



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

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES

**BIOMARCADORES PRECOSES DA INJÚRIA RENAL NO ENVENENAMENTO
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA SERPENTE COLOMBIANA *Bothrops ayerbeii*
EM RATOS**

FORTALEZA-CE

2017

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES

**BIOMARCADORES PRECOCES DA INJÚRIA RENAL NO ENVENENAMENTO
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA SERPENTE COLOMBIANA *Bothrops ayerbei*
EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre Havt Bindá

FORTALEZA-CE

2017

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

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

V537b Velasco Reyes, Mayra Alejandra.

Biomarcadores precoce de injuria renal no envenenamento experimental induzido pela serpente Colombiana Bothrops ayerbei em ratos / Mayra alejandra velasco reyes. – 2017.
90 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá .

1. Bothrops ayerbei. 2. Lesão renal aguda. 3. Biomarcadores renais. 4. Acidente ofídico. I. Título.

CDD
615.1

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES

BIOMARCADORES PRECOCES DA INJÚRIA RENAL NO ENVENENAMENTO
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA SERPENTE COLOMBIANA *Bothrops ayerbei* EM
RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em 14 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará – UECE

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, porque ele foi minha fortaleza nos momentos de soledade, por oferecer tranquilidade a meu coração nos momentos de frustração, e pela oportunidade de poder terminar meus estudos.

A minha família, principalmente meu pai **Lucio Velasco**, minha mãe **Ximena Reyes**, meus Irmãos **Fabian Velasco e Sandra Velasco**, minha cunhada **Luísa**, e minha sobrinha “**Pochis**” pelo apoio incondicional e por estar sempre presentes na minha preparação como Mestre.

Ao prof. Dr **Alexandre Havt Bindá**, por todo seu apoio durante minha estadia na universidade, pela orientação, pelos constantes incentivos motivacionais, pelo amor de pai e por compartilhar suas experiências e conhecimentos.

Ao **laboratório de Toxicologia Molecular (LTM)** por brindar as ferramentas necessárias para a culminação de meu projeto.

Aos laboratórios pertencentes ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **LDI (Laboratório de Doenças Infecciosas)**, **LFAFVET (Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas)**, pela contribuição durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Centro de Investigaciones Biomédicas da Universidade do Cauca, Colômbia**, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores integrantes das bancas de qualificação Profs. Drs. **Pedro Jorge Caldas Magalhães, Lucília Maria Abreu Lessa e Daniel de Sousa Freire** e defesa Profs. Drs. **Alexandre Havt Bindá, Alice Maria Costa Martins, e Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, pelas ideias e sugestões no aprimoramento do trabalho.

Aos professores do curso de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, por todos seus conhecimentos durante o percorrido da minha formação nas aulas.

Aos meus amigos do programa da pós-graduandos: **Junior, Laura, Natacha, Pedro Sá, Danya, Gabriel, Pedro, Amanda, Priscila, Lucas, Ana Flávia**, por sua amizade e os momentos compartilhados.

Aos amigos pós-graduandos do LTM e LDI: **Samilly, Herlice, Advane, Cleber, Marília, Mariana, Mara, Karol, Jessica, João Vitor, Pedro, Paloma, Jeanine, Júlio, Jeferson** pelos muitos momentos compartilhados no laboratório e na linda fortaleza, além do apoio durante toda minha formação como mestre, obrigada.

Aos estudantes de iniciação científica, **Pedro Mateus, Claudiane, Tiago, Rafaela, Macio** pela dedicação durante os experimentos. Obrigada...!

A meus amigos da Colômbia, **Nata, José, Astrid, Felipe, Alejito**, e do México, **Dulce**, vocês sabem, “somos los que somos”, obrigada pela companhia em todo momento.

Obrigada a todas y cada uma das pessoas que conheci em Fortaleza que de um ou outro jeito me brindaram apoio durante minha estância em Brasil.

Aos animais experimentais, verdadeiros heróis da ciência, que entregaram suas vidas para a realização deste trabalho e progresso do conhecimento científico.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico **FUNCAP** pelo apoio financeiro.

RESUMO

ANÁLISE DOS BIOMARCADORES PRECOSES DA LESÃO RENAL PROMOVIDOS PELO VENENO DA SERPENTE COLOMBIANA *Bothrops ayerbeii* EM RATOS

O envenenamento ofídico representa um problema de saúde pública, que se caracteriza por causar várias fisiopatologias sistêmicas, dentre estas a lesão renal aguda (LRA) é a de maior importância. A patogênese da LRA induzida por o envenenamento Botrópicos é multifatorial e tende a ser associada à nefrotoxicidade direta, coagulação vascular disseminada e atividade de enzimas proteolíticas que atuam sobre as estruturas do rim. No estado do Cauca na Colômbia a serpente *Bothrops ayerbeii* foi reconhecida como nova espécie através da descrição morfológica e à caracterização molecular de seu veneno, considerando esta última como uma valiosa assinatura para a identificação de espécies e as propriedades do veneno. Por conseguinte, o objeto deste trabalho é caracterizar os efeitos renais do veneno de *B. ayerbeii* (VBa), e avaliar parâmetros bioquímicos associados à função renal, perfil oxidativo e atividade antioxidante fazendo uma comparação com biomarcador precoce de lesão renal de transcrição gênica através de RT-PCR, e o análise histopatológica. Para isto, foram utilizados ratos Wistar de 250-300g (protocolo 150/14), divididos em três tempos 8, 16 e 24 horas cada um com dois grupos de avaliação controle (PBS) e tratado (75% DI50 do VBa). Assim, foi observado que o envenenamento por inoculação intraperitoneal do VBa, promove alterações bioquímicas associadas num começo a lesão direta do veneno sobre as estruturas renais, causando um aumento do ácido úrico plasmático (8h: $1,220 \pm 0,2061 \mu\text{g/dL}$) e urinário (8h: $5,600 \pm 0,230 \mu\text{g/dL}$), seguido por proteinúria (8h: $17,920 \pm 0,807 \mu\text{g/dL}$), diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG) (8h: $0,9211 \pm 0,2131 \text{ mL/min/100g}$), e aumento do clearance de água livre (8h: $-0,013 \pm 0,003 \text{ mL/min}$), assim como também um aumento da osmolalidade urinária (8h: $625,8 \pm 33,27 \text{ Mmol/Kg}$). Posteriormente foi encontrado um aumento nas concentrações de ureia na urina (16h: $31,120 \pm 1,866 \mu\text{g/dL}$) e creatinina urinária (24h: $54,890 \pm 3,360 \mu\text{g/dL}$), com uma diminuição do clearance de osmolalidade (16h: $317,8 \pm 26,05 \text{ Mmol/Kg}$) e um aumento da fração de excreção de Na^+ (16h: $4,552 \pm 0,204 \%$) e o RFG (24h: $0,7415 \pm 0,0717 \text{ mL/min/100g}$). A seguir o VBa apresentou alterações no perfil oxidativo no último tempo de avaliação com uma diminuição dos níveis de GSH (24h: $78,75 \pm 3,059 \mu\text{g/mg prot.}$) e verificou-se lesão nas células renais pela expressão de biomarcadores tais como: a molécula de injúria renal-1 (KIM-1) e a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL). Além disso, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-18 (IL-18), interleucina-1 beta (IL-1 β) e o peptídeo-1 quimiotático para monócitos (MCP-1) foram encontradas aumentadas, atuando como coadjuvantes no processo de lesão renal. Desta forma, o VBa não altera parâmetros plasmáticos associados a LRA, mas causa processos hemorrágicos que repercute na circulação sanguínea com extravasamento o que possivelmente causaria hipovolemia e conseqüente diminuição do RFG, seguido por uma regulação na excreção de substâncias. Comparando com os resultados da biologia molecular comprovou-se dano nas células renais, e desenvolvimento de processos inflamatórios que podem promover lesão renal. Concluímos assim, que o veneno de VBa promove alterações renais comprovado por biologia molecular, e não por teste bioquímicos, demonstrando que o uso de biomarcadores precoce é necessário para o entendimento da fisiopatologia renal gerada por o envenenamento de serpentes.

Palavras-chaves: *Bothrops ayerbeii*, lesão renal aguda, biomarcadores renais, acidente ofídico.

ABSTRACT

ANALYSIS OF EARLY BIOMARKERS OF RENAL INJURY PROMOTED BY COLOMBIAN SERPENT VENOM *Bothrops ayerbei* IN RATS

The snake poisoning represents a public health problem, which is characterized by several systemic pathophysiologicals, among which acute renal injury (AKI) is the most important. The pathogenesis of AKI induced by Botrópico poisoning is multifactorial and tends to be associated with direct nephrotoxicity, disseminated vascular coagulation and the activity of proteolytic enzymes that act on the structures of the kidney. In the state of Cauca in Colombia the snake *Bothrops ayerbei* was recognized as a new species through the morphological description and molecular characterization of its venom, considering the latter as a valuable signature for the identification of species and the properties of the venom. Therefore, the purpose of this work is to characterize the renal effects of venom of *B. ayerbei* (VBa), the present study evaluated biochemical parameters associated with renal function, oxidative profile and antioxidant activity, making a comparison with early biomarker of renal injury through gene transcription RT-PCR, and histopathological analysis. For this, 250-300g Wistar rats (150/14 protocol) were used, divided into three times 8, 16 and 24 hours each with two control (PBS) and treated groups (75% DVB of VBa). Thus, it was observed that poisoning by intraperitoneal inoculation of VBa promotes biochemical changes associated at the onset with direct injury of the venom on renal structures, causing an increase in plasma uric acid (8h: $1,220 \pm 0,2061 \mu\text{g} / \text{dL}$) and urinary (8h: $5,600 \pm 0,230 \mu\text{g} / \text{dL}$), followed by proteinuria (8h: $17,920 \pm 0,807 \mu\text{g} / \text{dL}$), decreased glomerular filtration rate (GFR) (8h: $0.9211 \pm 0.2131 \text{ mL} / \text{min} / 100\text{g}$), And increased clearance of free water (8h: $-0.013 \pm 0.003 \text{ mL} / \text{min}$), as well as increased urine osmolality (8h: $625.8 \pm 33.27 \text{ Mmol} / \text{kg}$). An increase in urine urea concentrations (16h: $31,120 \pm 1,866 \mu\text{g} / \text{dL}$) and urinary creatinine (24h: $54,890 \pm 3,360 \mu\text{g} / \text{dL}$) was observed, with a decrease in the osmolality clearance (16h: $317.8 \pm 26,05 \text{ Mmol} / \text{kg}$) and an increase in the Na + excretion fraction (16h: $4.552 \pm 0.204\%$) and the RFG (24h: $0.7415 \pm 0.0717 \text{ mL} / \text{min} / 100\text{g}$). (24h: $78.75 \pm 3.059 \mu\text{g} / \text{mg prot.}$) And renal cell damage was found by expression of renal biomarkers such as: renal injury-1 molecule (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). In addition, pro-inflammatory cytokines such as interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 beta (IL-1 β) and chemotactic peptide-1 for monocytes (MCP-1) were found to act as adjuvants in the injury process. Thus, VBa does not alter plasma parameters associated with AKI, but causes hemorrhagic processes that affect the blood circulation with extravasation, which could cause hypovolemic and consequent decrease of RFG, followed by a regulation in the excretion of substances. Compared with the results of molecular biology, renal cell damage has been proven, and inflammatory processes that may promote renal damage have been developed. We conclude that the VBa venom promotes changes in kidney damage as demonstrated by molecular biology, and not by biochemical tests, demonstrating that the use of early biomarkers is necessary for the understanding of renal pathophysiology generated by snake poisoning.

Keywords: *Bothrops ayerbei*, acute renal injury, renal biomarkers, ophidian accident.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|------------------------|---|--|
| VBa | - | Veneno da serpente <i>Bothrops ayerbei</i> |
| PLA₂ | - | Fosfolipase A ₂ |
| SVMP | - | Metaloproteinases de veneno de serpente |
| SP | - | Serine proteinase |
| CTL | - | Lectina tipo C |
| CRISP | - | Proteínas ricas em cisteína |
| DIS | - | Desintegrinas |
| BPP | - | Peptídeos potenciadores de bradicinina |
| PEP | - | Peptídeos |
| LAO | - | L-amino oxidase |
| NGF | - | Fator de crescimento nervoso |
| PDE | - | Fosfodiesterase |
| SVSP | - | Serino protease de venenos de serpentes |
| MB | - | Membrana Basal |
| FAD | - | Favin adenin dinucleídeo |
| FMN | - | Flavina mononucleotídeo |
| LRA | - | Lesão renal aguda |
| MDCK | - | Madin darby canine kidney |
| MTT | - | {brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} |
| AA | - | Aminopectidase |
| FA | - | Fosfatase alcalina |
| α-GST | - | Alfa-glutationa-S-transferase |
| γ-GT | - | Gama glutamil transferase |
| LDH | - | lactato desidrogenase |
| NAG | - | N-acetil-β-(D)-glucosaminidase |
| RBP | - | Proteínas de ligação ao retinol |
| KIM-1 | - | Molécula de injúria renal-1 |
| NGAL | - | Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica |
| CysC | - | Cistatina C |
| IL-18 | - | Interleucina-18 |
| OPN | - | Osteopontina |
| FABP | - | Proteína de ligação de ácidos graxos |

- IL-1 β** – Interleucina-1 beta
- IFN- γ** – Interferão-gama
- MCP-1** – Peptídeo-1 quimiotático para monócitos
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- MDA** – Malondialdeído
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- GSH** – Glutathiona reduzida
- RFG** – Ritmo de filtração glomerular
- Clcr** – Clearance de creatinina
- FeNa⁺** - Fração de excreção de sódio
- FeK⁺** - Fração de excreção de potássio

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mecanismo hemorrágico proposto de dois estágios da ação de metaloproteinases dependentes de zinco (SVMPs) do veneno de serpentes em vasos sanguíneos capilares. 17
- FIGURA 2.** Patogêneses da nefropatia de venenos de serpentes no fluxo sanguíneo renal. 20
- FIGURA 3.** Distribuição geográfica de *Bothrops ayerbeii* e exemplo de uma espécie recolhida no Valle alto do rio Patia Cauca-Colombia. 22
- FIGURA 4.** Composição do veneno da serpente *Bothrops ayerbeii*. 23
- FIGURA 5.** Biomarcadores da Lesão Renal Aguda, biomarcadores tradicionais urinários e biomarcadores para o diagnóstico precoce. 25
- FIGURA 6.** Desenho experimental, grupo controle e tratado. 34
- FIGURA 7.** Avaliação dos valores plasmáticos de creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 44
- FIGURA 8.** Avaliação dos valores plasmáticos de úreia em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 45
- FIGURA 9.** Avaliação dos valores plasmáticos de ácido úrico em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 45
- FIGURA 10.** Avaliação dos valores urinários de creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 46
- FIGURA 11.** Avaliação temporal dos valores urinários da úreia gerados pelo veneno da serpente *B. ayerbeii* quando avaliado em diferentes tempos. 47

- FIGURA 12.** Avaliação dos valores urinários da proteína em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 47
- FIGURA 13.** Avaliação dos valores urinários de ácido úrico em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 48
- FIGURA 14.** Avaliação dos valores da relação proteína / creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 49
- FIGURA 15.** Avaliação dos valores do ritmo de filtração glomerular em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 50
- FIGURA 16.** Avaliação dos valores do fluxo urinário em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 50
- FIGURA 17.** Avaliação dos valores do %FeNa⁺ em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 51
- FIGURA 18.** Avaliação dos valores do %FeK⁺ em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 52
- FIGURA 19.** Avaliação dos valores de clearance de osmolalidade em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 53
- FIGURA 20.** Avaliação dos valores de clearance de água livre em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 53
- FIGURA 21.** Avaliação dos valores de malondialdeído (MDA) em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 54

- FIGURA 22.** Avaliação dos valores da atividade do GSH em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos. 54
- FIGURA 23.** Avaliação da transcrição gênica de KIM-1 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 55
- FIGURA 24.** Avaliação da transcrição gênica de NGAL no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 56
- FIGURA 25.** Avaliação da transcrição gênica de MCP-1 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 56
- FIGURA 26.** Avaliação da transcrição gênica de IL-18 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 57
- FIGURA 27.** Avaliação da transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 58
- FIGURA 28.** Imagem representativa da avaliação temporal das alterações histológicas do tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbeii*, quando avaliado em diferentes tempos. 58

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Sequência de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e AS: antisenso).

41

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Gênero <i>Bothrops</i> | 14 |
| 1.2 Componentes dos Venenos | 15 |
| 1.4 Alterações Renais Produzidas pelos venenos de serpentes | 19 |
| 1.5 <i>Bothrops ayerbeii</i> | 22 |
| 1.6 Biomarcadores renais e estresse oxidativo | 24 |
| | |
| 2. JUSTIFICATIVA | 29 |
| | |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Objetivo geral | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos. | 31 |
| | |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Animais e Aspectos Éticos | 33 |
| 4.2 Substâncias e Veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> | 33 |
| 4.3 Avaliação dos Parâmetros Renais (<i>in-vivo</i>) | 33 |
| 4.3.1 Grupos experimentais | 33 |
| 4.3.2 Desenho experimental | 34 |
| 4.3.3 Análises Bioquímicas | 35 |
| 4.3.4 Análise da Função Renal | 37 |
| 4.3.5 Análise da Função Tubular | 37 |
| 4.3.6 Avaliação dos parâmetros de osmolalidade e fluxo urinário | 38 |
| 4.4 Avaliação da Atividade Oxidante | 39 |
| 4.4.1 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no tecido renal de ratos | 39 |
| 4.4.2 Avaliação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal | 39 |
| 4.5 Técnicas de Biologia Molecular | 40 |
| 4.5.1 Extração do RNA total | 40 |
| 4.5.2 Síntese de cDNA | 40 |
| 4.5.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) | 40 |
| 4.6 Estudo Histopatológico | 42 |
| 4.7 Análises Estatísticas | 42 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5 | RESULTADOS | 44 |
| 5.1 | Análises Bioquímicas | 44 |
| 5.1.1 | Determinação dos parâmetros bioquímicos no plasma de animais controle e tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 44 |
| 5.1.2 | Determinação das alterações bioquímicas na urina de animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 46 |
| 5.2 | Análise da Função Renal | 49 |
| 5.2.1 | Análise do Ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário da função renal de animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 49 |
| 5.3 | Análise da Função Tubular | 51 |
| 5.3.1 | Determinação da função tubular através da fração de excreção dos eletrólitos Na ⁺ (%FeNa ⁺) e K ⁺ (%FeK ⁺) em animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 51 |
| 5.4 | Avaliação dos parâmetros de osmolalidade | 52 |
| 5.5 | Perfil do dano oxidativo | 54 |
| 5.5.1 | Determinação dos valores de Malondialdeído (MDA) e da atividade da Glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 54 |
| 5.6 | Técnicas de Biologia Molecular | 55 |
| 5.6.1 | Perfil molecular da expressão de mRNA de biomarcadores de lesão renal e inflamação em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 55 |
| 5.7 | Análises Histopatológicas | 58 |
| 5.7.1 | Efeitos do veneno da espécie <i>B. ayerbeii</i> sobre as alterações histopatológicas em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente <i>B. ayerbeii</i> . | 58 |
| 6. | DISCUSSÃO | 61 |
| 7. | CONCLUSÕES | 72 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O acidente ofídico é um evento caracterizado pela inoculação de substâncias tóxicas como resultado da picada de serpentes peçonhentas, que pode causar severos danos a tecidos e órgãos e assim, gerar óbito. Este tipo de acidente é classificado como uma doença negligenciada e encontra-se relacionado de forma prevalente a atividades rurais em regiões tropicais (LÉVANO e FERNÁNDEZ, 2004; CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007), gerando impacto na população e nos sistemas de saúde, especialmente na África, Oceania e América Latina.

A estimativa global do número de casos reportados por picadas de serpentes é de 5,4 milhões de casos, dos quais 2,5 milhões destes casos são associados com envenenamentos que resultam em 125.000 mortes. Estas estatísticas encontram-se subestimadas devido à maioria dos dados disponíveis terem limitações em seu registro, pois em países de renda média ou baixa, a procura de centros de saúde, crenças e acesso aos cuidados clínicos não são ideais (KASTURIRATNE et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2010; MORAIS et al., 2013).

Em zonas tropicais latino-americanas estima-se anualmente um total de 150.000 envenenamentos de serpentes e aproximadamente 5.000 mortes relacionadas, sendo os países mais afetados, os de maior diversidade em relevo e *habitat*, dentre estes, México, Brasil e Colômbia (CUELLAR-GORDO et al., 2015). Em especial, as condições ambientais e geográficas da Colômbia favorecem para uma alta diversidade de espécies de serpentes com 272 identificadas, das quais 49 são citadas como de importância clínica que se encontram distribuídas por todo o país divididas em duas famílias, nove gêneros e uma espécie marinha (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007; CUELLAR-GORDO et al., 2015).

