



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

RODRIGO TAVARES DANTAS

**INJÚRIA RENAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops insularis* E O
PAPEL DA MOLÉCULA KIM-1 COMO BIOMARCADOR PRECOCE**

FORTALEZA-CE
2016

RODRIGO TAVARES DANTAS

**INJÚRIA RENAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops insularis* E O
PAPEL DA MOLÉCULA KIM-1 COMO BIOMARCADOR PRECOCE**

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

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA-CE
2016

RODRIGO TAVARES DANTAS

**INJÚRIA RENAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops insularis* E O
PAPEL DA MOLÉCULA KIM-1 COMO BIOMARCADOR PRECOCE**

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

Aprovada em 29/08/2016.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora).
Universidade Federal do Ceará.

Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.
Universidade Estadual do Ceará.

Profa. Dra. Darcielle Bruna Dias Elias.
Faculdade de Ensino e Cultura do Ceará.

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira.
Universidade Federal do Ceará.

Profa. Dra. Iêda Pereira de Souza.
Universidade Federal do Ceará.

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)

D215i Dantas, Rodrigo Tavares.
INJÚRIA RENAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops insularis* E O PAPEL DA
MOLÉCULA KIM-1 COMO BIOMARCADOR PRECOCE / Rodrigo Tavares Dantas. – 2016.
113 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.

1. *Bothrops*. 2. Injúria Renal Aguda. 3. Kidney injure molecule-1. I. Título.

CDD 615.1

À minha família e amigos pelo apoio e força constantes.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelos inúmeros obstáculos que tem me ajudado a suplantar;

À **minha mãe e meu pai** (*in memoriam*), razão de tudo que sou;

Ao **meu irmão**, pela torcida constante;

Ao **Vitor**, por estar sempre ao meu lado;

À minha orientadora, **Dra. Alice**, pela paciência, atenção e orientação segura;

Aos colegas de laboratório **Tiago, Jader, Gdayllon, Ramon, Nina** e em especial à **Dânya**, pois sem ajuda deles este trabalho seria impossível

Aos amigos **Caroline, Andrea, Juliana Neves, Hudson Juliano, Sigian e Alba**, por acreditarem em mim;

Às colegas de trabalho **Glaziane, Natália e Ana Beatriz**, pela compreensão e colaboração;

À minha chefe, **Dra. Ana Ruth**, pelo exemplo de profissional e pessoa, incentivo e apoio;

À minha coordenadora, **Régia**, pela atenção e compreensão,

Ao **Laboratório de Doenças Infecciosas** e seu coordenador, **Dr. Aldo Lima**, pela acolhida;

À **Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista**, por sua ajuda, colaboração e presteza,

Ao **Marcos Toyama**, pela parceria.

Segue o teu destino
Rega a tuas plantas,
Ama a tuas rosas.
O resto é sombra
De árvores alheias.

A realidade
Sei que é mais ou menos
Do que nós queremos
Só nós somos sempre
Iguais a nós próprios.

Suave é viver só.
Grande e nobre é sempre
Viver simplesmente.
Deixa a dor nas aras
Como ex-voto aos deuses.

Vê de longe a vida.
Nunca a interrogues.
A resposta está além dos deuses.

Mas serenamente
Imita o Olimpo
No teu coração.
Os deuses são deuses
Porque não se pensam.

Ricardo Reis

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma das mais importantes complicações do envenenamento botrópico, sendo considerada uma das principais causas de morte nestes acidentes. A creatinina plasmática vem sendo utilizada como biomarcador de injúria renal há mais de 90 anos, entretanto tem baixa sensibilidade e especificidade para a lesão renal aguda. A demanda por um teste capaz de detectar os estágios desta lesão tem estimulado a busca de novas ferramentas diagnósticas. Uma vez que células tubulares epiteliais são os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos, este trabalho avaliou as ações do veneno de *Bothrops insularis* (BiVT) sobre a função renal de camundongos, examinando o papel da proteína KIM-1 como biomarcador precoce de LRA. Também foram avaliados os efeitos do BiVT após incubação com linhagens celulares renais de túbulos proximais de macaco e humana, LLC-MK2 e HK2, respectivamente; na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase. Camundongos Swiss machos pesando entre 25-30 g foram inoculados com o BiVT por via intramuscular (3,5 mg/Kg) e observados por 24 horas no modelo de gaiola metabólica. Urina, sangue e os rins dos animais foram coletados para análise dos seguintes parâmetros: níveis urinário e sérico de creatinina, nível urinário da proteína KIM-1, análise histológica dos rins e avaliação do equilíbrio óxido-redutor no tecido renal. No estudo com células tubulares renais foram avaliados a viabilidade celular, o perfil de morte celular através da marcação com os marcadores anexina/7-AAD para avaliação de necrose/apoptose, rodamina para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial e DCF para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O BiVT promoveu um aumento da creatinina plasmática, reduziu a taxa de filtração glomerular e aumentou os níveis urinários do biomarcador KIM-1. A análise histológica do tecido renal revelou tumefação mesangial, degeneração e tumefação glomerulares, degeneração hidrópica, tumefação tubular e edema intersticial no córtex renal dos animais tratados com o BiVT. Na medula foram visualizadas as seguintes alterações: infiltração de células inflamatórias, pequenos vasos congestos, degeneração tubular hidrópica com secreção da proteína Tamm-Horsfall; e no interstício, presença de células inflamatórias. Células LLC-MK2 incubadas com o BiVT, tiveram redução de viabilidade, com bloqueio parcial deste efeito na presença da enzima catalase. Houve um aumento do número de células marcadas com 7-AAD, efeito não observado quando na presença de fenantrolina ou catalase; entretanto, a fenantrolina promoveu um aumento no número de células com dupla marcação e a catalase, um aumento no número de células não-marcadas. O BiVT induziu perda de potencial transmembrânico mitocondrial que não sofreu alteração quando incubado com fenantrolina, mas apresentou reversão parcial deste efeito na presença da catalase. Na presença do BiVT foi vista uma redução da viabilidade das células HK2, efeito parcialmente bloqueado na presença da fenantrolina ou catalase. Houve redução do potencial transmembrânico mitocondrial, efeito exacerbado pela fenantrolina e parcialmente bloqueado pela catalase. Também foi visto um aumento na produção de EROs, efeito parcialmente bloqueado na presença de fenantrolina ou catalase. Esses dados sugerem toxicidade do BiVT sobre o tecido renal e células tubulares proximais.

Palavras-chave: *Bothrops*, Lesão renal aguda, *Kidney injury molecule-1*.

ABSTRACT

Renal injury induced by the *Bothrops insularis* venom and the role of the kim-1 molecule as an early biomarker

Acute kidney injury (AKI) is one of the most important complications of bothropic envenomation, being considered one of the main causes of death in these accidents. Plasma creatinine has been used as a renal injury biomarker for more than 90 years; however, it has low sensitivity and specificity for acute kidney injury. The demand for a test capable of detecting injury stages has stimulated the search for new diagnostic tools. As epithelial tubule cells are the main targets for the toxic effects of venoms, this study evaluated the actions of *Bothrops insularis* venom toxin (BinsV) on the renal function of mice by evaluating the role of the KIM-1 protein as an early AKI biomarker. The effects of BinsV were also evaluated after incubation with renal cell lines of proximal tubules of monkeys and humans, LLC-MK2 and HK2, respectively; in the absence and presence of phenanthroline and catalase enzymes. Male Swiss mice weighing between 25 and 30 g were inoculated with BinsV intramuscularly (3.5 mg / kg) and observed for 24 hours in the metabolic cage model. The animals' urine, blood, and kidneys were collected for analysis of the following parameters: urinary and serum levels of creatinine, urinary levels of the KIM-1 protein, histological analysis of the kidneys and oxidoreductive balance evaluation in renal tissue. In the renal tubular cell study, cell viability and cell death profile were evaluated for necrosis/apoptosis using annexin/7-AAD markers, whereas rhodamine was used for evaluation of mitochondrial transmembrane potential and dichlorofluorescein (DCF) for the evaluation of reactive oxygen species (ROS) production. BinsV promoted an increase in plasma creatinine, reduced glomerular filtration rate, and increased urinary levels of the biomarker KIM-1. Histological analysis of renal tissue disclosed mesangial swelling, glomerular degeneration and swelling, hydropic degeneration, tubular swelling, and interstitial edema in the renal cortex of animals treated with BinsV. In the medulla, the following alterations were identified: inflammatory cell infiltration, small congested vessels, hydropic tubular degeneration with Tamm-Horsfall protein (THP) secretion, as well as the presence of inflammatory cells in the interstitium. LLC-MK2 cells that were incubated with BinsV had viability reduction, with partial blocking of this effect in the presence of the catalase enzyme. There was an increase in the number of cells labeled with 7-AAD, an effect not observed in the presence of phenanthroline or catalase; however, phenanthroline promoted an increase in the number of cells with double labeling, whereas catalase caused an increase in the number of non-labeled cells. BinsV induced loss of mitochondrial transmembrane potential, which did not change when incubated with phenanthroline, whereas this effect was partially reversed in the presence of catalase. A reduction in the viability of HK2 cells was observed in the presence of BinsV, an effect that was partially blocked in the presence of phenanthroline or catalase. There was a reduction in the mitochondrial transmembrane potential, an effect exacerbated by phenanthroline and partially blocked by catalase. An increase in ROS production was also observed, an effect that was partially blocked in the presence of phenanthroline or catalase. These data suggest BinsV toxicity on renal tissue and proximal tubular cells.

Keywords: *Bothrops*, Akute kidney injury, *Kidney injury molecule-1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos segundo o tipo de animal causador. Brasil, 2010 a 2014.	17
Gráfico 2 – Acidentes por animais peçonhentos, segundo animal agressor, Ceará, 2007 a 2016.	19
Gráfico 3 – Composição química, segundo análise transcriptômica, do veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i>	23
Figura 1 – Serpente <i>Bothrops insularis</i>	20
Figura 2 – Ilha da Grande Queimada.	21
Figura 3 – <i>Bothrops insularis</i> em seu habitat natural.	21
Figura 4 – Modelo esquemático da molécula de KIM-1.	31
Figura 5 – Reação de detecção dos níveis de Malondialdeído (MDA) através da reação de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).	38
Figura 6 – Interconversão da glutathiona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).	39
Figura 7 – Esquema das etapas do cultivo e tratamento das células LLC-MK2 e HK2.	41
Figura 8 – Esquema das etapas do ensaio de viabilidade celular.	43
Figura 9 – Esquema do ensaio de marcação com Anexina V/7-AAD. ...	44
Figura 10 – Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional.	46
Figura 11 – Princípio do ensaio de oxidação do DCFH ao DCFoxi fluorescente.	47
Figura 12 – Medida de biomarcadores clássicos de função renal.	50
Figura 13 – Níveis urinários de KIM-1.	53
Figura 14 – Correlação linear de Pearson entre KIM-1 urinário e creatinina plasmática de camundongos decorridas 24 horas de injeção intramuscular do veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i>	54

Figura 15 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i> em rins de camundongos.	56
Figura 16 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i> em rins de camundongos.	57
Figura 17 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i> em rins de camundongos.	58
Figura 18 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i> em rins de camundongos.	59
Figura 19 – Níveis teciduais de Malondialdeído.	63
Figura 20 – Níveis teciduais de Glutathiona Peroxidase.	65
Figura 21 – Efeito citotóxico do veneno total de <i>Bothrops insularis</i> sobre células LLC-MK2.	68
Figura 22 – Ação da fenantrolina sobre o efeito citotóxico do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre células LLC-MK2.	70
Figura 23 – Ação da catalase sobre o efeito citotóxico do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre células LLC-MK2.	72
Figura 24 – Dotplot do efeito do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre células LLC-MK2, determinado por citometria de fluxo, na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	74
Figura 25 – Efeito do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre a externalização da fosfatidilserina em células LLC-MK2, determinado por citometria de fluxo, na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	75
Figura 26 – Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células LLC-MK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	78
Figura 27 – Avaliação do potencial transmembrânico, determinado por citometria de fluxo, em células LLC-MK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	79
Figura 28 – Medida do potencial transmembrânico mitocondrial de células LLC-MK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	80
Figura 29 – Efeito citotóxico do veneno total de <i>Bothrops insularis</i> sobre células HK2.	82

Figura 30 – Ação da fenantrolina sobre o efeito citotóxico do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre células HK2.	83
Figura 31 – Ação da catalase sobre o efeito citotóxico do veneno de <i>Bothrops insularis</i> sobre células HK2.	84
Figura 32 – Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células HK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	86
Figura 33 – Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células HK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	87
Figura 34 – Histograma representativo da liberação de EROs, determinada por citometria de fluxo, em células HK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	90
Figura 35 – Liberação de EROs, determinada por citometria de fluxo, em células HK2 tratadas com o veneno de <i>Bothrops insularis</i> na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais.	16
Tabela 2 – Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos, por região e Unidade da Federação. Brasil, 2014.	18
Tabela 3 – Perfil dos acidentes ofídicos no Estado do Ceará segundo sexo, ocupação e faixa etária no período de janeiro de 2007 a junho de 2016.	19
Tabela 4 – Comparação entre as serpentes <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Bothrops insularis</i>	22
Tabela 5 – Principais manifestações clínicas do acidente brotrópico.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BiVT	Veneno Total da Serpente <i>Bothrops insularis</i>
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de Diclorofluoresceína
DCFoxi	2',7'-diclorofluoresceína oxidada
DMEM	Meio de Cultivo Celular Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay
GSH	Enzima Glutaciona Reduzida
GSH-Px	Enzima Glutaciona Peroxidase
GSSG	Enzima Glutaciona Oxidada
GO	Enzima Glutaciona Oxidase
GR	Enzima Glutaciona Redutase
HK2	Células Imortalizadas de Túbulo Proximal de Rim Humano
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
LAAO	L-aminoácido oxidase
LLC-MK2	Células Imortalizadas de Túbulo Proximal de Rim de Macaco (<i>Macaca mulatta</i>)
LRA	Lesão Renal Aguda
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloprotease ou Metaloproteinase de Matriz
MPVS	Metaloproteinase de Veneno de Serpentes
MTT	Sal de Tetrazólio (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NO	Óxido Nítrico
NTA	Necrose Tubular Aguda
PBS	Solução Tampão Fosfato
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
Rho 123	Rodamina 123
RPM	Rotações por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil-sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Géis de Poliacrilamida
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Contexto cultural das serpentes.....	15
1.2 Aspectos epidemiológicos do acidente ofídico.....	16
1.3 <i>Bothrops insularis</i>.....	19
1.4 Composição do veneno da serpente <i>Bothrops insularis</i>.....	22
1.5 Manifestações clínicas após acidente botrópico.....	25
1.6 Fisiopatologia da lesão renal aguda após acidente botrópico.....	27
1.7 A molécula KIM-1 como biomarcador precoce de lesão renal aguda.....	30
1.8 Justificativa.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais e substâncias em estudo.....	35
3.2 Delineamento experimental.....	35
3.3 Experimento <i>in vivo</i>.....	36
3.3.1 Grupos experimentais.....	36
3.3.2 Protocolo experimental.....	36
3.3.3 Mensuração de creatinina e KIM-1.....	37
3.3.4 Análise histológica	37
3.3.5 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor no tecido renal.....	38
3.3.5.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA).....	38
3.3.5.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	38
3.4 Experimento <i>in vitro</i>.....	40
3.4.1 Cultura de células tubulares renais.....	40
3.4.2 Grupos experimentais.....	41
3.4.3 Ensaio de viabilidade celular.....	42
3.4.4 Ensaio por citometria de fluxo.....	43

3.4.4.1 Avaliação do perfil de morte celular por marcação com Anexina V/7-AAD.....	44
3.4.4.2 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial.....	45
3.4.4.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas.....	46
3.5 Ensaio por citometria confocal.....	47
3.6 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Experimentos <i>in vivo</i>.....	49
4.1.1 Nível urinário de KIM-1.....	52
4.1.2 Análise histológica.....	55
4.1.3 Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor no tecido renal.....	62
4.2 Experimentos <i>in vitro</i>.....	66
4.2.1 Ensaio com células LLC-MK2.....	67
4.2.1.1 Avaliação de viabilidade celular.....	67
4.2.1.2 Avaliação do perfil de morte celular.....	73
4.2.1.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	78
4.2.2 Ensaio com células HK2.....	81
4.2.2.1 Avaliação de viabilidade celular.....	81
4.2.2.2 Avaliação do perfil de morte celular.....	85
4.2.2.3 Avaliação da liberação de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas.....	88
5 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto cultural das serpentes

A relação entre seres humanos e serpentes remete ao próprio processo de evolução, antecedendo até mesmo a época em que o fogo ainda não era dominado pelo homem. Desde então, as serpentes são animais temidos pela maior parte da população do planeta, tendo esse medo extrapolado a esfera de seu habitat natural para influenciar traços culturais de várias civilizações (Dicionário de Símbolos, 2016).

A serpente é um réptil muitas vezes associado ao mal, à morte e à escuridão, por ser considerada um animal misterioso, traiçoeiro e venenoso, como na cultura ocidental; contudo, é um símbolo muito rico de significado em outras culturas, podendo representar o rejuvenescimento, a renovação, a vida, a eternidade e a sabedoria, sendo respeitada como animal sagrado e símbolo de prosperidade, como no hinduísmo, budismo e yoga (Dicionário de Símbolos, 2016).

No mundo ocidental, onde o Cristianismo exerceu grande influência, a cultura judaico-cristã, no primeiro livro da Bíblia, o Gênesis, associa a figura da serpente a uma imagem negativa, o que acabou por culminar na criação da alcunha do “pecado original”, doutrina que pretende explicar a origem da imperfeição humana, do sofrimento e da existência do mal através da queda do homem. Tal ideia talvez se deva ao fato de existirem, naquela época, pouco ou nenhum recurso para neutralizar os efeitos do acidente ofídico tornando-o, muitas vezes, fatal (Goulart, 2002).

As serpentes têm uma distribuição territorial quase universal, habitando preferencialmente as regiões temperadas e tropicais. Essa distribuição deve-se à característica específica que apresentam estes animais de depender do calor para efetuar sua termorregulação. Desta forma, ainda em tempos atuais esses animais continuam a povoar o imaginário popular e a causar acidentes entre os humanos, como em eras passadas. Com o desbravamento das últimas reservas naturais do globo terrestre, os acidentes ofídicos têm marcado sua presença de maneira constante e, certamente, ainda manter-se-ão por muitos séculos (Wong et al., 2009).

É possível ainda classificar as serpentes como animais importantes para a manutenção da cadeia ecológica, pois exercem o papel de controle de pragas tais como ratos, insetos e até mesmo outras serpentes. Faz-se mister destacar também que alguns destes animais são dotados de glândulas produtoras de veneno e são denominadas peçonhentas. Dentre estas, aquelas consideradas de interesse médico são definidas como tanatofídeas, uma vez que podem causar morte aos seres humanos e animais. De interesse médico também são as peçonhas das quais já foram identificadas mais de 400 proteínas, que inclusive serviram de base para confecção de colas cirúrgicas e até mesmo de medicamentos (Tabela 1) (Beeton, Gutman, Chandy, 2006).

Tabela 1 – Exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais.

Fármaco	Uso Terapêutico	Fonte
Epitifibatide	Anticoagulante	Serpente <i>Sistrurus miliaris barbour</i>
Echistatin	Anticoagulante	Serpente <i>Echis carinatus</i>
Captopril	Antihipertensivo	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>
Ranatensin	Antihipertensivo	Sapo do Gênero Rana
Ancrod (Viperinex™)	Anticoagulante para acidente vascular cerebral isquêmico agudo	Serpente <i>Calloselasma rhodostoma</i>
Ziconotida (Prialt®)	Tratamento da dor crônica	Molusco marinho <i>Conus magus</i>
Exenatida	Diabetes Mellitus tipo 2	Réptil <i>Holoderma suspectus</i>

Fonte: Adaptado de Beeton, Gutman e Chandy, 2006.

1.2 Aspectos epidemiológicos do acidente ofídico

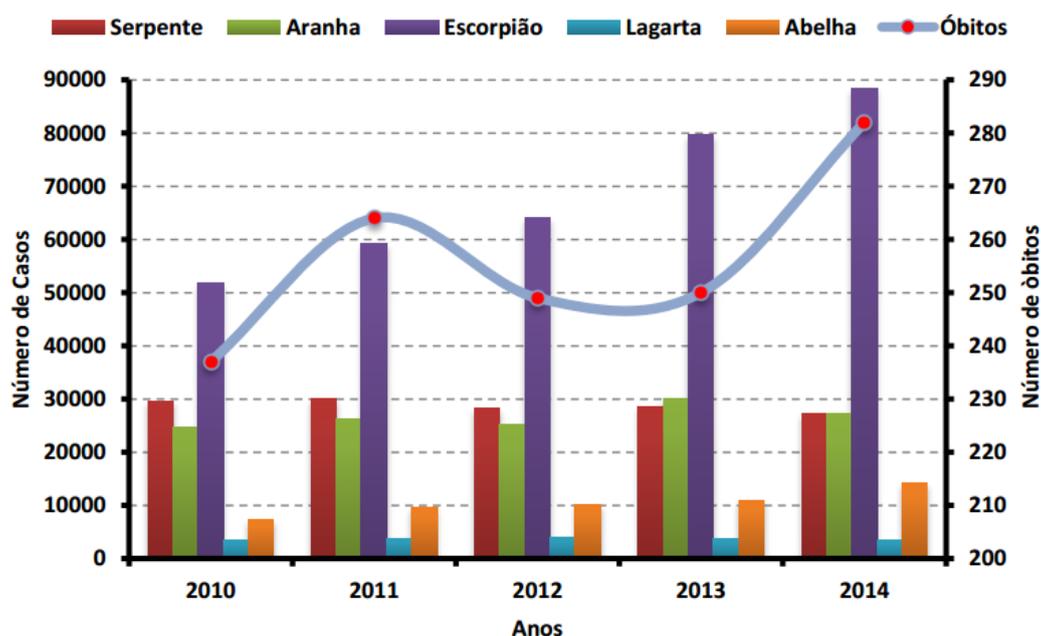
O Brasil, como quase toda a América, tem uma grande biodiversidade em número de serpentes. A classificação apropriada para as mais diversas serpentes sempre foi marcada por controvérsias. Nas duas últimas décadas houve o surgimento de diversas propostas classificadoras. O Brasil apresenta uma das mais amplas faunas de serpentes do Planeta com 366 espécies de

serpentes catalogadas e agrupadas em 10 famílias: Anomalepididae (6 espécies), Leptotyphlopidae (14), Typhlopidae (6), Aniliidae (1), Tropidophiidae (1), Boidae (12), Colubridae (34), Dipsadidae (237), Elapidae (27) e Viperidae (28). Dessas, 15% (55 espécies) são consideradas peçonhentas e responsáveis por cerca de 20 mil acidentes ofídicos anualmente no país (Bernarde, 2011).

As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem a duas famílias: Viperidae (acidentes botrópico, crotálico e laquético) e Elapidae (acidente elapídico). A proporção dos casos anuais e as respectivas taxas de letalidade revelam que 90% são acidentes botrópicos (letalidade de 0,31%), seguido de crotálicos (7,7%, com 1,87% de letalidade), laquéticos 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos 0,4% (0,52% de letalidade). O perfil epidemiológico do ofidismo demonstra que as principais vítimas são indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária entre 15 a 49 anos e apresentando uma letalidade geral de 0,45% (Araújo *et al.*, 2003; Santos, Farani, Rocha, 2009).

No Brasil, entre 2010 e 2014 foram notificados 691.307 acidentes por animais peçonhentos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, dos quais 1.282 evoluíram para óbito (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos segundo o tipo de animal causador. Brasil, 2010 a 2014.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

Em 2014 registrou-se 27.261 acidentes envolvendo serpentes (taxa de incidência de 13,4 casos para cada 100.000 habitantes; tabela 2), com 120 óbitos (taxa de letalidade de 0,44%). Os três estados com maiores números de acidentes foram Pará (19,3%), Minas Gerais (10,3%) e Bahia (8,2%). A região onde ocorreu a maioria dos acidentes por serpentes foi a Norte (35,5%), seguida das regiões Nordeste (22,7%), Sudeste (22,2%), Centro-Oeste (10,5%) e Sul (9%).

Tabela 2 – Número de acidentes e óbitos por animais peçonhentos, por região e Unidade da Federação. Brasil, 2014.

Região	Nº Casos	Óbitos
Norte	9.683	52
Nordeste	6.193	25
Sudeste	6.056	18
Sul	2.460	10
Centro-Oeste	2.869	15
Brasil	27.261	120

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

No estado do Ceará, foram notificados, no período de 2007 a junho de 2016, 28.402 acidentes por animais peçonhentos (Gráfico 2), dos quais 23,4% (6.169) envolvendo serpentes (Boletim..., 2016).

Nos últimos 10 anos houve uma maior concentração de acidentes na faixa etária de 20 a 49 anos, totalizando 50,2% dos casos. Embora haja uma equivalência entre o número de acidentes quando as vítimas são classificadas por sexo, 48,8% do sexo masculino e 51,2% do sexo feminino, houve uma predominância do escorpião como animal agressor entre as mulheres (63,4%), sendo a serpente (79%) o principal agressor entre os homens (Tabela 3). O maior número de registro de acidentes causados por serpentes ainda continua sendo no mês de julho e dentre os casos registrados, 84,4% ocorreram em agricultores (Boletim..., 2016).

Ainda em relação ao estado do Ceará, dos 28.402 casos de picadas por animais peçonhentos ocorridos no período supracitado, 92% (26.117) evoluíram para cura, sendo que 65,5% (17.112) foram atendidos em até 3 horas

após o acidente e, dentre os óbitos ocorridos, 12,5% (7) receberam atendimento decorridas mais de 24 horas do envenenamento. Embora casos graves de envenenamento tenham ocorrido em somente 1,1% (322) dos casos registrados; 79,1% (255 de um total de 322 casos) dos registros ocorridos com serpentes foram classificados como casos graves e apenas 18,8% (1.179) dos acidentados por serpentes fizeram uso do soro antiofídico (Boletim..., 2016).

Gráfico 2 – Acidentes por animais peçonhentos, segundo animal agressor, Ceará, 2007 a 2016*.



Fonte: Boletim Epidemiológico, 2016. *Sujeito a alterações. **Outros: abelha, lagarta, formiga etc.

Tabela 3 – Perfil dos acidentes ofídicos no Estado do Ceará segundo sexo, ocupação e faixa etária no período de janeiro de 2007 a junho de 2016.

	Sexo		Ocupação		Faixa Etária	
Homens	22.466	Agricultores	2.750	20 a 49 anos	14.257	
Mulheres	5.936	Total	3.258	Total	28.402	

Fonte: Boletim Epidemiológico, 2016.

1.3 *Bothrops insularis*

A serpente *Bothrops insularis* (Figura 1), descrita em 1921 pelo herpetólogo Afrânio do Amaral (Simioni; D'Abreu, 2001), é uma espécie

endêmica nativa da ilha de Queimada Grande também conhecida como jararaca ilhoa.

Figura 1 – Serpente *Bothrops insularis*.



Fonte: National Geographic Brasil (Julião, 2016).

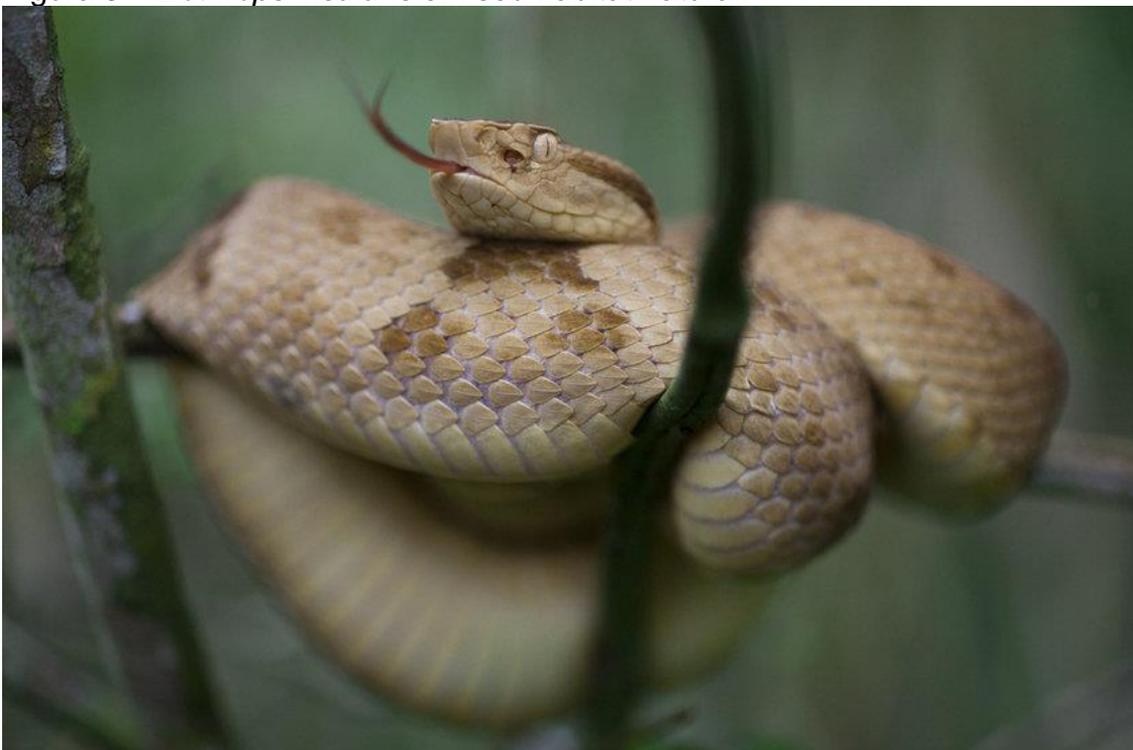
A Ilha da Grande Queimada (Figura 2) situa-se a 35 km da costa sul do Estado de São Paulo, no município de Itanhaém. Trata-se de uma encosta rochosa com 430.000 m² formado por terreno acidentado e irregular. Formada há 55 milhões de anos, em um desdobramento das origens da serra do Mar, a ilha da Queimada Grande foi ligada ao continente em diferentes períodos do passado. Entre 10 mil e 12 mil anos atrás, quando terminou a última glaciação da Terra, a área acabou cercada pelo mar, em decorrência da elevação no nível dos oceanos. A população de serpentes, que provavelmente eram da mesma espécie do continente – *Bothrops jararaca* –, ficou ilhada (tabela 4). Sem pequenos mamíferos para caçar, as cobras precisaram se adaptar à vida em cima das árvores (figura 3), pois a principal comida disponível eram as aves, de passagem pela ilha em suas migrações (Julião, 2016).

