995; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Norões (2009) esclarece que o aumento da produção de NO em envenenamentos botrópicos pode estar associado ao aumento de citocinas, a ativação da NOS por essas moléculas geraria concentrações micromolares de NO.

Norões (2009) avaliou a participação do óxido nítrico no envenenamento experimental em ratos, utilizando o veneno de *Bothrops atrox*, e observou um aumento significativo na produção de nitrito, demonstrando que a concentração de NO encontrava-se elevada, quando utilizou o bloqueador inespecífico (L-NAME), houve uma diminuição na produção de  $\text{NO}_2^-$ , concluindo assim que o aumento de NO foi causado por substâncias biologicamente ativas do veneno da serpente que atuam na fisiologia vascular através das isoformas iNOS e/ou eNOS, uma vez que são ambas inibidas pelo L-NAME. Na perfusão renal, a diminuição nos parâmetros vasculares e hidroeletrólíticos, estaria sendo causado pelo aumento da produção de NO, sintetizado por NOS presentes no rim. Outra suposição é que essas enzimas estariam sendo induzidas por citocinas liberadas a partir de células renais lesadas.

Quando se analisou os percentuais de transportes dos eletrólitos, também se observou diminuição nos transportes totais de sódio ( $\% \text{TNa}^+$ ) e cloreto ( $\% \text{TCl}^-$ ) assim como os respectivos transportes proximais, não foi observado alterações significativas no percentual de transporte total e proximal de potássio ( $\% \text{TK}^+$ ) quando comparado ao controle. A diminuição nos transportes pode estar associada a lesão das células tubulares, já que os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são extremamente lesivos aos túbulos renais (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012), essa atividade geralmente está associada a ação proteolítica dos venenos que está diretamente ligada a seu potencial citotóxico e acaba por causar efeitos deletérios no epitélio tubular renal, induzindo a liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas, implicando em alterações nas funções renais e diminuição dos transportes de eletrólitos (GUTIERREZ e LOMONTE, 1995; CHAVES *et al.*, 2005).

Os fatores acima citados, podem está contribuindo para a diminuição/perda da função de transporte das células epiteliais tubulares renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos como sódio, cloreto e potássio observados nesse estudo (em ambas as concentrações). Outro agente importante é o NO, que além de participar como um agente

vasodilatador, também participa no controle de fluidos extracelulares e dos transportes de eletrólitos (RAIJ & BAYLIS, 1995; KONE & BAYLIS, 1997; BACHMANN; MUNDEL, 1995). A lesão a nível tubular, pode ser observada através da deposição de material proteico observado na análise histopatológica, possivelmente em decorrência da ação proteolítica do veneno, causando o acúmulo de proteínas liberadas do citoplasma das células lesadas, juntamente com resíduos citoplasmáticos, ou mesmo devido ao aumento da permeabilidade (possivelmente com o envolvimento do PAF e mediadores inflamatórios como histamina). A presença desse material proteico, pode estar obstruindo os túbulos e com isso diminuindo o processo de transporte hidroeletrólítico.

A análise histopatológica dos rins perfundidos com o vBalt demonstrou a presença de material proteico nos glomérulos e túbulos renais, presença de degeneração hidrópica vacuolar, degeneração da cápsula de Bowman, tumefação e degeneração de túbulos e glomérulos, podemos sugerir dessa forma que a insuficiência renal aguda se deve ao processo de citotoxicidade direta sobre epitélio renal, o modelo de rim isolado de rato, comprova de fato através da análise histológica o dano direto causado pela peçonha da espécie em estudo a qual mostrou lesões a nível de glomérulos e túbulos. Constatou-se também a possível presença da proteína de Tamm-Horsfall, produzida pelas células epiteliais do túbulo renal, especialmente da porção espessa do ramo ascendente da alça de Henle, essas células secretam tal proteína, por um processo associado a capacidade de reabsorver cloretos, sendo que qualquer injúria tubular aguda pode provocar uma maior formação dessa proteína (DOUGLAS, 2001). Todos esses achados justificam as alterações nos parâmetros funcionais e eletrolíticos, a deposição de material proteico nos glomérulos e túbulos podem dificultar a filtração e transportes, justificando as diminuições da PP, RFG e Transportes de eletrólitos, por exemplo.

Achados semelhantes foram mostrados por Linard *et al.*, (2011), que estudando o envenenamento *in vivo* em ratos, por *Bothrops alternatus*, observou histologicamente extensas alterações na arquitetura renal, incluindo a desorganização da borda em escova, inchaço tubular, dilatação dos capilares peritubulares, dilatação do espaço capsular de Bowman, deposição de colágeno em volta dos glomérulos e dos túbulos proximais que persistiram por até sete dias após o envenenamento. Mello *et al.*, (2010) também estudaram o envenenamento experimental por *Bothrops alterntaus* em ratos (0,8 mg/Kg i.v), avaliando os parâmetros cinéticos renais, viram que o veneno foi detectado nos glomérulos, cápsula de Bowman, túbulos proximais e distais, no córtex renal, epitélio das alças de Henle e dutos coletores e na medula renal, sendo

detectado em até 7 dias pós-envenenamento, mostrando assim a distribuição total do veneno nos estruturas renais, o que reflete até onde pode haver danos ao epitélio renal.