Dados recentes têm apresentado que a Colômbia é afetada consideravelmente por casos de acidente ofídico, especialmente por serpentes do gênero *Bothrops*, o qual representa 90% dos acidentes reportados. Na estimativa anual, encontra-se uma incidência de 6,2 a 20 casos de acidentes para cada 100.000 habitantes e uma mortalidade de 0,04 a 7,6% dos casos reportados (NUÑES, 2014), pelo que a importância do estudo na fisiopatologia do envenenamento torna-se importante para o entendimento do acidente ofídico.

1.1 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops*, família Viperidae subfamília Crotalinae, tem um alto interesse científico, pois são as serpentes desse gênero as maiores causadoras de envenenamentos

ofídicos. Compreende um total de 37 espécies comumente conhecidas como víboras de covinhas (pitvipers), devido a sua principal sinapomorfia: a presença da fosseta loreal em uma concavidade do osso maxilar (NASCIMENTO, 2014). Esta estrutura termo-sensorial lhes permite identificar e dimensionar presas tais como pequenos mamíferos devido à endotermia (CAMPBELL e LAMAR, 2004).

Encontram-se amplamente distribuídas em todos os continentes, com exceção da Antártida e Austrália. São serpentes grandes, chegando a atingir um comprimento até 2 m, podem ser terrestres ou semi-arbóreas, de hábitos noturnos nas regiões tropicais, sendo mais ativas nos períodos chuvosos, durante os quais a maioria das atividades reprodutivas ocorrem (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; SASA et al., 2009).

Na Colômbia este gênero está representado pelas espécies *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops punctatus*, *Bothrops rhombeatus*, *Bothrops ayerbei* e *Bothriechis schlegelii*, as quais são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos (FOLLECO-FERNÁNDEZ, 2010; SARMIENTO, 2012; CUELLAR-GORDO et al., 2015). Recentemente no estado do Cauca na Colômbia, é descrito que a serpente responsável por altas taxas de incidência de acidentes ofídicos é a *B. ayerbei*, gerando 43,2% dos envenenamentos reportados no estado no período de 2000 a 2008 (AYERBE e LATORRE, 2010),

1.2 Componentes dos Venenos

Venenos de serpentes compreendem uma complexa mistura de moléculas de diferente estrutura bioquímica, com uma predominância de proteínas, chegando a 90% do peso seco, muitas das quais com atividade enzimática. Além das proteínas, também são encontrados no veneno pequenos peptídeos, carboidratos, lipídeos, íons metálicos e compostos orgânicos, que por sua vez são compostos de sódio, potássio, fósforo, cloro, cálcio, magnésio, manganês, zinco e cobre (ÂNGULO e LOMONTE, 2009; AL-SHAMMARI et al., 2013).

Toxinas das serpentes da família viperidae podem ser agrupadas em proteínas com atividade enzimática como: serino proteinases de venenos de serpentes (SVSP), metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMP), L-aminoácido oxidases (LAOs) e grupos de fosfolipases A₂ (PLA₂), além de proteínas sem atividade enzimática tais como: desintegrinas, moléculas como lectina tipo C, peptídeos potencializadores de bradicinina, miotoxinas, proteínas secretoras ricas em cisteína, fator de crescimento endotelial vascular e nervoso, cistatina e inibidores de peptidase do tipo Kunitz (FRY, 2005; CALVETE et al., 2007; ALAPE-GIRÓN et al., 2009).

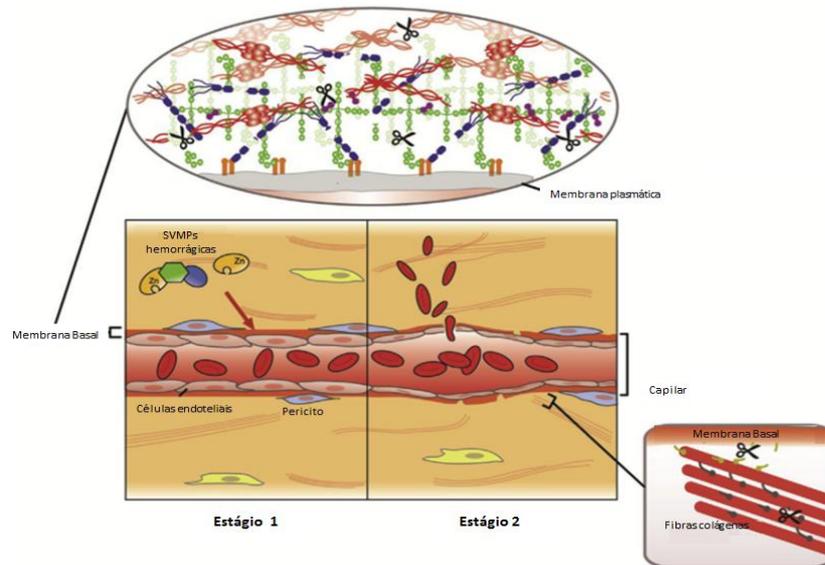
Todas estas moléculas que representam a composição dos venenos podem variar por fatores ambientais, nutricionais e geográficos, desta forma contribuindo para a atividade biológica específica do veneno (BORGES et al., 2001; ALAPE-GIRÓN et al., 2009; JORGE et al., 2017). Dentre estes compostos, os componentes de maior importância são as metaloproteinase (SVMPs), as fosfolipase A₂ (PLA₂s) e as serino proteinases (SVSP).

As Metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs) são toxinas abundantes em venenos Viperídeos e desempenham um papel importante no dano tecidual local, na hemorragia e na coagulopatia após o envenenamento. Estas se encontram classificadas com base no seu domínio e estão divididos em quatro grupos estruturais PI, PIIa e PIIb, PIIIa e PIIIb, e PIV (GUTIÉRREZ et al., 2005; FOX e SERRANO, 2008; ÂNGULO e LOMONTE, 2009).

O Grupo PI encontra-se estruturalmente composto pelo domínio metaloproteinase, resíduos de cisteinil e ligação de ponte dissulfeto. O grupo PII caracteriza-se por apresentar, além do domínio de metaloproteinase, um domínio de desintegrinas, o que potencializa seus efeitos. O grupo PIII está constituído por desintegrinas ricas em cisteínas podendo-se encontrar domínios glicosilados o que causa maior hemorragia do que os outros grupos. Finalmente, as SVMP P-IV são heterodímeros, com uma subunidade correspondente na cadeia de P-III e um domínio lectina tipo C, sendo classificada recentemente dentro da classe P-III (BERNARDES et al., 2008; FOX e SERRANO, 2008; GUTIÉRREZ et al., 2009a).

As modificações dos domínios têm importância porque permite comparar a potência dos efeitos. Assim à classe P-III é considerada como uma das mais potentes no processo hemorrágico quando comparada com as classes PI e P-II, as quais carecem de desintegrinas e são ricas em cisteínas (ASEGA et al., 2014; MORA-OBANDO et al., 2014). Atualmente, tem sido elucidado o mecanismo de ação das SVMPs o qual tende a ser unificado num modelo de dois estágios (**Figura 1**). Inicialmente, as SVMPs hemorrágicas se ligam e hidrolisam componentes da membrana basal (MB) de vasos capilares, particularmente degradando colágeno tipo IV. Seguida da degradação da MB se produz um enfraquecimento da estabilidade mecânica da parede capilar, e conseqüentemente as forças hemodinâmicas que operam normalmente na vasculatura (pressão hidrostática e tensão de cisalhamento) provocam a distensão e eventual ruptura da parede capilar, seguido do extravasamento (GUTIÉRREZ, 2016).

Figura 1. Mecanismo hemorrágico proposto de dois estágios da ação de metaloproteínas dependentes de zinco (SVMPs) do veneno de serpentes em vasos sanguíneos capilares.



Fonte: Adaptado de GUTIÉRREZ (2016).

Nota: Mecanismo de ação hemorrágico proposto em dois estágios de metaloproteínas dependentes de zinco (SVMPs) do veneno de serpentes em vasos sanguíneos capilares. As SVMPs hidrolisam os principais componentes da membrana basal (BM) que envolve as células endoteliais dos vasos capilares.

Fosfolipase A_2 é um dos principais compostos do veneno de serpentes que tem adquirido uma variedade de atividades tóxicas durante sua evolução, incluindo miotoxicidade, neurotoxicidade, citotoxicidade, efeitos anticoagulantes e inflamatórios.

De maneira geral, as PLA_2 s são enzimas responsáveis pela ativação de mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios como as prostaglandinas, os leucotrienos, fator de agregação plaquetária e lisofosfolídeos. Essas enzimas catalisam a hidrólise da ligação *sn*-2 de ésteres de fosfoglicerídeos, produzindo lisofosfolídeos e ácidos graxos insaturados em uma reação dependente de cálcio (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). Dentre seus efeitos mais importantes está sua participação nos eventos degenerativos das células musculares que acontece de maneira geral quando estas miotoxinas ligam-se ao receptor da membrana plasmática rompendo-a por mecanismos catalíticos dependentes ou independentes, o que provoca um pronunciado influxo de Ca^{2+} onde se produz vários eventos degenerativos que promovem o dano (GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003).

Por outro lado, L-amino oxidase de venenos de serpentes LAOs, são usualmente homodímeros com cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) covalentemente ligados a sua estrutura química. A cor amarela dos venenos

ricos nessas enzimas está relacionada à presença do pigmento riboflavina presente nos cofatores, fato que facilita sua purificação. São encontrados em altas concentrações que variam segundo a espécie e podem contribuir com a toxicidade do veneno (IZIDORO et al., 2014). Estas LAOs exibem especificidade catalítica para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos de cadeia longa e estão ativos numa ampla gama de pH e temperaturas. Suas estruturas, massa molecular e pontos isoelétricos são bastante variados, capazes de induzir alterações locais contribuindo nos efeitos hemorrágicos e edematogênicos, assim como nos efeitos sistêmicos da função plaquetária, que causam distúrbios da coagulação do plasma, entre outras (CAMPOS et al., 2013).

1.3 Envenenamento ofídico Botrópico

O entendimento do envenenamento se dá a partir da compreensão do veneno sendo este uma secreção produzida por glândulas exócrinas, de cor amarela ou branca, constituída por uma série de peptídeos e proteínas tóxicas dentre elas as miotoxinas, hemorraginas, nefrotoxinas, neurotoxinas e toxinas coagulantes que causam diferentes efeitos (LÉVANO e FERNÁNDEZ, 2004), as quais têm como função imobilizar, matar e/ou digerir a sua presa (ALAPE-GIRÓN et al., 2008).

O veneno é utilizado pelas serpentes como mecanismo para a obtenção de alimento, assim como mecanismo de defesa diante alguns predadores, como, por exemplo, o homem. Neste contexto, o envenenamento por venenos de serpentes ocasiona várias manifestações (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007; FADARE et al., 2012).

Na clínica é observado que o envenenamento por serpente está associado a várias manifestações clínicas importantes, dentre elas: 1) a lesão tecidual local; 2) miólise; 3) coagulopatia e hemorragia; 4) insuficiência renal e 5) cardiotoxicidade, gerando efeitos secundários que contribuem para morbidade e mortalidade (WHITE, 2005). Dentre a sintomatologia da lesão tecidual local gerada pelos venenos botrópicos encontram-se caracterizada por inchaço, bolhas, hemorragia e necrose muscular, que são desenvolvidas rapidamente após a picada (AL-JOHANY et al., 2015). A miólise sistêmica ocorre devido à atividade proteolítica que se encontra associada ao diagnóstico de rabdomiólise, que é uma manifestação clínica na qual ocorre a liberação de mioglobina do tecido muscular esquelético, filtrada e eliminada pelo sistema renal, gerando dano, com mudança na tonalidade da urina (AZEVEDO-MARQUES et al., 1987).

Diversos tipos de compostos do veneno podem afetar a hemostasia, encontrando-se

vários efeitos relacionados que conduzem á redução da coagulação sanguínea, aumento hemorrágico, choque hipovolêmico, dano secundário a órgãos (hemorragia intracerebral, hemorragia pituitária anterior) e danos renais. Além de apresentar alterações trombóticas, que podem conduzir á embolia pulmonar (WHITE, 2005).

Vários fatores estão envolvidos na patogênese da LRA após a picada de serpentes, a qual é desenvolvida de forma tardia e se encontra relacionada a uma ação direta do veneno ou por efeitos indiretos através de mediadores inflamatórios, impacto nefrotóxico da mioglobina, hemoglobina, hipovolemia, coagulopatia intravascular disseminada e isquemia renal como relatada por vários autores (ALBUQUERQUE et al., 2013; HROVAT et al., 2013; CASTRO et al., 2014).

Clinicamente, sabe-se que o tratamento nos casos clínicos de envenenamento é a imunoterapia com antiveneno que tem uma boa eficácia na neutralização de toxinas responsáveis por efeitos sistêmicos. Entretanto, o soro não é muito eficaz na reversão dos danos locais (GUTIÉRREZ et al., 2006), e sequelas do mesmo pode terminar no desenvolvimento de dano em diferentes órgãos por acumulação do veneno como no caso das falas renais. Por isso, novas alternativas vêm sendo estudadas, e o conhecimento para a detecção de dano é primordial no tratamento após envenenamento.

1.4 Alterações Renais Produzidas pelos venenos de serpentes

A fisiopatologia renal associada ao veneno de serpente envolve todos os componentes renais, isto é, glomérulo, túbulos, interstício e vasculatura (HROVAT et al., 2013). Devido ao rim ser um órgão altamente vascularizado tende a ser muito suscetível a toxinas dada a sua funcionalidade na eliminação de substâncias (REYES et al., 2009; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

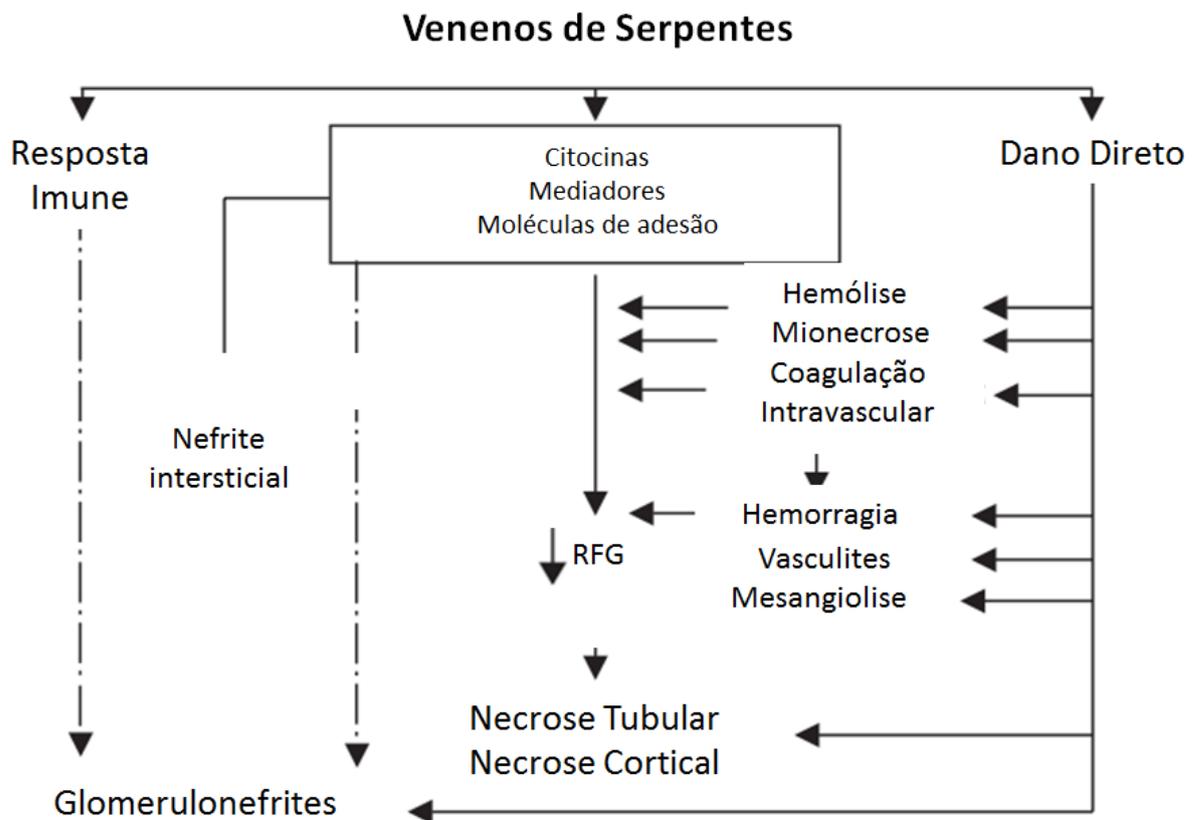
Achados clínicos e pré-clínicos apresentam manifestações onde são observadas comumente anomalias que desencadeia lesão renal aguda (LRA), e tende a ser desenvolvida após a picada de serpentes do gênero *Bothrops*. Dentre essas manifestações pode ser encontrado: oligúria, proteinúria, hematúria e incremento de creatinina plasmática, as quais podem ser persistentes, e evoluir a um estado crítico requerendo de tratamento com diálises. (RODRIGUES et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2013).

Estudos renais do envenenamento por *B. asper* mostraram por histologia uma progressão no dano renal através do tempo, onde conseguiu ser observado colapso glomerular, presença de cilindros hialinos, infiltrado inflamatório, dilatação dos túbulos e

vários tipos de glomerulonefrites até o desaparecimento da cápsula de Bowman (REYES et al., 2009). Estes dados se encontram em concordância, com outros estudos, no qual é encontrado alterações morfológicas no tecido renal tais como: dilatação glomerular, necrose tubular e danos nas estruturas renais, bem como sinais de hemorragia medular e intertubular nos estágios iniciais desencadeados pelo envenenamento de serpentes *Crotalus* (AL-JOHANY et al., 2015).

Lesões renais podem ser causadas por ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos de isquemia renal que resulta em LRA como a vasoconstrição renal e consequente isquemia renal, hemólises e depósitos de fibrina glomerular que causa microangiopatia trombótica, além de dano vascular, que também é resultante do dano por efeitos nefrotóxicos diretos (**Figura 2**) (ALBUQUERQUE et al., 2013; CASTRO et al., 2014).

Figura 2. Patogêneses da nefropatia de venenos de serpentes no fluxo sanguíneo renal.



Fonte: Adaptado de SITPRIJA, (2006).

Nota: Patogêneses da nefropatia de serpentes. TFG, taxa de filtração glomerular.

Modelos experimentais diferentes têm de ser utilizados para elucidar manifestações renais do veneno das serpentes, especialmente por aquelas do gênero *Bothrops*. Para tal fim são estudadas várias metodologias que permitem investigar os parâmetros renais sem interferência sistêmica ou hemodinâmica. Um Estudo realizado por CASTRO e colaboradores (2004), demonstrou dano tubular proximal promovido por altas concentrações do veneno da serpente *B. jararaca* sendo este efeito independente do cálcio extracelular, visto que sua remoção não impediu os danos e poderia ser mediado parcialmente por peroxidação lipídica.

Assim mesmo, metodologias de perfusão de rim isolado também têm sido estudadas com diferentes serpentes do gênero *Bothrops*, estes estudos demonstraram alterações nos parâmetros renais avaliados tais como: diminuição na pressão de perfusão, na resistência vascular renal, no ritmo de filtração glomerular, no fluxo urinário e nos percentuais do transporte tubular de sódio e potássio (HAVT et al., 2005; MARTINS et al., 2005; EVANGELISTA et al., 2010; MORAIS et al., 2013). Estes efeitos foram atribuídos à liberação de mediadores inflamatórios com a participação de óxido nítrico como consequência da destruição tecidual causada pelo veneno, já que necrose proeminente, hemorragia e edema são característicos do envenenamento botrópico (DE NORÕES, 2009).

Por sua vez, ensaios *in-vitro* tem permitido a comparação dos efeitos citotóxicos de diferentes compostos dos venenos de serpentes e sua neutralização (GIRÓN et al., 2005). Logo, a utilização de linhagens celulares tal como MDCK (Madin Darby Canine Kidney), são um modelo de células bem estabelecidas para o estudo dos mecanismos de ação intracelular que permite reconhecer a toxicidade renal.