Figura 2 – Ilha da Grande Queimada.



Fonte: National Geographic Brasil (Julião, 2016).

Figura 3 – *Bothrops insularis* em seu habitat natural.



Fonte: National Geographic Brasil (Julião, 2016).

Tabela 4 – Comparação entre as serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis*.

<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops insularis</i>
Vive no continente	Encontrada apenas na Ilha da Queimada Grande
Veneno letal	Veneno 5 vezes mais potente
Alimenta-se de pequenos roedores, répteis, anfíbios	Quando filhote se alimenta de lesmas, lacraias, sapos Na fase adulta alimenta-se de aves
Possui hábitos terrestres	Adaptou-se à vida em árvores para caçar aves. No final de sua cauda tem uma pequena curvatura que permite que ela se enrole nos galhos

Fonte: Adaptado de Wüster, Duarte, Salomão, 2005; A ilha..., 2016.

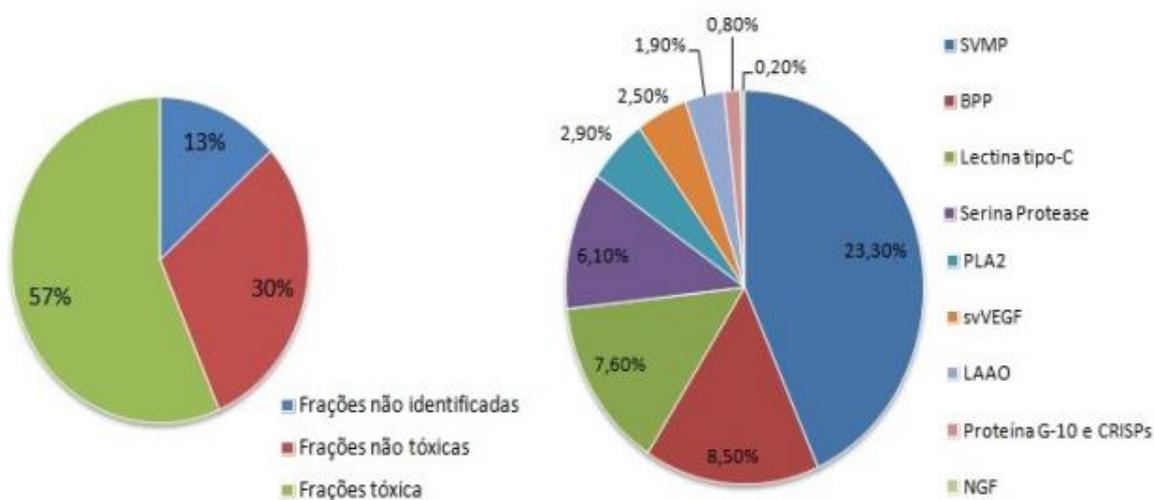
Expedições à ilha indicam que há uma população em torno de 1.500 a 2.000 serpentes do gênero, nos 43 hectares de florestas da ilha, o que representa uma densidade de aproximadamente 50 a 70 serpentes por hectare, o que a torna um dos maiores serpentários do mundo (Marques; Sazima, 2009). Histórias de ataques por estas serpentes às pessoas que tentaram habitar a ilha lhe renderam a alcunha de “ilha do medo” (A ilha..., 2016).

1.4 Composição do veneno da serpente *Bothrops insularis*

Os venenos de serpentes constituem misturas complexas contendo componentes protéicos e não protéicos com diferentes estruturas e funções. Os componentes protéicos constituem enzimas e proteínas não enzimáticas além de polipeptídeos como neurotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, desintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteases, fosfolipases, fosfodiesterases, entre outras. Entre os componentes orgânicos não protéicos encontramos aminoácidos livres e pequenos peptídios; carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios e aminas biogênicas (Varanda e Giannini, 1994; Tu, 1996; Matsui *et al.* 2000; Rajendra *et al.* 2004).

Valente *et al.* (2009) descreveram que o veneno é composto em sua maioria de frações tóxicas (Gráfico 3), e, dentro dessa fração, foram observados 11 constituintes principais como, metaloproteases (SVMP), peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP), lectinas do tipo C, serina protease, fosfolipases A₂ (PLA₂), fatores de crescimento do endotélio vascular (svVEGF), L- amino oxidase (LAAO), proteínas secretórias de cisteína (CRISPs), proteínas G10 e fatores de crescimento neurotróficos.

Gráfico 3 – Composição química, segundo análise transcriptômica, do veneno da serpente *Bothrops insularis*.



SVMP = metaloprotease, BPP = peptídeos potencializadores de bradicinina, PLA₂ = fosfolipase A₂, svVEGF = fator de crescimento vascular endotelial derivado de veneno de serpente, LAAO = L-aminoácido oxidase, NGF = fator de crescimento neural. Fonte: adaptado de Valente *et al.*, 2009.

Embora possa sofrer variação quantitativa quando comparadas às espécies, o veneno de serpentes é composto majoritariamente de proteínas, as quais perfazem cerca de 90% a 95% do peso seco das peçonhas (Dalmora, Vaccari, Pereira, 1992; Chaves, 2008). As proteínas tóxicas presentes na peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais e funcionais podendo agir tanto de forma isolada como sinérgica quando inoculadas no organismo de suas vítimas (Ramos, Selistre-de-Araújo, 2006). Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas. Estas enzimas incluem fosfolipase A₂ (PLA₂), proteinase, nucleotidase, fosfodiesterase e L-aminoácido oxidase (LAAO) e metaloproteinases (MMP) que, devido a sua similaridade com a convertase de

TNF- α , são capazes de causar apoptose *in vitro* (Masuda *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2012). Em adição as suas propriedades catalíticas, as quais podem contribuir para a ação digestiva do veneno, estas enzimas também induzem vários efeitos farmacológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (Bailey, Wilce, 2001; Kini apud Torres *et al.* 2003).

As enzimas PLA₂ catalizam a hidrólise de glicerofosfolípidios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolípidios e ácidos graxos (Verheijn *et al.* apud Koh *et al.* 2006; Kini, 2003). As PLA₂ estão agrupadas em três famílias principais: (I) citosólicas (cPLA₂); (II) secretórias dependente de Ca⁺² (sPLA₂) e (III) intracelulares não dependentes de Ca⁺² (iPLA₂) (Chakraborti, 2003; Balsinde *et al.*, 2006). As PLA₂ isoladas dos venenos de serpentes possuem várias bioatividades, como indução da motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante, antitumor, inibição da agregação plaquetária (Xu *et al.*, 2007). Dentre as fosfolipases dos venenos são reconhecidos três tipos diferentes: a) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), a qual apresenta atividade catalítica; b) as variantes, contendo lisina no carbono 49 (Lys49); c) variantes com serina ocupando a posição 49 (Ser49), sendo estas duas últimas enzimaticamente inativas (Lomonte *et al.*, 2003; Stabéli *et al.*, 2012).

As LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (Du e Clemetson, 2002). Embora a função biológica exata das LAAO isoladas de venenos de serpentes não esteja totalmente esclarecida, elas parecem estar envolvidas na resposta alérgica inflamatória e especificamente associadas à danos em células endoteliais de mamíferos (Izidoro *et al.*, 2006). Têm apresentado também ação citotóxica contra células tumorais, efeitos na agregação plaquetária, edema e indução de apoptose (Stabéli *et al.*, 2004; Izidoro *et al.*, 2014).

As metaloproteases (MMP), por sua vez, são parte uma família de enzimas especializadas na degradação da matriz extracelular das quais as células necessitam para manter o equilíbrio necessário ao funcionamento normal do organismo (Sternlicht & Werb, 2001). Esta família possui mais de 20

proteases secretadas capazes de remodelar a arquitetura da matriz celular, através da clivagem de seus principais componentes. No entanto, a sua atividade não se limita a uma simples alteração física da matriz, uma vez que, ao clivar as proteínas que a constituem, as MMPs são capazes de expor domínios crípticos e liberar peptídeos biologicamente ativos que direcionam o comportamento celular e assim contribuem para garantir um controle rigoroso do ambiente externo (Vu, 2001; McCawley; Matrisian, 2001; Mott & Werb, 2004).

1.5 Manifestações clínicas após acidente botrópico

O gênero Bothrops possui ampla distribuição no território nacional e corresponde ao grupo de serpentes peçonhentas mais importantes em número de espécies e densidade populacional. Há predomínio dos acidentes causados por serpentes pertencentes a este gênero correspondendo a cerca de 90% das notificações encaminhadas ao Ministério da Saúde (Oliveira et al., 2010; Marinho, 2015).

As manifestações clínicas e as alterações dos exames complementares dos acidentados devem-se às três principais atividades do veneno botrópico (tabela 5): atividade inflamatória aguda, atividade anticoagulante e atividade hemorrágica (Luciano; Silva; Azevedo-Marques, 2009).

Tabela 5 – Principais manifestações clínicas do acidente brotrópico.

Ações do veneno	Manifestações locais	Manifestações sistêmicas
Inflamatória	Edema intenso	Coagulopatia
Proteolítica local	Equimose e bolhas	Hemorragia
Anticoagulante	Sangramentos	Insuficiência respiratória
Hemorrágica	Infecção secundária	Insuficiência renal aguda
Nefrotóxica	Necrose	Septicemia
	Síndrome compartimental	Choque

Fonte: Luciano; Silva; Azevedo-Marques, 2009; Santos; Farani; Rocha, 2009.

O efeito da peçonha botrópica compreende desde ações locais e destruição tecidual por ação proteolítica do veneno no local da picada (Gutierrez & Rucavo, 2000) até ações sistêmicas por ativação da cascata de coagulação, podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação anticoagulante), liberação de substâncias hipotensoras e lesões na membrana basal dos capilares por ação de diversas proteínas (ação hemorrágica), que, associada à plaquetopenia e a alterações da coagulação promovem manifestações hemorrágicas, frequentes nesse tipo de acidente (Pereira; Pinho, 2001).

Inicialmente, o quadro clínico caracteriza-se por dor intensa no local de inoculação do veneno que se desenvolve rapidamente após a picada, e, posteriormente, edema de caráter progressivo. A patogênese dessa ação proteolítica é complexa e decorrente da ação de várias enzimas presentes no veneno, dentre elas, as hialuronidases, fosfolipases A₂, metaloproteinases e as L-aminoácido oxidases (Castro, 2006). Estes efeitos estão relacionados com ativação ou liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, derivados do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina), ativação do sistema complemento e de cininas TNF- α , INF- γ , IL-1 e IL-6 (Sgrignolli *et al.*, 2011).

A depender de vários fatores tais como, quantidade de veneno inoculada, idade e tamanho da serpente etc., as manifestações locais podem evoluir para equimoses, lesões bolhosas e sangramentos. Formação de abscessos com desenvolvimento de síndrome compartimental e necrose pode levar a perda funcional ou mesmo anatômica do local do membro acometido (Pereira; Pinho, 2001; Castro, 2006).

Insuficiência respiratória, coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal aguda (IRA), septicemia e choque estão entre as complicações sistêmicas mais comuns, têm patogênese multifatorial e estão entre as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em acidentes botrópicos (Gutiérrez, 2002; White, 2005; Luciano; Silva; Azevedo-Marques, 2009). Dentre estas, a IRA configura-se como a principal complicação dos acidentes ofídicos contribuindo para aumentar a letalidade associada à peçonha (Santos; Farani; Rocha, 2009).

1.6 Fisiopatologia da lesão renal aguda após acidente botrópico

O sistema renal, embora represente menos de 1% da superfície corporal de um indivíduo, recebe, em repouso, fluxo sanguíneo para os dois rins correspondente a 22% do débito cardíaco ou 1.100 mL/min. Como o volume plasmático total é de apenas 3 litros, enquanto a taxa de filtração glomerular é de cerca de 180 L/dia, o plasma pode ser filtrado e processado cerca de 60 vezes a cada dia (Hall, 2011). Estas características tornam o leito renal vulnerável à ação lesiva de produtos químicos ou biológicos, uma vez que a superfície endotelial glomerular é exposta às substâncias tóxicas presentes na circulação, e o processo de filtração dessas moléculas causa grande oferta de toxinas ao tecido renal. Isto é especialmente válido para os casos de acidentes ofídicos em que há absorção da peçonha para a circulação sistêmica (Castro, 2006).

Desta forma, diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico, tais como glomerulonefrite, glomerulite e nefrite intersticial, arterite e necrose tubular, necrose cortical e insuficiência renal. Ainda foi descrita também a ocorrência de hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria. Entretanto, entre os demais, a mais relatada tem sido a insuficiência renal aguda, importante causa de letalidade nos pacientes que sobrevivem à ação inicial da peçonha, a qual possui patogênese multifatorial (Castro, 2006; Sgrignolli *et al.*, 2011).

Muitos fatores têm sido implicados na patogênese da lesão renal induzida pelo envenenamento botrópico, como vasoconstrição renal e consequente isquemia renal. A etiopatogenia da lesão renal também tem sido atribuída à nefrotoxicidade direta da peçonha, miólise, hemólise, hipotensão, coagulação capilar glomerular, ação tóxica vascular e até mesmo, reações de hipersensibilidade à toxina ou ao soro antiofídico (Pinho *et al.*, 2000).

A patogênese da lesão renal em acidentes ofídicos é complexa envolvendo tanto a ação direta do veneno sobre o rim como também os efeitos inflamatórios, devido à liberação de várias citocinas e mediadores inflamatórios endógenos. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetária, catecolaminas e endotelina estão entre os mediadores envolvidos na patogênese da insuficiência renal aguda (IRA) induzida por venenos de serpentes (Sgrignolli *et al.*, 2011).

Estudo sobre envenenamento, evidenciou que a liberação de mediadores vasoativos noroepinefrina, epinefrina, dopamina, tomboxanos, endotelinas e prostaglandinas também se encontra elevada. Sabe-se que a fosfolipase A₂ estimula eixos hipotálamo-hipófise, aumentando a secreção de hormônios, como a vasopressina, os corticosteróides e a arginina responsáveis pelas respostas de fase aguda da lesão renal (Chisari *et al.*, 1998).

O envenenamento de ratos pelo veneno de *Bothrops asper* e *Bothropoides jararaca* induziram a elevação de TNF- α , IL- 1, IL-6, IL- 10, IFN- γ e óxido nítrico no soro desses animais. Os efeitos das citocinas e mediadores vasoativos são refletidos por alterações hemodinâmicas e por resposta imune, desempenhando um papel importante na patogênese da IRA em casos de envenenamento por serpentes (Petricevich *et al.*, 2000; Avila-aguiero *et al.*, 2001; Sitprija, 2006).

Após uma lesão inicial, o rim desenvolve uma resposta molecular que determinará o destino da célula. Pelo menos, quatro destinos celulares são identificados na IRA: as células podem apresentar necrose; morrer por apoptose; podem se dividir; ou se comportam indiferente ao estresse. Desta forma, a fisiopatologia da IRA é complexa e caracteriza-se por uma proeminente resposta molecular subjacente aos distúrbios funcionais, morfológicos e celulares encontrados nessa síndrome. Vários genes são expressos em resposta ao insulto renal inicial. Alguns genes desempenham um papel importante no desencadeamento e na manutenção da IRA, assim como na expressão morfológica da síndrome, enquanto outros têm papel decisivo na eventual recuperação da IRA (Vieira, 2001).

A IRA no acidente botrópico não costuma ser muito frequente com incidência variando entre 1,6 a 5% dos pacientes acidentados (Rodriguez *et al.*, 2000; Bucarechi *et al.*, 2001). Apesar de, após a inoculação, grande parte da peçonha botrópica permanecer na pele e, portanto, causar alterações predominantemente locais, efeitos sistêmicos como IRA podem ocorrer em uma minoria de pacientes. Quando existe, esta é de origem multifatorial ocorre quase sempre nas primeiras 24 horas do acidente, podendo evoluir, porém, com redução do débito urinário apenas no segundo ou terceiro dia (Amaral *et al.*, 1985; Amaral *et al.*, 1986). O atraso na soroterapia é considerado um importante fator de risco para IRA, embora haja relatos na literatura de ocorrência de IRA apesar

da administração do soro em tempo considerado adequado (Otero *et al.*, 2002). Adicionalmente, a idade parece ser também um fator importante. Alguns estudos indicam uma maior tendência à IRA nos pacientes com idade elevada, com maior mortalidade nessa população. Pode-se especular que a maior susceptibilidade à IRA após acidente ofídico no idoso se deva à sua menor massa renal funcionante (fisiológica, associada ao envelhecimento, ou secundária a uma nefropatia de base, hipertensiva, diabética ou isquêmica, que são mais comuns nessa população) (Ribeiro; Gadia; Jorge, 2008).

Na grande maioria dos casos (cerca de 90%), a IRA no acidente botrópico é oligúrica podendo ser resultante de desidratação por vômitos frequentes e perdas para o terceiro espaço podem levar à desidratação, ocasionando colapso circulatório e estado de choque, bem como também decorrente da possibilidade de formação de microtrombos nos capilares renais e da ação nefrotóxica direta do veneno (Vêncio, 1988; Amaral *et al.*, 1986).

A patogênese da lesão renal no acidente botrópico ainda não está bem elucidada. Através de estudos experimentais utilizando rim isolado, foi observado que a peçonha botrópica provoca toxicidade tubular renal. Outros autores sugerem ação proteolítica direta do veneno sobre os glomérulos, que é acompanhada de alterações morfológicas. No entanto, no animal intacto, outros fatores podem indiretamente contribuir para o desenvolvimento de IRA, como rabdomiólise e hemólise, principalmente quando acompanhadas de hipovolemia, além das alterações sobre o sistema de coagulação, que podem levar à deposição de fibrina nos capilares glomerulares. Por fim, algumas frações do veneno, com capacidade de promover a ativação e liberação de mediadores inflamatórios que, por sua vez, são capazes de alterar a hemodinâmica glomerular e a taxa de filtração glomerular. A lesão renal mais comum no acidente botrópico é a necrose tubular aguda, porém alguns casos evoluem com necrose cortical bilateral (Castro, 2006; Sitprija, 2006).

Estudos com o veneno de serpente *B. insularis* (BiVT) e suas frações em perfusão de rim isolado mostraram uma toxicidade acentuada provocando um quadro de insuficiência renal aguda com achado histológico de necrose tubular aguda (NTA). O veneno mostrou NTA moderada, enquanto que suas frações, trombina símile não promoveu NTA; fosfolipase A₂ promoveu NTA leve; L-aminoácido oxidase (LAAO) promoveu NTA moderada, confundindo-se com

apoptose; e a lectina promoveu NTA mais intensa; demonstrando o potencial tóxico direto das frações (Braga, 2006; Braga *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2008). Mello *et al.* (2014) demonstrou que o veneno de *B. insularis* exerceu efeitos citotóxicos nas células renais do túbulo distal, MDCK, como indução de morte celular, alteração da integridade da membrana plásmica, externalização de fosfatidilserina e alterações no potencial de membrana mitocondrial.

A indução de lesão renal aguda pelo acidente botrópico também parece estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). O pré-tratamento das células MDCK com catalase, superóxido dismutase e L-NAME inibiu os efeitos sobre morte celular causados pela peçonha, indicando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos danos causados pelo envenenamento pela peçonha de *B. alternatus* (Nascimento, 2008). Os danos para as células tubulares renais causados por ERO são mediados por oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos no DNA e a indução de morte celular (Ernani *et al.*, 2001).

1.7 A molécula KIM-1 como biomarcador precoce de lesão renal aguda

Biomarcador pode ser definido como uma molécula que é objetivamente medida e tem a capacidade de servir como um indicador de processos biológicos normais ou patológicos, ou ainda como preditor de resposta para uma intervenção terapêutica (Chevalier, 2004).

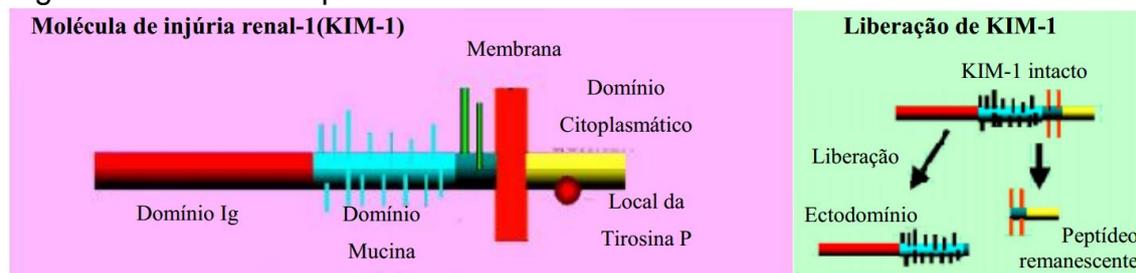
A creatinina tem sido utilizada como biomarcador de doença renal crônica (DRC) e injúria renal aguda (IRA). Mas é de conhecimento geral que a creatinina é um marcador que se eleva tardiamente no sangue de pacientes portadores destas condições clínicas. Desta forma, há a necessidade de desenvolvimento de novos métodos de monitorização de pacientes com lesão renal (Gámez-Valero *et al.*, 2015).

Proteínas urinárias são capazes de fornecer informações da situação fisiológica e tem o potencial para ser utilizadas como ferramentas para a detecção precoce da doença, bem como para escolha do tratamento e monitorização adequados (Lucarelli *et al.*, 2014; Miranda, 2016).

A KIM-1 (do inglês, *kidney injury molecule-1*), molécula de injúria renal, é uma glicoproteína transmembrana com uma imunoglobulina e um domínio mucina, mais especificamente um receptor fosfatidilserina, o qual é expresso na membrana apical de células tubulares proximais pós-isquemia ou injúria tóxica renal (Ichimura *et al.*, 2008; Field *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014; Wasung; Chawlab; Madero, 2015).

A proteína KIM-1 possui molécula completa de 104 kDa, sendo dividida em domínio citoplasmático e ectodomínio extracelular (Figura 4) (Ichimura; Mou, 2008). Seu ectodomínio extracelular (aproximadamente 90 kDa) é clivado pelas metaloproteinases e liberado pelas células do túbulo proximal para urina de roedores e humanos após a injúria tubular proximal renal. Durante a injúria, a KIM-1 assume as funções de fagócito endógeno e fagocita debris de células necróticas e apoptóticas, favorecendo o reparo tecidual e restauração da função (Ichimura *et al.*, 2008).

Figura 4 – Modelo esquemático da molécula de KIM-1.



Fonte: Ichimura; Mou, 2008.

Em condições fisiológicas, o rim normal não é capaz de aumentar a expressão da molécula KIM-1, tornando-a altamente específica para injúria renal, uma vez que nenhum outro órgão mostrou-se capaz de alterar sua concentração urinária (Hamideh *et al.*, 2014; Wasung; Chawlab; Madero, 2015). Outra importante característica deste biomarcador é que ele não é expresso pelo rim normal. Uma vez na urina, a KIM-1 apresenta uma alta estabilidade pois não sofre interferência do pH urinário e nem de outras variáveis (Vaidya *et al.*, 2005). Diante do exposto, o aumento precoce da expressão de KIM-1 seletiva pelas células tubulares proximais lesadas e a consequente liberação na urina são características importantes que estimulam a pesquisa do KIM-1 urinário como biomarcador de dano renal (Han *et al.*, 2002; Bonventre, 2014).

1.8 Justificativa

Embora as estatísticas precisas sobre a incidência e mortalidade devido a acidentes ofídicos sejam escassas, estima-se que entre 1,2 e 5,5 milhões de pessoas por ano sejam acometidas por acidente ofídico, com 25.000 a 125.000 mortes anuais, e um número estimado de 400.000 vítimas apresentem sequelas permanentes (Gutiérrez *et al.*, 2016). A lesão renal aguda é uma das mais importantes complicações do envenenamento botrópico e tem sido relatada como a maior complicação em pacientes que sobrevivem à ação da peçonha, sendo considerada a principal causa de morte nestes acidentes (Guercio *et al.*, 2006; Pinho; Yu; Burdmann; 2008).

Há mais de 90 anos, o diagnóstico da injúria renal, tem sido confirmado laboratorialmente pela medida de creatinina sérica. Embora seja amplamente utilizado na rotina clínica, esse marcador tem limitações na detecção precoce de danos renais (Belcher *et al.*, 2011; Bellomo *et al.*, 2012; Vijayan *et al.*, 2016), tendo em vista que seu aumento no sangue se dá somente quando 75% dos néfrons encontram-se disfuncionantes (Ware, 2015; Hsu *et al.*, 2014). Por estas razões, a medida de creatinina plasmática tem baixa sensibilidade e especificidade para a IRA (Siew *et al.*, 2011). Ademais, sua concentração sérica sofre influência do peso corpóreo, idade, sexo, raça, massa muscular e ingestão proteica, o que a torna um marcador pouco sensível na detecção precoce da IRA (Braun *et al.*, 2003).

Células tubulares epiteliais são os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos (Marrota *et al.*, 2006; Sitprija e Sitprija, 2012). A demanda por um teste capaz de detectar os estágios iniciais da injúria renal tem estimulado a busca de novas ferramentas diagnósticas (Kovalinka, 2014). Assim, nesse trabalho, detectou-se os níveis de KIM-1, molécula expressa somente na presença de dano na célula tubular epitelial proximal, cuja função parece promover a remoção de células apoptóticas e necróticas, ocorrendo, portanto, um aumento da sua expressão no espaço extracelular e na urina (Charlton, Portilla, Okusa, 2014).

Muitos estudos visam descobrir a ação de toxinas, bem como, o mecanismo pelo quais estas causam seus efeitos locais e sistêmicos. Recentemente, foi demonstrado o efeito do BiVT em células renais do túbulo

distal (Melo *et al.*, 2014). Anteriormente, Braga (2006) demonstrou, em rim isolado, alterações nos parâmetros de função renal, especialmente na reabsorção de sódio e cloreto após exposição ao veneno. Neste trabalho, estudou-se os efeitos do BiVT em células tubulares proximais, LLC-MK2 (macaco) e HK2 (humano). Esta foi a primeira demonstração dos efeitos renais do BiVT em células humanas.

Para ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de ação do BiVT, investigou-se também os componentes envolvidos no processo através dos bloqueios de metaloproteinase pela enzima fenantrolina e LAAO pela enzima catalase. Portanto, este trabalho buscou estudar e investigar, no tecido renal, os mecanismos fisiopatológicos induzidos pelo veneno da serpente *B. insularis*, com a finalidade de descoberta de uma ferramenta fisiofarmacológica para o estudo da nefropatia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Elucidar a compreensão dos mecanismos de nefrotoxicidade do veneno da serpente *Bothrops insularis* (BiVT), bem como identificar um biomarcador precoce de lesão renal aguda (LRA).

2.2 Específicos

- Estudar o papel do biomarcador KIM-1 como preditor precoce de LRA após exposição ao BiVT;
- Identificar as alterações histológicas de rins de camundongos inoculados com o BiVT;
- Avaliar os efeitos do BiVT no contexto do equilíbrio redox através de ensaios de avaliação do estresse oxidativo no tecido renal;
- Identificar os efeitos do BiVT sobre a viabilidade das células tubulares proximais renais LLC-MK2 e HK2;
- Estudar o mecanismo de morte celular induzido pelo BiVT em células LLC-MK2;
- Verificar o efeito do BiVT sobre o potencial de membrana mitocondrial nas linhagens celulares em estudo;
- Investigar o efeito do BiVT na geração de espécies reativas de oxigênio nas células HK2;
- Analisar a ação das enzimas fenantrolina e catalase sobre o efeito do BiVT nas linhagens celulares em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Substâncias em Estudo

Camundongos Swiss machos com aproximadamente 30g foram mantidos sob condições controladas (25 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. Foram usados animais hígidos, alimentados e bem hidratados. Foram excluídos do estudo animais não saudáveis, fora da faixa de peso e que não se adaptaram às condições do biotério, como não aceitar a água e/ou o alimento oferecidos. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC) (nº 40/2016) em conformidade com as diretrizes éticas.

O veneno da serpente *B. insularis* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Hiraki Toyama da Universidade do Estado de São Paulo, Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente. As enzimas catalase e fenantrolina foram obtidas a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Delineamento Experimental

No presente trabalho, avaliou-se a nefrotoxicidade do veneno da serpente *Bothrops insularis* (BiVT). O estudo foi dividido, de forma geral, em duas fases, uma *in vivo* e outra *in vitro*.