O dano citotóxico do epitélio tubular observado nesse estudo se deveu em parte a ação de EROs. A interação entre os radicais livres com os lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e demais componentes celulares danificou a estrutura e funcionalidade dos mesmos. Ao comprometerem a composição lipídica das membranas, causaram alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade, conseqüentemente, houve perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo celular, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (MELLO FILHO *et al.*, 1983; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Diante da elevada produção de radicais livres, entra em questão as defesas endógenas antioxidantes, a principal delas o GSH, peptídeo antioxidante presente em altas concentrações na matriz mitocondrial, seus baixos níveis podem estar diretamente relacionados com o aumento de EROs e peroxidação lipídica (LEITE, 2003).

Dessa forma, o nível de estresse oxidativo no tecido renal foi avaliado através da mensuração do malondialdeído (MDA) e da glutathiona reduzida (GSH), foi observado um aumento significativo do MDA e uma diminuição de GSH teciduais dos grupos perfundidos com vBalt. Os níveis elevados de MDA em ambas as concentrações evidencia elevada capacidade do veneno em causar peroxidação lipídica, mesmo frente a ação antioxidante da GSH, prejudicando assim as membranas celulares, isso de fato justifica a diminuição dos transportes hidroeletrólíticos, morte celular por apoptose/necrose e presença de material proteico no interior de túbulos e glomérulos.

Uma fração importante envolvida no processo de formação de EROs é a LAAO. Morais (2015) estudando a fração LAAO proveniente de *Bothrops leucurus*, observou um aumento das espécies reativas de oxigênio em células MDCK, ao remover o peróxido do meio, pela adição de catalase, verificou que aproximadamente 50% do efeito apoptótico foi abolido, sugerindo que o peróxido inicia um importante papel na indução de apoptose em células renais.

O estudo também objetivou investigar a viabilidade de células renais frente ao veneno de *B. alternatus*, para isso foi testado diferentes concentrações de veneno sobre células tubulares proximais renais LLC-MK2 (Macaco) e HK-2 (Humanas). Foi utilizado o ensaio de MTT, técnica utilizada para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular (MOSMAN *et al.*, 1993). Foi observada redução significativa da viabilidade apenas para a linhagem LLC-MK2, a partir das concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL (IC<sub>50</sub>= 221,3 µg/mL).

Resultados condizentes com os estudos de Teixeira-Cruz (2014) que observou diminuição da viabilidade celular em linhagens do tipo LLC-PK1, nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL com veneno total de *B. jararacussu*; e Nascimento *et al.*, (2007) que avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus*, através do ensaio com MTT em células epiteliais renais tubulares distal - MDCK e observou redução da viabilidade nas concentrações de 10 e 100 µg/mL. Outros estudos já foram realizados com veneno total de serpentes do gênero *Bothrops* em linhagens do tipo MDCK onde também houve diminuição da viabilidade celular: Collares-Buzato *et al.*, (2002) em estudo com a *Bothrops moojeni*, Moraes *et al.*, (2013), com a *Bothrops leucurus*, Mello *et al.*, (2014) com a *Bothropoides insulares* e Marinho *et al.*, (2015) com a *Bothropoides pauloensis*.

Quanto a linhagem HK-2 para a escala de concentrações utilizadas houve aumento da viabilidade celular nas baixas concentrações (25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 µg/mL), esse achado pode estar associado ao componente alternagina C (ALT-C), uma proteína do tipo desintegrina-like já isolada do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, que foi capaz de induzir a proliferação de células endoteliais vasculares humanas por regulação positiva da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), resultados demonstrados através de ensaios realizados *in vitro* (COMINETTI *et al.*, 2004; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005). A mesma fração, em baixas concentrações (1 e 10 ng) em ensaios *in vivo*, também foi responsável por induzir migração de células endoteliais e a formação de novos vasos (angiogênese), sendo classificada como proangiogênica; em concentrações mais altas esse efeito não foi observado (RAMOS *et al.*, 2007). No entanto, essa suposição é apenas um indício, dessa forma, mostra-se necessário novas investigações com utilização de outra metodologia no intuito de averiguar um possível aumento da população celular, comprovando assim que nessas linhagens submetidas a tais concentrações de vBalt, houve realmente proliferação celular.

Quando se investigou o tipo de morte celular foi observado o aparecimento de três populações celulares: células viáveis, não marcadas com 7-AAD ou Anexina V-PE; células necróticas, detectadas pela ligação específica do 7-AAD ao material nuclear e células marcadas duplamente, consideradas células que passaram pelo processo de indução apoptótica e, por não terem sido fagocitados, são lisados e entram em necrose secundária (ou apoptose tardia). Duas populações se destacaram significativamente, as células em estado necrótico e em apoptose secundária. No caso do nosso estudo, o resultado sugere que o principal tipo de morte induzida pelo vBalt na concentração utilizada (IC50), no tempo de 24 horas, para a linhagem LLC-MK2, foi por indução de necrose e apoptose tardia. Resultados condizentes com os achados de

Nascimento *et al.*, (2007) que utilizando a mesma metodologia, e também utilizando o veneno total de *Bothrops alternatus*, observou necrose nas concentrações de 10 e 100µg/mL em linhagens de células do tipo MDCK. Tais achados justificam a ação direta do veneno sobre os rins tanto na porção proximal (LLC-MK2), (neste estudo) quanto na porção distal (MDCK) (NASCIMENTO *et al.*, 2007) com consequente necrose tubular implicando numa menor capacidade de reabsorção de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, cujo principal local é o túbulo proximal (BRENNER E RECTOR, 2008).