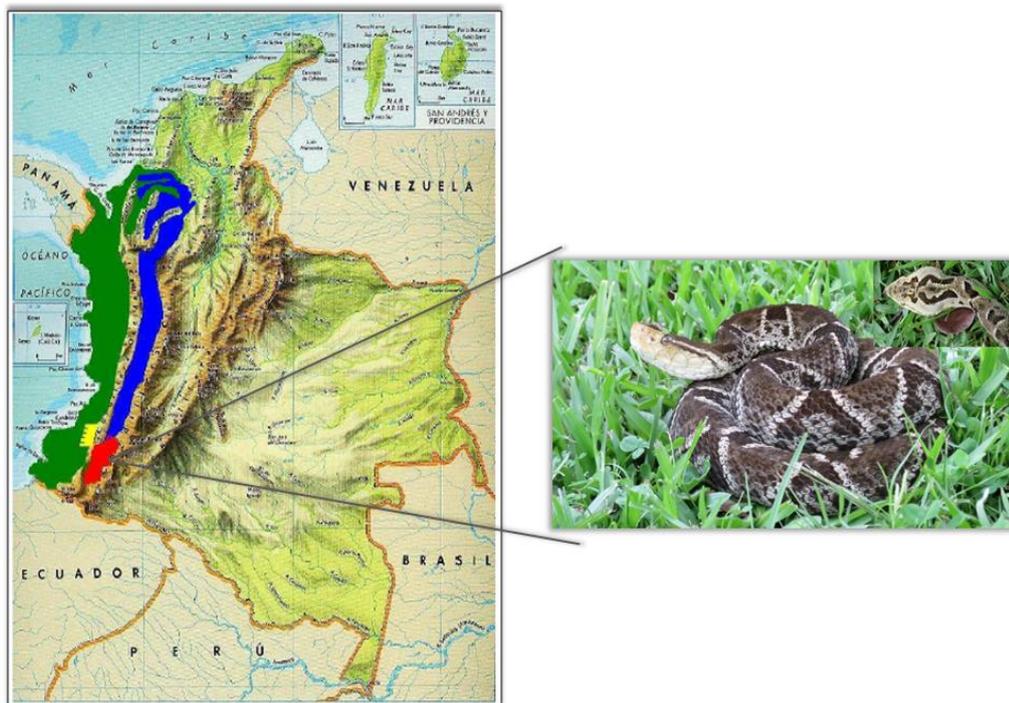
Desta forma, estudos realizados com o veneno de *Lachesis muta muta*, apresentou alterações nos parâmetros de viabilidade e de adesão celular, e sugeriu que as alterações nas medidas biofísicas da monocamada de células MDCK seriam relacionadas com a viabilidade celular, a permeabilidade da membrana, a permeabilidade da junção e adesão celular ao substrato

Do mesmo modo, estudos de toxicidade com o veneno *Crotalus vegrandis* e suas frações hemorrágicas e neurotóxicas foram avaliados sobre células primárias renais de camundongos e células de linhagem contínua Vero (células de rim de macaco verde africano) obtendo-se mudanças nos dois tipos de células avaliadas, quando quantificadas pelo método MTT {brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Estes resultados sugerem que as células Vero foram susceptíveis ao veneno total e suas frações, chegando a ser a fração hemorrágica mais eficiente do que a fração neurotóxica (GIRÓN et al., 2005).

1.5 *Bothrops ayerbei*

De acordo com a sua descrição morfológica a serpente *B. ayerbei* é uma espécie de grande comprimento, de cabeça alongada e afilada, com um formato na parte cefálica muito singular, tanto em machos como em fêmeas, a qual corresponde a uma de suas principais características morfológicas de diferenciação. Em sua fase adulta, possui um dorso que consiste em uma matriz de 14 a 19 triângulos pretos em forma de “X” divididos ao longo do corpo pela parte central superior, e sua cor pode variar de preto a cinza, com margens de cores claras. A sua distribuição geográfica (**Figura 3**) é dada por uma barreira natural estabelecida pelo rio Cauca, que corresponde ao bosque pré-montanhoso e subtropical com uma altura de 400 a 1800m acima do nível do mar (FOLLECO-FERNÁNDEZ, 2010).

Figura 3. Distribuição geográfica de *Bothrops ayerbei* e exemplo de uma espécie recolhida no Valle alto do rio Patia Cauca-Colombia.



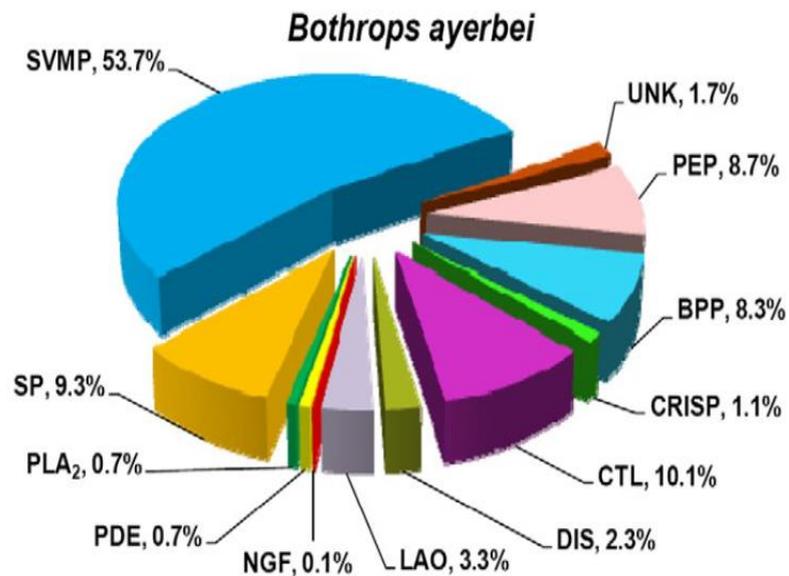
Fonte: Adaptado de FOLLECO-FERNANDEZ *et al.* (2008).

Esta espécie tem sido considerada como uma variante da serpente *B. asper* que a partir de avaliações morfológicas recentes foi considerada como uma nova espécie no ano 2010 (FOLLECO-FERNÁNDEZ, 2010). Mudanças na sua morfologia foram atribuídas a sua

distribuição devido a fatores ecológicos extrínsecos como a barreira natural do Valle do rio Patia na Colômbia, que divide estas duas espécies, e assim conduz a convergência dos caracteres morfológicos (SANDERS et al., 2004).

Estudo de MORA-OBANDO e colaboradores (2014) descrevem a composição proteica do veneno da serpente *B. ayerbeii* (**Figura 4**) e realizou-se uma comparação com a serpente *B. asper*. Neste contexto, observou-se uma considerável diminuição (0,7%) da fosfolipase A₂ (PLA₂) do veneno de *B. ayerbeii*, quando comparada com a alta proporção desta enzima (25,3%) no veneno de *B. asper*. Além disso, destaca-se a presença de altas quantidades de proteínas como metaloproteínas de venenos de serpentes (SVMP) (53,7%) no veneno de *B. ayerbeii* o que o torna com atividade hemorrágica mais potente quando comparada com outras espécies do mesmo gênero. Justificando desta forma, sua letalidade relacionada consideravelmente aos processos hemorrágicos sistêmicos em diferentes órgãos, mostrando, sua importância para a caracterização de seus efeitos, com o intuito de entender o quadro clínico apresentado no envenenamento causado por esta espécie (MORA-OBANDO et al., 2014).

Figura 4. Composição do veneno da serpente *Bothrops ayerbeii*.



Fonte: MORA-OBANDO et al. (2014)

Nota: Composição do veneno da serpente *Bothrops ayerbeii* de acordo a suas famílias proteicas expressadas em porcentagem do conteúdo de proteína total: SVMP metaloproteínase; SP: serino proteínase; CTL: lectina tipo C; PLA₂: fosfolipase A₂; CRISP: proteínas secretoras ricas em cisteína; DIS: desintegrinas; BPP: peptídeos potenciadores de bradicinina; PEP: outros peptídeos; LAO: L-aminoácido oxidase; NGF: fator de crescimento nervoso; PDE: fosfodiesterase; UNK: não identificado.

No estado de Cauca, localizado na Colômbia, é relatado uma elevada frequência de acidentes ofídicos em relação aos demais estados do mesmo país, devido ao mesmo contemplar 80% das espécies nacionais, sendo as serpente *B. asper* e *B. ayerbeii* registradas como as espécies de maior accidentalidade (RESTREPO e PEÑA, 2007; AYERBE e LATORRE, 2010).

Estudos anteriores já têm sido realizados em nosso grupo, onde foram desenvolvidas as primeiras pesquisas sobre os efeitos renais que o veneno da serpente *B. ayerbeii* poderia causar, desta forma conseguiu-se observar que o veneno desta serpente tem efeitos citotóxicos quando avaliados em cultura de células MDCK (Madin Darby Canine Kidney), apresentando-se uma diminuição na sua viabilidade celular em diferentes concentrações do veneno. Além disso, observou-se efeitos ao nível renal sem interferência sistêmica, na alteração de parâmetros avaliados sendo observada uma diminuição na pressão de perfusão, junto com uma diminuição da resistência vascular renal, um aumento do fluxo urinário e uma diminuição da fração de excreção de Na^+ . Seguidamente, e para observar as alterações renais *in-vivo* foram utilizadas diferentes doses sub-letais do veneno de *B. ayerbeii*, sendo observado um aumento no clearance de creatinina junto com proteinúria no tempo de avaliação de 24h, com isto comprovou-se que o veneno causa alterações renais de forma direta o indireta que modifica a funcionalidade do rim.

1.6 Biomarcadores renais e estresse oxidativo

Os biomarcadores da função renal são importantes no reconhecimento de anomalias renais funcionais e estruturais que se encontram associadas a alterações de parâmetros avaliados na urina e no plasma sanguíneo (MEHTA et al., 2007).

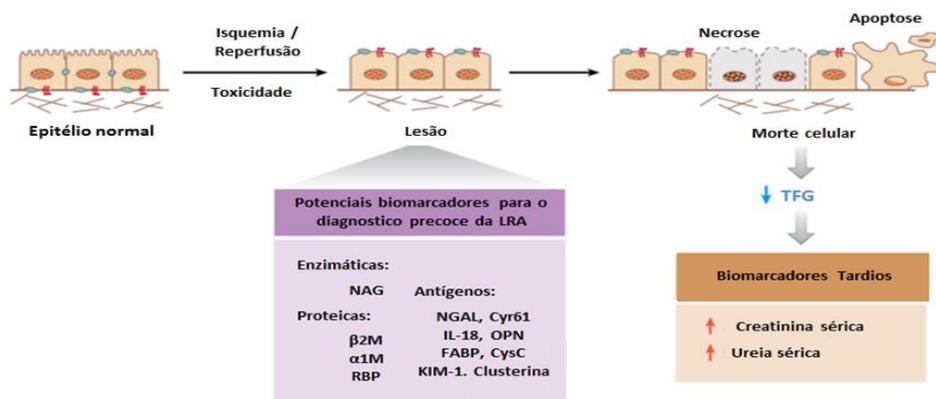
A fisiopatologia dos mecanismos que contribuem para a LRA seguidos de uma isquemia ou dano tóxico inclui; a) alterações na perfusão renal resultantes da perda de autorregulação e aumento da vasoconstrição renal, b) disfunção tubular e morte celular por apoptose e necrose, c) Representação de células viáveis e mortas que contribuem para a obstrução intratubular, d) alterações metabólicas que resultam em disfunção do transporte e pode causar anormalidades do equilíbrio tubuloglomerular, e e) produção local de mediadores inflamatórios resultando em inflamação intersticial e congestão vascular (PARIKH et al., 2007).

Os quadros clínicos de LRA encontram-se associada com a retenção de creatinina, ureia e outros resíduos metabólicos normalmente excretados pelo rim, os quais são usados

como medidas de uso rotineiro para a detecção da LRA. Outro parâmetro importante na LRA é o volume de urina o qual pode se encontrar normal ou pode resultar em oligúria ou até mesmo anúria (VAIDYA; BONVENTRE, 2006).

Contudo, estes parâmetros indicativos de LRA possuem baixa sensibilidade e alteram-se de forma significativa quando a lesão já está em estágios evoluídos. Neste contexto, existe uma busca por melhores e mais específicas biomarcadores que permitam a detecção precoce e conveniente de possíveis danos renais e, desse modo, melhorar o quadro clínico do paciente, evitando complicações maiores durante a evolução da doença renal. Diferentes tipos de biomarcadores renais têm sido usados e podem ser classificados em três categorias: 1) enzimáticos (Alanine aminopeptidase [AA], Fosfatase alcalina [FA], Alfa-glutationa-S-transferase [α -GST], β -glucosidase, gama glutamil transferase [γ -GT], calicreína, lactato desidrogenase [LDH], Lisozima [muramidase], N-acetil- β -(D)-glucosaminidase [NAG], endopeptidase neutra da borda em escova renal); 2) proteicos de alto e baixo peso molecular (β 2-microglobulina α 1-microglobulina, proteína de ligação ao retinol [RBP]); e 3) antígenos urinários (Molécula de injúria renal-1 [KIM-1], lipocalina associada à gelatinase neutrofílica [NGAL], cistatina C [CysC], Proteína rica em cisteína [Cyr61], interleucina 18 [IL-18], Osteopontina [OPN], F-actina, Trocador de Sódio e Cálcio e proteína de ligação de ácidos graxos [FABP] (**Figura 5**) (VAIDYA; BONVENTRE, 2006).

Figura 5. Biomarcadores da lesão renal aguda, biomarcadores tradicionais urinários e biomarcadores para o diagnóstico precoce.



Fonte: Adaptado de PARIKH *et al.* (2007).

Nota: Biomarcadores de LRA: marcadores tradicionais utilizados na prática clínica, tais como: compostos nitrogenados e creatinina sérica, inespecíficos e tardios. Biomarcadores de LRA utilizados para o diagnóstico precoce e sugestão de novas estratégias terapêuticas específicas, resultando em menos complicações e melhores resultados.

Dentre estes biomarcadores uns dos mais importantes e que são avaliados neste trabalho é a molécula de injúria renal-1 (KIM-1), o qual é uma glicoproteína transmembrana tipo 1, que se encontra expressa em baixos níveis nos rins normais como bem em outros órgãos e está situada nas células do túbulo proximal, localizada principalmente na membrana apical das células onde o ectodomínio da KIM-1 é eliminado da superfície celular por um processo dependente de metaloproteinase (BAILLY et al., 2002), esta eliminação em conjunto com um incremento na sínteses intra-renal de mRNA e proteína de KIM-1 é provavelmente a causa do aumento na urina após uma LRA (HAN et al., 2002). Estudos recentes têm indicado essa molécula como um biomarcador precoce de iniciação de dano renal (LUO et al., 2016) e foi evidenciado através de cultura de células epiteliais renais que o KIM-1 participa na recuperação de células e na regeneração tubular por ter demonstrado que atua como um receptor de fosfatidilserina e assim medeia a fagocitose de corpos apoptóticos e de detritos celulares (ICHIMURA et al., 2008).

Outro biomarcador importante é a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) a qual é uma glicoproteína ligada a gelatinase, expressa nos grânulos específicos dos neutrófilos e membro da família da lipocalina, que mais tarde mostrou ser também segregada por células epiteliais durante a inflamação (VAIDYA e BONVENTRE, 2006). Dados *in-vivo* têm sugerido que o ramo ascendente de henle e as células intercaladas do ducto coletor são os principais sítios de produção de NGAL nos rins (PARAGAS et al., 2011; SCHMIDT-OTT et al., 2007). O NGAL é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida pelo túbulo proximal de forma dependente da megalina (Hvidberg et al., 2005). Uma diminuição na reabsorção tubular após LRA pode causar um aumento adicional na concentração urinária de NGAL (HVIDBERG et al., 2005).

A interleucina-18 (IL-18), por sua vez, é uma citocina pró-inflamatória de 18k-Da secretada por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno, as quais têm a capacidade de induzir a produção de interferon-gama (IFN- γ) em células auxiliares T de tipo 1 (HERGET-ROSENTHAL et al., 2012). Foi descrita como membro da família das citocinas interleucina-1 (IL-1) e são reconhecidas como importantes reguladores das respostas imunes inatas e adquirida. A IL-18 é um mediador da inflamação e lesão do tecido isquêmico em muitos órgãos como coração e rim, e está constitutivamente expressa por células do túbulo contornado distal, túbulos de conexão e ducto coletor de rim em humanos saudáveis (FINN e PORTER, 2003). Na sua síntese, a IL-18 encontra-se como um precursor inativo sem um peptídeo de sinal, e permanece intracelular até à sua clivagem pela caspase-1, sendo subsequentemente secretada por monócitos ou macrófagos (FANTUZZI et al., 1999). Desse

modo, quimiocinas como ao peptídeo-1 quimiotático para monócitos (MCP-1) é outro importante biomarcador que tem como função o recrutamento de monócitos e macrófagos dentro do túbulo intersticial e é conhecido que esta molécula pode ser produzida principalmente em células do epitélio tubular de rins, contribuindo desta forma para inflamação intersticial renal e fibroses (FINN e PORTER, 2003).

Do mesmo modo que estes biomarcadores permitem identificar danos de lesão renal, as espécies reativas de oxigênio (EROs) encontram-se envolvidas em vários processos de degeneração de tecidos, o que permite esclarecer respostas fisiológicas. Considerando esta afirmação, temos que o malondialdeído (MDA) é um dos biomarcadores mais estudados sendo considerado um marcador global de distúrbios oxidativo relacionado a quantificação da peroxidação lipídica (KERKSICK e WILLOUGHBY, 2005). Os níveis aumentados de lipoperoxidação reportam comprometimento do funcionamento da membrana, com diminuição da fluidez e inativação de receptores e enzimas ligados à esta região, favorecendo para o aumento da permeabilidade não específica aos íons e em seguida, contribuindo para danos e mutações ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (SANTHOSH et al., 2013). Outro biomarcador importante é a glutatona reduzida (GSH) que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER et al., 2008). Além disso, essa enzima é presente no tecido renal e tem papel fundamental para o funcionamento adequado das células renais (MOREIRA et al., 2013).

Recentes estudos têm apresentado a importância da avaliação da atividade antioxidante como mecanismo de predição da evolução da doença renal. Observa-se um desequilíbrio entre os processos celulares oxidativo e a defesa antioxidante renal. Em estudos pré-clínicos recentes de injúria renal por antibióticos nefrotóxicos e modelo de isquemia observou-se uma redução considerável dos valores de GSH, da enzima superóxido dismutase (SOD) e heme oxigenase correlacionados ao incremento de MDA no tecido renal (RODRIGUES et al., 2014, DA COSTA et al., 2015).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Devido à prevalência dos envenenamentos que são apresentados mundialmente, torna-se importante à busca para suprimir os efeitos causados no acidente ofídico. Desta forma, pesquisas dos venenos de serpentes têm aumentado durante os últimos anos, elucidando alguns novos mecanismos de ação de moléculas isoladas dos venenos e contribuindo para melhores tratamentos clínicos.

No estado do Cauca na Colômbia, estudos epidemiológicos realizado no ano 2008, relatam que a serpente *B. ayerbeii*, uma nova espécie identificada apenas no ano 2010, era responsável da maior parte dos casos de envenenamentos reportados. Após a sua recente descrição, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos e a informação relatada aos seus efeitos ainda são limitada. Em adição, estudos de MORA-OBANDO e colaboradores (2010) realizaram a caracterização proteômica do veneno desta serpente observando um alto percentual de metaloproteinases na sua composição, o que a torna extremamente hemorrágica e é uma condição pouco comum nos venenos Botrópicos.

Recentemente nosso grupo de pesquisa e em colaboração com o laboratório de farmacologia de venenos, toxina e lectinas (LFAVET) demonstrou que o veneno de *B. ayerbeii* (VBa) tem efeitos citotóxicos em células renais MDCK, e alterações de parâmetros renais de pressão de perfusão, ritmo de filtração glomerular, resistência vascular renal, fluxo urinário e transporte de Na^+ , com todo na avaliação dos teste bioquímicos da função renal não conseguiu-se obter alterações de falha renal quando avaliado em diferentes concentrações subletais. Desta forma, estes resultados nos permitiu algumas hipóteses e o direcionamento à realização de novas pesquisas que mimetizam os acontecimentos desenvolvidos na clínica norteada para a função renal.

Diante o exposto, o presente estudo quis elucidar as alterações renais que a inoculação intraperitoneal do VBa pode causar em diferentes tempos após o envenenamento, realizando uma comparação dos teste bioquímicos tradicionais de lesão renal, com os biomarcador precoce renais que vem sendo desenvolvidos, além de observar se processos de estresse oxidativo poderiam estar implicados numa falha renal. Com isto, ajudar no entendimento e na compreensão das alterações fisiopatologia renal produzidas por o veneno da serpente *B. ayerbeii*. Visando elucidar novas formas para a adequação de futuras estratégias terapêuticas que possam ser efetivas nas alterações renais induzida por este veneno.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ❖ Estudar as alterações renais induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops qyerbei* e o papel dos biomarcadores moleculares na detecção precoce da lesão renal aguda.

3.2 Objetivos específicos.

- Identificar as alterações nos parâmetros bioquímicos tradicionais da função renal e tubular gerados pela inoculação do veneno da serpente *B. ayerbeii*;
- Avaliar o perfil molecular da expressão de mRNA de biomarcadores precoce associados com o processo de lesão renal e inflamação sobre o tecido renal após a inoculação do veneno da serpente *B. ayerbeii*;
- Avaliação do perfil oxidativo e a atividade antioxidante no tecido renal dos animais expostos ao envenenamento da serpente *B. ayerbeii*;
- Identificar as alterações histopatológicas que a inoculação intraperitoneal do veneno da serpente *B. ayerbeii* pode causar nos tecidos renais.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Aspectos Éticos

Foram utilizados ratos Wistar, com uma média de peso entre 260 a 300 gramas (n=6-7 por grupo). Os mesmos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em condições controladas em estantes ventiladas. Tiveram ciclo claro/escuro (12/12 horas), temperatura mantida em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e acesso a alimento e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo (150/14).