A primeira fase, *in vivo*, foi realizada com o objetivo de simular um acidente ofídico e avaliar o estabelecimento de lesão renal aguda (LRA) por meio de determinação bioquímica e análise histológica, bem como avaliar o papel do marcador KIM-1 como preditor precoce de LRA.

A segunda fase, *in vitro*, consistiu em ensaios de cultivo celular com linhagens bem caracterizadas de células renais tubulares proximais imortalizadas de macaco, LLC-MK2, e humana, HK2. O objetivo desta etapa foi corroborar os achados da primeira fase através da análise da viabilidade celular, do perfil de morte celular, da permeabilidade da membrana mitocondrial e da geração de espécies reativas de oxigênio. Para investigar se as enzimas metaloproteinase e L-aminoácido oxidase estavam envolvidas no efeito renal do

BiVT, buscou-se bloquear esses componentes, através do uso das enzimas fenantrolina e catalase, respectivamente.

3.3 Experimento *in vivo*

3.3.1 Grupos experimentais

Os animais foram previamente pesados e colocados em gaiolas metabólicas individuais. A gaiola dispõe de comedouro, bebedouro, coletor de fezes e um Becker coletor de urina. Após um período de 24 horas de adaptação dos animais às novas condições, eles foram novamente pesados e, em seguida, o tratamento dos grupos experimentais (n = 5 por grupo) foi iniciado. O grupo controle recebeu apenas o veículo de diluição do BiVT (água para injeção) e o grupo tratado recebeu o BiVT na concentração de 3,5 mg/Kg administrado por via intramuscular (glútea) através de punção com agulha 13 x 4,5 G e os animais foram mantidos em gaiola metabólica por 24 horas.

3.3.2 Protocolo experimental

Durante as 24 horas em que os animais permaneceram na gaiola metabólica, foi coletada a urina em Becker contendo óleo mineral. O conteúdo do Becker foi colocado em uma proveta graduada, na qual a urina apresentava-se separada do óleo mineral. A urina de 24 horas foi coletada e armazenada em dois frascos de 1,5mL. Os frascos de urina foram armazenados em freezer -80 °C, para posterior análise laboratorial. Amostras de sangue também foram coletadas, centrifugadas (4500 RPM durante 10 minutos) para obtenção do plasma e realização dos testes bioquímicos.

Decorridas 24 horas da administração do BiVT os animais dos grupos tratados e não tratados foram submetidos à nefrectomia esquerda. Para tanto, os mesmos foram anestesiados previamente com pentobarbital sódico (50mg/kg) e lidocaína (10mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada laparotomia por meio de uma incisão na parede abdominal, com base na linha alba, e duas incisões perpendiculares à primeira, para facilitar a

manipulação. As vísceras foram rebatidas para o lado direito para visualização do rim esquerdo, seguido pela sua remoção.

3.3.3 Mensuração de creatinina e KIM-1

Para mensurar a creatinina sérica e urinária, foi utilizado um analisador automático (Roche Diagnostics Limited, Rotkreuz, Suisse). O clearance de creatinina foi determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Clearance de Creatina} = \frac{\text{Creatina urinária} \times \text{Volume urinário de 24 h}}{\text{Creatina Plasmática} \times 1440 \text{ minutos}}$$

O ensaio para a quantificação de KIM-1 na urina foi realizado por meio da técnica Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) do tipo sanduíche, que apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, utilizando o kit da R&D systems. O ELISA sanduíche é baseado em: (1) adição das amostras e do padrão a placa de 96 poços, onde previamente houve a adsorção de anticorpos anti-KIM-1 de rato específicos (anticorpo de captura) pelo fabricante; (2) ligação da molécula de KIM-1 presente nas amostras a esses anticorpos de captura anti-KIM-1 específicos, ligados a placa; (3) adição e ligação de anticorpos conjugados a biotina (biotinilados) anti-KIM-1 de rato a epítomos do KIM-1 fixados nos anticorpos de captura; (4) conjugação da estreptavidina ligada à enzima (peroxidase) com a biotina dos anticorpos biotinilados; (5) e quantificação do complexo biotina-estreptavidina enzima, pela avaliação da atividade enzimática da peroxidase na presença do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Por fim, essa atividade enzimática foi medida por meio de espectrofotômetro, utilizando 450 nm, sendo o aumento da absorbância diretamente proporcional à concentração de KIM-1 na amostra, em pg/mL.

3.3.4 Análise histológica

Após cada experimento, os tecidos renais removidos foram colocados em solução a 10% de formol tamponado e, 24 horas após, transferidos para uma solução de etanol a 70%. Após o processamento de tecidos, secções mediana-

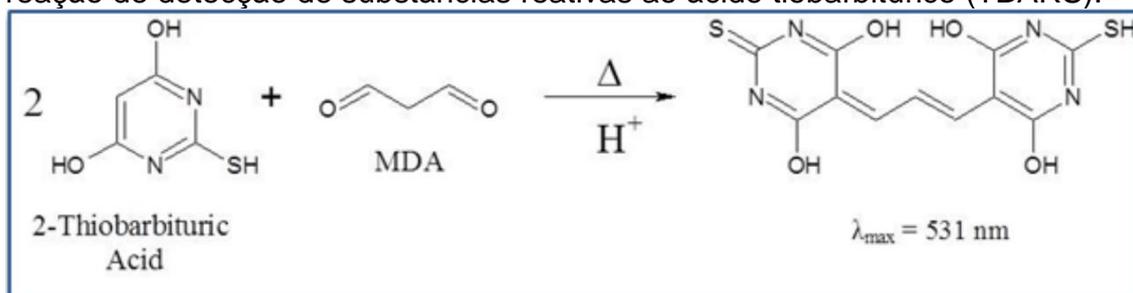
sagital de 5 μm em parafina foram coradas com hematoxilina-eosina, para avaliação histopatológica em Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0® e registro fotográfico.

3.3.5 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor no tecido renal

3.3.5.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

A concentração de Malondialdeído (MDA) no tecido renal foi determinada como um indicador da peroxidação lipídica utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, Thiobarbituric acid reactive substances; figura 5) (Mihara *et al.*, 1980). Fragmentos do rim esquerdo foram homogeneizados com 1,15% de KCl, seguido pela adição de 1% de ácido fosfórico e de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi incubada a 96 °C durante 20 minutos para a formação de um cromógeno cor-de-rosa. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 532 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido.

Figura 5 – Reação de detecção dos níveis de Malondialdeído (MDA) através da reação de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

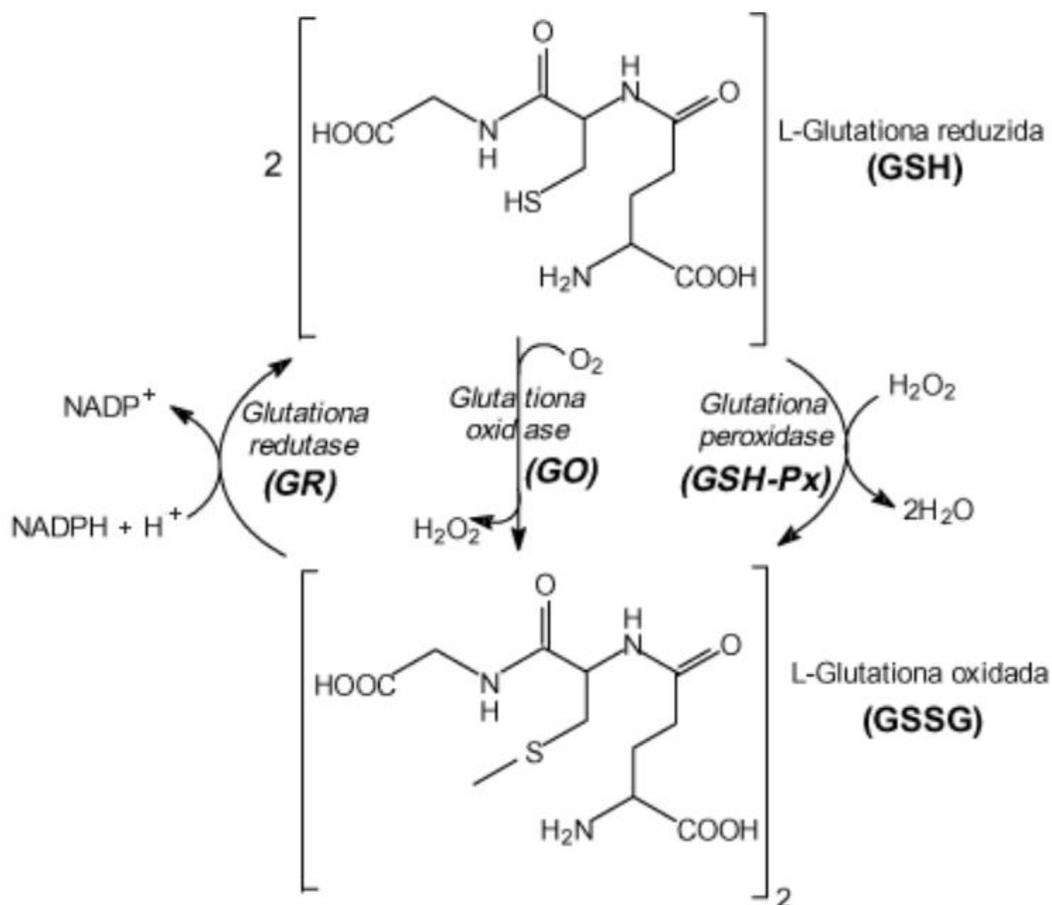


Fonte: Mihara *et al.*, 1980.

3.3.5.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada enzima glutathiona oxidada (GSSG), que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR) (Ballatori *et al.*, 2009; Figura 6).

Figura 6 – Interconversão da glutatona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR).



Fonte: Adaptado de Ballatori *et al.*, 2009.

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

3.4 Experimentos *in vitro*

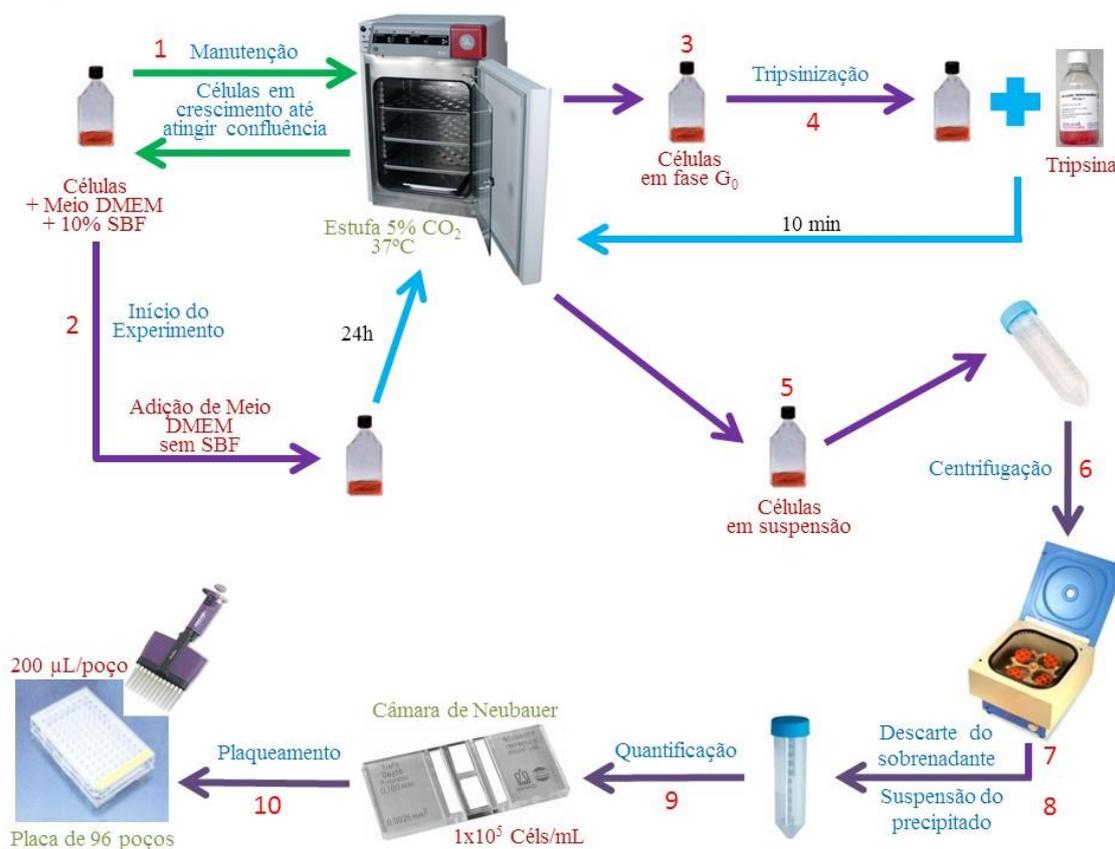
3.4.1 Cultura de células tubulares renais

As células epiteliais tubulares renais LLC-MK2 e HK2 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ até atingirem confluência (Butler e Dawson, 1992).

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos a 37 °C para deslocamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1mL de DMEM completo (adicionado de 10% de soro bovino fetal – SBF), e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio DMEM completo.

Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM completo. Para plaqueamento inicial dos experimentos, as células foram quantificadas e ajustada a concentração para 1x10⁵. Para quantificação, alíquotas foram removidas para contagem em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1x10⁵ células/mL em placas de 96 poços (figura 7).

Figura 7 – Esquema das etapas do cultivo e tratamento das células LLC-MK2 e HK2.



3.4.2 Grupos experimentais

Nesta fase da pesquisa, optou-se por estudar o efeito do BiVT sobre as linhagens celulares descritas anteriormente, bem como avaliar a participação das enzimas metaloproteinase e L-aminoácido oxidase sobre estes efeitos por meio de seu bloqueio com as enzimas fenantrolina e catalase, respectivamente. Desta forma, os grupos experimentais foram assim divididos:

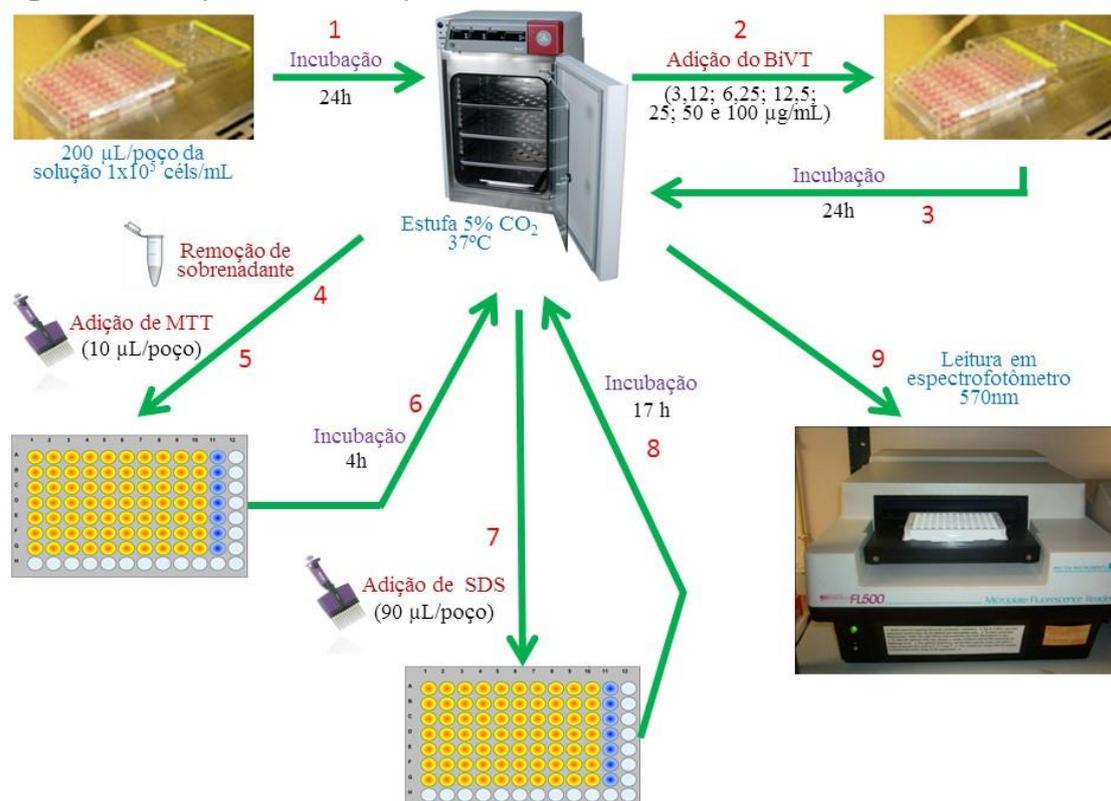
- Grupo controle: células tratadas apenas com o veículo de diluição do BiVT;
- Grupo de células tratadas com o BiVT isoladamente nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL;
- Grupo de células tratadas com o BiVT, na concentração da IC₅₀ encontrada, em associação com a enzima fenantrolina e;
- Grupo de células tratadas com o BiVT, na concentração da IC₅₀ encontrada, em associação com a enzima catalase.

3.4.3 Ensaio de viabilidade celular

Foi utilizado o teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para determinação da viabilidade das células em cultivo. O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica e viabilidade celular (Liu *et al.*, 1997; Mosmann, 1983).

As células plaqueadas foram tratadas e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 µL de sobrenadante foram removidos. Acrescentou-se 10 µL da solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, foram adicionados 90 µL de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm (figura 8).

Figura 8 – Esquema das etapas do ensaio de viabilidade celular.



3.4.4 Ensaios por citometria de fluxo

O protocolo de plaqueamento das células LLC-MK2 e HK2 em placas de 24 poços (1 mL/poço) bem como o tratamento com o BiVT na concentração da IC₅₀ isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase foram realizados como anteriormente descrito neste trabalho.

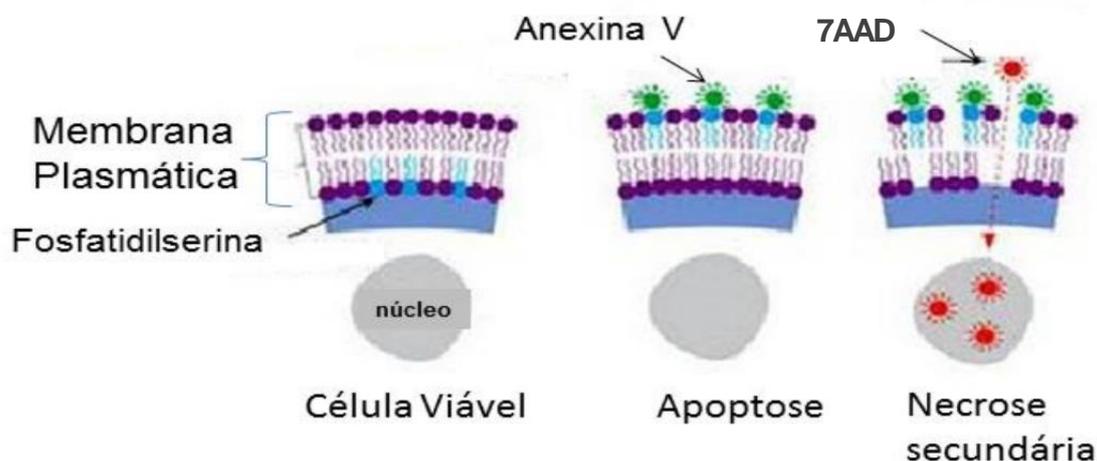
Previamente, a cada experimento de citometria de fluxo, as células foram tripsinizadas e lavadas por três centrifugações subsequentes na presença de tampão fosfato (PBS) a 4000 RPM por 5 minutos. Com o objetivo de excluir uma possível associação dos danos celulares ao tratamento, as análises também foram feitas em células cultivadas e tratadas em condições constantes de aerobiose (37 °C e 5% de CO_2).

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW resfriado a ar e operando em 488 nm.

3.4.4.1 Avaliação do perfil de morte celular por marcação com Anexina V/7-AAD

Este método baseia-se na detecção da fosfatidilserina (PS), que nas células apoptóticas se transloca do interior ao exterior da membrana plasmática. A anexina V é uma proteína anticoagulante vascular que possui uma grande afinidade pela fosfatidilserina. A anexina V pode ser conjugada com fluórocromos, permitindo a identificação das células apoptóticas através de sua ligação a fosfatidilserina na superfície celular. No entanto, a anexina V também é capaz de se ligar a PS no interior das células que não apresentam sua membrana plasmática intacta, consideradas como necróticas (Engeland *et al.*, 1998). Portanto, junto com a anexina, simultaneamente as células são incubadas com 7-AAD (7- Aminoactinomicina) um marcador que se internaliza somente nas células mortas que não possuem a membrana intacta e se intercala no DNA emitindo fluorescência (Figura 9). Este ensaio permite distinguir entre células viáveis (Anexina-; 7-AAD-), em apoptose (Anexina+; 7-AAD-), em apoptose tardia/necrose secundária (Anexina+; 7-AAD+) e em necrose (Anexina-; 7-AAD+).

Figura 9 – Esquema do ensaio de marcação com Anexina V/7-AAD.



Fonte: Adaptado de Engeland *et al.*, 1998.

Para este ensaio as células LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas do tratamento com o BiVT na concentração da IC50 isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase, o meio de cultura foi coletado e as células aderidas à placa foram lavadas com PBS e

tripsinizadas, e procedeu-se a marcação seguindo as instruções do fabricante Kit BD Pharmigen. Resumidamente, o “pellet” obtido após as lavagens e centrifugação foi ressuspenso em 100µL de tampão de ligação. Posteriormente, adicionou-se 5µL de AnnV e 5µL de 7-AAD e os tubos foram incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidos da luz, após este período adicionou-se 400 µL do tampão de ligação. Por último, os resultados foram analisados por citometria de fluxo (Cytomics FC de Beckman Coulter). A emissão de luz de excitação realizou-se a 488 nm com um laser de argônio. O sinal de AnnV-FITC (fluorescência verde) detectou-se a 518 nm e o sinal do IP (fluorescência vermelha) a 620nm. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9.

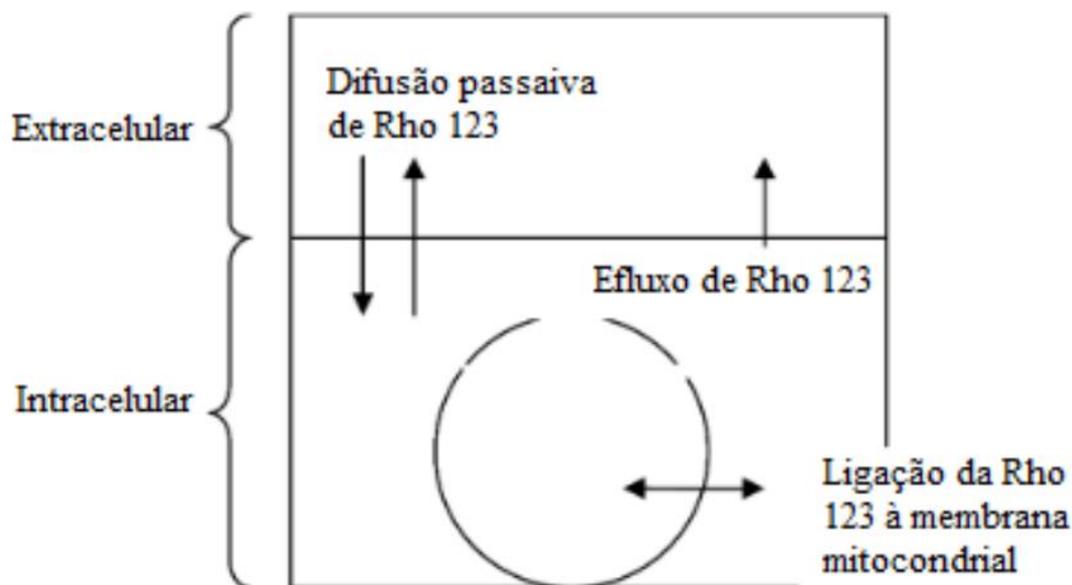
3.4.4.2 *Análise do potencial transmembrânico mitocondrial*

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado por meio da utilização do corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que marca, especificamente, a mitocôndria de células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência vermelha. Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (Johnson *et al.*, 1980) (Figura 10). Desta forma, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi mensurada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (Yang *et al.*, 2012).

As células LLC-MK2 e HK2 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas do tratamento com o BiVT na concentração da IC50 isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com Rodamina

123 (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo.

Figura 10 – Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123) e sua respectiva ligação à membrana mitocondrial funcional.

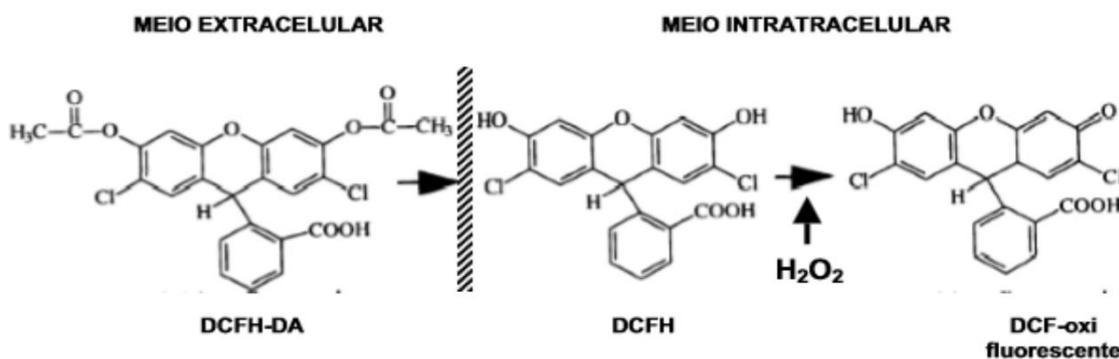


Fonte: Yang *et al.*, 2012.

3.4.4.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm (Figura 11). A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (Bass *et al.*, 1983).

Figura 11 – Princípio do ensaio de oxidação do DCFH ao DCFoxi fluorescente.



Fonte: Adaptado de Robinson, Carter, Narayanan, 1998.

Para a incorporação do DCFH no interior das células HK2, 5 μ L (concentração final 100 μ M) da solução estoque de DCFDA₂ carboxi-H em dimetilsulfóxido estéril (DMSO) foram adicionados aos poços da placa de 24 poços, contendo as células em cultivo, 24 horas após o tratamento com o BiVT na concentração da IC₅₀ isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase (Bass *et al.*, 1986). Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

3.5 Ensaio por microscopia confocal

Para as células LLC-MK2 também foi realizada a avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial através de microscopia Confocal. Para tanto, as células LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 horas do tratamento com o BiVT na concentração da IC₅₀ isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 μ g/mL) por meia-hora, em seguida foram montadas as lâminas e realizada a leitura no microscópio confocal ZEISS LSM 710.

3.6 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado test t de Student ou one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni quando apropriado. As correlações foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism5.0 (EUA).

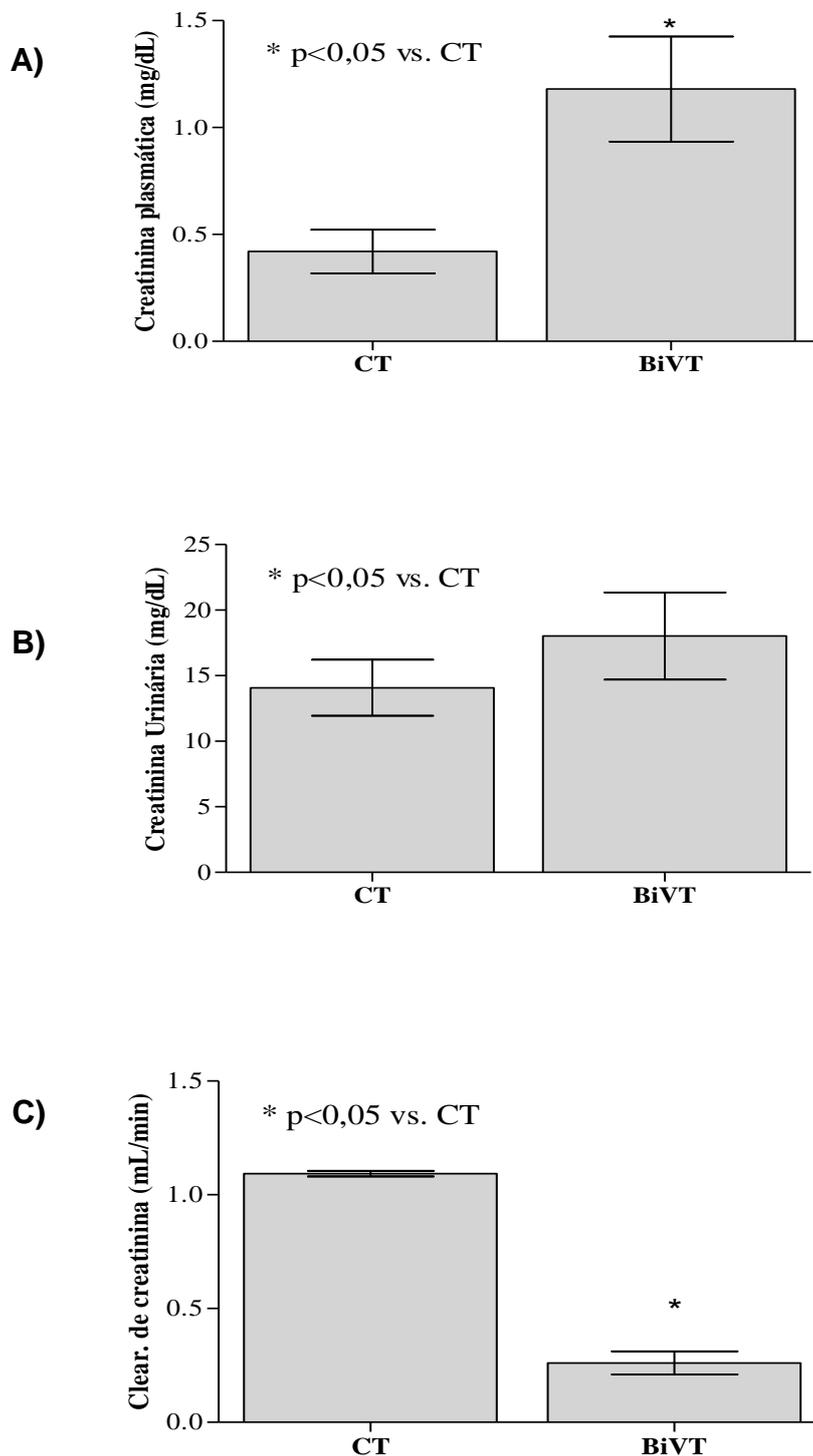
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos *in vivo*

Com o intuito de mensurar os níveis dos biomarcadores renais, bem como avaliar as alterações no tecido renal por meio de análise histológica após a exposição do BiVT, camundongos foram inoculados com 3,5 mg/Kg de BiVT ou com veículo de diluição. Após um período de 24 horas em gaiola metabólica, o sangue e a urina foram coletadas para mensuração dos níveis de creatinina plasmática e creatinina urinária, bem como do *clearance* de creatinina.