Nascimento *et al.*, (2007) ainda acrescenta que o fato da peçonha de *B. alternatus* conter proteínas capazes de induzir apoptose, mas que este fenômeno não foi observado em seus experimentos, pode indicar que a ação potente e forte do veneno na produção de necrose mascarou qualquer efeito apoptótico. Resultados semelhantes foram encontrados por Marinho *et al.*, (2015) estudando o veneno total de *Bothropoides pauloensis* e De Moraes *et al.*, (2013) com a *B. leucurus*, também observaram uma diminuição da viabilidade celular para ambos os venenos, e morte celular por apoptose (*Bothropoides pauloensis*), e necrose com poucas células apoptóticas (*B. leucurus*).

O efeito necrótico encontrado, pode ser decorrente de componentes específicos do veneno, como metaloproteinases e desintegrinas que clivam os componentes da matriz extracelular interrompendo a adesão celular (KAMIGUTI, 1998), PLA2 que desestabilizam a membrana celular podendo gerar necrose (KINI, 2003). No veneno da espécie *B. alternatus* já foram identificadas e caracterizadas algumas dessas frações: L-aminoácido oxidase - LAAO (STABELI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2016), a PLA2 (NISENBOM *et al.*, 1986), metaloproteinase (baltergin) e desintegrinas (SOUZA *et al.*, 2000; MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003; COMINETTI *et al.*, 2003, 2004; GAY *et al.*, 2005, 2009; SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2005), sendo as metaloproteinases a fração majoritária desse veneno: 43,1% de metaloproteinases, 7,8% de PLA2, 6,9% de LAAOs e 2,6% de desintegrinas (ÖHLER *et al.*, 2010). Desta forma todos esses componentes podem estar envolvidos no efeito encontrado.

Alguns estudos demonstraram que a porção lisa do túbulo proximal (segmento S3) é mais vulnerável à lesão nefrotóxica que as células tubulares proximais no córtex (segmentos S1 e S2), nessa parte do néfron, as células tubulares, dependendo do grau da lesão, perdem a borda em escova e sofrem necrose celular (LIEBERTHAL *et al.*, 1997;1998; NEIVA, 2008). Sendo as células tubulares epiteliais os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos, a apoptose nessas células é a causa principal da perda de função renal podendo ser induzida por vários

estímulos, disfunção mitocondrial, distúrbio na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  e privação de energia e radicais livres (LIN *et al.*, 2014; SITPRIJA e SITPRIJA, 2012) sendo que a exposição à grande quantidade de EROs induz a morte celular por necrose (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

De acordo com Sitiprija (2012), os parâmetros fisiológicos obtidos em estudos com perfusão de rim isolado em ratos variaram e podem diferir daqueles no envenenamento animal, visto que os efeitos hemodinâmicos das toxinas no rim isolado apresentaram apenas o efeito vascular renal excluindo as interferências que ocorreriam nas metodologias *in vivo*, causadas por outros fatores endógenos do animal em estudo, que afetariam de outra maneira o rim (MARINHO, 2013). Mesmo considerando esses fatores o estudo aqui realizado utilizando o modelo de rim isolado mostra alterações em todos os parâmetros observados, assim como nas demais análises e no cultivo celular, evidenciando o caráter nefrotóxico direto do veneno da serpente *Bothrops alternatus*.

## 7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que o veneno total de *Bothrops alternatus* foi capaz de causar alterações nos parâmetros hemodinâmicos renais no modelo de perfusão de rim isolado de rato, para as duas concentrações de 1 e 3 µg/mL, diminuindo a pressão de perfusão renal, ritmo de filtração glomerular, resistência vascular renal e fluxo urinário, os parâmetros hidroeletrólíticos: percentual de transporte total e proximal de sódio e cloreto, também diminuíram.

A análise histopatológica mostrou alterações em toda a arquitetura renal, apresentando presença de material proteico nos glomérulos e túbulos renais, degeneração hidrópico vacuolar, degeneração da cápsula de Bowman, tumefação e degeneração de túbulos e glomérulos com possível presença da proteína de Tamm-Horsfall intratubular.

Das duas linhagens celulares em estudo (LLC-MK2 e HK-2) o veneno total de *Bothrops alternatus* reduziu a viabilidade apenas da linhagem LLC-MK2 em altas concentrações, em baixas concentrações aumentou a viabilidade celular para ambas as linhagens estudadas, podendo ser um indício de que em baixas concentrações esse veneno, ou fração dele, induz proliferação celular.