4.2 Substâncias e Veneno da serpente *B. ayerbei*

Todos os produtos químicos e outros fármacos aqui mencionados foram obtidos da Sigma-Aldrich® USA, ou Vetec® Brasil. O veneno da serpente *B. ayerbei* (VBa) foi cedido gentilmente pelo Dr. Santiago Ayerbe do Centro de Investigação Biomédica da Universidade de Cauca (CIBUC)-Colômbia.

4.3 Avaliação dos Parâmetros Renais (*in-vivo*)

4.3.1 Grupos experimentais

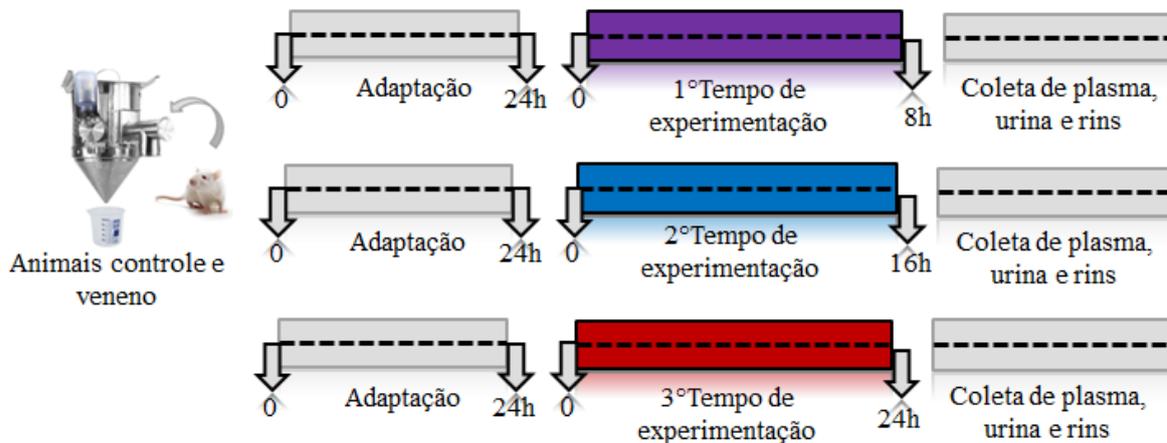
- Grupo controle
 - i) Controle salina: Animais tratados com PBS em um volume de 0,2 ml via I.P (Intraperitoneal) nos diferentes tempos avaliados (8, 16 e 24h), (n=6).

- Grupo veneno
 - ii) Grupos veneno *B. ayerbei*: Animais tratados com o veneno de *B. ayerbei* na dose de 75% da DL_{50} (50,1 μg /mouse) via I.P (Intraperitoneal) (MORA-OBANDO *et al.*, 2014) nos diferentes tempos avaliados (8, 16 e 24 h), (n=7).

4.3.2 Desenho experimental

Para a avaliação da função renal *in vivo*, os animais foram conduzidos e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas durante um período de adaptação de 24hs com água e ração à vontade. Ao término desse período, água e ração foram colocados novamente e deu-se início ao período de tratamento onde os mesmos foram divididos em dois grupos de forma aleatória: grupo controle (Solução de PBS) e grupo veneno (75% da DL_{50} VBa 2,78 $\mu\text{g/g}$). Uma vez terminada a administração, os animais permanecerem na gaiola durante diferentes períodos de tempo experimental (8, 16 e 24hrs), e a urina foi coletada ao término de cada um destes tempos (**Figura 6**). Em seguida, os animais foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e transferidos para uma mesa cirúrgica. Após uma laparotomia, a veia cava foi dissecada e puncionada para a coleta de sangue. Amostras de sangue foram coletadas em eppendorfs heparinizados (10%). Concluído este processo, plasma e urina foram centrifugados a 3500rpm por 15 min, e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem bioquímica de função renal. Os rins foram coletados e pesados numa balança de precisão analítica (Mettler Toledo- AB104S®). Em seguida um deles foi seccionado e armazenado em formol 10% tamponado para estudos histológicos. O restante do tecido renal coletado foi dividido em vários eppendorf de 1,5 mL e armazenados a -80 para os ensaios com biologia molecular e estresse oxidativo.

Figura 6. Desenho experimental, grupo controle e tratado.



Fonte: Autor.

4.3.3 Análises Bioquímicas

- **Dosagem de ácido úrico no plasma e urina**

Alíquotas de 50 µL de plasma e urina, foram utilizadas para a determinação de ácido úrico por reação de ponto final. Num primeiro momento, foi realizada a preparação do reagente de trabalho seguindo as recomendações do fabricante (Labtest®, Fortaleza, CE, Brasil), e numa placa de 96 poços foram pipetadas as amostras, o controle branco (reagente de trabalho) e o padrão, sendo estes dos últimos pipetados em triplicata. Terminado este processo foram adicionados 100µL do reagente de trabalho em cada poço, e a placa foi incubada sob agitação por 15 min. Finalmente, foi realizada a leitura de absorvância do teste e o padrão em 520nm. Para a determinação do ácido úrico foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Ácido Úrico (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste/Absorbância do padrão} \times 6$$

- **Dosagem da ureia no plasma e urina**

Alíquotas de 50µL de plasma e urina (diluída 1:20 em água destilada), foram utilizadas para a determinação de ureia por reação de ponto final. Num primeiro momento, foi realizada a preparação do reagente de trabalho urease tamponada e o oxidante de uso seguindo as recomendações do fabricante (Labtest®, Fortaleza, CE, Brasil). Em uma placa de 96 poços foram pipetadas as amostras, e o padrão, sendo estes último pipetado em triplicata. Terminado este processo foram adicionados 50µL da urease tamponada a cada poço, e a placa foi incubada a 37°C em agitação por 10 min. Finalizado este tempo, foram adicionados 50µL do oxidante de uso e a placa foi incubada novamente sob agitação durante 10 min. A leitura da absorvância do teste e padrão foram realizada a 600nm. Para a determinação da ureia foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Ureia (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste/Absorbância do padrão} \times 70$$

- **Dosagem de creatinina no plasma e urina**

Alíquotas de 50 µL plasma e urina (diluída 1:20 em água destilada) foram utilizadas para a determinação de creatinina (creatinina k®, Fortaleza, CE, Brasil) por reação cinética de 2 pontos utilizando o método de Jaffé. Num primeiro momento, foi realizada a preparação de picrato alcalino (reagente de trabalho) seguindo as recomendações do fabricante (Labtest®). Em uma placa de 96 poços foram pipetadas as amostras, o controle branco (reagente de trabalho) e o padrão, sendo estes dois últimos pipetados em triplicata. Terminado este processo foram adicionados 50 µL de picrato alcalino em cada poço e a placa foi transportada imediatamente para a leitura da absorbância do teste e padrão aos 30 e 90 segundos com leitura em 510 nm. Para a determinação da creatinina foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbância do teste}}{\Delta \text{ Absorbância do padrão}} \times 70$$

$$\Delta \text{ Absorbância do teste ou padrão} = A_{90\text{segundos}} - A_{30\text{segundos}}$$

- **Dosagem da proteína urinária**

Alíquotas 50 µL de urina foram utilizadas para a determinação de proteína por reação de ponto final. Seguidamente, numa placa de 96 poços foram pipetadas as amostras, o controle branco (reagente de cor) eo padrão, sendo estes dois últimos pipetados em triplicata. Terminado este processo foram adicionados 100 µL do reagente de cor em cada poço com ajuda de uma pipeta multicanal. Seguidamente, a placa foi incubada sob agitação por 15 min. Finalmente, foi realizada a leitura de absorbância do teste e padrão em 600 nm. Para a determinação da proteína na urina foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 50$$

- **Dosagem da relação proteína / creatinina**

Para avaliação de lesão glomerular, realizou-se a quantificação da relação proteína/ creatinina mediante a utilização dos valores de proteína urinária e creatinina urinária seguindo a fórmula padrão (CARLOTTI et al., 1998). Todos os valores foram expressos (mg/mg).

$$\text{Proteína/Creatinina (mg/mg)} = \text{Proteína urinária} / \text{Creatinina na urina}$$

4.3.4 Análise da Função Renal

Realizou-se a quantificação do Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) através do Clearance de creatinina (Ccr), o qual é utilizado para a determinação da função renal dos animais e foi calculada usando a fórmula-padrão (MELLO et al., 2010) todos os valores foram expressos em mL/min/100g :

$$\text{Ccr} = (\text{CrU} \times \text{V} / \text{CrP})$$

$$\text{V} = \text{V}_{\text{urina}} / [(\text{Peso}_{\text{animal}}/100) \times \text{Tempo}] \times 1000$$

Clcr = Concentração de creatinina urinária (mg/dL), **V** = Volume de urina por min (mL/min/100g), **CrP** = Concentração plasmática de creatinina (mg/dL), **V_{urina}**= Volume de urina por min (mL/min), **Peso_{animal}**= Peso em gramos do animal.

4.3.5 Análise da Função Tubular

- **Determinação da fração de excreção de sódio e potássio**

A fração de excreção de sódio (FeNa⁺) e potássio (FeK⁺) foram calculada a partir da mensuração de sódio e potássio urinário e plasmático por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) utilizando o método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Pak® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinários. O aparelho foi calibrado usando padrão contendo 140 mEq/l de Na⁺ e 5 mEq/l de K⁺. O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil). O cálculo utiliza as seguintes fórmulas (TOLEDO et al., 2013):

$$\text{FeK (\%)} = [(\text{KU (mEq/L)} / \text{K}^+ \text{ (mEq/L)}) / (\text{CrU (mg/dL)} / \text{CrP (mg/dL)})] \times 100$$

$$\text{FeNa (\%)} = [(\text{NaU (mEq/L)} / \text{Na}^+ \text{ (mEq/L)}) / (\text{CrU (mg/dL)} / \text{CrP (mg/dL)})] \times 100$$

KU = Potássio na urina, **K** = Potássio no soro, **NaU** = Sódio na urina, **Na** = Sódio no soro
CrU = Creatinina na urina, **CrP** = Creatinina em plasma.

4.3.6 Avaliação dos parâmetros de osmolalidade e fluxo urinário

A determinação da osmolalidade urinária e plasmáticas foi feita através de osmometria de congelamento (osmômetro vapro 5520®) usando padrões com osmolalidades apropriadas para as amostras (100, 290 e 1000 mOsm/kg). Seguidamente foi avaliado o clearance de osmolalidade (Cosm) seguido do clearance de água livre (CH₂O) assim como o fluxo urinário de acordo com o tempo de avaliação seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Cosm (mL/min)} = \text{Osm}_{\text{urina}} (\mu\text{Osm/ml}) \times \text{FU (mL/min)} / \text{Osm}_{\text{plasmática}} (\mu\text{Osm/ml});$$

$$\text{CH}_2\text{O (mL/min)} = \text{FU (mL/min)} - \text{Cosm (mL/min)}.$$

$$\text{FU} = \text{Urina (ml)} / \text{Tempo de avaliação (min)}.$$

Cosm= Clearance osmolar; **Osm_{urina}**= osmolalidade urinaria; **FU**= Fluxo urinário;

Osm_{plasmática}= Osmolalidade plasmática; **CH₂O**= Clearance de água livre.

4.4 Avaliação da Atividade Oxidante

4.4.1 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no tecido renal de ratos

Para confirmar a presença de dano oxidativo direto nos tecidos foi avaliado o grau de lipoperoxidação nos tecidos, mensurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de OHKAWA et al (1979). Foi realizado um homogenato dos tecidos renais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Desta solução coletou-se 250µL de homogenato em tubos de ensaio e, em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,06%. Seguidamente todas as amostras foram transportadas a banho Maria (95-100 °C) por 45 minutos. Logo após, a mistura foi resfriada em água corrente e, a seguir, foi adicionado 2 mL de n-butanol. Em seguida, o tubo foi agitado no vórtex por 1 min. e centrifugado a 1200 rpm/15 min. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e pipetado em uma placa de 96 poços, imediatamente foi realizada a leitura no leitor de Elisa (520-535 nm). Os resultados forem expressos em µ/mols de malondialdeído (MDA) por mg de tecido.

4.4.2 Avaliação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal

O princípio do teste consiste na utilização do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)), que é bem usado para analisar a atividade da GSH em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotometria (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual de glutathiona reduzida foi utilizado um homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 0,02M 100 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato) foi colocado em tubo de ensaio e adicionado 80 µL de água destilada+20 µL de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi misturado num vórtex e centrifugado a 3000 g por 10 min. Seguidamente, 100µL do sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo, para ser adicionado 200 µL de tampão tris 0,4M (ph 8,9) + 5 µL de solução de DTNB. A curva padrão foi obtida mediante a leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg). Todo o ensaio foi avaliado na absorvância de 412 nm e os resultados foram expressos em µg/mg de tecido.

4.5 Técnicas de Biologia Molecular

4.5.1 Extração do RNA total

A extração de RNA foi realizada com o kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (LIFE, technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) a fim de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA.

4.5.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação contém 1µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução continha de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200 ng/µL e água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20µL. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi de 25°C por 5 min, 46°C por 20 min, e 95°C por 1 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.5.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os processos fisiopatológicos no envenenamento da serpente *B. ayerbei* foram estudados conforme a transcrição do mRNA dos genes relacionados ao dano da lesão renal e aos processos pró-inflamatório celular, pela transcrição de KIM-1, MCP-1, NGAL, IL-18 e IL-1β realizadas com o aparelho CFX96 Touch qPCR System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) (Tabela 1). O gene de referência utilizado foi o GADPH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Tabela 1. Sequência de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e AS: antisenso).

| Processo relacionado | Genes | Sequência dos iniciadores (5`-3`) | Prod. (pb) | n° NCBI | Condições do PCR |
|-------------------------------|-------|--|------------|-------------|-------------------------------------|
| Biomarcadores de função renal | KIM-1 | S-CGCAGAGAAACCCGACTAAG AS-CAAAGCTCAGAGAGCCCATC | 132 | AF035963.1 | |
| | NGAL | S- TGAAGTGAAGGAGCGATTTCG AS-ATTGGTCGGTGGGAACAGA | 198 | NP_570097.1 | 95°C- 20" 60°C- 20" 72°C- 45" |
| | MCP-1 | S-GTGCTGTCTCAGCCAGATGC AS-CCCATTCCTTATTGGGGTCA | 187 | NM_031530.1 | |
| Inflamação e resposta inata | IL-18 | S- GACTGGCTGTGACCCTATCTGTGA AS- TTGTGTCCTGGCACACGTTTC | 154 | NM_019165.1 | 95°C-30" 60°C- 15" 72°C- 45" |
| | IL-1β | S-GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA AS-CTCATCTGGACAGCCCCAAGTC | 78 | AF079314.1 | |
| Referencia | GAPDH | S-GTTACCAGGGCTGCCTTCTCT AS-AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA | 61 | NM_017008.4 | 95°C- 20" 60°C- 20" 72°C- 45" |

Fonte: Autor

Para as reações de qPCR foi utilizado 10µL da Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1µL de cDNA das amostras completando com água livre de nucleases para um volume final de 20µL . Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de fusão realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativo de RNAm forem calculados de acordo com a metodologia 2-ΔΔCT, qual ΔΔCT= (CT gene alvo-CT gene referência do grupo tratado) / (CTgene alvo-CT gene referência do controle) como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4.6 Estudo Histopatológico

O tecido coletado no procedimento cirúrgico no item 4.3.2 foi mantido imerso em formol 10% durante 48hrs. Após esse período foi colocado em álcool 70% onde permaneceu até ser processado. Para o processamento das amostras foi utilizado o Processador Automático de Tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), onde as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após este procedimento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. Terminado este processo o material nos blocos de parafina foi cortado em 5µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para o processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando um micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e posteriormente registradas através de fotografias.

4.7 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão, ou mediano, máximo e mínimo, quando apropriados. Os dados foram analisados previamente pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* test. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *T student* seguido por teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni's (para dados paramétricos), ou aplicação do teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de Dunn's (para dados não paramétricos). Igualmente foi utilizado o teste Mann Whitney para os análises de biologia molecular. Considerando uma significância para o teste estatístico de $P < 0,05$. Todos os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0® .

RESULTADOS

5 RESULTADOS

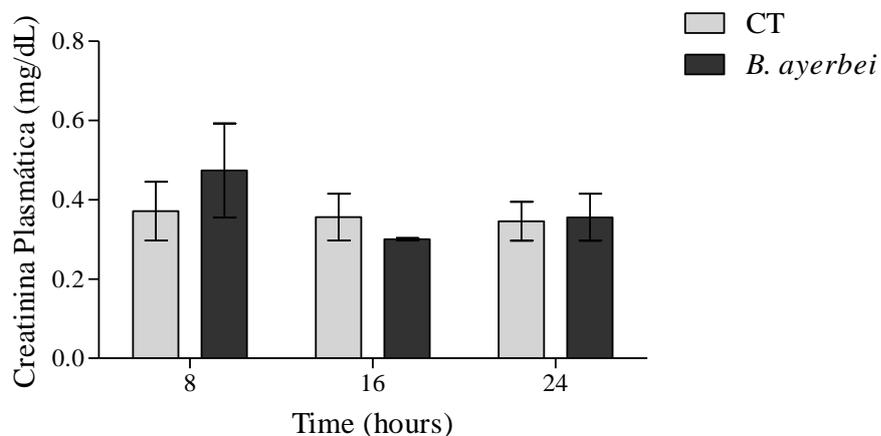
5.1 Análises Bioquímicas

5.1.1 Determinação dos parâmetros bioquímicos no plasma de animais controle e tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Os resultados a seguir apresentam os efeitos renais produzidos pelo veneno da serpente *B. ayerbei* (VBa) avaliados em diferentes tempos (8, 16 e 24h), mediante dosagem bioquímica. Conforme a **Figura 7**, não se observou diferenças significativas na creatinina plasmática entre os grupos controles de 8h ($22,440 \pm 0,615 \mu\text{g/dL}$), 16h ($20,140 \pm 1,183 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($22,500 \pm 1,130 \mu\text{g/dL}$), quando comparado com seus respectivos grupos tratados de 8h ($21,620 \pm 1,010 \mu\text{g/dL}$), 16h ($21,540 \pm 1,133 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($21,530 \pm 1,010 \mu\text{g/dL}$).

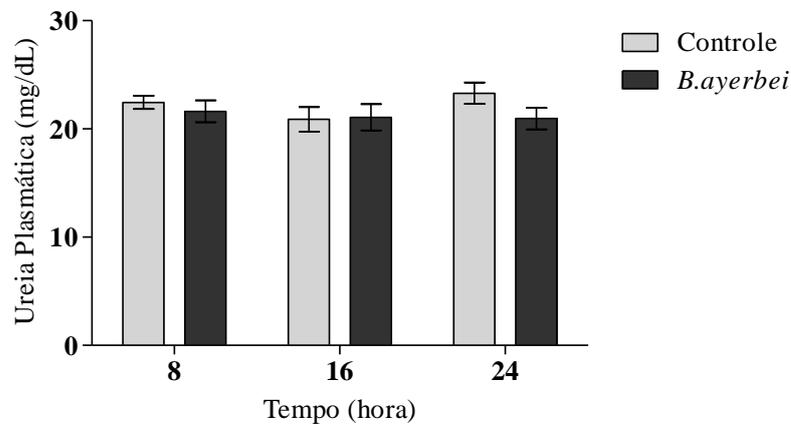
Concomitantemente, na **Figura 8**, não se apresenta mudanças significativas nos níveis séricos de ureia do grupo controle nos tempo de 8h ($22.440 \pm 0.615 \mu\text{g/dL}$), 16h ($20.140 \pm 1.183 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($22.500 \pm 1.130 \mu\text{g/dL}$), quando comparados com os seus grupos tratados nos tempos de 8h ($21.620 \pm 1.010 \mu\text{g/dL}$), 16h ($21.540 \pm 1.133 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($21.530 \pm 1.010 \mu\text{g/dL}$).

Figura 7. Avaliação dos valores plasmáticos de creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de creatinina em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

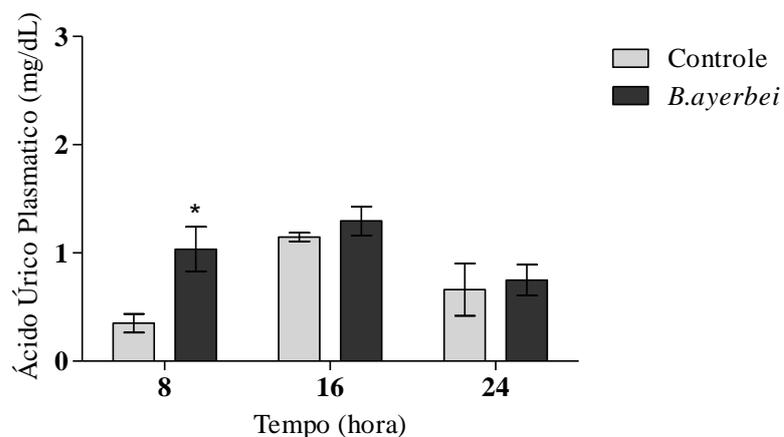
Figura 8. Avaliação dos valores plasmáticos de ureia em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de ureia em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

Como apresentado na **Figura 9**, os níveis séricos de ácido úrico foram aumentados no tempo de 8h ($1,220 \pm 0,2601 \mu\text{g/dL}$) sem mudanças nos tempos de 16h ($1,296 \pm 0,1339 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($0,885 \pm 0,180 \mu\text{g/dL}$) quando comparados aos seus respectivos grupos controle, 8h ($0,350 \pm 0,085 \mu\text{g/dL}$), 16h ($1,147 \pm 0,040 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($0,662 \pm 0,242 \mu\text{g/dL}$).