Foi observado um aumento da creatinina plasmática e uma redução do *clearance* de creatinina quando comparado o grupo tratado com o BiVT ao grupo controle (figuras 12A e 12C), o que pode inferir-se que estes dados são compatíveis com o estabelecimento de lesão renal aguda de acordo com a definição de Nunes *et al.* (2010). Não houve diferença estatística significativa na medida da creatinina urinária (figura 12B).

Figura 12 – Mensuração de biomarcadores clássicos de função renal.



Creatinina plasmática (A), creatinina urinária (B) e clearance de creatinina (C). Os experimentos foram realizados com n=5, e os dados expressos como concentração média \pm EPM ou volume médio por minuto \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado Teste t de Student. CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*.

O sistema renal tem a função de eliminar do corpo o material “indesejado” que não é mais necessário ao organismo. A remoção deste material acontece em intensidades variáveis por meio de um processo contínuo de filtração glomerular que pode atingir um fluxo de até 180 L/dia. Uma vez que o volume líquido do sangue é de cerca de 3 L, todo plasma é filtrado em média 60 vezes a cada 24 horas. Tal fato, torna o leito renal bastante vulnerável à ação local de toxinas presentes no sangue. Um provável exemplo disso é a lesão renal que se desenvolve após acidente botrópico e que se configura como a principal causa de morte dentre os pacientes que sobrevivem à ação da peçonha (Sgrignolli *et al.*, 2011).

Previamente, Braga (2006) demonstrou, em modelo de perfusão de rim isolado, redução da pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e redução dos transportes de sódio e cloreto após administração do BiVT.

Insuficiência renal aguda (IRA) tem sido definida como perda rápida da função renal, com azotemia (elevação de ureia e creatinina), entretanto, o termo lesão renal aguda (LRA) vem sendo proposto em substituição a IRA por ser mais amplo, abrangendo desde pequenas alterações na função renal até mudanças que necessitam de terapia de substituição renal (Nunes *et al.*, 2010).

As LRAs graves podem ser detectadas por meio de marcadores convencionais de função renal tais com ureia e creatinina, mas para detectar uma LRA leve é necessário um marcador mais sensível e específico que os marcadores de função renal tradicionais (Kaucsár, 2016). Um marcador ideal para as doenças renais deve ser específico para cada porção do néfron, permitindo a diferenciação das causas de LRA, bem como de lesão glomerular aguda, correlacionando-se a achados histológicos. Além disso, devem ter a capacidade de identificar as causas da LRA de forma precoce e predizer as futuras complicações através de métodos rápidos, fáceis, confiáveis, de baixo custo e não invasivos (Sabbisetti; Bonventre, 2012; Tesch, 2010). Uma das principais limitações que impedem o progresso clínico tem sido a incapacidade de prever, com precisão, e identificar precocemente a LRA (Peres, 2014).

Neste trabalho, buscou-se identificar um novo biomarcador associado a LRA que possa contribuir para detectar precocemente a suscetibilidade para o desenvolvimento de disfunção renal após acidente ofídico.

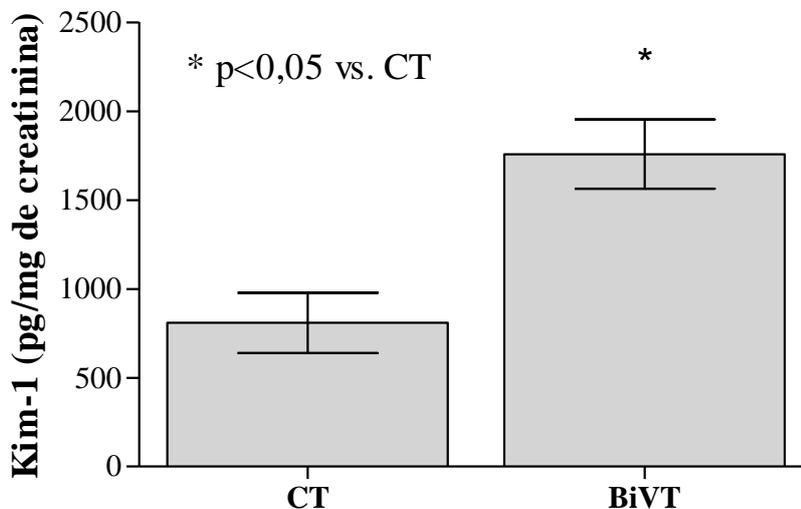
4.1.1 Nível urinário de KIM-1

A busca de novos biomarcadores capazes de detectar precocemente a lesão renal antes do desenvolvimento de LRA tem sido um grande desafio (McCullough *et al.*, 2013), eles podem fornecer importantes informações sobre o estado patológico e o local de origem da lesão, contribuindo para estratégias de manejo terapêutico, e descoberta de mecanismos fisiopatológicos (Sabbisetti; Bonventre, 2012). Os novos biomarcadores são agrupados como marcadores de lesão glomerular e lesão tubular, ou de acordo com o mecanismo de dano renal: estresse oxidativo, inflamação e fibrose renal (Sabbisetti; Bonventre, 2012; Tesch, 2010).

Os marcadores urinários podem ser proteínas ou enzimas expressas de forma constitutiva nas células tubulares renais ou podem ser marcadores induzíveis, isto é, produtos de genes cuja transcrição/tradução é ativada na lesão tubular como exemplos a gelatinase neutrofílica associada à lipocalina (NGAL), IL-18, a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e a molécula de lesão renal (KIM-1) (Koyner *et al.*, 2010; Lisowska-Myjak, 2010; Ko *et al.*, 2010).

No presente estudo, foram dosados os níveis de KIM-1 na urina de 24 horas dos animais mantidos em gaiola metabólica tratados com o BiVT (figura 13).

Figura 13 – Níveis urinários de KIM-1.



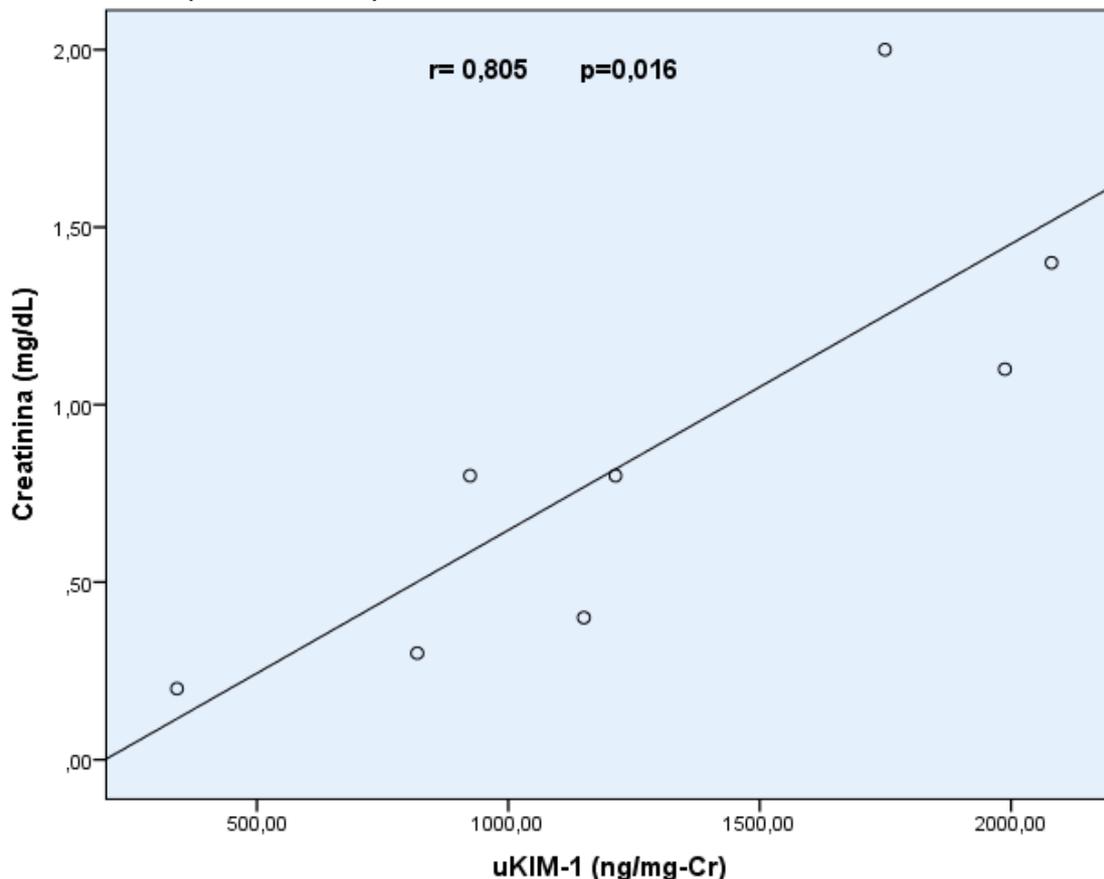
Os experimentos foram realizados com $n=5$, e os dados expressos como razão de massa de KIM-1 e creatinina urinária \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado Teste t de Student, $p<0,05$; CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*.

De acordo com análise da figura anteriormente exposta, vê-se que o BiVT elevou significativamente os níveis da KIM-1 sugerindo uma provável lesão renal tubular proximal.

Na correlação de Pearson, o KIM-1 teve uma correlação positiva com o indicador de LRA, a creatinina plasmática ($r = 0,805$, $p < 0,016$), como mostra a tabela a seguir.

A Figura 14 correlaciona a creatinina plasmática com o KIM-1 urinário, mostrando que ambos são diretamente proporcionais, ou seja, quanto maior o valor da creatinina, maior o valor do KIM-1.

Figura 14 – Correlação linear de Pearson entre KIM-1 urinário e creatinina plasmática de camundongos decorridas 24 horas de injeção intramuscular do veneno da serpente *Bothrops insularis*.



Tendo $r = 0,805$ e $p < 0,016$.

É importante reconhecer que alterações nas concentrações de creatinina e ureia séricas refletem principalmente mudanças funcionais em filtração e não são verdadeiros "marcadores de lesão renal". Sabe-se que a creatinina sofre influência da massa muscular e de outros fatores o que torna seu uso na detecção da lesão renal aguda, discutível. Ademais, a picada de serpente pode ocasionar lesão muscular local podendo alterar os níveis sérios deste marcador (Bonventre, 2009).

A KIM-1 é uma proteína do epitélio renal que atua convertendo as células tubulares proximais renais em fagócitos. Sua expressão não é mensurável nas células do túbulo proximal normal; entretanto, é marcadamente regulada por processos induzindo lesão e/ou desdiferenciação. Ela é altamente expressa no domínio apical da célula e seu ectodomínio é clivado e é estável, sendo excretada na urina. Sua presença na urina é altamente específica como um marcador não invasivo para lesão renal. Nenhum outro órgão tem sido

demonstrado como capaz de liberar KIM-1 em um nível que pudesse influenciar a excreção renal e tem sido mais sensível que a ureia e creatinina como um marcador para a lesão num grande número de estudos pré-clínicos com um largo número de insultos renais, incluindo diversas toxinas (Ichimura *et al.*, 2004; Van Timmeren *et al.*, 2006; Prozialeck *et al.*, 2007; Perez-Roja *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Jost *et al.*, 2009).

Foi recentemente demonstrado por Pedrosa (2015) que a KIM-1 urinária tem potencial para demonstrar LRA precocemente nos pacientes submetidos a quimioterapia nefrotóxica, além de prever recuperação completa ou não da LRA.

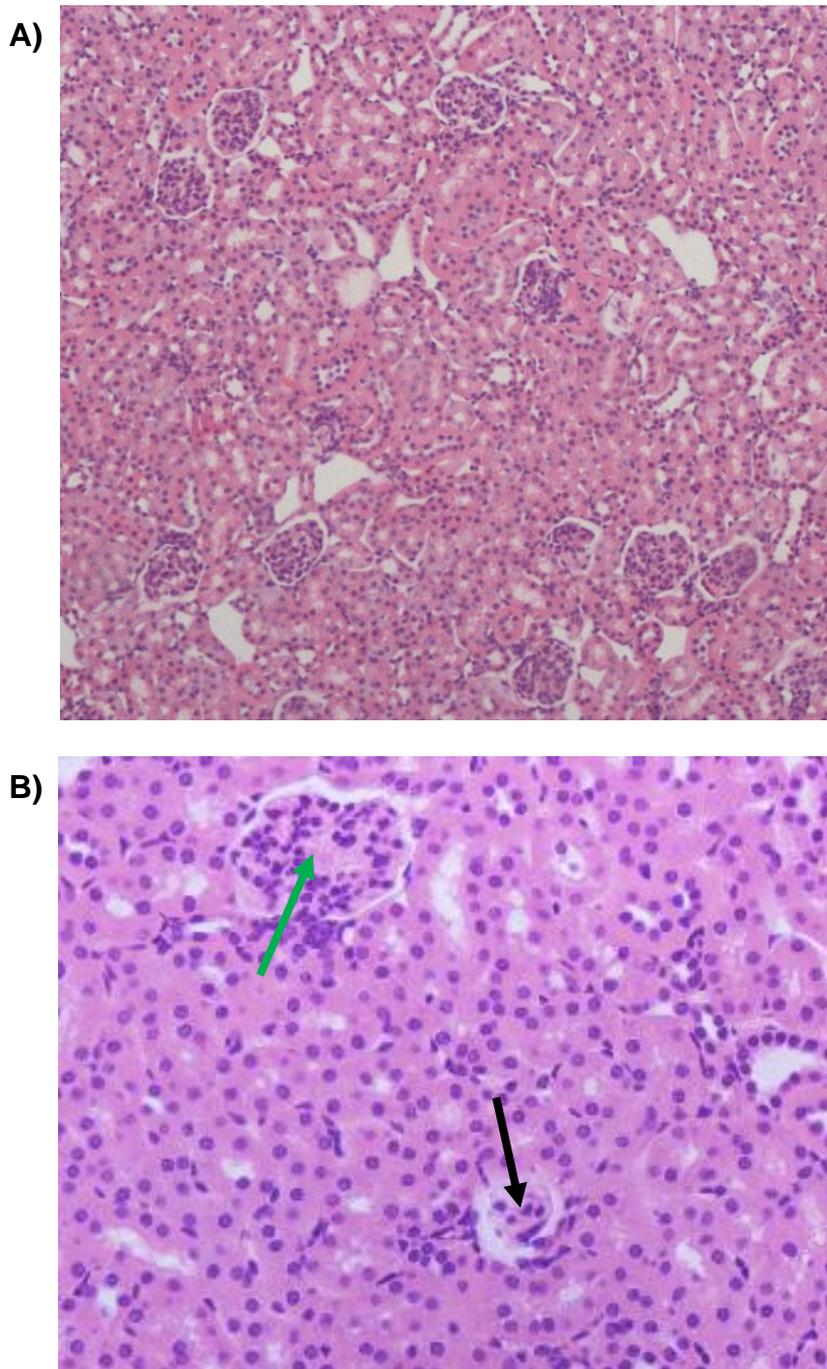
4.1.2 Análise histológica

O termo Lesão Renal Aguda (LRA) é utilizado para refletir todo o espectro de insuficiência renal aguda (IRA), reconhecendo que um declínio agudo da função renal é frequentemente secundário a uma lesão que provoca alterações funcionais ou estruturais nos rins (Fliser *et al.*, 2012).

Após a coleta do material biológico para determinação do marcador clássico e do novo biomarcador renal, os rins dos animais foram removidos e enviados para análise histológica com o intuito de correlacionar os resultados bioquímicos obtidos com a avaliação do dano tecidual renal direto induzido pelo BiVT.

Conforme observado nas figuras 15, 16, 17 e 18, não houve nenhuma alteração no tecido renal dos animais do grupo controle, enquanto nos grupos tratados foi observado no córtex renal, tumefação mesangial, degeneração e tumefação glomerulares, degeneração hidrópica, tumefação tubular, edema intersticial além de congestão e atrofia intraglomerulares. Na medula foram visualizadas as seguintes alterações: infiltração de células inflamatórias, pequenos vasos congestos, degeneração tubular hidrópica com secreção da proteína Tamm-Horsfall; e no interstício, presença de células inflamatórias. Esses dados sugerem toxicidade do BiVT sobre o tecido renal.

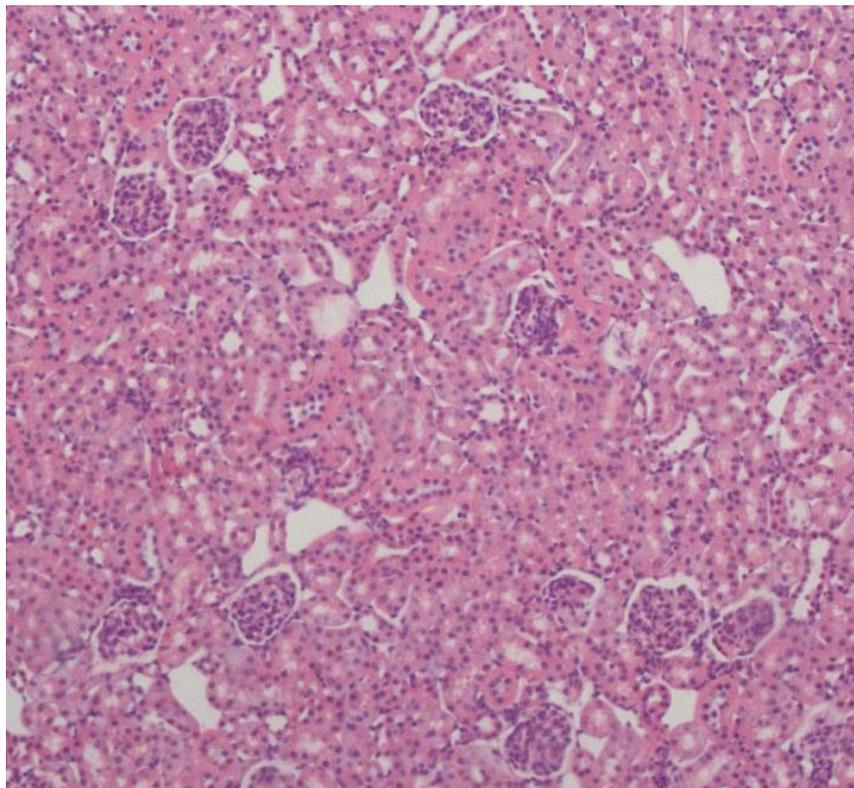
Figura 15 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops insularis* em rins de camundongos.



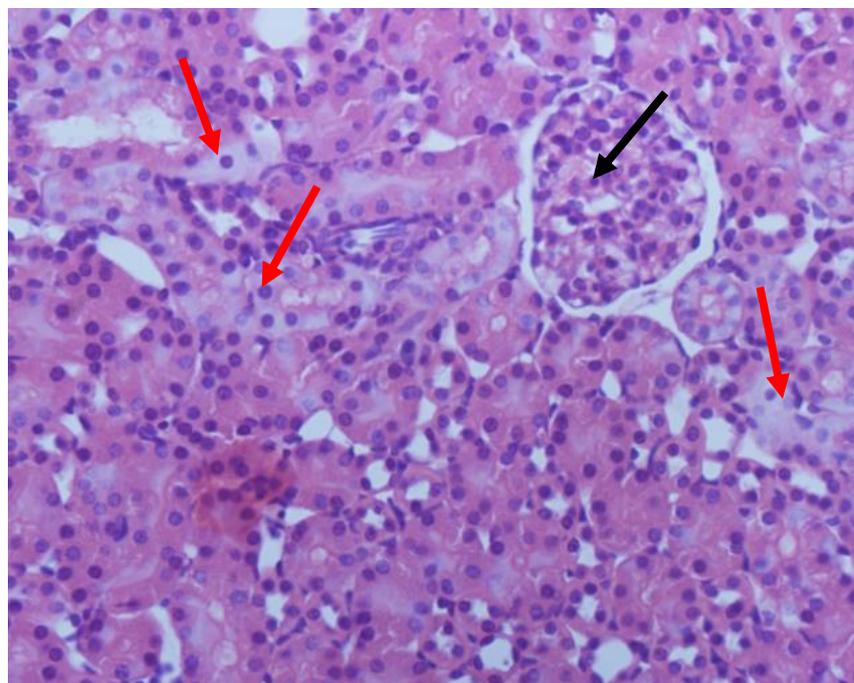
Legenda: (A) Grupo Controle mostrando córtex renal e glomérulos normais (aumento 100X); (B) grupo tratado com o BiVT mostrando atrofia glomerular – reduzido de tamanho (seta preta) e congestão glomerular – região mais eosinofílica (cor de rosa; seta verde). Coloração de Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0®.

Figura 16 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops insularis* em rins de camundongos.

A)

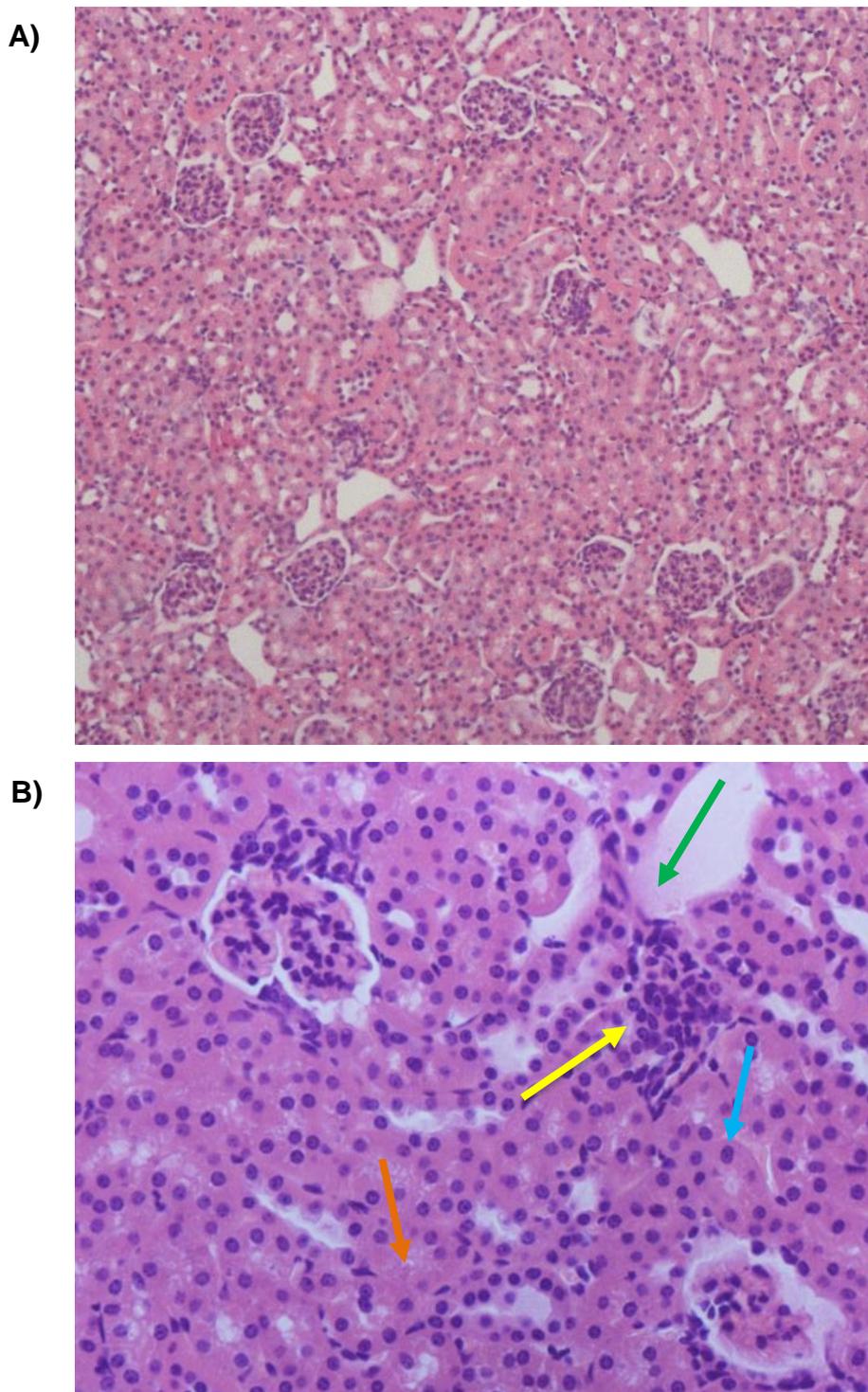


B)



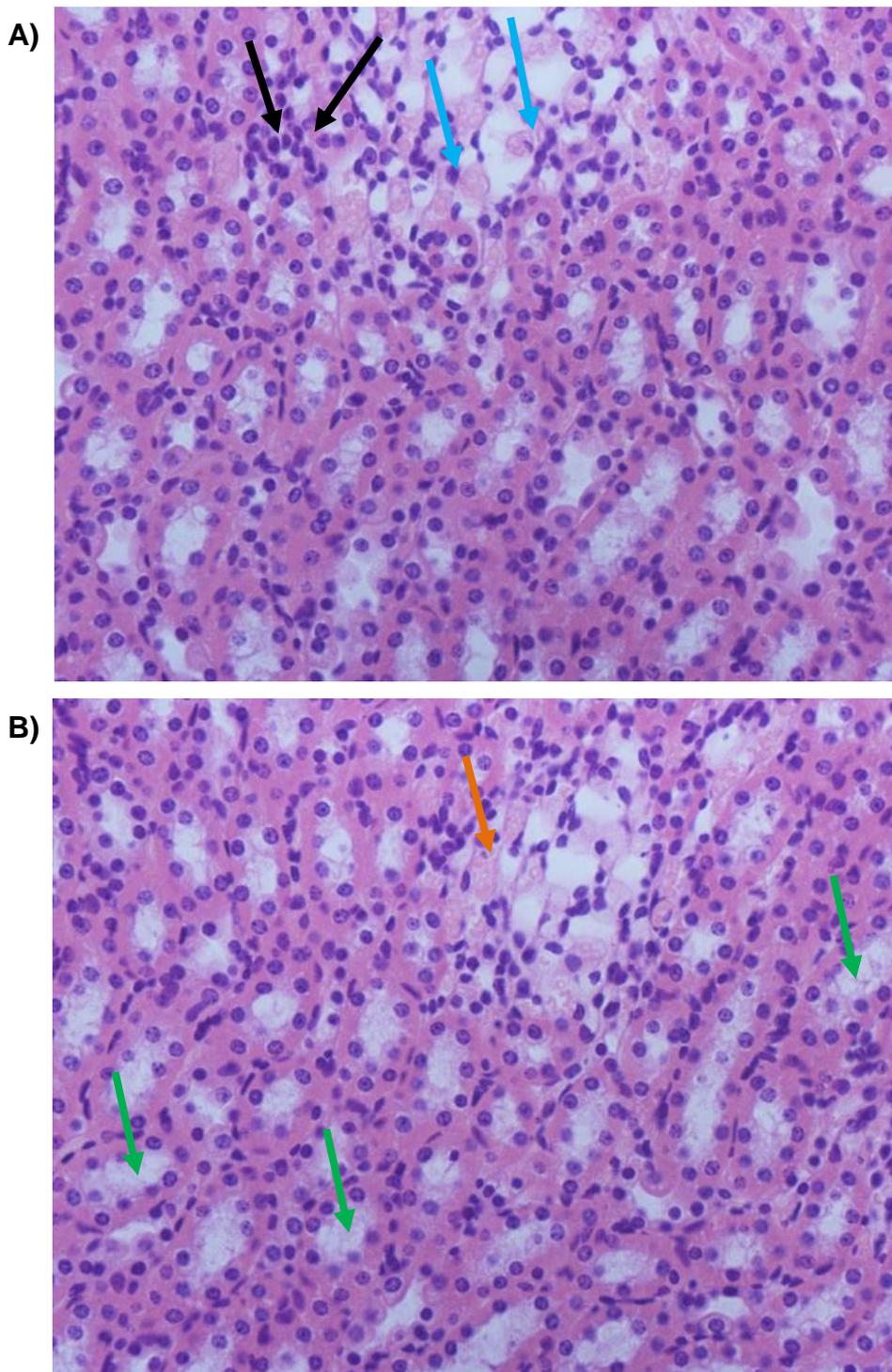
Legenda: (A) Grupo Controle mostrando córtex renal e glomérulos com arquitetura normais (aumento 100X) e (B) grupo tratados com o BiVT mostrando tumefação mesangial (dentro do glomérulo células mesangiais tumefeitas juntamente com o tufo de capilares; seta preta), degeneração hidrópica tubular (células tubulares com citoplasmas mais claros; setas vermelhas) Coloração de Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0®.