Todos esses efeitos observados no rim isolado podem estar associados com a perda da função das células tubulares, já que através dos ensaios de cultivo celular o vBalt induziu morte por necrose nas células tubulares proximais renais da linhagem LLC-MK2, o aumento nos níveis de MDA e diminuição de GSH mostra que parte desses danos se deve a ação de EROs causando peroxidação lipídica acarretando danos a membrana celular, sendo este fator importante na causa de morte celular observada.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo estimativas, serpentes do gênero *Bothrops* injetam em torno de 50 mg de veneno por picada, considerando que no túbulo proximal a concentração de veneno seja 10 a 20 vezes maiores que no plasma, dada a função concentradora do rim, é possível que este alcance mais de 100 µg/mL localmente (DE CASTRO *et al.*, 2004). Considerando o tempo de duração do experimento de perfusão como sendo de duas horas, e as concentrações utilizadas de 1 e 3µg/mL e da alteração de todos os parâmetros, o experimento consegue ser claro e traduzir as condições para um acidente real, pelo menos nas alterações condizentes com a ação direta do veneno sobre o rim.

Esses resultados ajudarão a esclarecer melhor o mecanismo de nefrotoxicidade e alterações hemodinâmicas induzidas pelo envenenamento por *Bothrops alternatus*. Estudos futuros ainda serão necessários, na tentativa de elucidar mais detalhadamente se existe uma ou mais frações específicas do veneno que estaria envolvida no mecanismo das lesões renais e nos efeitos aqui observados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA DE PÉREZ, O.; P. KOSCINCZUK; P. TEIBLER; M. SÁNCHEZ NEGRETTE; R. RUIZ, S. MARUÑAK; G. BOGARRÍN. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. **Toxicon**. v. 36, n.8, p.1165-1172. 1998.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**. v.40, n.4, p.335-393, 2002.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; JUNIOR, G. B. S.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópicos e crotálicos. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo; v. 28, n. 04 26: 220-227. 1986.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, O. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
- ANTUNES, C.T.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C.; SAIKI, M.; SANTORO, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 56, p. 1443–1458, 2010.
- ARAKI, S., MASUDA, S., MAEDA, H., YING, M.J., HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-incing protein 1. **Toxicon**, v. 40, p. 535-542, 2002.
- BACHMANN, S., MUNDEL, P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. **American J Kidney Dis**. v.24, p. 112-129, 1994.
- BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. v.40, n.10, p.1427-35, 2002.
- BAYDOUN, A. R.; WOODWARD, B. Effects of bradykinin in the rat isolated perfused heart: role of kinin receptors and endothelium-derived relaxiing factors. **Br. J. Pharmacol.** n.103, p.1829-1833, 1991.

BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWISKI, A. A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops spp.* and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**. v.1, p.11-22, 1995.

BAHLMAN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.

BAUAB, F.A., JUNQUEIRA, G.R., CORRADINI, M.C., SILVEIRA, P.V., NISHIOKA, A.S. Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. **Trop. Med. Parasitol.** v.45, p.243–245. 1994.

**Bérnils, R. S. e H. C. Costa** (org.). 2016. Brazilian reptiles – List of species. Version 2012.2. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 30 de Maio de 2016. [www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)

BERNADONI, J. L. *et al.* Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v.9, n. 10, 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOCHNER, R; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, n.1, p.07-16. 2003.

BOWMAN, R. H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 7, p. 1604-1612, 1970.

BOWMAN, R. H.; MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O and electrolyte in perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 2, p. 426-430, 1974.

BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) Snakes a natural history. **New York: Sterling Publishing Co.**, p.194-209, 1997

BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno de *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; FAGUNDES, F. H.; FONTELES, M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A2 isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 181-190. 2008a.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of L-

amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 199-207, 2008b.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O, MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859-867, 2006.

BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília n. 220, p. 23491, 12 nov. 1996 seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde.

Disponível em:

<[http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13707&Itemid=761](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=13707&Itemid=761)> Acesso em 30 de junho de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília, 2001.

BRENNER, B. M. & RECTOR, F. C. Brenner and Rector's. **The Kidney**. 8a. Ed. Editora Saunders, 2008.

BORGES-MARTINS, M.; ALVES, M.L.M.; ARAUJO, M.L. de; OLIVEIRA, R.B. de & ANÉS, A.C. 2007. Répteis p. 292-315. *In*: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 385 p.

<Disponível em>

Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS  
<http://www.ufrgs.br/herpetologia/R%C3%A9pteis/Rhinocerocephis%20alternatus.htm>

CASTRO, I.; BURDMANN, E.A.; SEGURO, A.C.; YU, L.; *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**. v. 43, n.07, p. 833- 839. 2004.

CASTRO, H.C.; D.L.S. DUTRA; A.L. OLIVEIRA-CARVALHO & R.B. ZINGALI. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**. v. 36, n. 12, p. 1903-1912. 1998.

CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. 2004. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler, 1824. *In*: CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. (eds.). **The venomous reptiles of the western hemisphere**, New York, Cornell University Press. p. 334-409.

CALVETE, J. J.; BORGES, A.; SEGURO, A.; FLORES-DÍAZ, M; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J. G; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a

medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics**, v.72, p.227-40, 2009.

CALVETE, J. J.; BORGES, A.; SEGURO, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J. G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics**. v.72, p.227-40, 2009.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B, ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURAO R. H, FURTADO, M. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteome Research**, v. 74, n. 4, p. 510-527, 2011.

CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. **J. Nat. Toxins** v. 20, n. 5, p. 574-577. 1999.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERRES, J. M. Role of TNF -  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p.171-178, 2005.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29: 1279-1303, 1991.

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

COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.; RAMOS, O.H.; FOX, J.W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem**. Apr 30; v. 279, n. 18, p. 18247-55. 2004.

COLLARES-BUZATO, C.B.; LE SUEUR, L.P.; CRUZ- HOFLING. M.A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in 82 Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 181, p. 124-132, 2002.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 226, p. 103-121, 1977.

COSTA, J DE O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; DE OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**. v.55, n.7, p.1365-77. 2010.

COSER, A. *et al.* Acidentes ofídicos nas mesorregiões do estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, n. 1, p. 14-21, 2015.

CRUZ, L. S, VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in developing world. **Ethnicity and Disease**, v. 19, n. 1, p. 42- 46, 2009.

CRUZ-HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ÁBREU, A. C. F. Histopathological changes in avain kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa) venom and phospholipase A2-containing fraction. **Histology and Histopathology**, v.16, p.185-195, 2001).

CRUZ, A.H., GARCIA-JIMENEZ, S., MENDONZA, R.Z., PETRICEVICH, V.L. Proandcanti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**. V. 2008. 2008.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 02, p. 21-26, 2012.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**. v. 10, n. 04, p.742-780. 1997.

DA SILVA, N. M. V., *et al.* Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**. v. 50, p. 196–205, 2007.

DE CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 833-839, 2004.

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. 2013.

DE PAULA, F.F. *et al.* Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**. v. 12, p. 74-83, 2014.

DE TONI, L.G *et al.* Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n.1, p. 199-207, 2015.

DENNIS, E.A., *et al.* Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem. Rev.** v. 111, p. 6130e6185. 2011.

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

DOUGLAS, C.R. **Patofisiologia de Sistemas Renal**. ROBE Editorial. 615 pgs. São Paulo. 2001.

DOS SANTOS, A.L *et al.* Estudo retrospectivo dos acidentes por serpentes atendidos no Hospital Geral de Palmas-TO, no período de 2010 e 2011. **DESAFIOS: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 1, n. 1, p. 227-246, 2015.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

EVANGELISTA, J. S. A. M. **Estudo de Efeitos Vasculares, Renais e Citotoxicidade do Veneno da Serpente *Crotalus durissus cascavella***. 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

EVANGELISTA, J. S. A. M. *et al.* Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 737-744, 2008.

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

FERREIRA, B.F. *et al.* Molecular Cloning and Pharmacological Properties of an Acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. **Toxins**, v.5, p.2403-2419, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin potentiating peptide (Peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 33-40, 1992.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDÁ, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein Chem.**, v. 17, p. 285-289, 1998.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, Sept. 2000.

FONTELES, M. C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal.** 1980. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C. *et al.* Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 235-246, 1983.

FONTELES, M. C. *et al.* Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 191-197, 1998.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmac**, v.20, p.1549-1556, 1971.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Orgs.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1ª Ed. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 3, p. 13-32.

FRESHENEY, R. I. **Culture of Animal Cells:** a manual of basic techniques. 6. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. 796 p.

FURTADO, M.F.D.; G.M.D.D. COLLETO & W. DIAS DA SILVA. 1991a. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, n.2, p.149-159. 1991.

FURTADO, M.F.D.; M. MARUYAMA; A.S. KAMIGUTI & L.C. ANTONIO. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**. v. 29, n. 2. p. 219-226. 1991b.

GAY, C.C., LEIVA, L.C., MARUNAK, S., TEIBLER, P., ACOSTA DE PEÉREZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**. v.46, p.546–554. 2005.

GAY, C. C., MARUÑAK, S. L., TEIBLER, P., RUIZ, R., ACOSTA DE PÉREZ O. C., LEIVA, L. C. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. **Toxicon**. v.53, p.53-59. 2009.

GARCIA, L.M; LEWIS, L.J. Therapeutic potencial of venom peptides. **Nature**, v.2, p. 790-802. 2003.

GHAZARYAN, N.A. *et al.* Phospholipases A2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, p. 463-82, 2015.

GREEN, L.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, abr. 1981.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**. v.48, n.1, p.44-54, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GUIMARÃES, J. A.; VIEIRA, M. A. R.; CAMARGO, M. J. F.; MAACK, T. Renal vasoconstrictive effect of kinins mediated by B1-kinin receptors. **Eur. J. Pharmacol.** n. 130, p. 177-185, 1986.

GUTIBRREZ, J. M., *et al.* Comparative study of the edema-forming activity of costa rican snake venoms and Its neutralization by a polyvalent antivenom. **Camp. Biochem. Physiol.** V.85, p. 171-175, 1986.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v.33, p. 1405-1474, 1995.

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

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DIAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009b.

GUTIERREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Bol. Mal. Salud Amb.** Maracay, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

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

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. New York: **Oxford University Press**, 2007.

HAMILTON, R. L. *et al.* Simple and inexpensive membrane “lung” for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 667-668,1974.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid. Res.** v. 9, n. 5, p. 667-668, 1968.

HARRISON, R.A., HARGREAVES, A., WAGSTAFF, S.C., FARAGHER, B., LALLOO, D.G. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.12, p. 569, 2009.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.1, p.130-41, 2005.