Figura 9. Avaliação dos valores plasmáticos de ácido úrico em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.

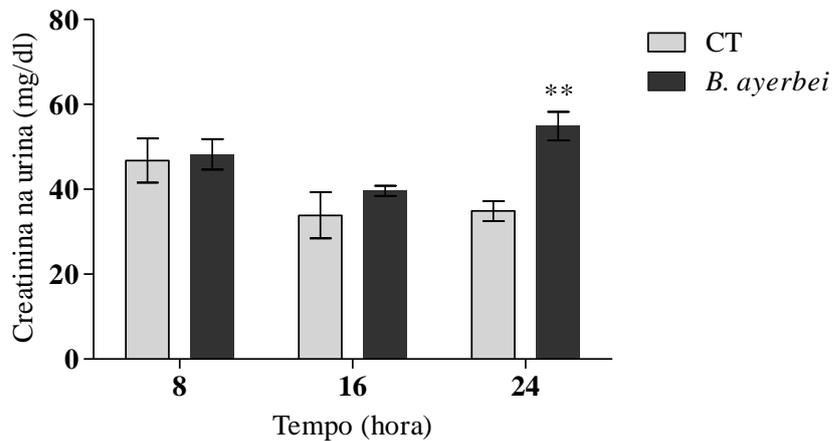


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis plasmáticos de ácido úrico em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$.

5.1.2 Determinação das alterações bioquímicas na urina de animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Como apresentado na **Figura 10**, observou-se um aumento significativo na dosagem de creatinina urinária no tempo de 24h ($54,890 \pm 3,360 \mu\text{l/dL}$), sem alterações nas 8h ($46,830 \pm 4,262 \mu\text{l/dL}$) e 16h ($40,640 \pm 1,594 \mu\text{l/dL}$), quando comparadas com seus respectivos grupos controle de 24h ($34,870 \pm 2,396 \mu\text{l/dL}$), 8h ($51,790 \pm 4,949 \mu\text{l/dL}$) e 16h ($41,360 \pm 7,808 \mu\text{l/dL}$).

Figura 10. Avaliação dos valores urinários de creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.

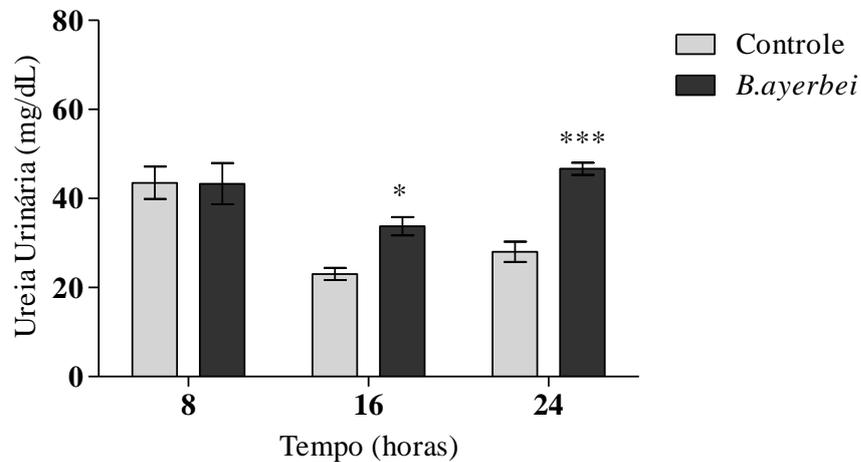


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis urinários de creatinina em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$.

Dosagens de ureia urinária foram realizadas como se apresenta na **Figura 11**, com um aumento no tempo de 16h ($31,120 \pm 1,866 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($46,670 \pm 1,393 \mu\text{g/dL}$), mas sem alterações nas 8h ($38,140 \pm 3,921 \mu\text{g/dL}$), quando comparado com seus respectivos grupos controle, 16h ($23,060 \pm 1,343 \mu\text{g/dL}$) 24h ($26,790 \pm 2,318 \mu\text{g/dL}$) e 8h ($38,440 \pm 1,640 \mu\text{g/dL}$).

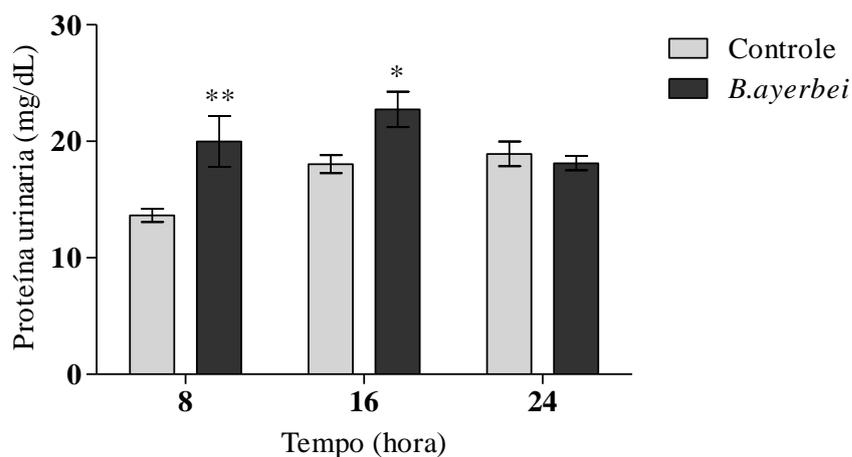
Seguidamente, como observado na **Figura 12**, medidas de proteína na urina foram realizadas obtendo-se um aumento significativo nos tempos de 8h ($17,920 \pm 0,807 \mu\text{g/dL}$) e 16h ($24,950 \pm 2,471 \mu\text{g/dL}$), sem mudanças no tempo de 24h ($22,110 \pm 2,812 \mu\text{g/dL}$), quando comparados com seus respectivos grupos controle, 8h ($13,740 \pm 0,576 \mu\text{g/dL}$), 16h ($18,110 \pm 0,758 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($32,510 \pm 1,520 \mu\text{g/dL}$).

Figura 11. Avaliação temporal dos valores urinários da ureia gerados pelo veneno da serpente *B. ayerbeii* quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis urinários de ureia em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbeii*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,01$.

Figura 12. Avaliação dos valores urinários da proteína em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.

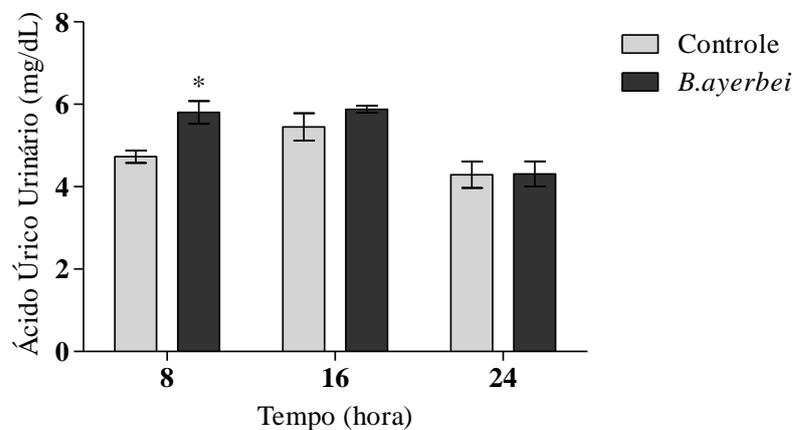


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis urinários de proteína em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbeii*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Como apresentado na **Figura 13**, os níveis urinários de ácido úrico aumentam no tempo de 8h ($5,600 \pm 0,230 \mu\text{g/dL}$) quando comparado com o seu respectivo grupo controle de 8h ($4,728 \pm 0,149 \mu\text{g/dL}$). Não houve diferença significativa em relação aos tempos de 16h ($5,879 \pm 0,083 \mu\text{g/dL}$) e 24h ($4,037 \pm 0,1459 \mu\text{g/dL}$) quando comparados aos seus grupos controle de 16 e 24h ($5,728 \pm 0,232 \mu\text{g/dL}$) ($4,016 \pm 0,208 \mu\text{g/dL}$), respectivamente.

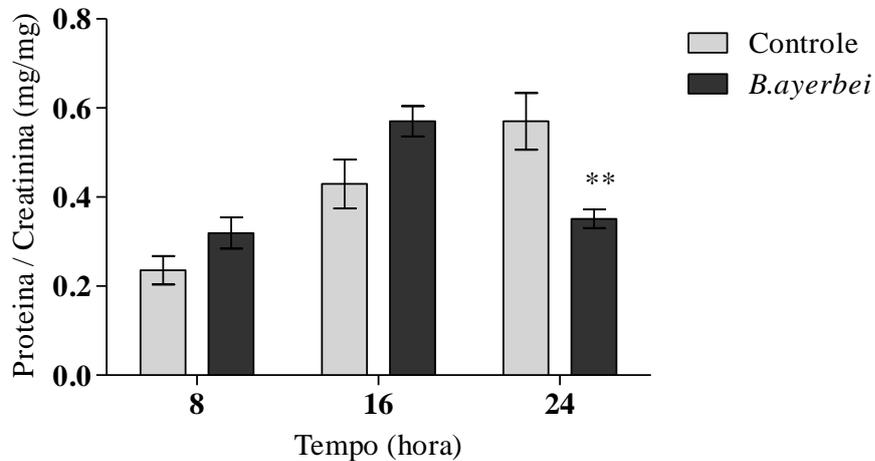
Seguidamente, como apresentado na **Figura 14**, na relação proteína/creatinina foi observado uma diminuição significativa no tempo de 24h ($0,351 \pm 0,021 \text{ mg/mg}$), quando comparado com o seu grupo controle de 24h ($0,570 \pm 0,063 \text{ mg/mg}$). Não foi encontrado diferenças significativas nos tempos de 8h ($0,319 \pm 0,0351 \text{ mg/mg}$) e 16h ($0,570 \pm 0,034 \text{ mg/mg}$), quando comparado com seus grupos controle de 8h ($0,235 \pm 0,032 \text{ mg/mg}$) e 16h ($0,429 \pm 0,054 \text{ mg/mg}$).

Figura 13. Avaliação dos valores urinários de ácido úrico em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis urinários de ácido úrico em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$.

Figura 14. Avaliação dos valores da relação proteína / creatinina em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis da relação Proteína/Creatinina em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$

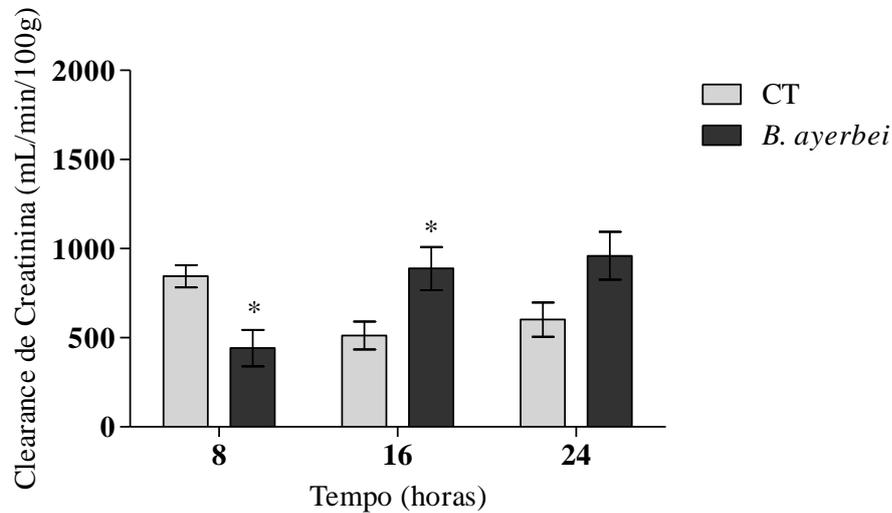
5.2 Análise da Função Renal

5.2.1 Análise do Ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário da função renal de animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Para a análise da função renal foram realizadas as dosagens de clearance de creatinina (Ccr) por meio da mensuração de creatinina plasmática e urinária. Conforme a **Figura 15**, no tempo de 8h foi observada uma diminuição significativa dos níveis de Ccr ($442,1 \pm 102,3$ mL/min/100g), quando comparada com o seu grupo controle de 8h ($845,4 \pm 62,73$ mL/min/100g), com um aumento nas 16h ($888,5 \pm 120,3$ mL/min/100g), em comparação aos seus grupos controle de 16h ($513,0 \pm 78,29$ mL/min/100g). Porém, não houve alterações no grupo tratado de 24h ($959,7 \pm 134,5$ mL/min/100g) em relação ao seu grupo controle ($602,2 \pm 95,87$ mL/min/100g).

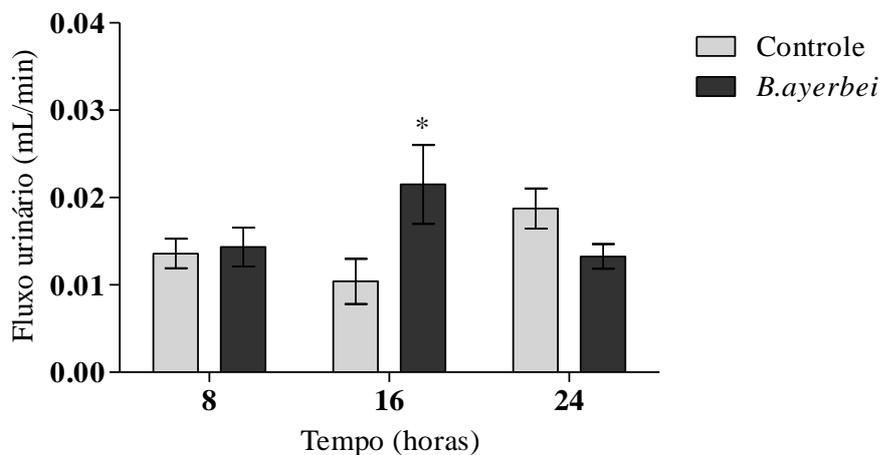
De acordo com a **Figura 16**, que descreve os valores do fluxo urinário, se observou um aumento significativo no tempo de 16h ($0,0215 \pm 0,002$ mL/min) quando comparado com seu tempo controle de 16h ($0,0104 \pm 0,002$ mL/min), sem mudanças nos tempos de 8h ($0,009 \pm 0,001$ mL/min) e 24h ($0,01875 \pm 0,002$ mL/min) quando comparado com o grupo tratado de 8h ($0,018 \pm 0,003$ mL/min), e 24h ($0,013 \pm 0,001$ mL/min).

Figura 15. Avaliação dos valores do ritmo de filtração glomerular em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis do clearance de creatinina em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Figura 16. Avaliação dos valores do fluxo urinário em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis do fluxo urinário em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

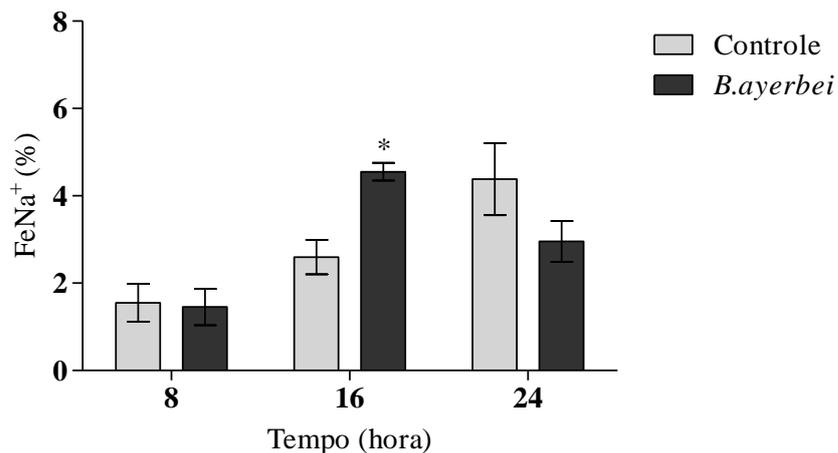
5.3 Análise da Função Tubular

5.3.1 Determinação da função tubular através da fração de excreção dos eletrólitos Na⁺ (%FeNa⁺) e K⁺ (%FeK⁺) em animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Nota-se na **Figura 17**, um aumento na fração de excreção de sódio %FeNa⁺ no tempo de 16h ($4,552 \pm 0,204$ %), quando comparado com o seu grupo controle ($2,598 \pm 0,391$ %), mas não houve alterações nos tempos de 8h ($1,454 \pm 0,414$ %) e 24h ($2,956 \pm 0,468$ %) quando comparados com seus respectivos controles, 8h ($1,550 \pm 0,433$ %) e 24h ($4,385 \pm 0,8259$ %).

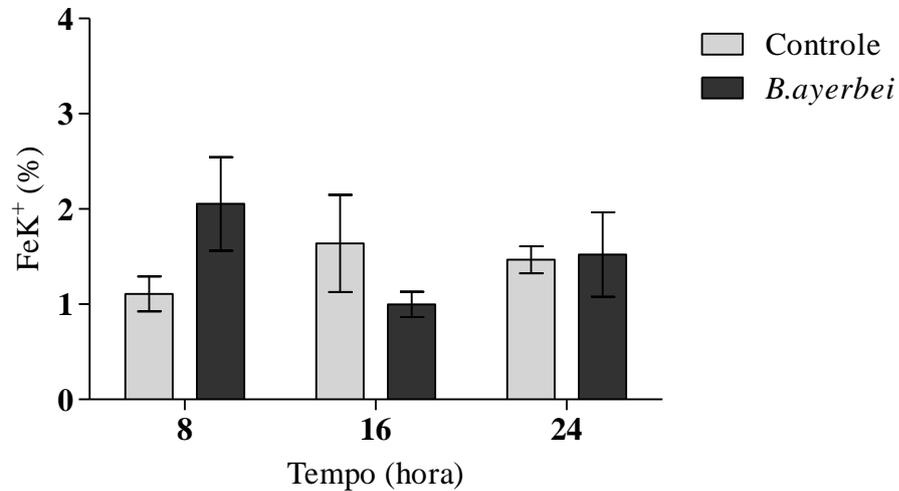
Como apresentado na **Figura 18**, não se observou diferença significativa no %FeK⁺ dos grupos tratados de 8h ($2,054 \pm 0,492$ %), 16 ($0,831 \pm 0,198$ %) e 24 ($1,307 \pm 0,421$ %) quando comparados com seu grupos controle de 8h ($0,9550 \pm 0,129$ %), 16h ($2,285 \pm 0,769$ %) e 24h ($1,467 \pm 0,143$ %).

Figura 17. Avaliação dos valores do %FeNa⁺ em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos valores de %FeNa⁺ em animais tratados com o 75% DI₅₀ do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. ** $P < 0,01$

Figura 18. Avaliação dos valores do %FeK⁺ em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



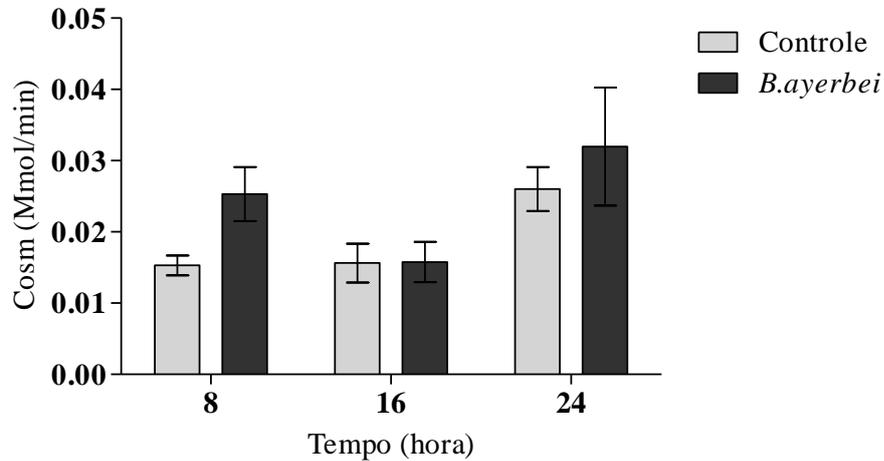
Os valores representam a média \pm erro padrão dos valores de %FeK⁺ em animais tratados com o 75% DI₅₀ do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

5.4 Avaliação dos parâmetros de osmolalidade

De acordo com a **Figura 19**, que descreve os valores do clearance de osmolalidade, não foram observadas mudanças significativas nos tempo de 8h ($0,025 \pm 0,003$ mL/min) 16h ($0,015 \pm 0,002$ mL/min) e 24 ($0,031 \pm 0,008$ mL/min) quando comparado com seus tempos controle de 8h ($0,015 \pm 0,001$ mL/min), 16h ($0,015 \pm 0,002$ mL/min) e 24h ($0,023 \pm 0,002$ mL/min).

