



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

RODRIGO TAVARES DANTAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS DA FRAÇÃO L-AMINOÁCIDO
OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE**

Bothrops marajoensis

FORTALEZA
2010

RODRIGO TAVARES DANTAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS DA FRAÇÃO L-AMINOÁCIDO
OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE**

Bothrops marajoensis

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

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA
2010

D215a Dantas, Rodrigo Tavares
Avaliação dos efeitos renais da fração l-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*/ Rodrigo Tavares Dantas. – Fortaleza, 2010.
103 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ceará.

1. Bothrops 2. L-Aminoácido Oxidase 3. Rim I. Martins, Alice Maria Costa (orient.) II. Título.

CDD:615.942

RODRIGO TAVARES DANTAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS DA FRAÇÃO L-AMINOÁCIDO
OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE**

Bothrops marajoensis

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

Aprovada em 03/08/2010.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

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

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará

À minha família pelo apoio e força constantes.

AGRADECIMENTOS

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

Aos **meus pais**, razão de tudo que sou;

Ao **meu irmão** pela torcida constante;

Ao **Robert** pela força, carinho e dedicação;

Aos amigos **Airton, Vera, Ricardo, Juliana Neves, Lucíola e Caroline Souza** por acreditarem em mim;

Às minhas **tias Mazé e Lúcia**;

À **Aura Rhanes**, por me prestar ajuda sempre que solicitada;

Aos colegas de laboratório **Ramom, Kamila, Gdayllon, Felipe, Isabel** pela ajuda;

Aos colegas de outros laboratórios **Daniel** e em especial **Roberta Jeane** que tornou concreta uma parte desta dissertação;

À **Alba**, pessoa de fundamental importância na realização deste trabalho desde o processo de seleção do mestrado até a conclusão do mesmo, além do companheirismo, da amizade e de seu otimismo constante;

Ao **Alexandre Havt**, pelo empenho e paciência na realização dos experimentos;

À **professora Alice** por ter me aceitado como orientando e pela orientação precisa;

Ao **Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas** e sua coordenadora **Dra. Helena Serra Azul**, pelo espaço sempre disponível;

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

Ao **Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas**, a sua Coordenadora, a **Prof. Goretti** e a todos seus funcionários, pelo abrigo;

Ao **Marcos Toyama**, pela parceria;

À **Dra. Júlia Manso** e toda equipe do **Laboratório de Bioquímica de Parasitas** do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, em especial o **Roberto** e a **Célia**, pela brilhante recepção e assistência prestada;

À **Prof. Fátima Oliveira**, por abrir portas.

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

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

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

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

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

Ricardo Reis

RESUMO

No mundo, existem cerca de 3.000 espécies de serpentes das quais 10 a 14% são peçonhentas. Dentre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes/ano com cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano. De acordo com o Ministério da Saúde, as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos no país e a insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação grave dos envenenamentos produzidos por estas serpentes. Tendo em vista que a fração L-aminoácido oxidase (LAAO) constitui grande parte da composição total do veneno de serpentes, em algumas serpentes chegando a constituir mais de 30% do total de proteínas do veneno, neste trabalho, foram investigados os efeitos renais da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (LAAOBM) em sistema de perfusão de rim isolado e em cultura de células tubulares renais da linhagem MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Para perfusão de rim isolado foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250 e 300g, cujos rins foram excisados cirurgicamente e perfundidos com solução de Krebs-Hanseleit contendo 6%p/v de albumina bovina previamente dialisada. Foram investigados os efeitos da LAAOBM (10 µg/mL; n=4) sobre a Pressão de Perfusão (PP), Resistência Vascular Renal (RVR), Fluxo Urinário (FU), Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺), Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺), de Potássio (%TK⁺) e de Cloreto (%TCl⁻). As células MDCK foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal e então incubadas com a LAAOBM nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,652 µg/mL. Após 24 horas de incubação, foram realizados os ensaios de viabilidade e proliferação celular utilizando-se o método do MTT. A LAAOBM promoveu uma redução da pressão de perfusão aos 90 minutos de experimento e esta redução foi ainda discretamente maior aos 120 minutos. Observou-se também queda da resistência vascular renal aos 120 minutos. Houve uma queda abrupta e acentuada do fluxo urinário aos 90 minutos que, apesar da tendência à recuperação observada aos 120 minutos, ainda mostrou-se bastante reduzido quando comparado ao grupo controle. A infusão da LAAOBM também promoveu uma redução do ritmo de filtração glomerular aos 90 minutos quando comparada ao grupo controle e este parâmetro manteve-se ainda no mesmo patamar de redução aos 120 minutos. A LAAOBM reduziu gradativamente o percentual de transporte tubular de sódio aos 90 e 120 minutos e o percentual de transporte tubular de cloreto nos tempos de 60, 90 e 120 minutos. A análise histológica dos rins perfundidos com LAAOBM mostrou a presença de alterações morfológicas significativas, como acúmulo de proteínas nos espaços tubulares e glomerulares. Na cultura de células MDCK a LAAOBM promoveu uma redução da viabilidade celular a partir da concentração de 3,25µg/mL até a concentração de 50µg/mL, com valor da CI₅₀ de 2,43µg/mL. Foram observadas também, através de microscópio óptico invertido, alterações morfológicas destas células, tais vacuolização citoplasmática, alteração do estado de confluência e desprendimento das mesmas do substrato de cultura. Estes resultados demonstram que a LAAOBM alterou todos os parâmetros vasculares e renais avaliados na perfusão de rim isolado e possui ação citotóxica sobre as células MDCK após 24 horas de incubação.