HAVT, A.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF blockers. **Toxicon**, 39, pp. 1841–1846, 2001.

JORGE, R.J.B *et al.* Differences between renal effects of venom from two *Bothrops jararaca* populations from southeastern and southern Brazil. **Toxicon**. v. 125, p. 84-90. 2017.

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of câncer cells: A multiparameter approach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-344, 2005.

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. 2015.

JORGE, R.J.B. **Venômica e Antivenômica de *Bothrops erythromelas*: estudo da variação intraespecífica**. 2015. 130f. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – PPGF, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320 (Pt 2), p. 635-641, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, n. 7, p. 853- 862, 1998.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDERNABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUÑES, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death Differ**, v.16, n.1, p.3-11, 2009.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, n.26, p.239-257, 1972.

KONE, B.C., BAYLIS, C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. **Am J Physiol**. v.272, p.561-578, 1997.

KOVACIC. P., SOMANATHAN, R. Unifying mechanism for eyetoxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidantbenefits, cell signaling and cell membranes. **Res. Cell Membr. Free Radic**. vol.2, p.56–69, 2008.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KRYSKO, D. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis**. v.10, p.1709-26, 2006.

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**. V.44, n.3, p.205-21, 2008.

LEE, M. L. *et al.* King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. **Int J Med Sci**, v. 6, p. 593-60, 2014.

LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J. P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake 86 venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **J Leukoc Biol**. v. 90, n. 1, p. 155-166, 2011.

LEMONS J.C.; ALMEIDA T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA A.A.; SIMOES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos noticiados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev Bras Epidemiol**; v. 12, p. 50-59, 2009.

LIEBERTHAL, W.; KOH, J.S.; LEVINE, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. **Semin Nephrol**. v.18, n.5, p.505-18. 1998.

LIEBERTHAL W. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. **Kidney Int**. v. 52, n.4, p.1102-15. 1997

LEITE, L.C.C.; M.F.D. FURTADO; T.C. CORREA & I. RAW. Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-exchange chromatography. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 102 n.3, p.515-520. 1992.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v.2, p.1-14, 2003.

LIN, M.; LI, L.; ZHANG, Y.; ZHENG, L.; XU, M.; RONG, R.; ZHU, T. Baicalin ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in HK-2 cells through the inhibition of ER stress and the activation of Nrf2 signaling. **Int J Mol Sci**, v. 7, p. 12507-12522, 2014.

LINARD, A *et al.* Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1810, n.09, p. 895–906. 2011.

LIMA, D.B. **Potencial antimicrobiano e antiparasitário do veneno da *Dinoponera quadriceps***. 88fls (Dissertação) Mestrado. 2014. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará. 2014.

LIMA, J. S. *et al.* Perfil dos acidentes ofídicos no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. Uberaba, v. 42, n.5, p. 561-564, 2009.

- LIMA A. A. M.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. **Pharmacol. Toxicol.** v. 70, p. 163-167, 1992.
- LOMONTE, B.; J.M. GITIÉRREZ; M.F.D. FURTADO; R. OTERO; J.P. ROSSO; O. VARGAS; E. CARMONA & M.E. ROVIRA. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon.** v.28, n.10, p. 1137-1146. 1990.
- LÖBELL, C. E. **De conditionibus, quibus secretiones in glandulis perficiuntur.** Dissertatio Inauguralis Marburg. 1849. 37 p.
- MAMEDE, C.C.; DE QUEIROZ, M.R.; FONSECA, K.C.; DE MORAIS, N.C.; FILHO, S.A.; BELETTI, M.E.; STANZIOLA, L.; DE OLIVEIRA, F. Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Protein Pept Lett.** v. 20, n.2, p. 192-9. 2013.
- MARINHO *et al.* *Bothropoides pauloensis* venom effects on isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelial cells. **Toxicon.** v.108, p.126 e133. 2015.
- MARINHO, A.D. **Efeitos renais e mecanismos de morte celular promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.** 101f. (Dissertação de Mestrado) PPGF – Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.
- MACKESSY, S.P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, 2006.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPAVA-STITZER, S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.
- MELO, M. L. *et al.* Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 61, p. 775–784, 2008.
- MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J.** v.218, p. 273-5. 1983.
- MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO H. D.; FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STARUCH, M. A.; FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N, CALILELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; SILVA A. J. M.; COSTA, P. R. R. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.

MELLO, C.P *et al.* *Bothropoides insularis* venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon.**, n. 88 p.107e114 .2014.

MELLO, S.M.; LINARDI, A.; RENNÓ, A.L.; TARSITANO, C.A.; PEREIRA, E.M.; HYSLOP, S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon.** v.55, n.2-3, p.470-80. 2010.

MORA, R., VALVERDE, B., DIAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, p.651-660, 2005.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; D.F. CARDOSO & M.M. TANIZAKI. Differences in distribution on myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v.28, n.11, p. 1293-1301. 1990a.

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

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da ciclooxigenase no rim perfundido de rato.** 1990. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

MORAIS, I.C.O. **Estudo dos efeitos renais e mecanismo de morte celular induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus*.** 2011. 108 f (Dissertação) – PPGF - Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza, 2011.