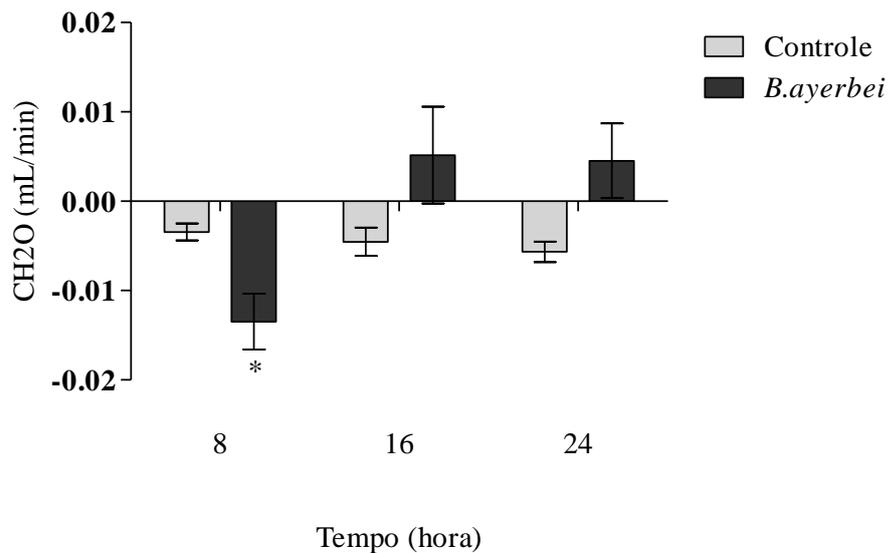
Como exposto na **Figura 20**, observou-se um aumento no clearance de agua livre no tempo de 8h ($-0,013 \pm 0,003$ mL/min) quando comparado com o seu grupo controle ($-0,003 \pm 0,001$ mL/min). Contudo não houve mudanças nos tempos de 16h ($0,003 \pm 0,004$ mL/min) e 24h ($-0,005 \pm 0,007$ mL/min) quando comparado com seu grupo controle 16h ($-0,004 \pm 0,001$ mL/min).e 24h ($-0,005 \pm 0,001$ mL/min).

Figura 19. Avaliação dos valores de clearance de osmolalidade em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis de clearance de osmoralidade em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. * $P < 0,05$.

Figura 20. Avaliação dos valores de clearance de agua livre em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



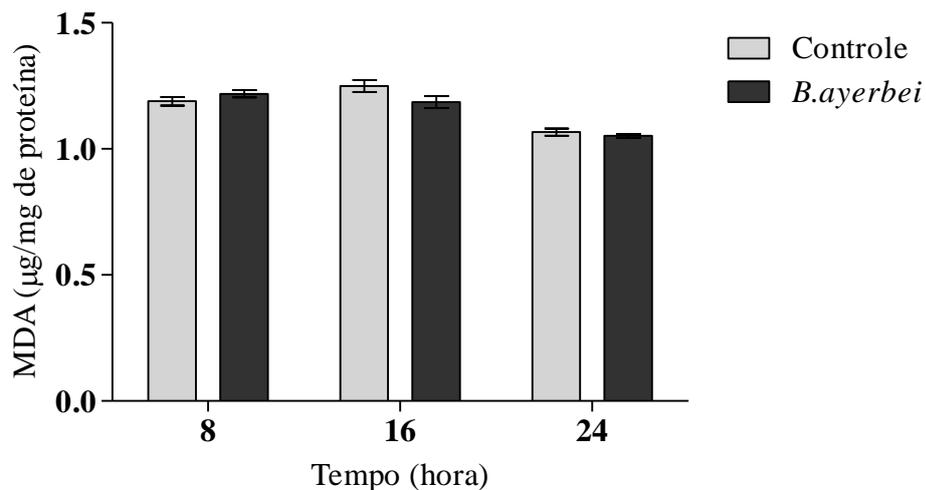
Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis de clearance de agua livre em animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

5.5 Perfil do dano oxidativo

5.5.1 Determinação dos valores de Malondialdeído (MDA) e da atividade da Glutathiona reduzida (GSH) em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Como se visualizar na **Figura 21**, os níveis de MDA não foram significativos nos tempos avaliados de 8h ($1.218 \pm 0.014 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) e 16h ($1.186 \pm 0.023 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) e 24h ($1.052 \pm 0.051 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$), quando comparado com seu grupo controle de 8h ($1.189 \pm 0.017 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$), 16h ($1.249 \pm 0.024 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) e 24h ($1.204 \pm 0.025 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$).

Figura 21. Avaliação dos valores de malondialdeído (MDA) em ratos, nos grupos controle e tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.

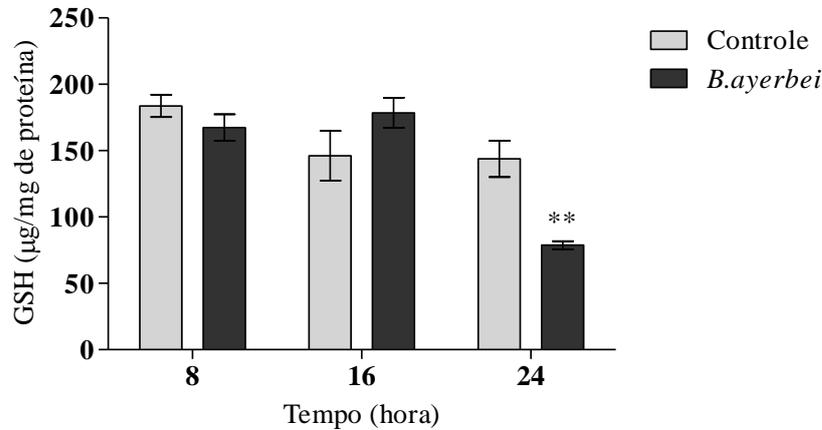


Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis de MDA em tecido de animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's. ** $P < 0,01$.

Como apresentado na **Figura 22**, não se observou diferença significativa da atividade do GSH dos grupos controle de 8h ($183,7 \pm 8,473 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) e 16h ($146,2 \pm 18,68 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) quando comparados aos respectivos grupos tratados de 8h ($167,4 \pm 9,930 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) e 16h ($185,3 \pm 11,48 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$). No entanto observamos alteração no tempo de 24 horas ($78,75 \pm 3,059 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$) quando comparado ao seu grupo controle de 24h ($143,8 \pm 13,74 \mu\text{g}/\text{mg prot.}$).

Figura 22. Avaliação dos valores da atividade do GSH em ratos, nos grupos controle e

tratado com o VBa, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão dos níveis da atividade de GSH em tecido renal de animais tratados com o 75% DL₅₀ do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por Two-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni's.

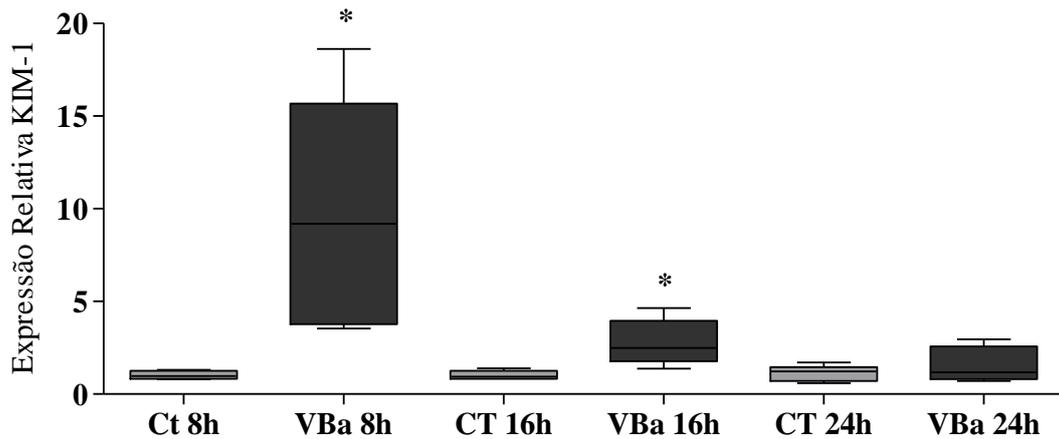
5.6 Técnicas de Biologia Molecular

5.6.1 Perfil molecular da expressão de mRNA de biomarcadores de lesão renal e inflamação em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

De acordo com a **Figura 23**, os animais tratados apresentaram um aumento da expressão quantitativa relativa do mRNA de KIM-1 nos tempos de 8h ($9,850 \pm 2,520$), e 16h ($2,768 \pm 0,492$) quando comparados com seus respectivos grupos controle de 8h ($1,018 \pm 0,115$) e 16h ($1,020 \pm 0,106$), confirmando uma lesão precoce gerada pelo VBa. Não foram observadas diferenças no tempo de 24h ($1,614 \pm 0,343$), quando comparado com a seu grupo controle ($1,142 \pm 0,173$).

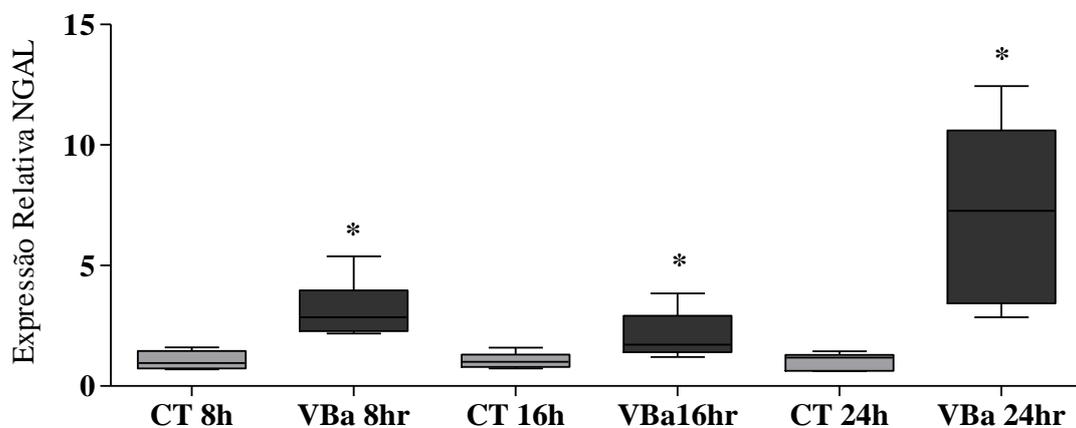
Nota-se na **Figura 24** um aumento da expressão do mRNA de NGAL em todos os tempos tratados com VBa 8h ($3,182 \pm 0,493$), 16h ($2,098 \pm 0,400$) e 24h ($7,242 \pm 1,496$), quando comparados com seus respectivos grupos controle, 8h ($1,050 \pm 0,197$), 16h ($1,040 \pm 0,148$) e 24h ($1,052 \pm 0,139$).

Figura 23. Avaliação da transcrição gênica de KIM-1 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da transcrição gênica de KIM-1 de tecido renal de animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs controle.

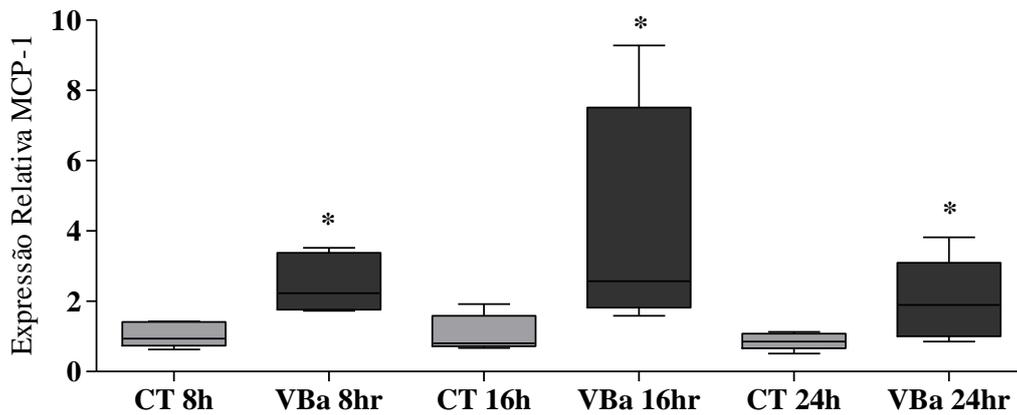
Figura 24. Avaliação da transcrição gênica de NGAL no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da transcrição gênica de NGAL de tecido renal de animais tratados com o 75% DI_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs controle.

Como observado na **Figura 25**, os níveis de MCP-1 aumentaram em todos os grupos de 8h ($2,513 \pm 0,292$), 16h ($4,153 \pm 0,148$) e 24h ($2,062 \pm 0,482$), quando comparados com seus respectivos grupos controle, 8h ($1,048 \pm 0,156$), 16h ($1,082 \pm 0,232$) e 24h ($0,8660 \pm 0,107$).

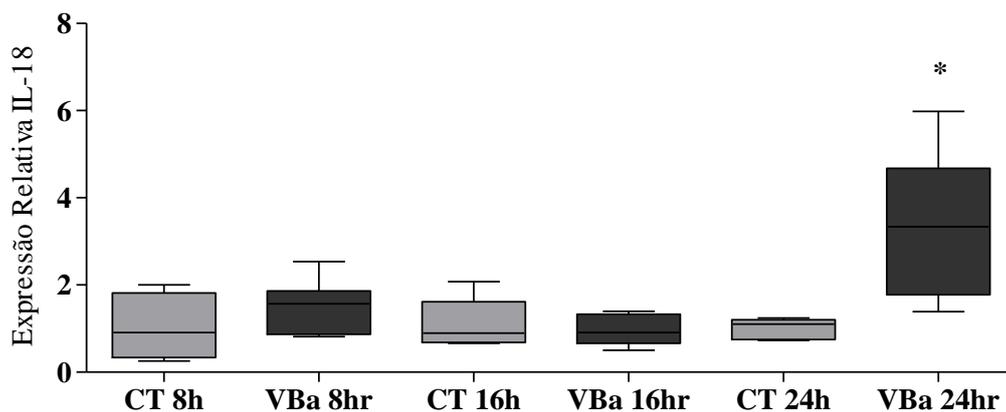
Figura 25. Avaliação da transcrição gênica de MCP-1 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a média \pm erro padrão da transcrição gênica de MCP-1 de tecido renal de animais tratados com o 75% DL_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs controle

Na **Figura 26**, observou-se também um aumento significativo na expressão do mRNA de IL-18 no tempo de 24h ($3,464 \pm 0,600$), quando comparado com o seu grupo controle de 24h ($1,022 \pm 0,090$). Não houve alteração significativa nos demais tempos de 8h ($1,504 \pm 0,227$) e 16h ($0,9583 \pm 0,140$) em comparação com o seus respectivos grupos controle de 8h ($1,020 \pm 0,381$) e 16h ($1,098 \pm 0,260$).

Figura 26. Avaliação da transcrição gênica de IL-18 no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em diferentes tempos.

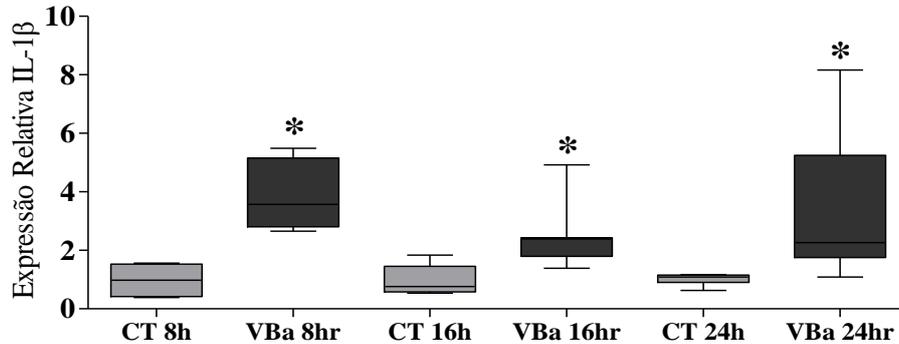


Os valores representam a média \pm erro padrão da transcrição gênica de IL-18 de tecido renal de animais tratados com o 75% DL_{50} do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs controle.

Conforme mostrado na **Figura 27**, os níveis do mRNA para IL-1 β aumentaram significativamente nos animais tratados com VBa em todos os tempos 8h ($3,863 \pm 0,486$), 16h ($2,469 \pm 0,434$) e 24h ($3,335 \pm 1,055$), quando comparados com o seus respectivos grupos

controle, 8h ($0,9775 \pm 0,304$), 16h ($0,9640 \pm 0,237$) e 24h ($1,022 \pm 0,082$).

Figura 27. Avaliação da transcrição gênica de IL-1 β no tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em diferentes tempos.



Os valores representam a mediana da transcrição gênica de IL-1 β de tecido renal de animais tratados com o 75% DI₅₀ do veneno da serpente *B. ayerbei*. A análise estatística foi feita por teste Mann Whitney. $P < 0,05$ vs controle.

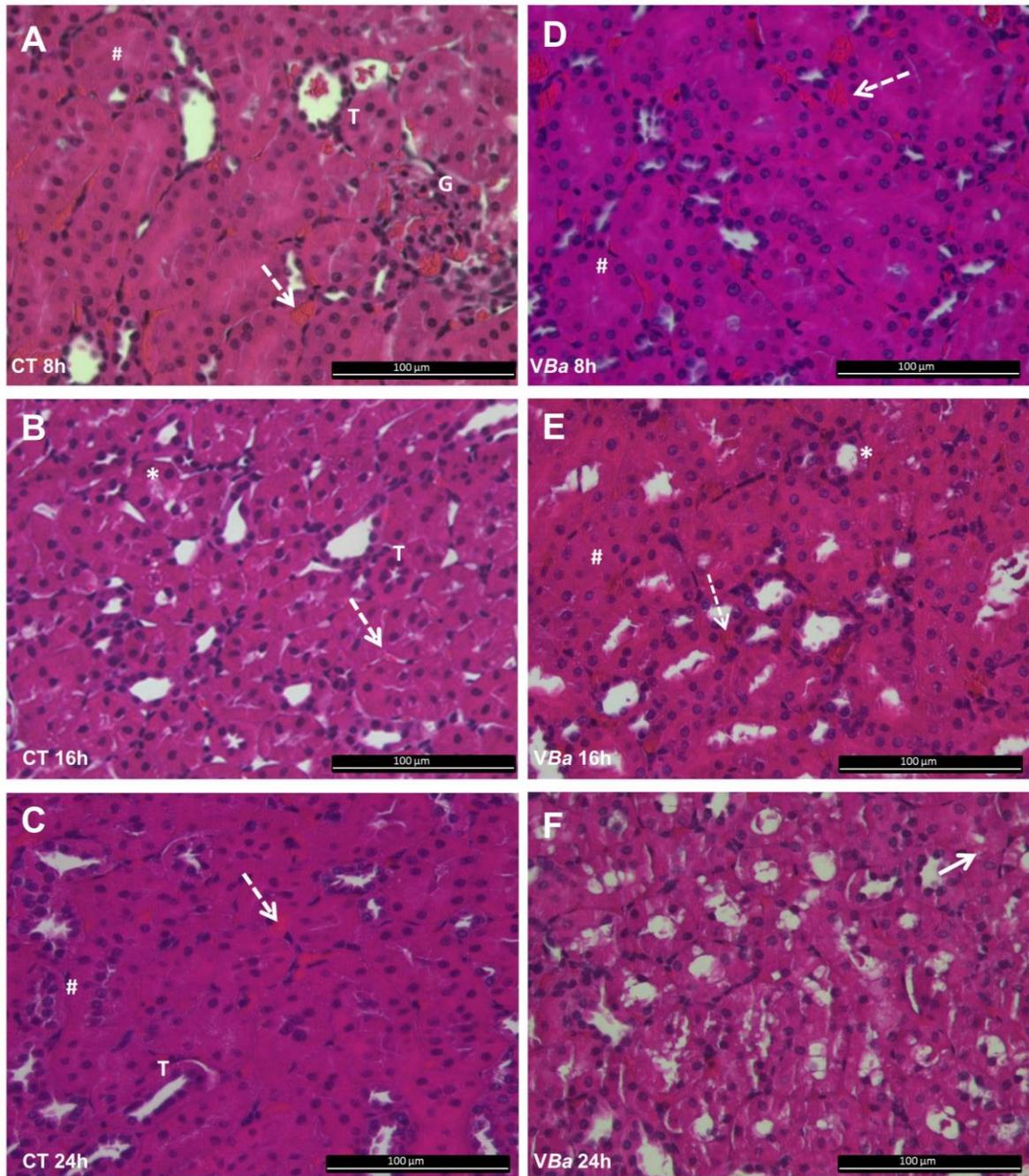
5.7 Análises Histopatológicas

5.7.1 Efeitos do veneno da espécie *B. ayerbei* sobre as alterações histopatológicas em tecido renal de animais tratados com o veneno da serpente *B. ayerbei*.