Palavras-chave: *Bothrops marajoensis*. L-aminoácido Oxidase. Rim.

ABSTRACT

There are about 3.000 species of snakes worldwide, but only 10 to 14% are venomous. Among South American countries, Brazil is the one with the largest number of accidents, with approximately 20.000 snakebites each year. According to the Department of Health of Brazil, the genus *Bothrops* are the main involved in snakebites in the country. Acute renal failure (ARF) is a serious complication of snake poisoning. The fraction L-amino acid oxidase (LAAO) constitutes a main part of the total composition of snake venoms. In some cases this amount can reach 30% of total venom proteins. The renal effects of fraction L-amino acid oxidase isolated from the venom of *Bothrops marajoensis* (LAAOBM) was investigated in this study. Isolated perfused rat kidney and the cultured renal tubular cells line MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) were used here. For the isolated perfused rat kidney method, we used Wistar rats weighing between 250 and 300. Their right kidneys were surgically excised and perfused with Krebs-Hanseleit containing 6% w/v bovine albumin previously dialyzed. The effects of LAAOBM (10 mg/mL, n=4) were analyzed on the Perfusion Pressure (PP), Renal Vascular Resistance (RVR), Urinary Flow (UF), Glomerular Filtration Rate (GFR) Percentage of Sodium Proximal Tubular Transport (%pTNa⁺), Percentage of Sodium (%TNa⁺), Potassium (%TK⁺) and Chloride (%TCl⁻) Tubular Transport. MDCK cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum and incubated with LAAOBM at concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.652 mg/mL. After 24 hours of incubation, assays were performed on cell proliferation and viability using the MTT method. The LAAOBM promoted a reduction of perfusion pressure at 90 minutes of the experiment and this reduction was even slightly higher at 120 minutes. It was also observed decrease in renal vascular resistance at 120 minutes. There was a sharp and sudden drop in urine flow at 90 minutes, despite the tendency of recovery observed at 120 minutes, still proved to be quite small when compared to the control group. The infusion of LAAOBM also promoted a reduction in glomerular filtration rate at 90 minutes compared to the control group and this parameter still remained at the same level of reduction at 120 minutes. The LAAOBM gradually reduced the percentage of sodium tubular transport at 90 and 120 minutes and the percentage of chloride tubular transport in the periods of 60, 90 and 120 minutes. Histological analysis of kidneys perfused with LAAOBM showed the presence of significant morphological changes such as accumulation of proteins in tubular and glomerular spaces. In the MDCK cell culture LAAOBM promoted a reduction in cell viability from concentrations of 3.25 mg / mL until 50µg/mL, with IC₅₀ value of 2.43 mg/mL. Inverted light microscopy showed morphological changes of these cells, such as vacuolation, alteration of the state of confluence and detachment of the substrate culture. These results demonstrated that LAAOBM changed all the parameters evaluated in renal and vascular perfusion of isolated kidney and had cytotoxic activity on MDCK cells after 24 hours of incubation.

Keywords: *Bothrops marajoensis*. L-amino acid oxidase. Kidney.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	18
Figura 2 – Serpente do gênero <i>Lachesis</i>	18
Figura 3 – Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	18
Figura 4 – Serpente <i>Bothrops marajoensis</i> em seu habitat natural.....	20
Gráfico 1 – Classificação dos Acidentes Ofídicos ocorridos no Estado do Ceará no período de 1992 a 1995 segundo os gêneros das serpentes.....	22
Gráfico 2 – Distribuição dos acidentes ofídicos segundo os gêneros das serpentes envolvidas. Ceará, Brasil, 2001 a 2007.....	23
Figura 5 – Desidrogenação de L-aminoácidos catalisada pela LAAO.....	31
Figura 6 – Estéreovisão do sítio catalítico mostrando uma interação entre LAAO e L-fenilalanina.....	32
Figura 7 – Características morfológicas da apoptose e da necrose.....	35
Figura 8 – Etapas do processo de morte celular por apoptose.....	36
Figura 9 – Vias de sinalização da apoptose.....	37
Figura 10 – Esquema de Purificação da LAAOBM.....	45
Figura 11 – Foto do sistema de perfusão de rim isolado.....	47
Figura 12 – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.....	47
Figura 13 – Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).....	49
Figura 14 – Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).....	49
Figura 15 – Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).....	50
Figura 16 – Etapas iniciais do procedimento cirúrgico para exérese renal.....	51
Figura 17 – Etapas finais do procedimento cirúrgico para exérese renal.....	52