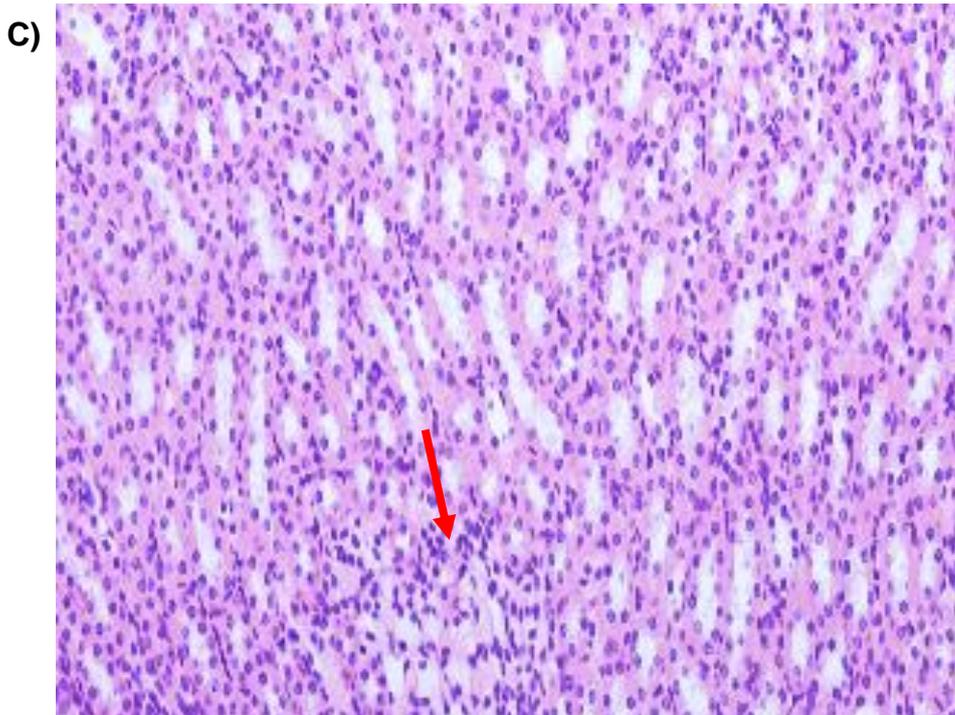
Figura 17 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops insularis* em rins de camundongos.



Legenda: (A) Grupo Controle mostrando córtex renal e glomérulos com arquitetura normais (aumento 100X) e (B) grupo tratado com o BiVT mostrando degeneração e tumefação glomerulares (seta azul), tumefação tubular (células tubulares inchadas ou edemaciadas com pouca luz tubular; seta laranja), edema intersticial (seta verde) e infiltrado intersticial (seta amarela). Coloração de Hematoxilina-Eosina, 400x. Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0[®].

Figura 18 – Fotomicrografia das alterações histológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops insularis* em rins de camundongos.





Legenda: (A) e (B) mostrando medula renal (aumento 400X) de grupos tratados com o BiVT com infiltrado de células inflamatórias (setas pretas), pequenos vasos congestionados (setas azuis), degeneração tubular hidrópica com secreção da proteína Tamm-Horsfall (setas verdes) e vasos congestionados (seta laranja); (C) mostrando interstício de grupos tratados com o BiVT (aumento 200X) com presença de infiltrado inflamatório (seta vermelha). Coloração de Hematoxilina-Eosina. Microscópio Nikon Eclipse Nis, Software Nis 4.0®.

Os rins são particularmente vulneráveis à ação de toxinas por causa de seu alto fluxo sanguíneo e sua capacidade de concentrar substâncias na urina. Alterações morfológicas celulares no rim podem ser provocadas por substâncias químicas, as quais são importantes causas de adaptações, lesão e morte celular (Arauco *et al.*, 2007).

A tumefação celular, também caracterizada como degeneração hidrópica ou vacuolar, edema celular ou inchaço turva, é consequência da entrada de água na célula devido a alteração da permeabilidade da membrana celular. O edema celular ocorre quando há alteração no equilíbrio iônico, com entrada de sódio, devido a diminuição na produção de energia (ATP), as células tornam-se levemente granuladas e vacuolizadas. Insuficiência de ATP pode ser decorrente de dano mitocondrial. A tumefação é um tipo de lesão que ocorre principalmente nos rins, fígado e miocárdio. Nos rins, os túbulos têm a luz diminuída e irregular, às vezes com o citoplasma danificado. A célula fica com volume aumentado, organelas espaçadas e núcleo intacto, sem deslocamento.

As células com núcleos pálidos ou fragmentados já estão sofrendo necrose. Macroscopicamente o rim fica com peso aumentado, e o parênquima torna-se saliente quando a cápsula é cortada. Em microscopia eletrônica é possível observar-se dilatação do retículo endoplasmático e mitocôndrias. Uma tumefação tardia pode ser observada no processo de morte celular por apoptose enquanto a tumefação precoce é observada na necrose (Ferrari, 2000).

Foi demonstrado que injeção intravenosa do veneno da *B. jararaca* causou extensos depósitos de trombos de fibrina e necrose tubular aguda (Burdmann *et al.*, 1993). Em ratos, a injeção do veneno total da *B. moojeni* causou injúria glomerular com mesangiólise, microaneurismas e alterações na membrana basal glomerular associada a proteinúria (Boer-lima, Gontijo, Cruz-hofling; 1999). Em rim isolado, o veneno da *B. insularis* alterou a arquitetura renal provocando focos de necrose tubular aguda, provavelmente por toxicidade direta (Braga, 2006).

A necrose tubular aguda é uma lesão irreversível do epitélio tubular renal (Alpers, 2005) com duas etiologias potenciais. A isquemia, nos casos de insuficiência circulatória renal como a que ocorre no choque hipovolêmico pela diminuição do fluxo sanguíneo renal; e a lesão tóxica direta do epitélio de revestimento tubular, no caso de intoxicações químicas, como nos envenenamentos (Kumar; Abbas; Fausto, 2005).

A proteína de Tamm-Horsfall é uma glicoproteína (mucoproteína), proteína matriz de vários cilindros, secretada pelas células tubulares distais e da alça de Henle, compreende cerca de um terço ou mais da excreção normal de proteínas na urina. Tendo em vista que a fisiopatologia da nefrotoxicidade é multifatorial, vários fatores contribuem para a deterioração da função renal como a obstrução tubular acarretada pela co-precipitação com as proteínas de Tamm-Horsfall (Andrade, Seguro, 1997).

Os cilindros encontrados na urina têm na sua composição a proteína de Tamm-Horsfall. A classificação dos cilindros é feita conforme sua composição e aparência à microscopia óptica sendo: hialinos, compostos apenas por proteínas de Tamm-Horsfall, ocorrem em desidratação, exercícios físicos intensos, ou associados à proteinúria glomerular; hemáticos, compostos de glóbulos vermelhos, mostrando origem glomerular, como nas glomerulonefrites e vasculites; algodonosos, compostos de leucócitos, como nas inflamações

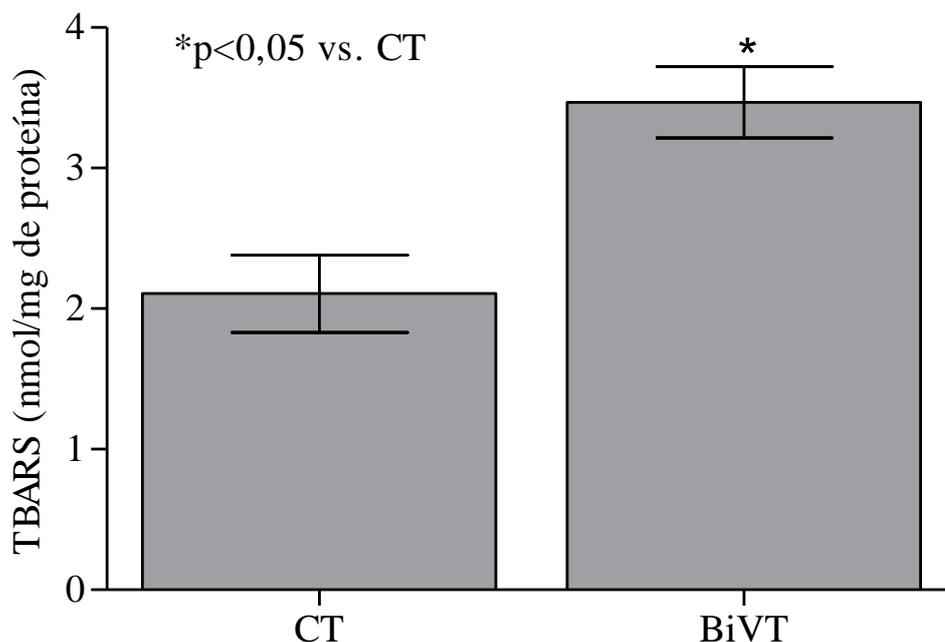
parenquimatosas; lipoides, ocorrem em casos de proteinúria maciça, como nas síndromes nefróticas; granulares, compostos por células epiteliais tubulares, restos celulares associados à debris, característicos de pacientes com necrose tubular aguda, lesão mais frequente na histologia após envenenamento botrópico (Martins; Scalabrini Neto; Velasco, 2006; Marrota *et al.*, 2008).

4.1.3 Avaliação de alterações no equilíbrio óxido-redutor no tecido renal

Os marcadores da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), estão elevados no plasma e na urina dos pacientes com insuficiência renal. O MDA faz parte das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS (do inglês: Thiobarbituric acid reactive substances), que são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica (Kil *et al.*, 2014). Desta forma, a concentração de Malondialdeído (MDA) no tecido renal foi determinada como um indicador da peroxidação lipídica utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Mihara *et al.*, 1980).

No presente trabalho, o BiVT aumentou significativamente os níveis de MDA no tecido renal em relação ao grupo controle, representando, portanto, um aumento da peroxidação lipídica neste sítio (figura 19). Em condições patológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas em quantidades excessivas, induzindo peroxidação lipídica, inativação de enzimas antioxidantes, quebra de DNA, ativação de leucócitos, danos em células endoteliais e produção de citocinas, fatores esses que contribuem para danos teciduais (Kim, Jang, Park, 2010).

Figura 19 – Níveis teciduais de malondialdeído.



Os experimentos foram realizados com $n=5$, e os dados expressos como razão de massa de MDA por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado Teste t de Student, $p<0,05$; CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*.

Os danos para as células tubulares renais causados por ERO são mediados por oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos no DNA e a consequente indução de morte celular (Ernani *et al.*, 2001). A lesão renal aumenta a transdução do sinal para produção de óxido nítrico (NO). Mesmo pequenas quantidades de NO produzida reagem rapidamente na presença de altas concentrações de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando o radical livre peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Os principais alvos dos EROs nas células são as proteínas contendo grupamento sulfidril, o DNA e os lipídios, principalmente aqueles constituintes da membrana fosfolipídica, resultando em aumento da permeabilidade celular e alteração da função renal com perda de sua arquitetura e função (Devarajan, 2006).

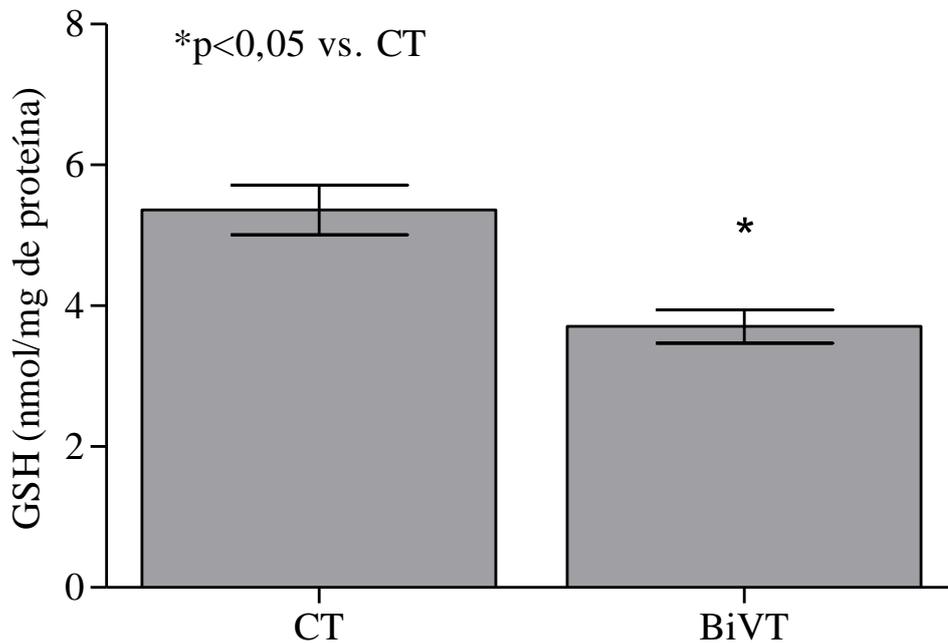
Radicais superóxidos e seus produtos de redução, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, principalmente, o radical hidroxila (OH^{\cdot}), são alguns dos responsáveis pela lesão celular, promovendo a peroxidação lipídica, com lesão das mitocôndrias, lisossomos, degradação do colágeno e da própria membrana celular, levando à morte das células (Bussmann *et al.*, 2014; Shimo

et al., 2011). Quando tais alterações se processam no tecido renal, promovem aumento da permeabilidade tubular com perda das funções de transporte, bem como redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e liberação inapropriada de enzimas líticas lisossômicas, que acelerariam o processo de degradação celular, com conseqüente diminuição da função renal (Ernani *et al.*, 2001; Bonventre, 1993), desta forma, o estresse oxidativo, que corresponde a produção de radicais livres sobrepujando a defesa antioxidante, provoca uma rápida degeneração da função da célula tubular renal.

Estudos recentes têm demonstrado que a formação de ERO desempenha um papel na fisiopatologia inicial da LRA. Níveis aumentados de TBARS após isquemia renal têm sido descritos como marcador de estresse oxidativo (Kadkhodaei *et al.*, 2014; Najafi *et al.*, 2014). No parênquima renal, células tubulares, células glomerulares e os macrófagos são geradores potenciais de EROs (Galle, 2001). Ademais, sabe-se que o envenenamento botrópico ativa uma cascata de liberação/ativação de mediadores inflamatórios no tecido renal, os quais podem amplificar a geração de EROs (Rodrigo; Rivera, 2002).

Baixas concentrações de GSH tecidual podem ser interpretadas como evidência de desequilíbrio redox (Wu *et al.*, 2004); portanto, o ensaio de dosagem da glutathiona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH – glutathiona peroxidase) é uma ferramenta utilizada para avaliar desequilíbrio redox em tecidos vivos. Neste trabalho, foi vista uma redução nos níveis de GSH em relação ao grupo controle, indicando uma possível redução da atividade enzimática antioxidante no tecido renal após envenenamento botrópico (figura 20).

Figura 20 – Níveis teciduais de glutathiona peroxidase.



Os experimentos foram realizados com $n=5$, e os dados expressos como razão de massa de GSH por grama de tecido \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado Teste t de Student, $p<0,05$; CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*.

Algumas situações geradoras de estresse oxidativo incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por microorganismos, hiperóxia, alguns xenobióticos, radiação ionizante, isquemia e exercício físico extenuante. Ongajooth *et al.* (1996) avaliaram a peroxidação lipídica, a concentração de elementos traço de enzimas antioxidantes em pacientes urêmicos, com diferentes níveis de creatinina sérica e observaram que os níveis de MDA estavam aumentados nos pacientes urêmicos e que a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e catalase estava reduzida, bem como os níveis de zinco e vitamina E, o que sugere a presença de um estresse oxidativo na falência renal.

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG (Glutathiona oxidada) e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. A proporção entre as duas espécies

(GSH/GSSG), reflete a capacidade da célula em responder ao ataque oxidativo (Janiques *et al.*, 2014).

Yoshimura *et al.* (1996) verificaram uma redução nos níveis de RNAm da GSH-Px e correlacionaram este fato à falência renal. A peroxidação lipídica persiste com a evolução da doença renal (Biasioli *et al.*, 1996). Lucchi *et al.* (1993) observaram que pacientes com reduzida depuração de creatinina apresentaram maiores níveis de dienos conjugados no plasma e tecido adiposo, mostrando que há um aumento do estresse oxidativo com a progressão da doença. Pinto *et al.* (2012) mostraram que há participação da liberação de mediadores inflamatórios e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células tubulares na LRA induzida pela sepse além de lesão endotelial com disfunção hemodinâmica, caracterizando-se como uma associação de vasoconstrição renal de origem hemodinâmica e inflamatória. Efeitos semelhantes podem ser observados no acidente botrópico com alterações hemodinâmicas como resultado do sequestro de fluidos para o local da picada, de sangramento ou da liberação de substâncias vasoativas como os mediadores inflamatórios (Pinho; Yu; Burdmann, 2008).

Além das EROs promoverem respostas inflamatórias agudas e crônicas, também atuam nas ações hemodinâmicas renais, prejudicando as propriedades de permeabilidade glomerular seletiva, induzindo respostas de crescimento desordenado ou aberrante, causando a perda do fenótipo celular e apoptose (Ferreira, 1994; Yu, 1994).

4.2 Experimentos *in vitro*

Braga (2006), estudando os efeitos do BiVT em modelo de rim isolado, observou que houve uma redução nos parâmetros eletrolíticos relativos ao sódio e ao cloreto; e queda no clearance osmótico. Uma vez que a reabsorção dos eletrólitos se dá mais ao nível de túbulo proximal, foram utilizadas, neste estudo, duas linhagens de células renais do túbulo proximal; LLC-MK2, células tubulares proximais de macaco Rhesus, e HK2, células imortalizadas do túbulo proximal renal humano.

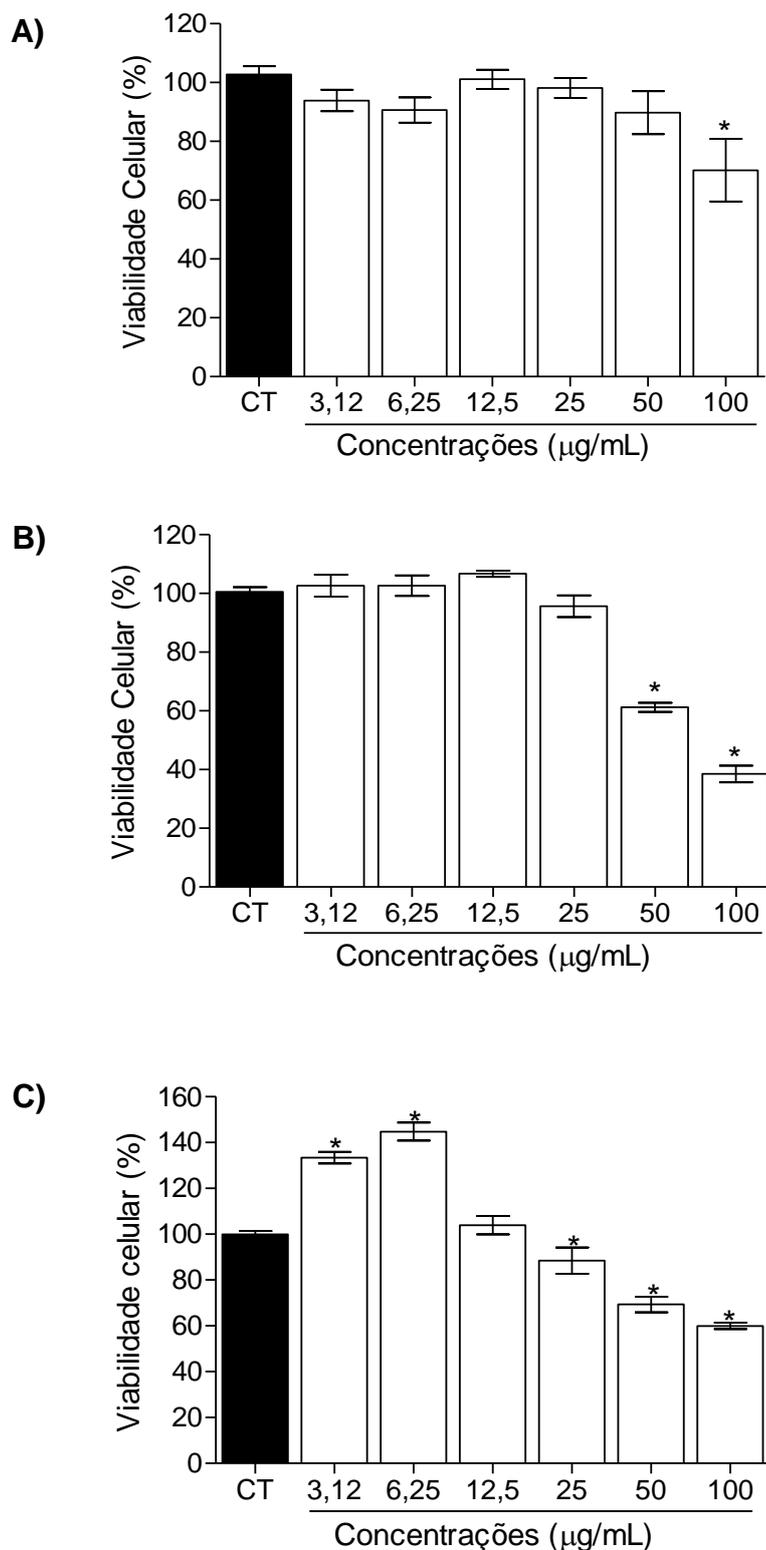
4.2.1 Ensaios Com Células LLC-MK2

A linhagem de células LLC-MK2, estabelecida em 1955 (Hull; Cherry; Tritch, 1962), corresponde a células epiteliais de rim macaco Rhesus (*Macaca mulata*). Estas células constituem uma linhagem com características morfológicas e funcionais semelhantes às células de túbulo proximal de mamíferos e têm sido muito utilizadas na investigação de uma variedade de processos celulares, incluindo o transporte epitelial e resposta celular a agentes tóxicos.

4.2.1.1 Avaliação de Viabilidade Celular

As células LLC-MK2 foram cultivadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ céls/mL e tratadas com o BiVT nas seguintes concentrações: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A atividade citotóxica foi avaliada pelo ensaio de MTT decorridas 06, 12 e 24 horas após incubação das células com as substâncias em estudo (figura 21).

Figura 21 – Efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células LLC-MK2.



Viabilidade celular após 6 (A), 12 (B) e 24 horas (C) de incubação como o BiVT. Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05; CT = controle negativo.

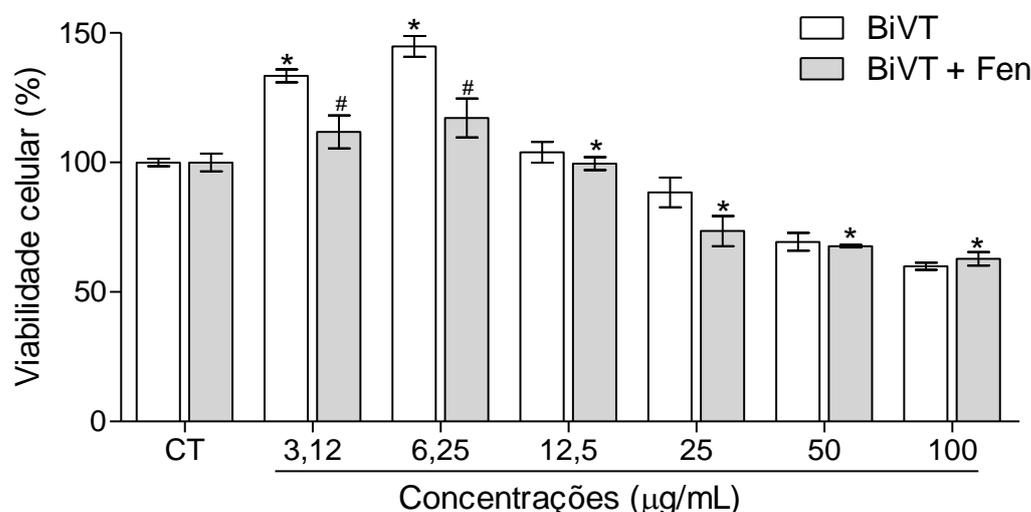
O BiVT apresentou efeito citotóxico, caracterizado pela redução significativa da viabilidade celular, na concentração de 100 µg/mL após 6 horas de incubação, com IC₅₀ = 164,00 (Figura 21A). Após 12 horas de incubação o mesmo efeito foi observado nas concentrações 50 e 100 µg/mL com IC₅₀ = 67,03 (Figura 21B). Decorridas 24 horas de incubação, a citotoxicidade foi vista nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL com IC₅₀ = 116,20 (Figura 21C), sendo observado também um aumento do percentual de viabilidade das células nas concentrações de 3,12 e 6,25 µg/mL quando comparada ao grupo controle. Estes resultados corroboram aqueles encontrados na avaliação dos efeitos do BiVT *in vivo* expostos anteriormente.

O modo de ação do veneno de serpentes tem sido caracterizado com base em estudos das citotoxinas que o constituem. Estas citotoxinas apresentam vários efeitos fisiológicos, os quais são principalmente regulados para modificar a estrutura e função da membrana celular, entretanto esta modificação pode gerar danos irreversíveis e ocasionar a morte da célula (Gasnov; Dagda; Rael, 2014).

Em análise transcriptômica do veneno total da serpente *Bothrops insularis*, entre as frações identificadas, a metaloproteinase corresponde à maior parcela, representando um percentual de 23,30% do veneno total (Valente *et al.*, 2009).

No presente trabalho, avaliamos a participação desta fração na citotoxicidade do BiVT sobre a linhagem celular renal LLC-MK2. Para tanto, incubou-se estas células durante um período de 24 horas, nas mesmas condições e concentrações descritas anteriormente, com o BiVT em associação com a enzima fenantrolina, um inibidor específico da metaloprotease (Figura 22). De acordo com a figura 22, a adição de fenantrolina não foi capaz de bloquear o efeito citotóxico do mesmo.

Figura 22 – Ação da fenantrolina sobre o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células LLC-MK2.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina.

A matriz extracelular (MEC) é uma mistura de macromoléculas como colágeno, proteoglicano, fibras elásticas e glicoproteínas não-colagênicas, que são automodeláveis e oferecem suporte mecânico para órgãos e tecidos. É a MEC que, dependendo do contexto, controla diferentes processos celulares como o crescimento, morte, migração, adesão, expressão gênica e diferenciação. Estes eventos participam dos processos fisiológicos como o embrionário, formação tecidual, angiogênese, transformação e metástases em processos tumorais e seu controle é feito através de um sinal de transdução da MEC para as células, o qual mediado por receptores de integrina que desempenham um papel chave na organização dos componentes do citoesqueleto. Por conseguinte, uma alteração importante na adesão focal induz uma variedade de respostas celulares, que podem levar à morte celular programada. Assim, a presença de proteases exógenas que degradam a matriz extracelular pode resultar em citotoxicidade celular (Corrêa, 2005; Sanchez *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2012). Entretanto, o bloqueio da ação desta enzima não alterou a citotoxicidade do BiVT.

Metaloproteinases isolados a partir de venenos de serpentes (MPVS) também podem degradar as proteínas da MEC e interferem em vários processos

interativos entre as células e a matriz extracelular, por meio da inibição de receptores de integrina. MPVS são responsáveis por alguns dos efeitos locais e sistêmicos da peçonha que estão relacionados à proteólise dos principais componentes da matriz extracelular. Contudo, a atividade desta enzima não se limita a uma simples alteração física da matriz, uma vez que, ao clivar as proteínas que a constituem, as MMPs são capazes de expor domínios críticos e liberar peptídeos biologicamente ativos que direcionam o comportamento celular (Vu, 2001; McCawley; Matrisian, 2001; Mott & Werb, 2004; Furtado; Nepomuceno, 2012).