Secções histológicas representadas por estrutura renal preservada onde se visualizam o córtex e a medula com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, dos grupos controle foram observadas em todos os tempos analisados, com ausência de necrose, inflamação, glomerulopatias e glomerulonefrites. Foram observados, na maioria dos casos tanto nos grupos controle como tratados, leve tumefação do epitélio tubular, discreta ectasia e hemorragia intersticial, além de alguns túbulos exibindo acúmulo luminal de material eosinófilo de aspecto proteináceo como apresentado na **Figura 28**. Não se encontram alterações nos grupos controle de 8 e 16h (28-A; 28-B) quando comparados com os grupos tratado de 8 e 16 h (28-D, 28-E). No grupo tratado de 24 se exibiu moderada e dispersa vacuolização de epitélio tubular, com túbulos exibindo acúmulos luminiais eosinofílicos (28-F) quando comparado com o tecido dos animais controle (28-C).

Figura 28. Imagem representativa da avaliação temporal das alterações histológicas do tecido renal de ratos, nos grupos controle e tratado com o veneno de *B. ayerbei*, quando avaliado em

diferentes tempos.



Fotomicrografia dos tecidos renais processados pela técnica de coloração de Hematoxilina-eosina (HE) dos grupos experimentais. A) Grupo controle 8h; B) Grupo controle 16h; C) Grupo controle 24h; D) Grupo VBa 8h; E) Grupo VBa 16h; F) Grupo veneno 24h. Tecidos renais exibiram estruturas tubulares (T) e glomerulares (G) os quais apresentam alterações tais como vacuolização do epitélio (Seta), hemorragia intersticial (seta traçada), tumefação do epitélio (#) e ectasia (*).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos do veneno da serpente *B. ayerbeii* (VBa) em diferentes tempos (horas) após inoculação intraperitoneal, através de parâmetros renais bioquímicos tradicionais e moleculares precoce. O envenenamento por o 75% da DL₅₀ da serpente *B. ayerbeii* não promoveu mudanças significativas nos parâmetros plasmáticos utilizados no diagnóstico da LRA, tais como, uréia e creatinina sérica, conforme visto em outros estudos apresentados por outras serpentes (HROVAT et al., 2013; VASARUCHAPONG et al., 2014). Embora, foi notado um aumento nos níveis plasmáticos de ácido úrico, similar aos encontrados no estudo de AL-JOHANY et al (2015) com o veneno da serpente *Crotalus durissu*.

Em contraste com os achados supracitados, neste trabalho foram verificadas alterações na urina de ratos por um aumento na excreção de ácido úrico, creatinina, ureia e proteína, em concordância com outros venenos (BOER-LIMA et al., 2002; ALEGRE et al., 2010).

Assim mesmo, ao analisar o transporte de eletrólitos e a filtração glomerular percebeu-se alterações nos índices normais ao longo do tempo em resposta ao VBa. Desta forma, pensou-se que estes efeitos poderiam estar relacionados a uma possível ação diurética causada por o VBa, pois neste estudo foi identificado um aumento da fração de excreção de Na⁺ (%FeNa⁺) e do volume urinário, além de mudanças no clearance de água livre e na osmolalidade.

Em seguida, e com o intuito de saber se biomarcadores moleculares precoce de LRA podem estar expressos no mRNA do tecido renal, foi realizada a quantificação da expressão de biomarcadores renais e inflamatórios tais KIM-1, NGAL, IL-18, MCP-1 e IL-1 β , sendo observado um aumento significativo na expressão de todos eles o que contribuiu no entendimento do envenenamento por o VBa.

Posteriormente e com o intenção de ampliar o conhecimento dos efeitos desse veneno foi observado o grau de estresse oxidativo mediante a quantificação dos níveis de MDA e GSH sendo verificada uma diminuição significativa neste último. Resultado similar aos observados por SANTHOSH et al (2013) com veneno de *Vipera russelii* e AL-JOHANY et al (2015) com o veneno de *Crotalus durissu*.

Como já mencionado, sabe-se que efeitos sistêmicos desencadeados após a picada de serpentes, promovem complicações que podem ser letais, como é a lesão renal aguda, a qual é considerada um evento clínico importante nos casos de acidentes ofídicos, sendo uma disfunção frequente causada pelo veneno da serpente *Bothrops*, logo contribuindo de forma

relevante à morbidade e mortalidade (GUTIÉRREZ et al., 2009b; RODRIGUES et al., 2011; BARONE et al., 2014).

Embora haja todas estas alterações, sabe-se que os venenos de serpentes apresentam características adaptativas na sua composição, sendo identificadas variações proteicas incluídas entre serpentes da mesma espécie (JORGE, 2015). Como consequência, têm sido observados diferentes efeitos farmacológicos e/ ou tóxicos que tornam previsível o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos (CALVETE et al., 2011). Neste sentido, a avaliação de novos venenos apresenta-se relevante. Por conseguinte, e com o intuito de caracterizar os efeitos renais da serpente *B. ayerbei*, o atual trabalho avaliou parâmetros bioquímicos clínicos associados à lesão renal aguda nos primeiros estágios do envenenamento.

Na clínica, a LRA é definida como a perda súbita da função renal medida pelo declínio do ritmo de filtração glomerular, que se desenvolve ao longo de horas até dias, resultando na diminuição da perfusão renal, lesão das células renais ou obstrução da excreção da urina (KAKAJIWALA; FERGUSON; FITZGERALD, 2017).

Conforme os critérios supracitados, neste trabalho não se conseguiram encontrar alterações nos valores de creatinina sérica, ureia plasmática e no débito urinário, após a inoculação do VBa, embora foi evidenciado um aumento nos valores plasmáticos de ácido úrico nas primeiras 8 horas após a exposição do VBa, sendo estes resultados similares aos reportados por FREZZATTI e SILVEIRA (2011), onde a ação direta do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* promoveu mudanças nos parâmetros bioquímicos com hiperuricemia, que podem estar associadas a um evento de lise celular que contribuiu com a formação de ácido úrico causando acúmulo no plasma. Assim mesmo, o estudo realizado por SHI et al., (2003) têm evidenciado que a lesão celular gerada em células dentríticas incrementa coadjuvantes endógenos como o ácido úrico uma vez que a degradação de RNA e DNA realizada por estas células produzem purinas que são convertidas em ácido úrico causando sua acumulação. Estes possíveis eventos podem estar acontecendo de forma sistêmica nos tecidos como consequência da atividade proteolítica dos venenos como o VBa, aumentando assim os níveis plasmáticos de ácido úrico, apresentado neste trabalho.

Seguidamente, e em relação aos dados urinários, em nosso trabalho foi observado um aumento na excreção de ureia na urina nos tempos avaliados de 16h e 24h após a inoculação do VBa, o qual poderiam estar associados a uma resposta dos rins aos efeitos isquêmicos, apresentados como consequência à perda de fluidos causado por eventos hemorrágicos como visto nos casos de envenenamentos relatados na clínica (GUTIÉRREZ et al., 2009; PAULO et al., 2013). Neste contexto, o evento isquêmico causa que o rim se proteja da lesão, evocando

vários mecanismos de proteção desta forma há tendência para reter líquido e sal e, simultaneamente, excretar o máximo de resíduos nitrogenados, com o intuito de produzir uma urina altamente concentrada (KUMAR, 2012).

A seguir, e em relação aos dosagem bioquímicos urinários, em nosso estudo foi apresentado um aumento significativo na excreção de ácido úrico no tempo de 8h quando comparado com a seu grupo controle, que pode estar associado a danos nos túbulos proximais por acúmulo dos componentes do veneno, causando modificações na reabsorção de substâncias o que originariam um aumento na excreção das mesmas. Vários estudos evidenciam esta acumulação de venenos em diferentes órgãos, dentre eles os rins, causando toxicidade (VASCONCELOS et al., 1998; ESCALANTE et al., 2003; MELLO et al., 2010). Estudos realizados com o veneno da serpente *B. jararaca*, evidenciam que a medida que o veneno é excretado pelos rins, os mecanismos de concentração e transporte tubular favorecem às manifestações de toxicidade celular direta. Logo, a perda da função celular epitelial poderia causar disfunção tubular e, como consequência, aumentar a excreção de várias substâncias (JORGE et al., 2017), tais o ácido úrico, uma vez que a regulação deste no sistema de transporte renal é regulada por quatro componentes que envolvem filtração glomerular, reabsorção, secreção e reabsorção pós-secreção, como determinantes para a regulação do mesmo no plasma (MOUNT et al., 2006).

Continuamente, os dados apresentados sugerem que a exposição do VBa nas primeiras 8h poderia causar efeitos citotóxicos nas células renais e dessa forma promover o aumento do, ácido úrico urinário e plasmático (FREZZATTI; SILVEIRA, 2011), além disso, temos a saber que estas alterações só forem apresentadas no tempo de 8h, sem mudanças nos tempos de 16h e 24h deixando em evidência uma possível modulação dos rins aos efeitos do veneno.

Por outro lado, estudos realizados por DE CASTRO et al., (2004) vêm revelando que os venenos de serpentes especialmente do gênero *Bothrops* são nefrotóxicos conduzindo anormalidades glomerulares e tubulares. Desta forma, sabe-se que uns dos principais alvos de numerosas agentes nefrotóxicos é o glomérulo, e este é a primeira estrutura do néfron que entra em contato com o mesmo. Mudanças estruturais no glomérulo provocadas pelos venenos de serpentes já têm sido reportadas, sendo observada uma disfunção do citoesqueleto com a descontinuidade dos filamentos de actina, que causam alterações nos pedicelo dos podócitos da membrana basal alterando a função da barreira de filtração, sendo estas alterações associadas à metaloproteinases (SVMP) e fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes nos venenos (BOER-LIMA et al., 2002; LINARDI et al., 2011). Considerando o anterior e

sabendo que o VBa reporta um porcentagem de 53,7 de SVPM na sua composição (MORA-OBANDO et al., 2014). Permite desta forma, sugerir que a elevação dos níveis significativos de proteinúria urinária nos tempos de 8 e 16h, após inoculação do VBa poderia estar associado ao acúmulo do veneno nos glomérulos e nos túbulos renais (PANFOLI et al., 2010).

Assim, podemos admitir a hipótese que acúmulo do veneno possa causar lesão glomerular e consequente proteinúria. Porém, esse dano foi temporário, haja visto não termos encontrado esta alteração no período de 24 horas, sugerindo a recuperação renal, comprovado pela diminuição encontrada na relação proteína /creatinina onde se apresenta uma diminuição significativa no mesmo tempo avaliado.

Por outro lado, na avaliação da função renal, foram evidenciadas alterações no ritmo de filtração glomerular (RFG), onde foi observado uma diminuição no tempo de 8h, com um aumento significativo no tempo de 24h após inoculação do VBa, sem mudanças no tempo de 16h. Tendo em consideração os resultados do tempo inicial de 8h para o RFG, estes podem ser mediados pelo aumento de ácido úrico plasmático apresentado no mesmo tempo, ajudando desta forma com a diminuição do RFG, isto em relação ao estudo desenvolvido por MAIUOLO et al., (2016) onde hiperuricemia poderia acarretar em vasoconstrição renal regulada pela ativação do sistema renina-angiotensina.

Além disso, estudo realizado com SVMP evidenciou que estas proteínas causam um efeito vasoconstrictor provavelmente pela conversão de proteínas precursoras em peptídeos vasoativos, como a conversão de pré-endotelina à endotelina 1, o que causaria o aumento da resistência vascular renal, com uma diminuição do fluxo plasmático renal (MITRMOONPITAK et al., 2013). Desta forma, SVMP também poderia contribuir aos achados do RFG no tempo de avaliação de 8h.

Em relação ao aumento significativo do RFG no tempo de 24h em resposta ao VBa, o mesmo pode estar relacionado à elevação da creatinina urinária que foi apresentada no mesmo tempo avaliado. Alguns estudos realizados em perfusão de rim isolado mostram que efeitos diuréticos estão presentes em alguns venenos de serpentes (HAVT et al., 2001; BARBOSA et al., 2002; MARTINS et al., 2005; JORGE et al., 2017). Desta forma, os mesmos efeitos poderiam estar sucedendo no presente estudo.

Estes efeitos diuréticos apresentados neste trabalho poderiam ser mediados pela ação de alguns componentes que se encontram nos venenos de serpentes como são os peptídeos potencializadores de bradicinina (PPB), os quais são oligopeptídeos ricos em prolina que atuam como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (ALBERTO-SILVA et

al., 2015). Desta forma sua inibição promoveriam efeitos vasodilatadores. Além disso, os PPB poderiam aumentar a sensibilidade do receptor de bradicinina do músculo liso, bem como ativar a liberação local de bradicinina, o que agravaria a vasodilatação local e sistêmica (MURAYAMA et al., 1997), tendo um aumento do RFG. Por sua vez estes efeitos diuréticos causa aumento na eliminação de sódio e a sua vez aumentam a eliminação de água e algumas substâncias nitrogenadas, como observadas neste trabalho por o aumento destas nos tempos de 16 e 24 horas.

Concomitantemente com as anormalidades dos valores de creatinina e ureia, apresentadas neste trabalho, houve aumento no %FeNa⁺ no tempo de 16h associado com um aumento do volume urinário no mesmo tempo de avaliação, que poderia ser explicado por seus efeitos diuréticos como já mencionado. Em acordo com os dados expostos, estudos realizados com compostos isolados do veneno de *B. jararaca* mostraram a participação dos mesmos sobre arteríolas renais como vasodilatadores e também nos túbulos renais, aumentando a excreção de sódio e água (XAVIER et al., 2017), mecanismo que pode estar associado com o aumento destes parâmetros no tempo de avaliação de 16h, como apresentado neste trabalho.

Além disso, danos nos túbulos proximais podem ser apresentados reduzindo a reabsorção de substâncias como já sugerido pela acumulação dos venenos nos rins que pode causar maiores riscos de falha renal devido a que sua concentração pode atingir mais de 50% da concentração no plasma (CASTRO, 2006). Isto pode ocasionar dano nos túbulos como já advertido em outras pesquisas, onde é observado que a lesão pode ocasionar necrose tubular aguda (MELLO et al., 2014). Estas constatações podem ser reforçadas por trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, utilizando este mesmo veneno da serpente *B. ayerbeii*, que permitiu observar um efeito citotóxico direto sobre a viabilidade de células MDCK - Madin-Darby Canine kidney (VELASCO, 2013), as quais apresentam características funcionais e morfológicas similares às células do ducto de coletor e/ou do túbulo distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO et al., 2002).

Adicionalmente, foi realizada a avaliação dos parâmetros de osmolalidade sendo calculados o clearance de osmolalidade (Cosm) e o clearance de água livre (CH₂O), obtendo uma diminuição significativa no tempo de 8h de CH₂O sem mudanças no Cosm, poucos estudos tem sido realizados com o venenos de outras serpentes, embora, nós relacionamos estes dados com achados já mencionados na diminuição do RFG, que causaria uma alta concentração de solutos na urina.

Tendo em vista os aspectos observados da ação do VBa, resumidamente, este não

alterou parâmetros plasmáticos de lesão renal, embora é evidenciado mudanças na avaliação da função renal, tubular e nos parâmetros de osmolalidade. Desta forma e com o intuito de esclarecer os efeitos do veneno, nós avaliamos a expressão de biomarcadores precoce de LRA e biomarcadores de processos inflamatórios os quais podem participar na progressão da falha renal, sabendo que componentes do veneno podem participar na liberação de mediadores inflamatórios os quais podem influir na hemodinâmica renal. Diferentes estudos realizados com venenos de serpentes tem evidenciado a participação desses mediadores inflamatórios. Esta afirmação pode ser comparada em estudos realizados com íleo de cobaias, onde foram encontrados efeitos na hipotensão causados pelo veneno da serpente *B. pirajai*, não causados pelos PPB, comprovado mais tarde pela ausência destas proteínas na sua composição (BERNARDES et al., 2013), mas elucidou-se a participação de prostaglandinas, citocinas, bradicininas, fatores de complemento e fator de ativação plaquetária como os responsáveis destes eventos (HAVT et al., 2005).

Biomarcadores precoce de lesão renal estão sendo muito utilizados na clinica para prever a evolução da lesão e promover melhores tratamentos, devido à baixa sensibilidade e especificidade dos marcadores clássicos de disfunção renal tais creatinina e ureia sérica, impossibilitam a identificação precoce da LRA, com perda de oportunidade terapêutica (NASCIMENTO, 2012).

Deste modo, nós evidenciamos que o VBa apresentou um aumento na expressão de mRNA do biomarcador renal KIM-1 no tempo de avaliação de 8h e 16h, sendo não significativa no tempo avaliado de 24h.

O KIM-1 é um biomarcador de lesão renal precoce, a qual não se encontra expressa em rim saudáveis e um incremento na expressão dela em células epiteliais do túbulo proximal sugere LRA (YANG et al., 2015). Estudos realizados com hibridização *in situ* e imunohistoquímica revelaram que o KIM-1 é expresso em células epiteliais tubulares proximais desdiferenciadas em regiões danificadas, especialmente no segmento S3 do túbulo proximal na faixa externa da medula externa, o qual é uma região altamente suscetível a lesão por isquemia ou toxinas (BAILLY et al., 2002). Por conseguinte, em nosso trabalho níveis aumentados de KIM-1 nos tempos de avaliação de 8 e 16h, nos permitiu observar que o VBa pode atuar sobre as células dos túbulos proximais através de processos isquêmicos, associados aos efeitos hipovolêmicos dos venenos e/ou a uma ação direta nefrotóxica nestas células (SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009). Com uma modulação da função renal ao não ser evidenciado efeitos no tempo de 24 horas.

Com tal característica, em nosso trabalho foi apresentada uma supra-expressão do

NGAL em todos os tempos avaliados. Esta é uma molécula de sequência similar às proteínas da família das lipocalinas e encontra-se supra-regulada em resposta à isquemia renal ou lesão nefrotóxica e pode possuir atividade protetora no rim limitando o dano renal (RONCO et al., 2010). O aumento do NGAL é detectável apenas 3h após a lesão e ele atinge o pico em aproximadamente 6 ou 12 h após lesão, dependendo da gravidade da lesão, assim mesmo este aumento pode persistir até 5 dias após a lesão inicial quando a mesma é grave (MISHRA et al., 2005).

Tanto KIM-1 como o NGAL são biomarcadores precoces de LRA. No entanto, IL-18 é um biomarcador que se expressa de forma mais tardia em comparação com estes dois biomarcadores, mas de forma mais precoce quando comparado com a creatinina sérica (RONCO et al., 2010). A detecção do mesmo encontra-se associada à citocinas pró-inflamatórias, e tem a capacidade de induzir a produção de interferon-gama em células T tipo 1 e é um mediador sensível de lesão isquêmica no rim (HERGET-ROSENTHAL et al., 2012).

Neste trabalho a supra expressão do mRNA de IL-18 foi apresentado no tempo avaliado de 24h. A produção destas quimiocinas é importante na mediação seletiva e na amplificação da resposta inflamatória. O clivagem da IL-18 exerce um efeito pró-inflamatório por transdução de sinal através do heterodímero de proteína acessória do receptor de IL-18 (CHEUNG et al., 2005). De forma geral, esta é produzida pelas células intercaladas dos ductos coletores nos rins saudáveis, as quais estão envolvidas na regulação do equilíbrio ácido-base e é induzida de forma mais ampla em células epiteliais tubulares lesadas do túbulo contornado distal.

Alem disso, a IL-18 participa na migração de leucócitos do sangue para os tecidos no local da inflamação e, portanto, desempenham uma função como quimioatraentes, ao igual que a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a qual é também conhecida como fator de ativação de macrófagos, e é produzida pelas células mesangiais renais, endoteliais, e epiteliais tubulares, sendo regulada sua expressão por citocinas tais IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (KOHAN et al., 1992; LUSTER et al., 1998; SUNG et al., 2002). Neste sentido a produção destas moléculas por estímulos exógenos contribui na produção de citocinas pró-inflamatórias e sua produção excessiva pode contribuir significativamente para o choque, falência múltipla e a morte. (HERNÁNDEZ et al., 2011).

De forma geral a redução do fluxo sanguíneo renal causado por toxinas de venenos induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, mediadores vasoativos e neurotransmissores os quais são fundamentais no desenvolvimento de nefropatias (SITPRIJA, 2008). Por outro lado, Interleucina-1 beta (IL-1 β) é regulada em células mesangiais por células de crescimento,

inflamação e proteínas da matriz extracelular (FINN; PORTER, 2003). Nosso trabalho apresentou um aumento da expressão dos mRNA destas interleucinas nos três tempos avaliados de 8, 16 e 24h, como uma possível resposta ao dano causado pelo VBa sobre células da matriz extracelular, uma vez que componentes do veneno tais as SVMP possuem efeitos proteolíticos sob estas estruturas, sendo também associada com uma supra-regulação do mRNA de MCP-1 (FINN; PORTER, 2003).

Concluimos assim, que o VBa consegue promover alterações nos biomarcadores precoce, nos estágios iniciais do envenenamento e observou-se que marcadores tradicionais associados a lesão renal aguda não apresentaram mudanças significativas quando comparadas com o seus grupos controle. Por conseguinte, consegue ser comprovado que a utilização de novas técnicas moleculares são importantes no entendimento da fisiopatologia renal do envenenamento.