MORAIS, I.C.O. **Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração l-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*.** 2015. 96 f (Tese) – PPGF - Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza, 2015.

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

MORAIS, I.C.O *et al.*. L-Aminoacid Oxidase from *Bothrops leucurus* Venom Induces Nephrotoxicity via apoptosis and Necrosis. **Plos One.** July 20. V.10, n.07. 2015

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell. Biol.** v.85, p. 591-605. 2007.

NAHAS, L.; A.S. KAMIGUTI & A.R. BARROS. Trombin-like and Factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Trombosis Haemostasis.** v.41, p.314-328. 1979.

NAUMANN, G. B. *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an lamino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1810, p. 683-694, 2011.

NEIVA, L.B.M. **Toxicidade da polimixina b em células Ilc-pk1 e a enzima heme oxigenase-1.** (2008) - 70fls. Tese (Doutorado) - Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo .2008

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

NISENBOM, H.E.; J.C. PERAZZO; A.J. MONSERRAT & J.C. VIDAL. Contribution of Phospholipase A2 to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. **Toxicon**, London, v.24, n. 8, p.807-817. 1986.

NIZET, A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. **Kidney Int.**, v. 7, p. 1-11, 1975.

ÖHLER, M. GEORGIEVA, M. SEIFERT, J. VON BERGEN, M. ARNI, R.K. GENOV, C. BETZEL, C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities **J. Proteome Res.** v.9, p. 2422–2437. 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v.95, n.2, p.351–8, jun. 1979.

OLIVEIRA, J.C., DE OCA, H.M., DUARTE, M.M., DINIZ, C.R., AND FORTESDIAS, C.L. Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. **Toxicon**, v.40. p.321–325. 2002.

OLIVEIRA, C. M. B. D., SAKATA, R. K., ISSY, A. M., GEROLA, L. R., SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Rev Bras Anesthesiol**; v.61, n.2, p. 255-265. 2011.

ORRENIUS, S., GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, p. 72-81, 2015.

PAGLIUSO, R.G., GOLONI-BERTOLLO, E.M., ABBUD FILHO, M., PAVARINO BERTELLI, E.C. Estresse oxidativo e Disfunção Crônica do Enxerto: Renal Oxidative stress and Renal Chronic Allograft Dysfunction. **Arq. Ciênc. Saúde.** v.13, n.4, p.223- 227, 2006.

PEGG E. D. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. **Cryobiology**, v. 8, p. 431-440, 1971.

PINHO, F.M, YU, L. BURDMANN, E.A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. **Semin. Nephrol**, 28: 354-262. 2008.

PINHO, F. M. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.** v.22, n.3, p.162- 168, 2000.

PIROTZKY, E.; BIDAULT, J.; BURTIN, C.; GLUBERY, M. C.; BENVISTE, J. Release of platelet- activating factor, slow-reacting substance vasoactives, amines from isolated rat kidney. **Kidney int**, v. 25, p. 404-410, 1984.

PONCE-SOTO, L.A.; BARROS, J.C.; MARANGONI, S.; HERNANDEZ, S.; DAL BELO, C.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA2 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v.150, n.2, p.291-7. 2009.

QUEIROZ, L.S. & C.A. PETTA. 1984. Histopatological changes caused by venom of Urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 26, n.5, p. 247-253. 1984.

RAIJ, L., BAYLIS, C. Glomerular actions of nitric oxide. **Kidney Int.** v.48, p. 20-32, 1995.

RAMOS, O.H.P.; TERRUGGI, C.H.B.; RIBEIRO, J.U.; COMINETTI, M.R.; FIGUEIREDO C.C.; BÉRARD, M.; CREPIN, M.; VERO NICA MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Modulation of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 461, p. 1-6. 2007.

RANG, H.P; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia.** 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier editora LTDA, 2004.

RANG, W. Q.; DU, Y.H.; HU, C.P.; YE, F.; XU, K.P.; PENG, J.; DENG, H.W.; LI, Y.J. Protective effects of evodiamine on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Planta Med.** Dec; v.70, n.12, p.1140-3. 2004.

RIBEIRO, P.H; ZULIANI, J.P; FERNANDES, C.F; CALDERON, L.A; STÁBELI, R.G; NOMIZO, A; SOARES, A.M. Mechanism of the cytotoxic effect of l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Int J Biol Macromol.** v.92, p. 329-337. 2016.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES-DE-CAMPOS, V. A. F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo: avaliação de 43 casos,1988/93. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.44, n.4, p.312-318, 1998.

ROCHA, M.M. T. da; FURTADO, M. de F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 383-393, June 2005.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.

SAID, M. The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Fundamental & clinical pharmacology**, v.25, p.708-16, 2011.

SANCHEZ, E.F.; T.V. FREITAS; D.L. FERREIRA-ALVES; D.T. VELARDE; M.R. DINIZ; M.N. CORDEIRO; G. AGOSTINI-COTTA & C.R. DINIZ. 1992. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon.** v.30, n.1, p. 95-103. 1992.

SANTOS-COSTA, M.C.; A.B. OUTERAL; F.M. D'AGOSTINI & L.H. CAPPELLARI. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoológica**, Porto Alegre. v.14, n.1, p. 89-93, 2001.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and medicine**. v.1, n.30(11), p.1191-212. 2001.