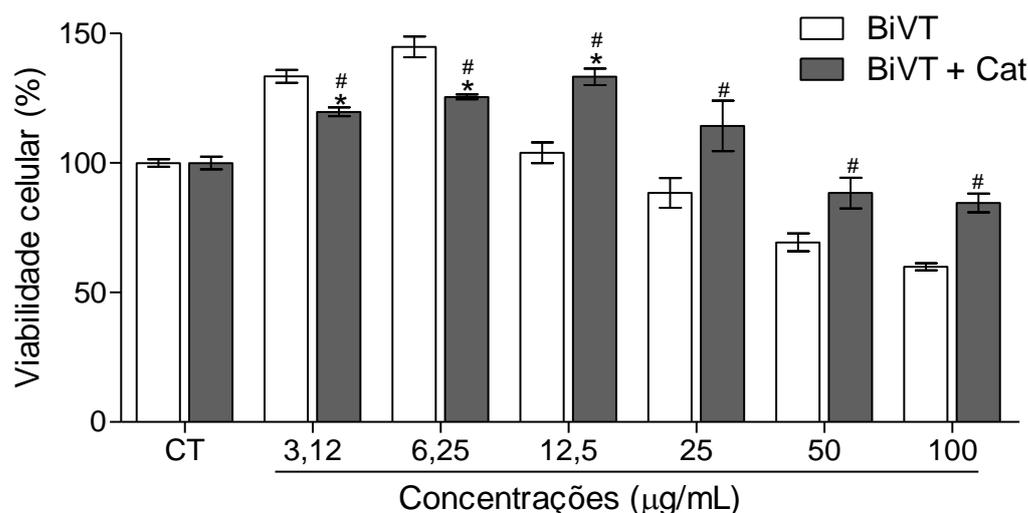
Oliveira (2008) avaliou a expressão de MMP durante os processos de degeneração e regeneração do músculo gastrocnêmico após indução de inflamação e lesão tecidual local por uma miotoxina isolada do veneno da serpente *Bothrops pauloensis*. Seus resultados mostraram que houve um aumento na expressão da MMP e esta enzima parecia estar agindo como um estímulo pró-inflamatório, induzindo a produção e liberação de citocinas pelas células inflamatórias e pelas células satélite, o que representa um importante papel no processo inflamatório e, conseqüentemente, na evolução da lesão tecidual local e da regeneração. Foi observado também, neste trabalho, que a fenantrolina promoveu um bloqueio do aumento da viabilidade celular induzida por baixas concentrações do BiVT (figura 22).

Outro componente citotóxico importante dos venenos de serpentes é a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO). Entretanto, a função biológica exata das LAAOs isoladas de venenos de serpentes não está totalmente esclarecida. Elas parecem estar envolvidas na resposta alérgica inflamatória e especificamente associadas a danos em células endoteliais de mamíferos. Tem sido demonstrado também sua ação bactericida, leishmanicida, citotóxica contra células tumorais, efeitos na agregação plaquetária, edema e indução de apoptose (Stabéli *et al.*, 2004; Izidoro *et al.*, 2006; Izidoro *et al.*, 2014).

Em algumas espécies de serpentes a LAAO constitui mais de 30% do total de proteínas presente no veneno (Zeler, 1977; Ponnudari, Chung, Tan, 1994). Embora a fração LAAO corresponda a uma percentagem menor que 2% da composição do BiVT (Valente *et al.*, 2009), optou-se por avaliar sua participação nos efeitos descritos do BiVT sobre as células LLC-MK2 uma vez que Braga (2006) demonstrou uma importante ação desta enzima na atividade

tóxica do BiVT em modelo de rim isolado. Para tanto, incubou-se estas células com o veneno total na presença da enzima catalase que é um inibidor da fração LAAO. Utilizou-se as mesmas concentrações descritas anteriormente por um período de incubação de 24 horas (figura 23).

Figura 23 – Ação da catalase sobre o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células LLC-MK2.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Cat = catalase.

Neste grupo experimental, houve uma redução significativa da atividade citotóxica do veneno total e redução da proliferação celular observada nas menores concentrações estudadas do BiVT.

Conforme citado anteriormente, Braga (2006) observou que a fração LAAO do BiVT, dentre outras estudadas, foi a que apresentou um efeito mais próximo daquele produzido pelo veneno bruto em modelo de rim isolado, com redução dos parâmetros vasculares, funcionais renais, da reabsorção de eletrólitos e do clearance osmótico em modelo de rim isolado, além da moderada produção de necrose tubular aguda caracterizando seu papel importante na atividade tóxica do BiVT. O mesmo autor cita ainda que estes efeitos podem estar relacionados à atividade da LAAO em promover a liberação de H₂O₂ – uma espécie reativa de oxigênio – e seus mediadores, associada à sua capacidade

de promover apoptose, uma vez que esta teria a mesma representação morfológica da necrose tubular aguda.

Diversas LAAOs têm sido purificadas e caracterizadas e a análise das mesmas tem revelado diferenças entre seu peso molecular, substrato de ação, interação plaquetária, indução de hemorragia, apoptose e outras características (Tempone *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2000). Foi demonstrado que LAAOs isoladas de veneno de serpentes são capazes de induzir morte celular por necrose e apoptose, quando incubadas com células em meio de cultura (Wei *et al.*, 2007) ou ainda por depleção da concentração de aminoácidos essenciais do meio de cultivo (Ande *et al.*, 2006). Apesar destas diferenças, alguns autores afirmam que o mecanismo geral de toxicidade destas enzimas está baseado na geração de quantidades citotóxicas de H₂O₂ (Torii; Naito; Tsuruo, 1997). Foi também observado que células submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio podem ativar proteínas do choque térmico e iniciar uma desorganização da membrana e/ou citoplasma celular, fragmentação do DNA, apoptose e, por conseguinte, morte celular (Izidoro *et al.*, 2006; Izidoro, 2007).

A produção de EROs após dano celular pode ser um dos fatores de indução de lesão irreversível e morte das células. Entretanto, nestas, há um sistema de defesa antioxidante constituído por sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Galle, 2001). Os sistemas enzimáticos incluem enzimas como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras que agem especificamente contra EROs através de reações em cadeia culminando na redução da ocorrência de danos oxidativos (Razvickas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2004). Desta forma, pode-se sugerir que a enzima catalase quando incubada com o BiVT promoveu um efeito citoprotetor por bloquear a ação da fração LAAO. Estes resultados evidenciam a provável participação da fração LAAO no mecanismo de citotoxicidade do BiVT.

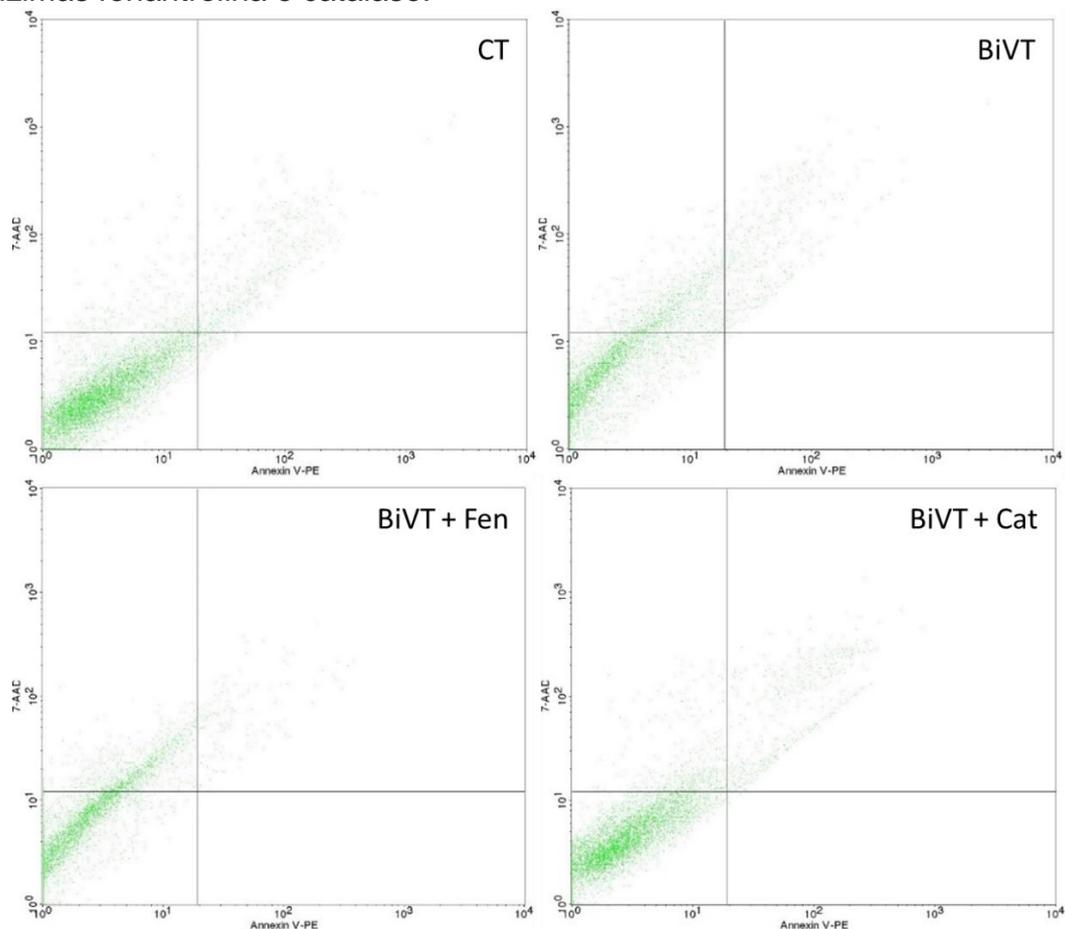
4.2.1.2 Avaliação do Perfil de Morte Celular

Para determinar as alterações induzidas pelo BiVT nas células LLC-MK2, foi realizada a detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana utilizando como marcadores, respectivamente, Anexina V-FITC e 7-AAD (7-Aminoactinomicina) por meio de leitura em

citometria de fluxo. Este é um método de análise de partículas, as quais passam individualmente por um feixe de luz, permitindo a verificação de diversos parâmetros, tanto morfológicos quanto funcionais, a partir da ocorrência de dispersão da luz e emissão de fluorescência de comprimento de onda específico.

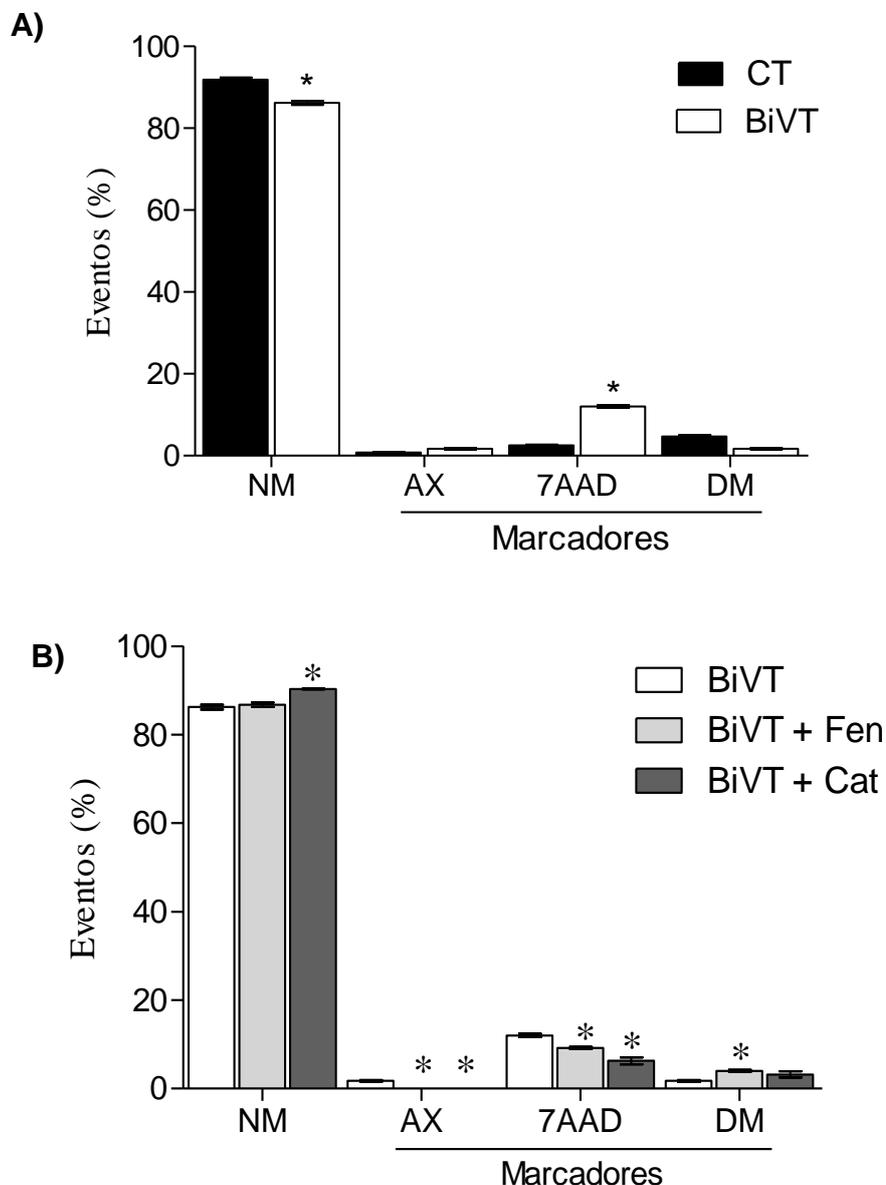
Após um período de 24 horas de exposição ao veneno, as células foram submetidas à análise no citômetro. A concentração do veneno utilizada foi aquela obtida como IC50 (116,20 µg/mL) pelo método de MTT após 24 horas incubação destas células com o mesmo (figuras 24 e 25). Para avaliar a participação da fração MPVS e LAAO nos resultados obtidos, incubou-se o BiVT em associação com as enzimas fenantrolina e catalase, respectivamente.

Figura 24 – Dotplot do efeito do veneno de *Bothrops insularis* sobre células LLC-MK2, determinado por citometria de fluxo, na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Legenda: Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-FITC. Controle positivo foi tratado com ciclofosfamida 200µg/mL; CT = controle positivo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Figura 25 – Efeito do veneno de *Bothrops insularis* sobre a externalização da fosfatidilserina em células LLC-MK2, determinado por citometria de fluxo, na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



A) Comparação do percentual de células marcadas com o 7-AAD, anexina V-FITC e a dupla marcação do grupo controle em relação ao grupo tratado com o BiVT. B) Comparação do percentual de células marcadas com o 7-AAD, anexina e a dupla marcação do grupo tratado com o BiVT isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase. Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs BiVT. As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Culturas tratadas com ciclofosfamida (200 μ g/mL) foram utilizadas como controle positivo na indução de apoptose; NM = não marcadas, CT = controle positivo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase, DM = dupla marcação.

Em células tratadas com o BiVT foi verificado um aumento significativo em relação ao grupo controle do percentual de células marcadas por 7-AAD, dado que sugere que houve perda de permeabilidade da membrana e morte celular por necrose. Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle quando da marcação isolada com Anexina V-FITC nem da dupla marcação com Anexina V-FITC e 7-AAD (figura 25A).

No grupo tratado com BiVT na presença da fenantrolina houve redução das marcações isoladas com Anexina V-FITC e 7-AAD e aumento da dupla marcação em relação ao grupo tratado apenas com o BiVT. Este resultado sugere uma mudança no perfil de morte celular de necrose para a associação de necrose com apoptose tardia (figura 25B).

Para o grupo tratado com o BiVT na presença da catalase, foi observada redução das marcações isoladas com Anexina V-FITC e 7-AAD, sem alteração significativa da dupla marcação quando comparado ao grupo tratado apenas com o BiVT, não havendo, portanto, mudança no perfil de morte celular, evidenciando ainda um perfil de morte celular apenas necrótico, embora tenha sido observada uma diminuição da citotoxicidade do BiVT (figura 25B).

A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico, normalmente mantido no folheto interno, o lado citosólico, das membranas celulares, por uma enzima denominada translocase aminofosfolipídeo ATP. Quando uma célula sofre uma lesão que induz um processo de morte celular por apoptose, este inicia-se pela translocação da fosfatidilserina para a face externa da membrana celular. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose – enquanto a membrana celular continua intacta – até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (Engeland *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V são evidências de apoptose (Mochizuki *et al.*, 2003). A fosfatidilserina no folheto externo na membrana plasmática inicia uma cascata para que a fagocitose ocorra, impedindo a lise celular e a liberação de antígenos intracelulares, evitando desta forma, uma resposta inflamatória.

O 7-AAD é um corante vital que se liga ao DNA das células, no entanto, é incapaz de penetrar em membrana celular íntegra. Uma vez que no processo de necrose há perda da integridade da membrana celular, o aparecimento de células marcadas unicamente com 7-AAD indica um perfil de

morte celular por necrose. Contudo, células em processo de apoptose tardia são marcadas duplamente por anexina V e 7-AAD visto que se encontram no estágio final de desintegração celular.

A resposta à injúria de células túbulo-intersticiais em muitas formas de doença renal inclui alteração no número celular (alteração na relação morte/proliferação celular) e hipertrofia (Shankland; Wolf, 2000). Diferentes padrões de morte celular podem estar envolvidos no processo de citotoxicidade induzida por venenos. O conhecimento dos mecanismos citotóxicos dessas substâncias é de grande importância no entendimento da fisiopatologia dos acidentes ofídicos e de suas complicações sistêmicas. A elucidação desses mecanismos permite a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização podendo auxiliar no diagnóstico precoce bem como no desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas mais eficazes (Garcia; Lewis, 2003).

A citotoxicidade de venenos botrópicos foi demonstrada em outras linhagens celulares. Em estudos feitos por Jorge *et al.* (2011), o veneno da *B. pauloensis*, *B. diporus* e *B. pirajai* apresentaram atividade citotóxica em células tumorais, sendo o mecanismo citotóxico relacionado tanto a necrose como apoptose. Avaliando a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus* em células MDCK, Nascimento *et al.* (2007) verificaram redução da viabilidade celular, cujo mecanismo de morte celular deu-se predominantemente por necrose e possivelmente através da ação das espécies reativas de oxigênio.

Segundo Ande *et al.* (2006) os mecanismos de citotoxicidade induzidos pelas LAAOs envolvem apoptose, necrose ou ainda depleção da concentração de aminoácidos essenciais do meio de cultura. O mecanismo de apoptose estaria relacionado com o desenvolvimento de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares que levariam a célula à morte, já o processo de necrose estaria relacionado com a ação direta do peróxido de hidrogênio sobre a membrana plasmática da célula.

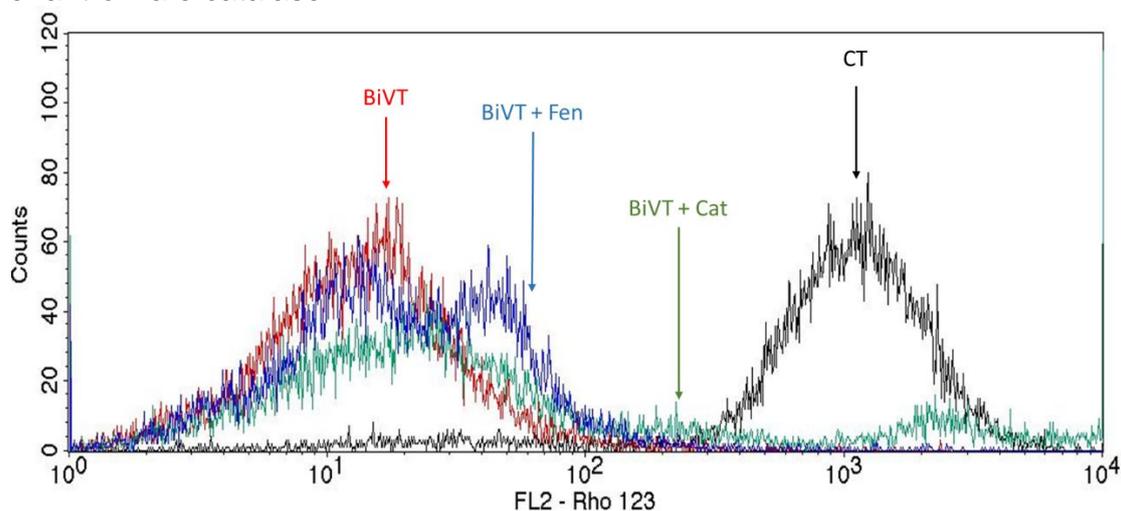
O mecanismo geral de toxicidade associado à LAAO está baseado na geração de quantidades citotóxicas de H₂O₂, um tipo de espécie reativa de oxigênio (Torii; Naito; Tsuruo, 1997). Previamente foi demonstrado, neste estudo, que houve aumento das EROs em tecido renal de camundongos após

injeção intramuscular do BiVT, corroborando os achados com as células LLC-MK2.

4.2.1.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Nesse ensaio, as células foram tratadas com o BiVT (116,20 µg/mL) na ausência e na presença das enzimas fenatrolina e catalase para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (figuras 26, 27 e 28). Em seguida foram incubadas com a rodamina 123 (Rho 123), corante fluorescente específico que se acumula especificamente no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis. A redução da emissão de fluorescência na organela é indicativa de diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o qual é uma característica sugestiva da ocorrência de apoptose pela via intrínseca, levando a uma redução do acúmulo de Rho 123.

Figura 26 – Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células LLC-MK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.

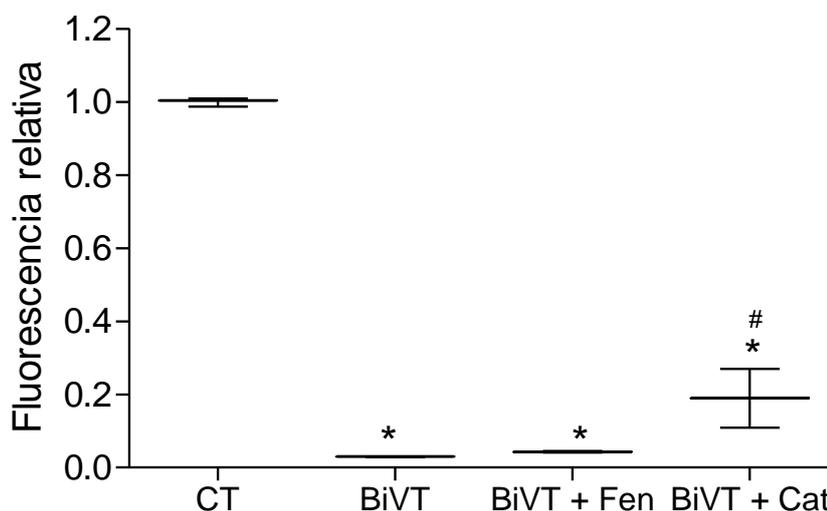


Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência. CT = controle positivo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Na figura 26 foi verificada uma redução da emissão de fluorescência quando comparados os grupos tratados ao grupo controle; pela análise da figura 27 foi evidenciado que esta redução é estatisticamente significativa. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com o BiVT associado

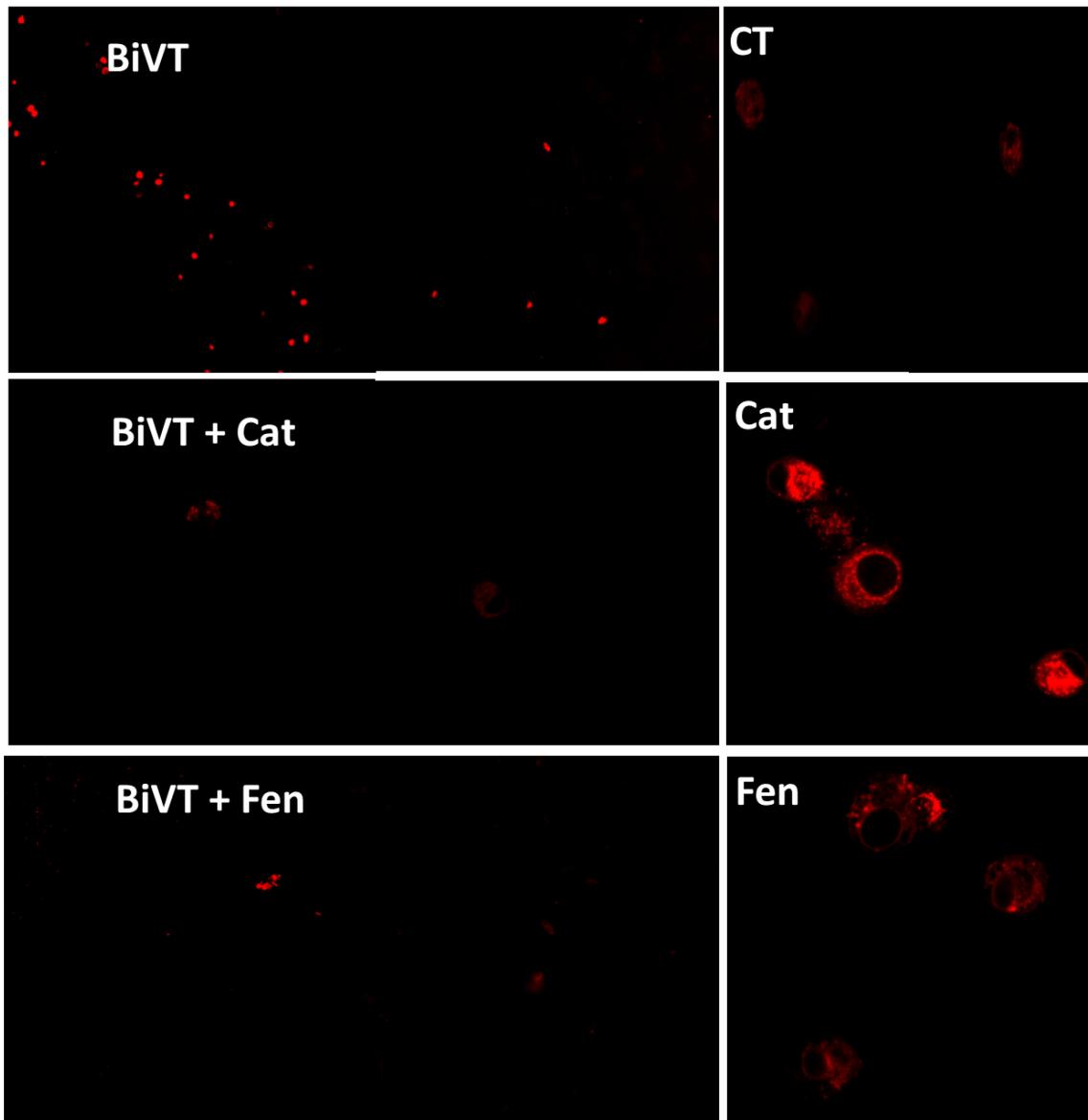
à fenantrolina e com o BiVT isoladamente; entretanto, houve um aumento da fluorescência observado para o grupo tratado com o BiVT associado à catalase que foi estatisticamente significante em relação ao grupo tratado apenas com o BiVT. Esse dado mostra, mais uma vez, um provável envolvimento da fração LAAO na nefrotoxicidade induzida pelo BiVT, embora seu percentual neste veneno seja bastante reduzido quando comparado a outras espécies de serpentes de mesmo gênero. De Moraes (2015) demonstrou que a fração LAAO do veneno da serpente *Bothrops leucurus* induziu hiperpolarização mitocondrial nas células MDCK.

Figura 27 – Avaliação do potencial transmembrânico, determinado por citometria de fluxo, em células LLC-MK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ vs CT; # $p < 0,05$ vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Figura 28 – Medida do potencial transmembrânico mitocondrial de células LLC-MK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Imagens obtidas por microscopia confocal; CT = controle negativo, BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

De acordo com a figura 28 foi observada uma redução do acúmulo de rodamina nas células tratadas com o BiVT evidenciando uma perda da função mitocondrial. Este efeito foi parcialmente bloqueado pela catalase. A fenantrolina não foi capaz de bloquear este efeito.

As mitocôndrias podem ser danificadas por aumento do cálcio citosólico, por EROs e privação de oxigênio, sendo sensíveis a virtualmente todos os estímulos nocivos, incluindo hipóxia e toxinas. É comum a lesão mitocondrial resultar na formação de um canal de alta condutância na membrana

mitocondrial, chamado de poro de transição de permeabilidade mitocondrial. A abertura desse canal determina a perda do potencial de membrana da mitocôndria e alteração do pH, resultando em falha da fosforilação oxidativa e depleção progressiva do e ATP, culminando na necrose da célula. As mitocôndrias contêm também várias proteínas que ativam as vias apoptóticas, incluindo o citocromo c. O aumento da permeabilidade mitocondrial pode resultar em extravasamento dessas proteínas para o citosol e morte por apoptose (Kumar *et al.*, 2013).