A seguir e dadas as alterações encontradas, foram geradas novas perguntas, ao saber, se processos de estresse oxidativo poderiam influir nos efeitos apresentados por VBa, sabendo que nos organismos aeróbios pode existir um desequilíbrio na formação de radicais livres que são formados na presença de eventos patológicos, sobre condições fisiológicas e protegido pelo sistemas de defesa antioxidante (ZARARSIZ et al., 2007). Deste modo, a formação de radicais livres causa dano nas células pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais são metabólitos parcialmente reduzidos de moléculas de oxigênio, que tem maior atividade em relação com a molécula de O₂ (ZHAO; DIZ; ROBBINS, 2007).

O estresse oxidativo é uma manifestação comum e pode mediar o dano cardiovascular, neurológico e de numerosas complicações renais. As ERO atuam principalmente nas células mesangiais e endoteliais, e encontram-se implicadas em várias fisiopatologias de diversos tipos de lesão glomerular, causando inflamação e até apoptose (SINGH et al., 2006).

Em virtude disso, os processos de estresse oxidativo constituem mecanismos de produção progressiva em numerosas doenças renais e incremento da quantidade de malondialdeído (MDA) e F₂-isoprostanos, promovendo o dano renal (MARTIN et al., 2015). Para verificar a presença de estresse oxidativo, em nosso estudo foi realizada a quantificação dos níveis de MDA, a qual não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos avaliado.

Por outro lado, ao quantificar os níveis de GSH encontrou-se uma diminuição no tempo de 24h. O GSH é um tiol de baixo peso molecular, que se encontra envolvido em mecanismo de proteção molecular modulando as respostas celulares à substâncias químicas tóxicas. O mesmo pode ser encontrado praticamente em todas as células constituída pelo

tripeptídeo (L-glutamina, L-cisteína e glicina), que desempenha uma grande variedade de funções (KUMAR; SUGENDRAN; VIJAYARAGHAVAN, 2003).

Níveis reduzidos de GSH já foram reportados por diferentes estudos com o veneno de *Vipera russelli*, onde é observado uma diminuição como resultado da disfunção oxidativo induzida pelo veneno aumentando níveis de ERO (SANTHOSH et al., 2013; AL-JOHANY et al., 2015).

A seguir, em nosso trabalho o análise histopatológica realizada durante os diferentes tempos de avaliação de 8, 16 e 24h após o envenenamento intraperitoneal, não apresentaram mudanças nos tecidos renais para 8 e 16h quando comparados com o seu grupo controle. Contudo, no tempo de 24h apresentou lesões caracterizadas por vacuolização disseminada, e degeneração celular assim como também acúmulo de material proteico. Os quais são associados ao efeito do VBa a partir de sua ação proteolítica, sendo a estrutura do rim pouco afetada. Trabalhos realizados por AL-JOHANY et al., (2015) evidenciaram anormalidades histopatológicas no rim produzidas por o envenenamento das serpentes *Echis pyramidum*, onde é observado tumefação dos glomérulos e necrose tubular, bem como sinais de hemorragia medular e intertubular.

Novos estudos tem que ser considerados com o VBa, com um tempo de avaliação maior para saber se o rim consegue se recuperar do dano após o envenenamento ou, pelo contrário, se o efeito gerado por o VBa consegue modificar a função e a estrutura do rim.

Por fim, temos a entender que o veneno da serpente possui vários componentes que podem promover diferentes respostas fisiológicas, isto pode ser observado em estudos realizados em hemodinâmicas onde proteínas isoladas do veneno da serpente *Russell* tais como as PLA₂ e SVMP evidenciam respostas opostas em seus efeitos (MITRMOONPITAK et al., 2013). Desta forma, estes estudos nós permite observar que, nos casos dos envenenamentos, distintas alterações são apresentadas devido à complexa mistura de substâncias que são encontradas nos venenos e podem ser evidenciadas com o decorrer do tempo de exposição. Em nosso trabalho, a análise da cinética do envenenamento por VBa apresentou diferentes efeitos com o recorrer do tempos de avaliação os quais foram associadas a distintos eventos.

Num primeiro momento o veneno pode causar hemorragia que repercute na circulação sanguínea com extravasamento, o que possivelmente causaria hipovolemia e consequente diminuição do fluxo sanguíneo renal, com aumento do ácido úrico, gerando vasoconstrição renal com a diminuição do RFG. Seguidamente e, dada a quantidade de metaloproteinases presentes na sua composição, consegue ser observado um aumento da atividade proteolítica

característica deste veneno e contínuo aumento da proteína urinária, seguido de um possível dano dos túbulos renais, o que aumentaria a liberação de compostos como ureia e creatinina na urina, associada a ação diurética, que aumenta o $\%FeNa^+$ e aumenta o RFG como demonstrado, assim mesmo foi evidenciado alterações nos biomarcadores precoce os quais apresentaram maior veracidade nas alterações causadas por o VBa, demonstrando a importância da sua utilização.

Limitações do estudo foram apresentadas, quando avaliados os biomarcadores de lesão renal os quais foram divididos em diferentes tempos de avaliação e comparados entre cada grupo (controle e veneno). Neste trabalho, foi observada uma variação entre os grupos controles quando comparados entre eles, possivelmente como resposta a fatores externos como as gaiolas metabólicas, alterações ambientais, manipulação dos animais e alguns fatores intrínsecos dos mesmos. Identificando esta limitação, nossos dados foram apresentados comparando as alterações dentro dos grupos de tempo avaliados. Desta forma, os resultados resultaram mais fidedignos ao saber que cada grupo de animais foram submetidos às mesmas condições durante cada tempo de avaliação.

Finalmente, o veneno da serpente *B. ayerbei* causou alterações em alguns dos parâmetros bioquímicos clínicos e moleculares avaliados, , que contribuem no conhecimento das alterações precoces apresentadas por este veneno em ratos Wistar. Seguidamente, deve-se considerar que na clínica, o envenenamento ofídico encontra-se relacionado com dano local que promove eventos de mioglobinúria, rabdomiólise e alterações na hemostasia, causando alterações renais. Em nosso trabalho, foi utilizada a via intraperitoneal para a inoculação do veneno, a qual poderia corresponder a uma via de ação direta nos órgãos resultando nas alterações encontradas. Desta forma, sugerimos novos trabalhos onde se consiga observar as possíveis alterações renais causadas pelos venenos botrópicos utilizando uma via de inoculação intramuscular, mimetizando o acontecido na clínica.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Conclui-se que o veneno da serpente *Bothrops ayerbeii* não altero parâmetros de marcadores tradicionais plasmáticos associados à lesão renal aguda, embora, observaram-se alterações na avaliação funcional e tubular da atividade renal, possivelmente pelos distúrbios hemodinâmicos apresentados pelo envenenamento o que causo uma regulação da secreção de substâncias quando avaliados nos diferentes tempos de exposição ao veneno. Ademais, foi identificada a participação de mediadores inflamatórios durante todos os tempos junto com biomarcadores de lesão renal precoce, o que nos permitiu comprovar que biomarcadores moleculares podem ser mais efetivos na detecção de alterações celulares de dano em tecido renal. Por outro lado, apresentou-se, alterações por estresse oxidativo no desequilíbrio da atividade antioxidante. Com todo, é observado que o veneno de *B. ayerbeii* causa dano renal precoce desencadeado após o envenenamento o qual foi detectado principalmente por biomarcadores precoce moleculares que pela utilização de biomarcadores tradicionais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-JOHANY, A. M; AL-SADOON, M. K; ABDEL-MONEIM, A. E; BAUOMY, A. A; DIAB, M. S.M.A. Histological, molecular and biochemical detection of renal injury after Echis pyramidum snake envenomation in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 302–311, 2015.

AL-SHAMMARI, A. M; KHAN, S.U; AL-SADOON, M.K; AL-SALEH, S. Biochemical characterization of pyramid viper, echis pyramidum, venom. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 6, p. 1741–1749, 2013.

ALAPE-GIRÓN, A; SANZ, L; ESCOLAMO, J; FLOREZ DÍAS, M; MADRIGAL, M; SASA, M; CALVETE, J.J. Snake venomomics of the lancehead pitviper bothrops asper. Geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008.

ALAPE-GIRÓN, A; FLOREZ-DÍAZ, M; SANZ, L; MADRIGAL, M; ESCOLANO, J; SASA, M; CALVETE, J.J. Studies on the venom proteome of Bothrops asper: Perspectives and applications. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 938–948, 2009.

ALBERTO-SILVA, C; GILIO, J. M; PORTARO, F. C. V; QUEROBINO, S. M; CAMARGO, A. C. M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors of Bothrops jararaca snake venom affect the structure of mice seminiferous epithelium. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 27, 2015.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M; JACINTO, C. N; SILVA, G. B; LIMA, J. B; VERAS, M. S. B; DAHER, S. Lesão renal aguda causada pelo veneno das cobras Crotalus e Bothrops: uma revisão da epidemiologia, das manifestações clínicas e do tratamento. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 55, n. 5, p. 295–301, 2013.

ALEGRE, V. D. S; BARONE, J. M; YAMASALI, S. C; ZAMBOTTI-VILLELA, L; SILVEIRA, P.F. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon*, v. 56, n. 3, p. 402–410, 2010.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H; SOARES, A.M; FONTES, M. R. M; FULY, A. L; FERCÔRREA, M. A; ROS, J. C; GREENE, L. J; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, v. 64, n. 4, p. 723–732, 2002.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009.

ASEGA, A. F; OLIVEIRA, A. K; MENEZES, M. C; NEVES-FERREIRA, A. G. C; SERRANO, S. M. T. Interaction of *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 80, p. 1–8, 2014.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*, 1987.

BARBOSA, P. S. F; HAVT, A; FACÓ, P.E.P; SOUSA, T. M; BEZERRA, I. S. A. M; FONTELES, M. C; TOYAMA, M. H; MARANGONI, S; NOVELLO, J. C; MONTEIRO, H. S. A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 40, n. 10, p. 1427–1435, 2002.

BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-l-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. *Toxicon*, v. 79, p. 1–10, 2014.

BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S. R.; TORRES, F. S.; COSTA, J.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; HOMSI-BRANDESBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, v. 51, n. 4, p. 574–584, 2008.

BERNARDES, C. P. et al. Proteomic analysis of Bothrops pirajai snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 250–267, 2013.

BOER-LIMA, P. A.; ROCHA GONTIJO, J. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 2 SUPPL., 2002.

BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; CAMACHO, E.; ROSA, J. C.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO Proteomic analysis of Bothrops pirajai snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *Journal of Proteomics*, v. 80, p. 250–267, 2013.

BOER-LIMA, P. A.; ROCHA GONTIJO, J. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 2 SUPPL., 2002.

CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics of Bitis species reveals large intragenus venom toxin composition variation: Application to taxonomy of congeneric taxa. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 7, p. 2732–2745, 2007.

CAMPOS, L. B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. venoms This work is dedicated to the memory of Dr. Joaquim Coutinho Netto in gratitude for his mentorship and LBC guidance. **Toxicon**, v. 76, p. 1–10, 2013.

CARLOTTI, A. P. C. P. et al. Valor da relação proteína / creatinina , em amostras únicas de urina para semi-quantificação da proteinúria , em crianças com nefrose. **Jornal de pediatria**, v. 74, p. 404–410, 1998.

CASTRILLÓN-ESTRADA, D. F. et al. Envenenamiento ofídico Snake poisoning. v. 23, n. 1, p. 96–111, 2007.

CASTRO, B. B. A. DE et al. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 139–149, 2014.

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

CHEUNG, H. et al. Accessory Protein-Like Is Essential for IL-18-Mediated Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5351–5357, 2005.

CERDÁ, J. et al. Epidemiology of acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 3, p. 881–886, 2008.

COLLARES-BUZATO, C. B.; DE PAULA LE SUEUR, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by Bothrops moojeni snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 181, n. 2, p. 124–132, 2002.

CUELLAR-GORDO, L. C. et al. Comportamiento epidemiológico del accidente ofídico en el Departamento del Magdalena, Colombia (2009-2013). **Ciencias de la Salud**, v. 14, n. 2, p. 161–177, 2015.

DAMICO, D. C. S. et al. Cytotoxicity of Lachesis muta muta snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 5, p. 678–692, 2007.

DE CASTRO, I. et al. Bothrops venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 43, n. 7, p. 833–839, 2004.

DE NORÕES, T. B. S. Efeitos renais promovidos pelo veneno de serpente bothrops atrox e a produção de óxido nítrico. [s.l.] **Universidade Federal do Ceará**, 2009.

ESCALANTE, T. et al. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, n. 1, p. 17–28, 2003.

EVANGELISTA, I. L. et al. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 6, p. 1061–1070, 2010.

FADARE, J. O.; OA, A. Management of snake bite in resource-challenged setting: A review of 18 months experience in a Nigerian hospital. **Journal of Clinical Medicine and Research**, v. 4, n. 3, p. 39–43, 2012.

FANTUZZI, G.; REED, D. A.; DINARELLO, C. A. IL-12-induced IFN- γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 761–767, 1999.

FINN, W. F.; PORTER, G. A. Urinary biomarkers and nephrotoxicity. In: DE BROE, M. E. et al. (Eds.). . **Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 621–655.

FOLLECO-FERNÁNDEZ, A. J. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (serpentes: viperidae) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie. **Revista Novedades Colombianas**, v. 0, n. GARCÍA, p. 33–70, 2010.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.

FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom: Comparison with probenecid. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011.

FRY, B. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–420, 2005.

GARCÍA-NIETO, V.; GONZÁLEZ-CERRATO, S.; LUIS-YANES, M. I.; MONGE-ZAMORANO, M.; REYES-MILLÁN, B. Decreased concentrating capacity in children with febrile urinary tract infection and normal ^{99m}Tc- dimercaptosuccinic acid scan: does medullonephritis exist? **World J Pediatrics**. v. 10, n. 2, p. 133-137, 2014

GIRÓN, M. E. et al. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 3, p. 147–152, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223–1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. **Toxicon**, v. 109, p. 51–62, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 976–987, 2009a.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. 0727–0731, 2006.

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

HAVT, A. et al. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 130–141, 2005.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA 2 and PAF blockers. v. 39, 2001.

HERGET-ROSENTHAL, S. et al. Proteomic Biomarkers for the Early Detection of Acute Kidney Injury. **Contributions, Sec. Biol. Med. Sci**, v. 1, p. 27–48, 2012.

HERNÁNDEZ, C. A. et al. Inflammatory mediators release in urine from mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, 2011.

HROVAT, A. et al. Evaluation of snake envenomation-induced renal dysfunction in dogs using early urinary biomarkers of nephrotoxicity. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 239–244, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, P. W.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HVIDBERG, V. et al. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 773–777, 2005.

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

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

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

KAKAJIWALA, A. K.; FERGUSON, M. A.; FITZGERALD, J. C. Acute Kidney Injury. In: MATTEI, P. et al. (Eds.). . **Fundamentals of Pediatric Surgery: Second Edition**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 75–85.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, nov. 2008.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 38–44, 2005.

KOSCINCZUK, P. et al. Acute kidney injury caused by Crotalus and Bothrops snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, p. 295–301, 2013.

KUMAR, J. Pathophysiology of ischemic acute tubular necrosis. **Clinical Queries: Nephrology**, v. 1, n. 1, p. 18–26, 2012.

KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 333–338, 2003.

LÉVANO, J.; FERNÁNDEZ, R. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos instituto nacional de salud **Centro Nacional de Productos Biológicos**. peru: [s.n.].

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

LUO, Q.-H. et al. Evaluation of KIM-1 and NGAL as Early Indicators for Assessment of Gentamycin-Induced Nephrotoxicity <i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 41, n. 6, p. 911–918, 2016.

MAIUOLO, J. et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal of Cardiology**, v. 213, p. 8–14, 2016.

MARTIN, C. J.; GOEDDEKE-MERICKEL, C. M. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Nephrology nursing journal : journal of the American Nephrology Nurses' Association**, v. 32, n. 3, p. 683–685, 2015.

MARTINS, A. M. C. et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 595–599, 2005.

MEHTA, R. L. et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit Care**, v. 11, n. 2, p. R31, 2007.

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

MELLO, S. M. et al. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 2–3, p. 470–80, 2010.

MISHRA, J. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9466, p. 1231–8, 2005.

MITRMOONPITAK, C. et al. Effects of phospholipase A2 and metalloprotease fractions of Russell's viper venom on cytokines and renal hemodynamics in dogs. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 47–53, 2013.

MORA-OBANDO, D. et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 159–172, 2014.

MORAIS, I. C. O. et al. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 61, n. 1, p. 38–46, 2013.

MOREIRA, V. et al. A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A2 homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, n. 1–3, p. 68–79, 2013.

MOUNT, D. B.; KWON, C. Y.; ZANDI-NEJAD, K. Renal Urate Transport. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 313–331, 2006.

MURAYAMA, N. et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1189–93, 1997.

NASCIMENTO, D. D. S. Filogenia Molecular De Serpentes Neotropicais Do Grupo *Bothrops Atrox* (Linnaeus, 1758) (Viperidae: Crotalinae). [s.l.] **Universidade de Brasília**, 2014.

NASCIMENTO, H. F. M. Novos Marcadores de Lesão Renal Aguda. [s.l.] **Universidade do porto**, 2012.

NUÑES, L. J. L. **Informe final del evento accidente ofídico Colombia, año 2014. Instituto Nacional de Salud**, 2014. Disponível em: <[http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiol%C3%B3gico/Accidente ofídico 2014.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe_de_Evento_Epidemiol%C3%B3gico/Accidente_of%C3%ADico_2014.pdf)>

PANFOLI, I. et al. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: Old and new approaches. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 2, n. 4, p. 417–427, 2010.

PARAGAS, N. et al. The Ngal Reporter Mouse Detects the Response of the Kidney to Injury in Real Time. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 216–222, 2011.

PARIKH, C. R. et al. Biomarkers of acute kidney injury: early diagnosis, pathogenesis, and recovery. **Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 55, n. 7, p. 333–340, 2007.

REYES, A. et al. Alteraciones histológicas en riñones de ratas , inducidas por dosis bajas del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. **Revista Electronica de Veterinaria**, v. 10, n. 1695–7504, p. 1–11, 2009.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-8, 1979.

RODRIGUES, L. S. et al. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron clinical practice**, v. 119, p. 131–137, 2011.

RONCO, C. et al. Oliguria, creatinine and other biomarkers of acute kidney injury. **Contrib Nephrol**, v. 164, p. 118–127, 2010.

RUCAVADO, A. et al. Viperid Envenomation Wound Exudate Contributes to Increased Vascular Permeability via a DAMPs/TLR-4 Mediated Pathway. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 8, n. 12, p. 349, 2016.

SANTHOSH, M. S. et al. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: A therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 721–731, 2013.

SANTOS, M.; FARANI, M.; ROCHA, P. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp . e *Crotalus* sp .: revisão e análise crítica da literatura. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 31, n. 2, p. 132–138, 2009.

SARMIENTO, K. Aspectos biomédicos del accidente ofídico. **Universitas Méd. Bogotá Colombia**, v. 53 (1), p. 68–85, 2012.

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 904–922, 2009.

SCHMIDT-OTT, K. M. et al. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 407–413, 2007.

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

SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 516–521, 2003.

SINGH, D. et al. Antioxidants in the prevention of renal disease. **Journal of medicinal food**,

v. 9, n. 4, p. 443–450, 2006.

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature clinical practice. Nephrology**, v. 4, n. 11, p. 616–27, 2008.

TOLEDO, M. A.; PARK, M.; MACEDO, E. Physicochemical analysis of blood and urine in the course of acute kidney injury in critically ill patients: a prospective, observational study. **BMC anesthesiology**, v. 13, n. 1, p. 31, 2013.

VELASCO, M.A.R. Eevaluación de los efectos renales inducidos por el veneno de la serpiente *Bothrops ayerbei* folleco, 2010 en ratas wistar, ratón albino suizo y células mdck. [s.l.] **Universidad Del Cauca**, 2013.

VAIDYA, V. S.; BONVENTRE, J. V. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 5, p. 697–713, 2006.

VASARUCHAPONG, T. et al. Comparative studies on hematological and plasma biochemical parameters in different types of venomous snakes in Thailand. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 4, p. 955–959, 2014.

VASCONCELOS, C. M. L. et al. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 439–443, 1998.

WARING, W. S.; WEBB, D. J.; MAXWELL, S. R. J. Systemic Uric Acid Administration Increases Serum Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers. p. 365–371, 2001.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 951–967, 2005.

XAVIER, C. H. et al. Bj-PRO-5a and Bj-PRO 10c Found at C-Type Natriuretic Peptide Precursor of *Bothrops jararaca* Change Renal Function of Hypertensive Rats. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

YANG, L. et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **Journal of**

Clinical Investigation, v. 125, n. 4, p. 1620–1636, 2015.

ZARARSIZ, I. et al. Protective effect of melatonin against formaldehyde-induced kidney damage in rats. **Toxicology and industrial health**, v. 23, n. 10, p. 573–579, 2007.

ZHAO, W.; DIZ, D. I.; ROBBINS, M. E. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. **British Journal of Radiology**, v. 80, n. SPEC. ISS. 1, p. 23–31, 2007.