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

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz J Med Biol Res**. Ribeirão Preto, v. 38, n. 10, p. 1505-1511, Oct. 2005.

SETÚBAL, S.S. PONTES, A.S. FURTADO, J.L. XAVIER, C.V. SILVA, F.L. KAYANO, A.M. IZIDORO, L.F. SOARES, A.M. CALDERON, L.A. STÁBELI, R.G. ZULIANI, J.P. Action of two phospholipases A2 purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. **Biochemistry (Mosc)**. v.78, n.2, p.194-203. 2013.

SOUSA, D. F. **Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi***. 2010. 151 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SOUZA, D.H.F.; M.R.C. IEMMA; L.L. FERREIRA; J.P. FARIA; M.L.V. OLIVA; R.B. ZINGALI; S. NIEWIAROWSKI; H.S. SELISTRE-DE-ARAÚJO. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease Alternagin inhibits  $\alpha 2\beta 1$  integrin mediated cell adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v.384, n.2, p.341-350. 2000.

SOUZA, D.G. *et al.* Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v.134, n.5, p.985-994, 2001.

SOUZA, F.C. M. **Efeito renal do veneno da *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo Fator antibotrópico do *Didelphis marsupialis***. 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SLOVITER, R. S. Apoptosis: a guide for the perplexed. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, p.19-24, 2002.

SMOLKA, M.B.; S. MARANGONI; B. OLIVEIRA & J.C. NOVELLO. 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**. v.36, n.7, p. 1059-1063. 1998.

SILVEIRA, J.A.M. **Efeitos renais e alterações morfológicas causados pelo peptídeo natriurético sintético do veneno de *Crotalus durissus cascavella***. 2015. 90f (Dissertação) – PPGF - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará – UFC, 2015.

SINAN/MS – Sistema Nacional de Agravos de Notificação / Ministério da Saúde.  
Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> acesso em 30 de junho de 2016.

SITIPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nefrology** v.11, p. 442-448, 2006.

SITIPRIJA, V.; SITIPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v.60, p.943-953, 2012.

STÁBELI, R.G. MARCUSSI, S. CARLOS, G.B. PIETRO, R.C. SELISTRE DE ARAUJO, H.S. OLIVEIRA, E.B. GIGLIO, J.R. SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Méd. Chem.** v.12, p.2881–2886. 2004.

STÁBELI, R. G, *et al.* Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 41, p. 132–140, 2007.

TAN, N.H.; FUNG, S.Y.; Snake venom L-amino acid oxidase. In: **Mackessy, S. (Ed.), Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. pp. 219-232. 2009.

TEIXEIRA, C., CURY, Y., MOREIRA, V., PICOLO, G. CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.54, p.67-76, 2009.

TEIXEIRA-CRUZ, J.M. **Estudo do efeito citotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* em células tubulares renais da linhagem LLC-PK1 e antagonismo pela heparina**. 77fl. 2014. Dissertação (mestrado) – UFRJ / ICB / Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

TIN-NU-SWE, TIN-TUN, MYINT-LWIN, THEIN-THAN, TUN-PE, J.I.S. ROBERTSON, B.J. LECKIE, R.E. PHILLIPS, D.A. WARRELL. Renal ischaemia, transient glomerular leak and acute renal tubular damage in patients envenomed by Russell's viper (*Daboia russelii siamensis*) in Myanmar. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.87, pp. 678–681. 1993.

Uetz, P. & Jirí Hošek (eds.). The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed May 30, 2016.

VALÉRIO, A.A.; CORRADINI, A.C.; PANUNTO, P.C.; MELLO, S.M.; HYSLOP, S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. **J Protein Chem.** v. 21, n.8, p.495-503. 2002.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; FRANÇA, J.B.; MANFREDINI, V. BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo. **Química Nova**. v.30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VITORINO-CARDOSO, A. F.; PEREIRA RAMOS, O. H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modelling. **Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.** v.144, p.334–342. 2006.

WANG, W. Renal potassium channels: recent developments. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v. 13, p. 549-555, 2004.

WALLACH, VAN; KENNETH L. WILLIAMS, JEFF BOUNDY 2014. **Snakes of the World: A Catalogue of Living and Extinct Species.** Taylor and Francis, CRC Press, 1237 pp. 2014.

WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.** v. 34, p. 1520-1523, 1955.

WARREL D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds) The venomous reptiles of the Western Hemisphere. **Cornell University Press**, New York, p.709-715, 2004.

WARRELL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal** v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

WARREL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 207-223, 2012.

WELCH, W. J.; WILCOX, C. S.; AISAKA, K.; GROSS, S. S.; GRIFFITH, O. W.; FONTOURA, B. M. A. Nitric oxide synthesis from L-arginine modulates renal vascular resistance in isolated perfused and intact rat kidneys. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 17, p. 165-168, 1991

WHO – World Health Organization. Animal Bites. Snake Bites. 2016  
Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/> >  
Acessado em: 30 maio de 2016.

YU, S. P.; CHOI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.9360-9362, 2000.

ZAMUNER, S. R. *et al.* Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. v. 44, p. 259–271, 2004.

ZAQUEO, K.D *et al.* Isolation and biochemical characterization of a new thrombinlike serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News. Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.