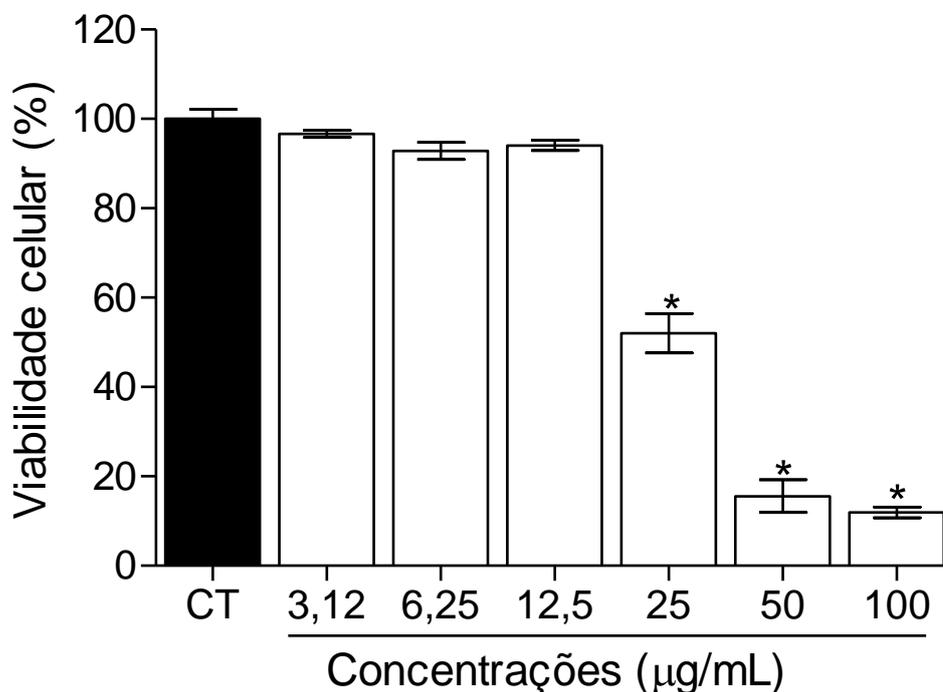
4.2.2 Ensaios Com Células HK2

As células HK2 são uma linhagem imortalizada proveniente do túbulo proximal renal humano (ATCC 2290). De acordo com testes bioquímicos realizados, fenotipicamente, estas células HK2 guardam as mesmas características das células tubulares de adultos normais. Em especial, foi demonstrado que as células HK2 mantêm a borda em escova e atividades enzimáticas típicas (ácido e fosfatase alcalina, aminopeptidase de leucina e gama-glutamil transferase). Vários estudos apontam esta linhagem celular como uma ferramenta experimental para o estudo da fisiopatologia renal bem como para mecanismos de lesão e reparação ao nível da célula tubular (Romiti *et al.*, 2008; Verzola *et al.*, 2014).

4.2.2.1 Avaliação de Viabilidade Celular

Células HK2 foram cultivadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ céls/mL e tratadas com o BiVT nas seguintes concentrações 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. O efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio de MTT decorridas 24 horas após incubação das células com as substâncias em estudo.

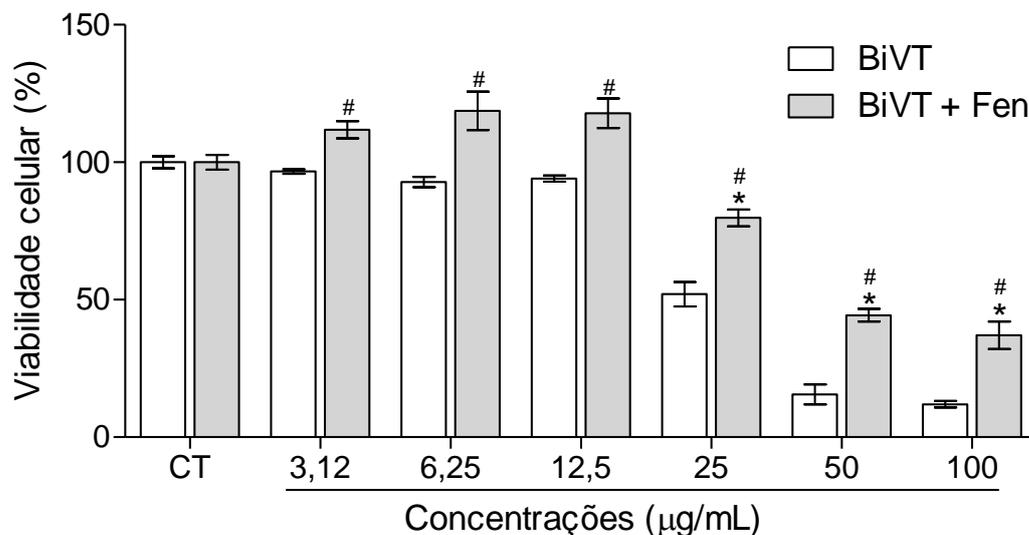
O BiVT apresentou efeito citotóxico, caracterizado pela redução significativa da viabilidade celular, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de incubação (Figura 29).

Figura 29 – Efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células HK2.

Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$; CT = controle negativo.

Para este tipo celular também foi avaliado o efeito da metaloprotease sobre a toxicidade do BiVT, através da incubação concomitante deste com a enzima fenantrolina por um período de 24 horas nas concentrações já mencionadas anteriormente. Na presença da fenantrolina houve inibição parcial da citotoxicidade promovida pelo BiVT conforme mostra a figura 30.

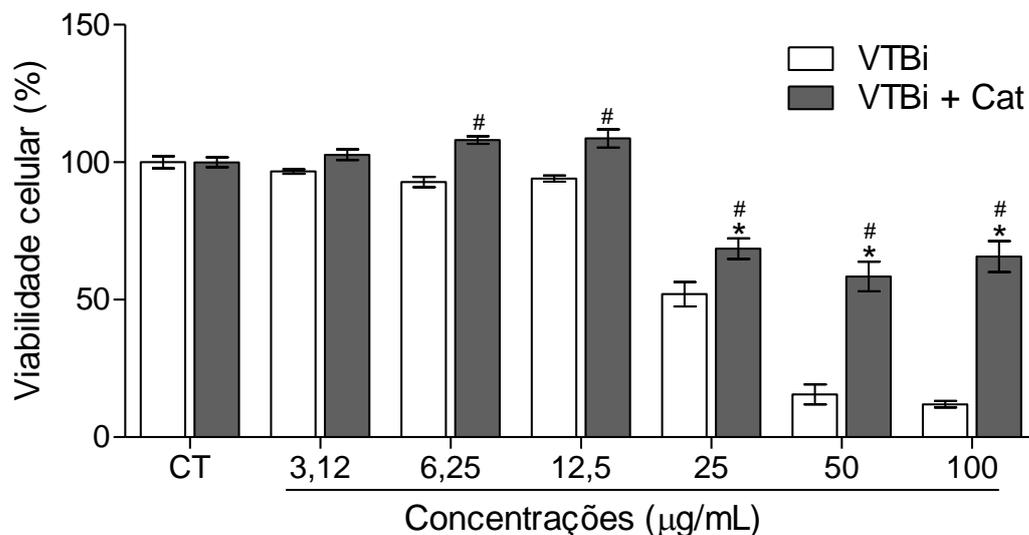
Figura 30 – Ação da fenantrolina sobre o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células HK2.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina.

Para avaliar a participação da fração LAAO na ação do BiVT sobre as células HK2, incubou-se este, nas mesmas concentrações já mencionadas, por um período de 24 horas, juntamente com a enzima catalase. Na presença dessa enzima também foi observado bloqueio parcial do efeito citotóxico do veneno total (figura 31).

Figura 31 – Ação da catalase sobre o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops insularis* sobre células HK2.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = Veneno total de *Bothrops insularis*, Cat = catalase.

Ambas as frações inibiram parcialmente a ação citotóxica do veneno, contudo um efeito mais pronunciado foi observado para a enzima catalase, o qual corrobora o papel preponderante da LAAO em comparação à metaloprotease no efeito citotóxico do BiVT sobre as células HK2.

Quando comparada a ação do BiVT em relação às duas linhagens celulares utilizadas nesse estudo, LLC-MK2 e HK2, observa-se que a ação citotóxica do BiVT foi mais pronunciada sobre as células HK2. Tal dado sugere que as células HK2 são mais sensíveis à ação do BiVT. A enzima fenantrolina em associação com o BiVT apresentou efeito divergente em relação às duas linhagens celulares em estudo, não sendo observada alteração estatisticamente significativa em relação à citotoxicidade do BiVT sobre as células LLC-MK2, porém houve redução da mesma sobre as células HK2 na presença desta enzima. A catalase apresentou efeito semelhante em ambas as linhagens celulares quando comparada à ação isolada do BiVT.

Proteínas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* já foram detectados nos glomérulos, túbulos proximais e distais, tecido vascular e perivascular, sugerindo que as toxinas se ligam às estruturas renais onde, provavelmente, exercem uma ação nefrotóxica direta. De acordo com esta

observação, foi demonstrado que o veneno de *B. alternatus* é citotóxico para células MDCK em cultura e causa extensas alterações do citoesqueleto destas células induzindo comprometimento da interação célula-matriz extracelular (Nascimento *et al.*, 2007). Sabe-se que metaloproteinasas são enzimas que degradam a matriz extracelular e estão envolvidas na patogênese da LRA por lesão isquêmica (Kaneto *et al.*, 2012).

De Moraes *et al.* (2013) demonstrou que o veneno da *Bothrops leucurus* induziu nefrotoxicidade no rim isolado de rato, associado com citotoxicidade em células tubulares renais. Em estudo posterior, o mesmo grupo observou que a fração LAAO deste veneno induziu morte celular de maneira concentração dependente sobre as linhagens celulares MDCK e HK2 em ambas as linhagens e ensaio de liberação de LDH e marcação com Anexina V/IP sugerem que a morte celular ocorreu por necrose e apoptose (De Moraes *et al.*, 2015). Entretanto, vale ressaltar que a LAAO é o maior componente protéico do veneno da *Bothrops leucurus* enquanto corresponde a menos de 2% dentre as frações tóxicas do BiVT, já a fração metaloproteínase corresponde a 23%.

Naumann *et al.* (2011) estudaram vários aspectos da LAAO isolada do veneno de *Bothrops leucurus*, concluindo que essa enzima, apresenta características de uma citotoxina. Entretanto, o mecanismo funcional e a correspondente base estrutural da atividade dessa flavoproteína ainda requerem estudos aprofundados. O conhecimento do mecanismo de ação dessa e de outras toxinas animais nos dá uma melhor compreensão dos mecanismos de envenenamento.

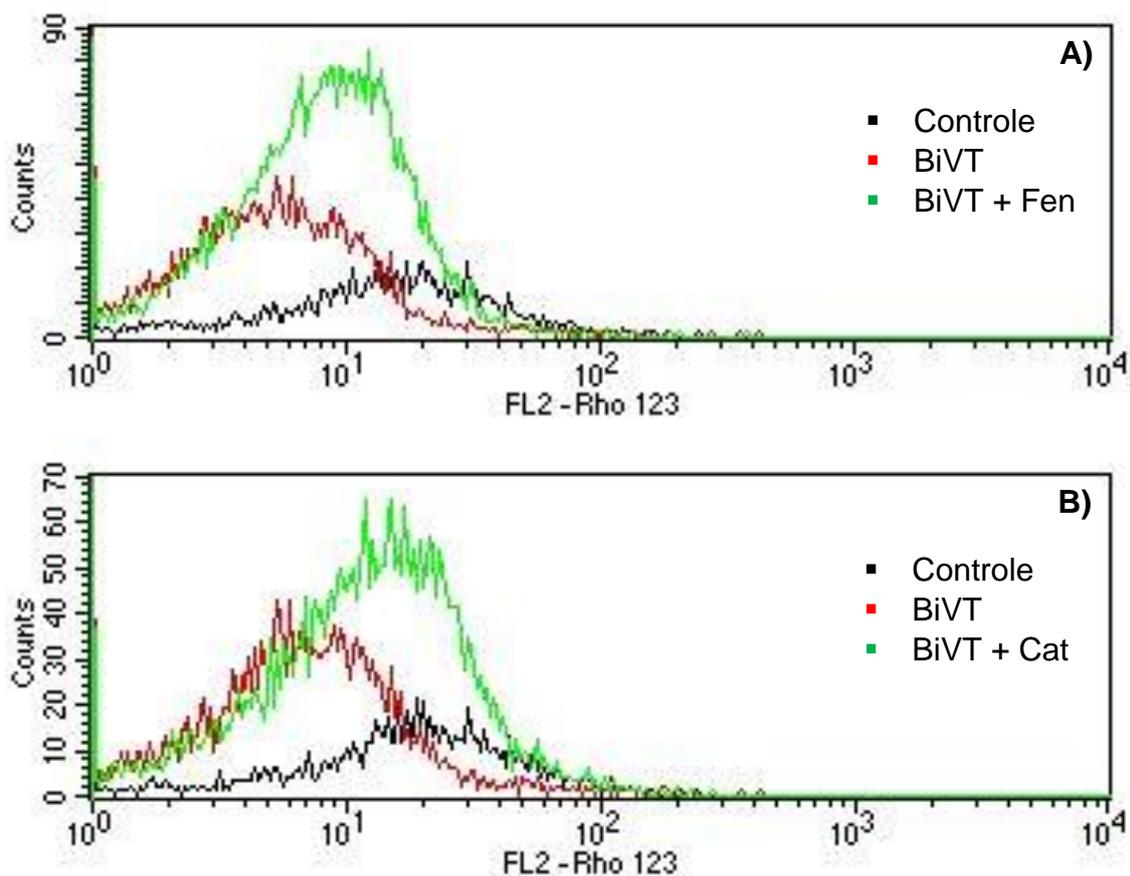
4.2.2.2 Avaliação do Perfil de Morte Celular

Uma vez que o BiVT apresentou efeito citotóxico sobre as linhagens celulares em estudo nos ensaios de viabilidade celular pelo método de redução do MTT, buscou-se avaliar o perfil de morte celular. Para tanto, o método escolhido foi a avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial e liberação de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas.

Neste ensaio, as células foram tratadas com o BiVT isolado na concentração da IC50 encontrada (26,88 µg/mL) e em associação com as enzimas fenatrolina e catalase para avaliação do potencial transmembrânico

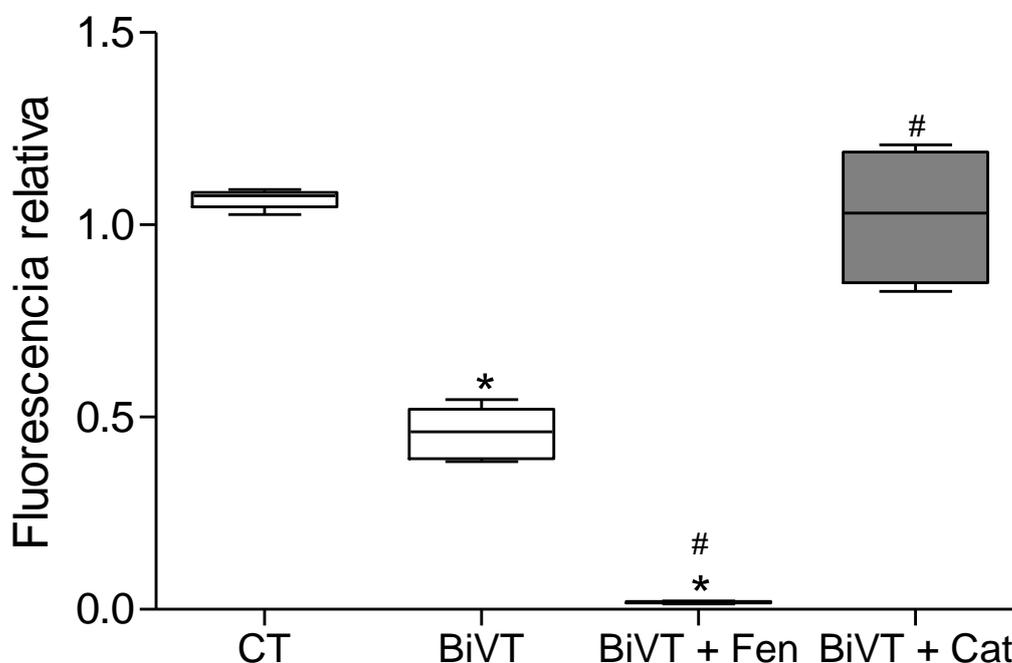
mitocondrial. Em seguida foram incubadas com a rodamina 123 (Rho 123), corante fluorescente específico que se acumula especificamente no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis. Os dados apresentados foram obtidos por citometria de fluxo. As figuras 32 e 33 mostram a análise qualitativa e quantitativa, respectivamente.

Figura 32 – Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células HK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência. BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Figura 33 – Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial, determinado por citometria de fluxo, de células HK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = veneno total de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

O BiVT reduziu a emissão de fluorescência de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. O bloqueio da ação da metaloprotease pela enzima fenantrolina exacerbou o efeito observado para o BiVT isodamente, ao passo que, a catalase mostrou um resultado oposto, com aumento da emissão de fluorescência. Este resultado sugere que a LAAO do BiVT teria grande participação na gênese de danos mitocondriais.

A fisiopatologia da LRA envolve múltiplos eventos celulares que causam danos aos túbulos proximais renais. Por exemplo, lesão nos túbulos proximais resulta na desorganização do citoesqueleto apical de actina, redistribuição desta e de outras proteínas, colapso das microvilosidades da borda em escova, perda da polaridade celular, e perda da adesão de células-matriz, facilitando a secreção de células na luz tubular. Além disso, estas

alterações podem resultar na morte das células tubulares proximais por apoptose e necrose, levando a áreas de perda do epitélio tubular com exposição da matriz extracelular e degradação da mesma. Recrutamento de leucócitos e processo inflamatório também são mediadores importantes da insuficiência renal aguda nestes casos. Tendo em vista que a matriz extracelular é um dos principais alvos de ação da enzima metaloproteinase, percebe-se que a mesma pode desempenhar papel importante na gênese em muitos desses eventos (Kaushal *et al.*, 2013).

O mecanismo de citotoxicidade desencadeado pela LAAO ainda não está completamente esclarecido. Hipóteses postulam que LAAO liga-se diretamente à superfície celular, promove a liberação de H_2O_2 que se acumula nesta área em uma concentração relativamente mais elevada, e a apoptose seria desencadeada pela oxidação de membrana. Contudo, evidências experimentais sugerem que o mecanismo de apoptose induzido por LAAO é distinto daquele causada pelo H_2O_2 exógeno (Chunmei *et al.*, 2012).

Alterações no potencial de membrana mitocondrial podem ser consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio ou aumento do cálcio citosólico. Na via intrínseca da apoptose, ou via mitocondrial, os estímulos gerados no interior da célula levam a ativação de proteínas pró-apoptóticas. Em seguida, ocorre a ruptura do potencial transmembrânico mitocondrial, fazendo com que ocorra um influxo de íons e ao mesmo tempo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c para o citosol (Jeong *et al.*, 2015). De Moraes *et al.* (2015) demonstraram que LAAO isolada do veneno da *B. leucurus* induziu hiperpolarização mitocondrial em células MDCK. Alguns trabalhos sugerem que o potencial de membrana mitocondrial aumenta após indução de apoptose, iniciada por EROs, cálcio, Bax e ceramidas (Liu *et al.*, 2013).

Desta forma, resolveu-se investigar a participação de espécies reativas citoplasmáticas na ação antiproliferativa do BiVT em células HK2.

4.2.2.3 Avaliação da Liberação de Espécies Reativas de Oxigênio Citoplasmáticas

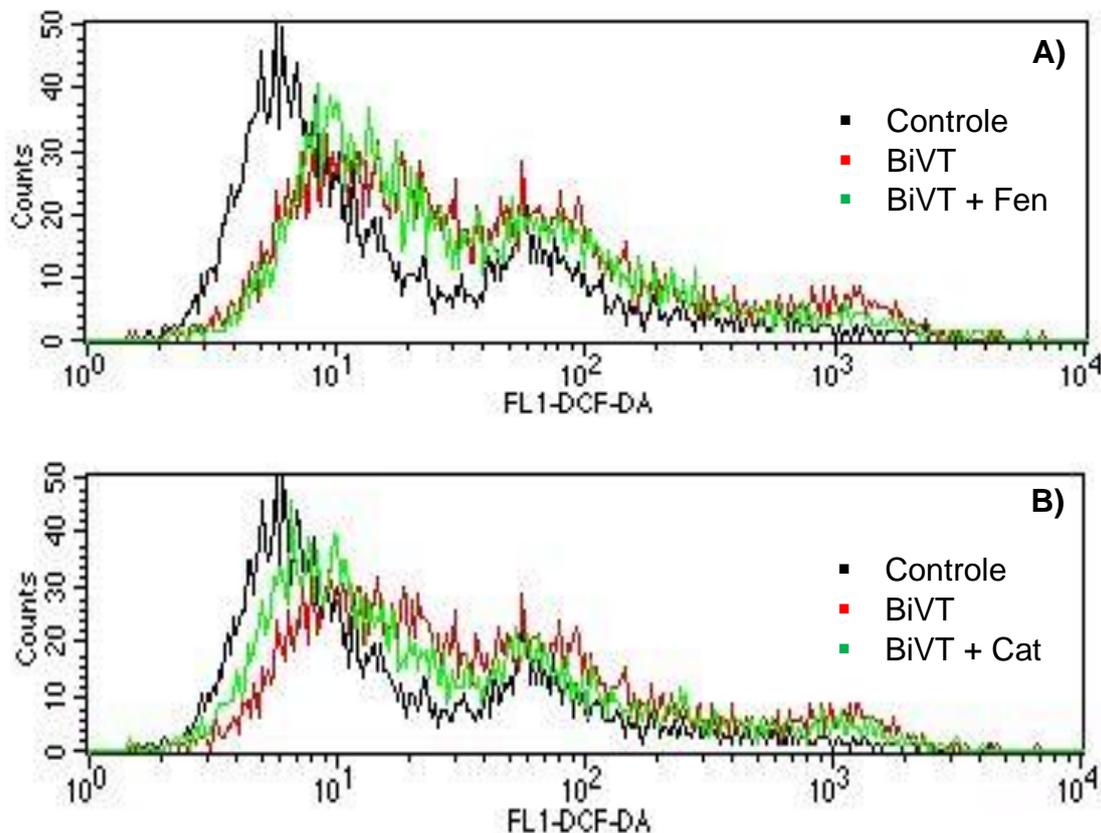
Espécies reativas de oxigênio são parte integrante das vias de transdução de sinais, “maquinário” celular que regula o processo de morte da célula bem como seu estado redox. Entretanto, sua produção excessiva pode

danificar lipídios, proteínas e até mesmo o DNA. Estudos apontam que diferentes condições patológicas como lesão renal crônica, hipertensão arterial sistêmica e diabetes apresentam as células tubulares renais como o alvo inicial para a gênese do dano renal definitivo (Verzola *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

Foi utilizada a técnica do DCF-DA com o objetivo de analisar a produção de ERO individualmente em cada célula em cultivo através da técnica de citometria de fluxo. O DCFH-DA é um composto não fluorescente que dentro da célula forma a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. EROs geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde a qual pode ser mensurada por receptores de fluorescência (FL1).

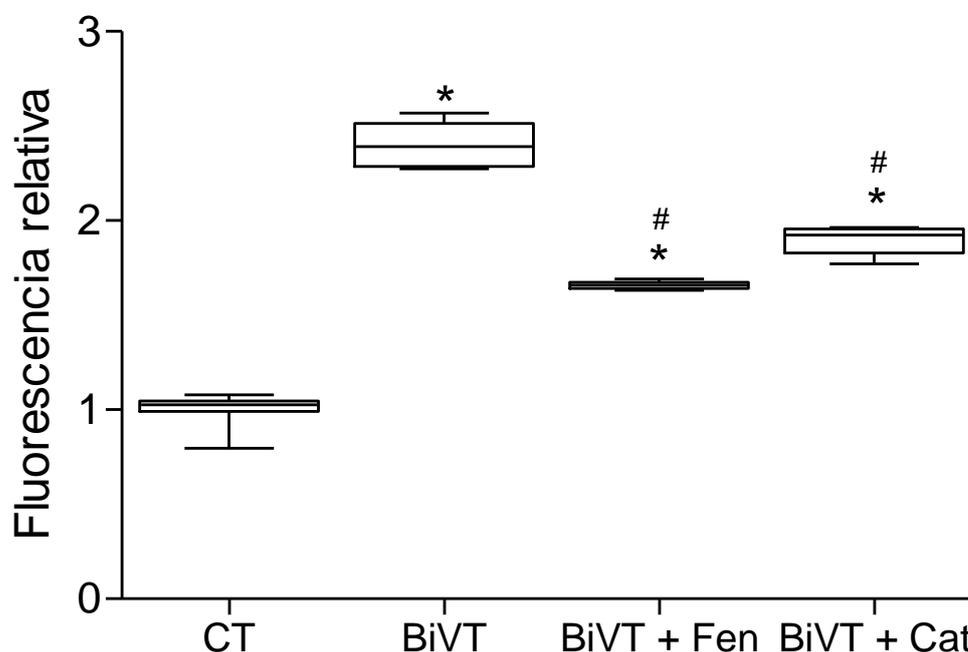
As células HK2 foram cultivadas por 24 horas com o BiVT na concentração da IC50 (26,88 µg/mL) isoladamente e em associação com as enzimas fenantrolina e catalase. As análises qualitativa e quantitativa dos resultados obtidos são mostradas nas figuras 34 e 35, respectivamente.

Figura 34 – Histograma representativo da liberação de EROs, determinada por citometria de fluxo, em células HK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência; BiVT = veneno de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Figura 35 – Liberação de EROs, determinada por citometria de fluxo, em células HK2 tratadas com o veneno de *Bothrops insularis* na ausência e na presença das enzimas fenantrolina e catalase.



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 vs CT; #p < 0,05 vs BiVT; CT = controle negativo, BiVT = veneno total de *Bothrops insularis*, Fen = fenantrolina, Cat = catalase.

Quando feitas as análises, foi possível perceber que as mudanças foram estatisticamente significantes quando se compara o controle negativo com os grupos tratados, ou seja, o aumento da fluorescência de DCFoxi indica que houve aumento da produção de ERO. Adicionalmente, no grupo tratado com BiVT, a detecção de fluorescência relacionada à produção de ERO aumentou significativamente, resultados concordantes com a dosagem de MDA e GSH teciduais expostos anteriormente neste trabalho.

Em estudo realizado para avaliar o efeito da hipóxia em células musculares estriadas esqueléticas, percebeu-se através da técnica de DCF que os danos causados estavam relacionados com a produção de ERO e, sobretudo, da despolarização da membrana mitocondrial, diminuindo os níveis de GSH, causando um desequilíbrio na razão GSH/GSSH e também aumentando a produção de MDA (Puntel *et al.*, 2011).

Carlotti e colaboradores correlacionaram a formação de ERO com consequente comprometimento mitocondrial através da utilização da rodamina, como demonstrado neste trabalho (Carlotti Junior; Colli; Kazuo, 2001).

Sabe-se que as ERO podem ser geradas por diversos mecanismos, principalmente pelo sistema NADPH-oxidase e também através da mitocôndria. O processo de hipóxia leva a um desequilíbrio na cadeia respiratória mitocondrial, resultando em acúmulo de elétrons e subsequente formação de ERO, cuja produção excessiva pode levar a danos teciduais diretos, principalmente morte celular programada (Maianski *et al.*, 2004).

Observou-se que tanto o grupo tratado com fenantrolina quanto aquele tratado com catalase ainda mostraram um aumento estatisticamente significativo na produção de EROs quando comparados ao grupo controle; entretanto, ambos reduziram de forma significativa a produção de EROs quando comparados ao grupo tratado com o BiVT isoladamente. Este resultado sugere que, ambas as enzimas, MPSV e LAAO do BiVT, contribuem para a geração de EROs, embora a sua produção ainda continue elevada mesmo com o bloqueio da ação das mesmas.

Algumas toxinas purificadas de venenos do gênero *Bothrops* são capazes de reproduzir os efeitos renais obtidas com o veneno total. Estudos com perfusão de rim isolado demonstraram que as frações LAAO (Braga *et al.*, 2008), lectinas do tipo C (Braga *et al.*, 2006), fosfolipase A₂ (Barbosa *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2010) e trombina símile (Braga *et al.*, 2007) alteram os parâmetros de função renal. A técnica de perfusão de rim isolado também confirmou a nefrotoxicidade tubular aguda direta de venenos do gênero *Bothrops*. Em estudo para avaliar as alterações renais após injeção sistêmica de baltergin em ratos, uma metaloproteinase purificada a partir do veneno de *B. alternatus*, foram observadas na análise histológica discretas alterações na arquitetura renal. Entretanto, em altas doses, baltergin foi capaz de provocar congestionamento, hemorragia subcapsular e infiltrado inflamatório, porém não houve detecção de necrose tubular. Tais dados indicam que diferentes toxinas atuam em sinergia para produzir a LRA que é observada em animais tratados com veneno total (Gay *et al.*, 2009).

5 CONCLUSÃO

Após a realização de experimentos *in vivo* e *in vitro*, pode-se concluir que:

- O aumento do nível de KIM-1 urinário indica que há uma ação tóxica e lesiva do veneno de *Bothrops insularis* ao nível das células tubulares proximais de camundongos e corrobora seu papel como biomarcador precoce de lesão renal;
- O BiVT causou dano no tecido renal com aumento da geração de espécies reativas de oxigênio;
- Houve indução de necrose pelo BiVT em células renais tubulares, LLC-MK2, e células renais humanas do túbulo proximal, HK2, com o envolvimento de disfunção mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio;
- Fenantrolina e catalase bloquearam parcialmente a ação citotóxica do veneno, mostrando o envolvimento das frações metaloproteinase e L-aminoácido oxidase nos efeitos do BiVT, provavelmente agindo de forma sinérgica, porém com mecanismos distintos de indução de lesão celular renal.

REFERÊNCIAS

A ILHA da morte. Cobras. 04 fevereiro 2016. Disponível em: <<http://cobrasvenenosas.com/Tags/cobras-da-especie-jararaca-ilhoa/>>. Acesso em 01 julho 2016.

ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmohoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 216–226, 2000.

ALPERS, E. C. The kidney. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. 1525p. cap. 20, p 955-1021.

AMARAL, C. F.; DA SILVA, O. A.; GOODY, P.; MIRANDA, D. Renal Cortical Necrosis Following Bothrops jararaca and B. jararacussu Snake Bite. **Toxicon**, n. 23, p. 877-885, 1985.

AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M.; MAGALHAES, R. A.; DOS REIS, R. J. *et al.* Acute Kidney Failure Secondary to Ophidian Bothropic and Crotalid Accidents. Analysis of 63 Cases. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, n. 28, p. 220-227, 1986.

ANDE, R. S. *et al.* Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.

ANDRADE, L.; SEGURO, A. C. Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Nefrotoxicidade induzida pelo radiocontraste. **J. Bras. Nefrol.**, n. 19, v. 2, p. 208-211, 1997.

ARAUCO, L. R. R.; STÉFANI, M. V.; NAKAGHII, L. S. O.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L. Histologia do rim, fígado e intestino de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) alimentados com dietas contendo própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p.1436-1441, 2007.

ARAÚJO, H.S.S. **Expressão de metaloproteinases recombinantes de veneno de serpente com potencial de uso terapêutico**. Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2000.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr, V. (orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.

ÁVILA-AGUIERO *et al.* Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatric Emergency Care**, v. 17, n. 6, p. 425-429, 2001.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg Med** (Fremantle), v13, p28-36, 2001.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 191–214, 2009.

BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M.A. Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v1761, p1344-1350, 2006.

BARBOSA, P.S.; MARTINS, A.M.; HAVT, A.; TOYAMA, D.O.; EVANGELISTA, J.S.; FERREIRA, D.P.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C. & MONTEIRO, H.S. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**. v.15, n. 4, pp 376-386, 2005.

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.

BARISONI, L. Podocyte Biology in Segmental Sclerosis and Progressive Glomerular Injury. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 19, p. 76-83, 2012.

BARISONI, L.; SCHNAPER, H. W.; KOPP, J. B. Advances in the Biology and Genetics of the Podocytopathies Implications for Diagnosis and Therapy. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, p. 201-216, 2009.

BASS, D. A.; OLBRAND, P.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; McCALL, C.E. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986.

BASS, D. A.; PARCE, W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P. SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p. 403-414, 2006.

BELCHER, J. M.; EDELSTEIN, C. L.; PARIKH, C. R. Clinical Applications of Biomarkers for Acute Kidney Injury. **American Journal of Kidney Disease**; v. 57, n. 6, p. 930-940, 2011.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute Kidney Injury. **Lancet**, v. 330, n. 9843, p. 756-766, 2012.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.

BIASIOLI, S., SCHIAVON, R., De FANTI, E., CAVALCANTI, G., GIAVARINA, D. The role of erythrocytes in the peroxidation process in people on hemodialysis. **ASAIO Journal, Philadelphia**, v. 42, n. 5, p. 890-894, 1996.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; CRUZ-HOFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am J Trop Med Hyg**, n. 61, p. 698-706, 1999.

BOLETIM epidemiológico. Acidentes por animais peçonhentos. **Governo do Estado do Ceará. Secretaria de Saúde**, Ceará, 10 de Junho de 2016, p. 1-8. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>>. Acesso em: 01 julho 2016.

BONVENTRE, J. V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 43, n. 5, p. 1160-78, 1993.

BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, p. 3265–3268, 2009.

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

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

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.

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 activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 329-338, 2007.

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

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P.; WATSON, A. D. J. Creatinine in the dog: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 4, p. 162-179, 2003.

BUCARETCHI, F.; HERRERA, S. R.; HYSLOP, S.; BARACAT, E. C.; VIEIRA, R. J. Snakebites by Bothrops spp in Children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop**. Sao Paulo, n. 43, p. 329-333, 2001.

BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B.; BARRETO, O. C. *et al.* Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am J Trop Med Hyg**, n. 48, p. 82-88, 1993.

BURDMANN, E. A.; SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P. **Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom**. Nephron Clinical Practice, n. 119, p. 131-137, 2011.

BUSSMANN, A. R.; MARTON FILHO, M. A.; MÓDOLO, M. P.; MÓDOLO, R. P.; AMADO, P.; DOMINGUES, M. A.; CASTIGLIA, Y. M.; MÓDOLO, N. S. Effect of allopurinol on the kidney function, histology and injury biomarker (NGAL, IL 18) levels in uninephrectomised rats subjected to ischaemia-reperfusion injury. **Acta Cir Bras**. v. 29, n. 8, p. 515-21, 2014.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford; Blackwell, 1992.

CARLOTTI JUNIOR, C. G.; COLLI, B. O.; KAZUO, J. Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 59, n. 2, p. 365-371, 2001.

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

CHARLTON, J. R.; PORTILLA, D.; OKUSA, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, n. 7, p. 1301-11, 2014.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. **Cell Signalling**, v. 15, p. 637-665, 2003.

CHAVES, T. S. Ação do veneno de Bothrops leucurus e da radiação laser De (gaalas, 780nm) em músculo tibial de ratos inoculados. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, pag. 1131-1134, CD, ISBN: 978-85-60064-13-7, 2008.

CHEVALIER, R. L. Biomarkers of congenital obstructive nephropathy: past, present and future. **The Journal of urology**, v. 172, n. 3, p. 852-7, 2004.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. **WHO**, v. 76, p. 515-524, 1998.

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M. J.; GIOVAMBATTISTA, A; GAILLARD, R. C. A phospholipase A2-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*)

stimulates neuroendocrine and immune functions determination of different sites of action. **Endocrinology**, v. 139, p. 617–625, 1998.

CHUNMEI, G. et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302–311, 2012.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCETTI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONE, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2 fraction. **Toxicon**, v. 36, n.10, p. 1323-1332, 1998.

CORRÊA, T. C. S. **Ação do gene supressor de tumor e de metástase RECK no processo de invasão tumoral: modelo de interação célula matrix-extracelular em gliomas humanos**. 2005. Dissertação. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA-NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. **Insuficiência Renal Aguda**. Medicina, Ribeirão Preto, n. 36, p. 307-324, 2003.

DA CRUZ HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) venom and a phospholipase A2-containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, n. 1, p. 185-195, 2001.

DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54, p. 21-30, 1992.

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 MORAIS, I. C. O. **Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus***. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

DE MORAIS, I. C. O. *et al.* L-Aminoacid Oxidase from *Bothrops leucurus* Venom Induces Nephrotoxicity via Apoptosis and Necrosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am SocNephrol**. v. 17, n. 6, p. 1503-20, 2006.

DICIONÁRIO DE SÍMBOLOS. Disponível em: <<http://www.dicionariodesimbolos.com.br/serpente/>>. Acesso em 01/07/16.

DING, J.; BAY, B.; GOPALAKRISHNAKONE, P. L-amino acid oxidase from *Crotalus adamanteus* venom induces caspase-independent apoptosis in human NUGC-3 gastric cancer cells. **Cancer Research**, v. 74, n. 19, p. 5425, 2014.

DU, XY e CLEMETSON, KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

DUFOUR, A.; OVERALL, C. M. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and câncer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 13, p. 233–242, 2013.

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

ERNANI, L. R.; TELOKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C.; LUCAS, M. L.; BELLOKLEIN, A. Effects of L-arginine and L-name on renal ischemia-reperfusion in rats. **Braz J Urol.**, v. 27, n.1, p. 78-83, 2001.

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

FERRARI, C. K. B. Apoptose: a importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese das doenças. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 9, n. 1, p. 21-31, 2000.

FERREIRA, S. H. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 8, p.1693-1698, 1994.

FIELD, M. *et al.* Urinary biomarkers of acute kidney injury in deceased organ donors--kidney injury molecule-1 as an adjunct to predicting outcome. **Clinical Transplantation**, [Copenhagen], v. 28, n. 7, p. 808-815, July. 2014.

FLISER, D.; LAVILLE, M.; COVIC, A.; FOUQUE, D.; VANHOLDER, R.; JUILLARD, L. *et al.* A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, n. 27, v. 12, p. 4263-4272, 2012.

FURTADO, S. G.; NEPOMUCENO, J. C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio de teste wts (warts). **Perquirere**, v. 9, n. 1, p. 224-240, 2012.

GABRIEL, L. M. I.; SANCHEZ, E. F.I; SILVA, S. G.; SANTOS, R. G. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, v. 18, n. 1, p. 24-33, 2012.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology dialysis transplantation**, v. 16, n. 11, p. 233-235, 2001.

GÁMEZ-VALERO, A. *et al.* Urinary extravascular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

GARCIA, M. L.; LEWIS, R. J. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n.10, p.790-802, 2003.

GASANOV, S. E.; DAGDA, R. K.; RAEL, E. D. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A₂s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. **J Clin Toxicol.**, v. 4, n. 1, p. 1-34, 2014.

GAY, C. C.; MARUNAK, 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, n. 1, p. 53-59, 2009.

GUERCIO, R. A.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUZA, M. V.; RICART, C. A. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci.**, v. 4, n. 11, 2006.

GOULART, C.E.S. Ofidismo. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/artig146.htm>>. Acesso em: 01/07/16. 2002.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377–394, 2002.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, p. 93-122, 2016.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011.

HAMIDEH, D. *et al.* Albuminuria correlates with hemolysis and NAG and KIM-1 in patients with sickle cell anemia. **Pediatric Nephrology**, [Berlin], v. 29, n. 10, p. 1997-2003, Oct. 2014.

HAN, W. K.; BAILLY, V.; ABICHANDANI, R.; THADHANI, R.; BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, p. 237–244, 2002.

HARA, M.; YANAGIHARA; T.; KIHARA, I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 2, p. 231-238, 2007.

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains llc-mk1, llc-mk2, and llc-mk2(nctc-3196) and their utility in virus research. **J Exp Med.**, v. 115, n. 5, p. 903–918, 1962.

HSU, W. L.; LIN, Y. S.; HU, Y. Y.; WONG, M. L.; LIN, F. Y.; LEE, Y. J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 437-442, 2014.

ICHIMURA T, HUNG CC, YANG SA, STEVENS JL, BONVENTRE JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, p. 552–563, 2004.

ICHIMURA, T. *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, [Ann Arbor], v. 118, n. 5, p. 1657-1668, May. 2008.

ICHIMURA, T.; MOU, S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, [Shanghai], v. 6, n. 5, p. 533-538, May. 2008.

IZIDORO, L. F. M. **Caracterização Bioquímica e Funcional de uma Nova L-Aminoácido Oxidase Isolada da Peçonha da Serpente *Bothrops pirajai***. 2007. 73f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

IZIDORO, L. F. M. *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biogarnic. & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M. *et al.* Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: **Trends in Pharmacology and Biochemistry, BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 196754, 19 pages, 2014.

JANIKUES, A. G. P. R.; LEAL, V. O.; STOCKLER-PINTO, M. B.; MOREIRA, N. X.; MAFRA, D. Efeitos da suplementação de farinha de uva sobre marcadores inflamatórios e antioxidantes em pacientes em hemodiálise: Estudo duplo-cego randomizado. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 4, p. 496-501, 2014.

JEONG, J.W. Pachymic Acid Induces Apoptosis of EJ Bladder Cancer Cells by DR5 Up-Regulation, ROS Generation, Modulation of Bcl-2 and IAP Family Members. **Phytother Res**. 2015.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 77, n. 2, p. 990-4, 1980.

JOHNSTONE, D. B.; HOLZMAN, L. B. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. **Nat Clin Pract Nephrol.**, v. 2, p. 271-282, 2006.

JORGE, R. J., MARTINS, A. M., MORAIS, I. C., XIMENES, R. M., RODRIGUES, F. A., SOARES, B. M., EVANGELISTA, J. S., TOYAMA, M. H., MARTINS, A. M., MORAES FILHO, M. O., MONTEIRO, H. S. In vitro studies on Bothrops venoms cytotoxic effect on tumor cells. **J Exp Ther Oncol.**, v. 9, p. 249-53, 2011.

JOST, G. *et al.* Retention of Iodine and Expression of Biomarkers for Renal Damage in the Kidney After Application of Iodinated Contrast Media in Rats. **Investigative Radiology**, v. 44, n. 2, p. 114-123, 2009.

JULIAO, A. A ilha do medo. Disponível em: <http://viajeaquibril.com.br/materias/ilha-queimada-grande-sao-paulo>. Acesso em: 01.07.2016.

JUNQUEIRA, M. R. **Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno das serpentes *Bothrops insularis* (Viperidae)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

KADKHODAEI, M.; NAJAFI, A.; SEIFI, B. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **Int J Surg**. v. 12, n. 11, p. 1162-6, 2014.

KANETO, T. *et al.* Role of matrix metalloproteinase-2 in recovery after tubular damage in acute kidney injury in mice. **Nephron Exp Nephrol**. v. 122, p. 23-35, 2012.

KAUCSÁR, T. *et al.* Urine/Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Ratio Is asensitive and Specific Marker of Subclinical Acute Kidney Injury in Mice. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. 148-159, 2016.

KAUSHAL, G. P.; SINGH, A. B.; HERZOG, C.; SHAH, S. V. Meprin A metalloproteinase and its role in acute kidney injury. **Am J Physiol**, v. 304, p. 1150–1158, 2013.

KIL, H. N.; EOM, S. Y.; PARK, J. D.; KAWAMOTO, T.; KIM, Y. D.; KIM, H. A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric Acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. **Toxicol Res**. v. 30, n. 1, p. 7-11, 2014.

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

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

KO, G. J. *et al.* Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 298, p. 1472-1483, 2010.

KOVALINKA, A. Myo-Inositol Oxygenase: A Novel Kidney-Specific Biomarker of Acute Kidney Injury?. **Clinical Chemistry**, v. 60, 5th ed., p. 708-710, 2014.

KOYNER J, VAIDYA V, BENNETT M, MA Q, WORCESTER E, AKHTER S, ET AL. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**. v. 5, p. 2154-2165, 2010.

KUMAR, V. *et al.* Lesão celular, morte celular e adaptações *in*: **Patologia básica**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928p.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. 1525p. cap. 2, p 47-86, cap 3, p. 87-118, cap. 4, p.119-144.

LIRA-DA- SILVA, M.R.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS -E- SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 21 -25, 2009.

LISOWSKA-MYJAK B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. **Blood purification**, v. 29, p. 357-65, 2010.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LIU, D.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG, M.; WANG, L. Cd-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. **PLoS One**, v. 22, p. e68770, 2013.

LOMONTE B, ANGULO Y., CALDERON L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LUCARELLI, G. *et al.* Emerging urinary markers of renal injury in obstructive nephropathy. **BioMed research international.**, v. 303, p. 32-45, 2014.

LUCCHI, L., BANNI, S., BOTTI, B., CAPPELLI, G., MEDICI, G., MELIS, M.P., TOMASI, A., VANNINI, V.I., LUSVARGHI, E. Conjugated diene fatty acids in patients with chronic renal failure: evidence of increased lipid peroxidation? **Nephron, Basel**, v. 65, n. 3, p. 401-409, 1993.

LUCIANO, P. M.; SILVA, G. E. B.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. Acidente botrópico fatal. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP - Universidade de São Paulo**, v. 42, n.1, p. 61-65, 2009.

LUO, Q. H. *et al.* KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 397, n. 1-2, p. 53-60, Dec. 2014.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 534–540, 2001.

MAIANSKI, N. A.; GEISLER, J.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; ROOS, D.; KUIJPERS, T. W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death Differ.** v. 11, n. 2, p. 143-53, 2004.

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

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA I. Old habits die hard: mouse handling by a pitviper species on a rodent-free island. **Amphibia-Reptilia**, v. 30, p. 435–438, 2009.

MARROTTA, A. M. M. *et al.* Insuficiência renal aguda após acidente botrópico: um relato de caso. **Revista Biociências**, n. 12, v.1, 2008.

MARROTTA, A. M. M.; ALENCAR, M. R. P.; ANDRADE, T. A.; XAGORARIS, M.; RUIVO, G. F. Insuficiência renal aguda após acidente botrópico: um relato de caso. **Rev. Biociência**, v. 12, n. 1-2, p. 88-93, 2006.

MARTINS, H. S.; SCALABRINI NETO, A.; VELASCO, I. T. **Emergências clínicas baseadas em evidências**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006.

MASUDA, S.; ARAKI, S.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, n. 1, p. 59-63, 1997.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MCCULLOUGH, P. A *et al.* Implementation of novel biomarkers in the diagnosis, prognosis, and management of acute kidney injury: executive summary from the tenth consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). **Contributions to nephrology**, v. 182, p. 5–12, 2013.

MELLO, C. P. *et al.* *Bothropoides insularis* venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon**, v. 88, p. 107-114, 2014.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochem Med.** v. 23, n. 3, p. 302-11, 1980.

MILANI, J. R.; JORGE, M. T.; DE CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; *et al.* Snake Bites by the Jararacucu (*Bothrops jararacussu*): Clinicopathological Studies of 29 Proven Cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**. n. 90, v. 5, p. 323-334, 1997.

MIRANDA, E. P. **Avaliação dos biomarcadores urinários no controle do tratamento de estenose de junção ureteropélvica em adultos**. 2016. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MOCHIZUKI, T. *et al.* Detection of Apoptotic Tumor Response In Vivo After a Single Dose of Chemotherapy with ^{99m}Tc-Annexin V. **J Nucl Med**, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2003.

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

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opinion Cell Biol.**, v. 6, p. 558-564, 2004.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.; MOTA, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and crude venoms. **Toxicon**, v. 29, p. 1471-1480, 1991.

NAJAFI, H.; FIROUZIFAR, M. R.; SHAFAT, O.; CHANGIZASHTIYANI, S.; HOSSEINI, N. Protective effects of *Tribulusterrestris* L extract against acute kidney injury induced by reperfusion injury in rats. **Iran J KidneyDis**. v. 8, n. 4, p. 292-8, 2014.

NASCIMENTO, J. M. **Caracterização da DNase da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*: comparação com a DNase ácida de mamíferos envolvida em apoptose**. 2008. 198 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

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.

NIELSEN, J. S.; MCNAGNY, K. M. The role of podocalyxin in health and disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 1669-1676, 2009.

NUNES, G. L. S. Avaliação da função renal em pacientes hipertensos. **Rev Bras Hipertens**, v.14, n. 3, p. 162-166, 2007.

NUNES, T. F.; BRUNETTA, D. M.; LEAL, C. M.; PISI, P. C. B.; RORIZ-FILHO, J. S. Insuficiência renal aguda. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 43, n. 3, p. 272-82, 2010.

OLIVEIRA, C. F. **Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente Bothrops pauloensis: um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2)**. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

OLIVEIRA, F. N.; BRITO, M. T.; MORAIS, I. C. O.; FOOK, S. M. L.; ALBUQUERQUE, H. N. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, 2010.

ONGAJOOH, L., ONGAJYOOH, S., LIKIDLILID, A., CHANTACHUM, Y., SHAYAKUL, C., NILWARANGKUR, S. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidant enzymes in chronic renal disease patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 79, n. 12, p. 791-800, 1996.

OTERO, R.; GUTIERREZ, J.; BEATRIZ, M. M.; DUQUE, E.; RODRIGUEZ, O.; LUIS, A. J.; *et al.* Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis Snakebites in Colombia. A Clinical and Epidemiological Study of 39 Cases Attended in a University Hospital. **Toxicon**, n. 40, p. 1107-1114, 2002.

PEDROSA, D. C. **Kim-1 urinário em crianças submetidas a tratamento Antineoplásico com potencial nefrotóxico: um estudo de Coorte prospectivo**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

PEREIRA, I. D.; PINHO, F. M. O. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PERES, L. A. B. *et al.* Papel da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) urinária na nefrotoxicidade da cisplatina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **J. bras. nefrol**, v. 36, n. 3, p. 280-288, 2014.

PEREZ-ROJAS, J.; BLANCO, J. A.; CRUZ, C.; TRUJILLO, J.; VAIDYA, V. S.; URIBE, N.; BONVENTRE, J. V.; GAMBA, G.; BOBADILLA, N. A. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 292, n. 1, p. 131–139, 2007.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C.F.P.; TAMBOURGI, D. V. *et al.* Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms. **Toxicon**, n. 38, p. 1253–1266, 2000.

PINHO, F. M. O.; YU, L.; BURDMANN; E. A. Snakebite-Induced Acute Kidney Injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 354-362, 2008.

PINTO, C. F.; WATANABE, M.; FONSECA, C. D.; OGATA, C. I.; VATTIMO, M. F. F. A sepse como causa de lesão renal aguda: modelo experimental. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46, p. 86-90, 2012.

PONNUDARI, G. ; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 313, p. 373-378, 1994.

PROZIALECK, W. C. *et al.* Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. **Kidney Int.**, v. 72, n. 8, p. 985–993, 2007.

PUNTEL, G. O.; CARVALHO, N. R.; AMARAL, G. P.; LOBATO, L. D.; SILVEIRA, S. O.; DAUBERMANN, M. F.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A. Therapeutic cold: an effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. **Free Radical Research**. v. 45, n. 2, p. 133-146, 2011.

QUEIROZ, R. G. **Componentes derivados de venenos de serpentes com ação antitumoral em melanoma murino**. 2012. 96f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2012.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and antiinflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1-17, 2004.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. **Toxicology and Pharmacology**, v.142, n. 3-4, p. 328-346, March-April 2006.

RAZVICKAS, C. V.; BORGES, F. T.; DE OLIVEIRA, A. S.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Efeito da hipóxia e reoxigenação na resposta à angiotensina II em células mesangiais *in vitro*. **J. Bras. Nefrol.** v. 35, n. 4, 2013.

RIBEIRO, L. A.; GADIA, R.; JORGE, M. T. Comparison between the Epidemiology of Accidents and the Clinical Features of Envenoming by Snakes of the Genus *Bothrops*, Among Elderly and Non-Elderly Adults. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 41, p. 46-49, 2008.

ROBINSON, J. P.; CARTER, W. O.; NARAYANAN, P. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, Funcional assays by flow cytometry. 2. ed. p. 1-1001, 1995.

RODRIGO, R.; RIVERA, G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 409-22, 2002.

RODRIGUEZ, A. A; UZCATEGUI, W.; AZUAJE, R.; AGUILAR, I.; GIRON, ME. A Clinical and Epidemiological Analysis of Accidental Bites by Snakes of the Genus *Bothrops* in Venezuela. **Rev Cubana Med Trop.** n. 52, p. 90-94, 2000.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S. R.; COGO, J. C.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v. 43, n. 6, p. 633-638, 2004.

ROMITI, N. et al. P-Glycoprotein inhibitory activity of lipophilic constituents of *Echinacea pallida* roots in a human proximal tubular cell line. **Planta Med**, v. 74, p. 264-6, 2008.

SABBISSETTI, V.; BONVENTRE, J. V. **Brenner and Rector's The Kidney**. Ninth Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 1016–1042

SANCHEZ, E. F. *et al.* Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *B. leucurus* venom. **Arch Biochem Biophys.**, v. 468, n. 2, p. 193-204, 2007.

SANTOS, M. F. L.; FARANI, M. C.; ROCHA, P. N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp: revisão e análise crítica da literatura. **J Bras Nefrol**, v. 31, n. 2, p. 132-138, 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS. Acidentes Ofídicos. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Caderno 14, p. 1-24. Brasília-DF, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/Informe-Epidemiol--gico-animais-pe--onhentos---.pdf>. Acesso em 01/07/16.

SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron Clin Pract**, v.119, p. 131–137, 2011.

SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 69, p. 2131-2147, 2006.

SHANKLAND, S. J.; WOLF, G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 278, n. 4, p. 515-529, 2000.

SHIMO, T.; MOTO, M.; ASHIZAWA, N.; OBA, K.; NAGATA, O. Study on toxicological aspects of crystal-mediated nephrotoxicity induced by FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor, in rats. **Drug Chem Toxicol.** v. 34, n. 2, p. 192-8, 2011.

SIEW E.D.; WARE L.B.; IKIZLER T.A.; Biological markers of acute kidney injury. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 22, p. 810-820, 2011.

SIMIONI, L.; D'ABREU, A.C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca da ilha) venom and phospholipase A2 containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 185 - 195, 2001.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442-448, 2006.

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

STABÉLI, R. S.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI, R. R.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, G. S.; MOURA, A. A.; CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. (2012). Purification of Phospholipases A2 from American Snake Venoms, Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis, Dr. Leonardo Calderon (Ed.), ISBN: 978-953-51-0813-9, InTech, DOI: 10.5772/53052. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/purification-of-phospholipases-a2-from-american-snake-venoms>>. Acesso em 16.06.2016.

STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463–516, 2001.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim Biophys Acta** v. 1824, p. 164–176, 2012.

TAKEDA, T.; MCQUISTAN, T.; ORLANDO, R. A.; FARQUHAR, M. G. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. **J Clin Invest**, v. 108, p. 289-301, 2001.

TAVARES, C.; MACIEL, T.; BURIN, S.; AMBRÓSIO, L.; GHISLA, S.; SAMPAIO, S.; CASTRO, F. L-Amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom induces cytotoxicity and apoptosis in JAK2V617F-positive cell lines. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 2, p. 128–134, 2016.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE JR, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* ssp. with hydrogen peroxide by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. 620–624, 2001.

TESCH, G. H. Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective. **Nephrology** (Carlton, Vic.), v. 15, n. 6, p. 609–16, 2010.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 9539–9542, 1997.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Natural toxins II.**, v. 391, p. 37-62, 1996.

VAIDYA, V. S. et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. **American journal of physiology. Renal physiology.**, [Bethesda, Md], v. 290, n. 2, p. F517 - F529, Feb. 2006.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R.; LEÓN, I. R.; ROCHA, S. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. Bothrops insularis venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 241 -255, 2009.

VAN-TIMMEREN, M. M. et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 291, n. 2, p. 456-464, 2006.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. Cap. 14, p. 2005.

VÊNCIO, D. Estudo do ofidismo em Goiás: comprometimento da função renal. **Rev goiana Med**, n. 34, p. 95-116, 1988.

VERZOLA, D.; RATTO, E.; VILLAGGIO, B.; PARODI, E.L.; PONTREMOLI, R.; GARIBOTTO, G.; VIAZZI, F. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. **PLoS One**, v. 9, p. e115210, 2014.

VIEIRA Jr, J. M. Atualização em insuficiência renal: expressão gênica na insuficiência renal aguda (IRA). **J. Bras. Nefrol.**, v. 23, n. 4, p. 230-233, 2001.

VIJAYAN, A.; FAUBEL, S.; ASKENAZI, D. J.; CERDA, J.; FISSELL, W. H.; HEUNG, M.; HUMPHREYS, B. D.; KOYNER, J. L.; LIU, K. D.; MOUR, G.; NOLIN, T. D.; BIHORAC, A. Clinical Use of the Urine Biomarker [TIMP-2] × [IGFBP7] for Acute Kidney Injury Risk Assessment. **American Journal of Kidney Diseases** v. 68, n. 1, p. 19-28, 2016.

VOGELMANN; S. U.; NELSON, W. J.; MYERS, B. D.; LEMLEY, K. V. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. **Am j Physiol Renal Physiol**, v. 285, p. 40-51, 2003.

VU, T. H. *et al.* MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell.**, v. 93, p. 411-22, 2001.

WARE, W. A. Glomerulonefropatias. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5a ed. [Rio de Janeiro]: Elsevier; 2015. p. 575-582.

WASUNG, M.; CHAWLAB, L.; MADERO, M. Biomarkers of renal function, which and when? **Clinica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 438, p. 350-357, Jan. 2015.

WEI, X. L.; WEI, J. F.; LI, T.; QIAO, L.-Y.; LIU, Y.-L.; HUANG, T.; HE, S.-H. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1126–1139, 2007.

WHITE, J. Snakes venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WONG, O. F.; HIN-TAT, F.; SHING-KIT-TOMMY, L.; KA-KEUNG, L.; CHAK-WAH, K.; Simpson, I. D. A preliminary survey of Hong Kong snake shops and the potential snake bite risks for the healthcare system. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 9, p. 931-936, 2009.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **J. Nutr.** v. 134, p. 489–492, 2004.

WUSTER, W.; DUARTE, M. R.; SALOMÃO, M. D. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. **J. Zool.**, v. 266, p. 1-10, 2005.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal homodimeric phospholipase A2 from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 28, p. 969-973, 2007.

YANG, L.; FAWCETT, J. P.; ØSTERGAARD, J.; ZHANG, H.; TUCKER, I. G. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. **Mol Pharm.**, v. 9, n. 1, p. 29-36, 2012.

YOSHIMURA, S., SUEMIZU, H., NOMOTO, Y., SAKAI, H., KATSUOKA, N., MORIUCHI, T. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. **Nephron, Basel**, v. 73, n. 2, p. 207-211, 1996.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, n. 74, p. 139-162, 1994.

YU, L.; DOS SANTOS, B. F. C.; BURDMANN, E. A.; SUASSUNA, J. H. R.; BATISTA, P. B. P. **Insuficiência Renal Aguda**. Diretrizes da AMB Sociedade Brasileira de Nefrologia. São Paulo, 2007.

ZELER, A.E. Snake venom action: are enzymes involved in it? **Experientia**, v.

33: p. 143-150. 1977.

ZHOU, Y. *et al.* Comparison of Kidney Injury Molecule-1 and Other Nephrotoxicity Biomarkers in Urine and Kidney Following Acute Exposure to Gentamicin, Mercury, and Chromium. **Toxicol Sci.**, v. 101, n. 1, p. 159–170, 2008.

ZHU, X. *et al.* Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces THP-1 macrophage apoptosis via ROS bursts and activation of the mitochondrial caspase pathway. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 3719-36, 2015.

ANEXO

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DA NEFROTOXICIDADE DO VENENO DA SERPENTE *BOTHOPOIDES INSULARIS IN VIVO E IN VITRO*", protocolo nº40/2016, sob responsabilidade do Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/04/2016 a 01/06/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	12
Peso/Idade	30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734