Figura 18 – Fotografia do rim isolado no sistema de perfusão.....	52
Figura 19 – Microfotografia de células MDCK em cultura.....	56
Figura 20 – Microfotografias de células MDCK após 6 horas, 36 horas e 60 horas do cultivo.....	56
Figura 21 – Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK.....	58
Figura 22 – Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação celular.....	59
Figura 23 – Esquema gráfico do isolamento de RNA total com automação pelo equipamento QiaCube (Qiagen).....	61
Figura 24 – Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	66
Figura 25 – Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	66
Figura 26 – Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	67
Figura 27 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	67
Figura 28 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	68
Figura 29 – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	68
Figura 30 – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	69
Figura 31 – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> (LAAOBM: 10 µg/mL).....	69

Figura 32 – Fotomicrografia de rim perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit modificada, mostrando que a perfusão não altera a fisiologia renal.....	70
Figura 33 – Fotomicrografia de rim esquerdo não perfundido.....	71
Figura 34 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> na concentração de 10 µg/mL, evidenciando alterações na arquitetura renal.....	71
Figura 35 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> na concentração de 10 µg/mL, demonstrando depósito acentuado de material proteico nos túbulos.....	72
Figura 36 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> na concentração de 10 µg/mL, demonstrando moderado depósito acentuado de material proteico nos espaços urinários.....	72
Figura 37 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da <i>Bothrops marajoensis</i> em células tubulares renais MDCK.....	73
Figura 38 – Fotomicrografias de células tubulares renais MDCK expostas à LAAOBM (1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50 µg/mL) e não-expostas (controle) utilizando microscópio óptico invertido.....	74
Figura 39 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre a expressão relativa do gene pró-apoptótico <i>BAX</i> em células MDCK.....	75
Figura 40 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre a expressão relativa do gene anti-apoptótico <i>BCL-XL</i> em células MDCK.....	76
Figura 41 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre a expressão relativa do gene anti-apoptótico <i>MCL-1</i> em células MDCK.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das serpentes.....	17
Quadro 2 – Comparação de frações L-Aminoácido Oxidase Isoladas de Venenos de Serpentes.....	39
Quadro 3 – Comparação da sequência N-terminal aminoácido da LAAOBM com outras frações LAAO extraídas de veneno de serpentes obtidas da pesquisa de similaridade BLAST.....	46
Quadro 4 – Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.....	54
Quadro 5 – Sequência dos iniciadores usados na reação de qPCR.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Breve classificação das serpentes	15
1.2 <i>Bothrops marajoensis</i>	19
1.3 Acidente ofídico	20
1.4 A função renal	24
1.5 Insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico	26
1.6 Fisiopatologia da insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico	28
1.7 L-Aminoácido oxidase isolada de venenos de serpentes	30
1.8 Apoptose	34
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais de experimentação	43
4.2 Células MDCK	43
4.3 Purificação da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i>	43
4.4 Perfusão de rim isolado	46
4.4.1 Sistema utilizado	46
4.4.2 Calibração do sistema	48
4.4.3 Solução perfusora	50
4.4.4 Técnica cirúrgica	51
4.4.5 Grupos experimentais	53
4.4.6 Protocolo experimental	53
4.4.7 Análises bioquímicas dos perfusatos e urinas	53
4.4.8 Cálculo dos parâmetros funcionais renais	54
4.4.9 Análise histopatológica	55
4.5 Ensaio com cultura de células	55
4.5.1 Cultivo das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)	55

4.5.2 Ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular	56
4.5.2.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	57
4.6 Ensaaios para avaliação de expressão gênica	60
4.6.1 Isolamento de RNA total	60
4.6.2 Reação de transcriptase reversa	61
4.6.3 Reação de polimerase de cadeia em tempo real (qPCR)	62
4.6 Análise estatística	63
4.7 Aspectos éticos	64
5 RESULTADOS	65
5.1 Efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre a perfusão de rim isolado	65
5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i>	70
5.3 Efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre células MDCK em cultura	73
5.4 Determinação dos efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente <i>Bothrops marajoensis</i> sobre a expressão gênica de células MDCK em cultura	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve classificação das serpentes

As serpentes, ou ofídios, formam a ordem *Squamata*, o mais numeroso grupo de répteis vivos e compõem a subordem *Serpentes*, que, atualmente conta com cerca de 3.000 espécies distribuídas em 20 famílias e 465 gêneros. Estão inclusas na classe *Reptilia*, subclasse *Lepdosauria*, tendo cerca de 410 espécies venenosas, porém este número é bastante variável, reflexo da complexidade de formas e ausência de conhecimento profundo das relações filogenéticas destes animais (BARRAVIERA, 1993; MELGAREJO, 2003). Ademais, estudos constantes de revisão com descrições de novas espécies e invalidação de outras, promovem uma variação quase contínua nestes números.

As serpentes têm uma distribuição territorial quase universal, mas habitam, principalmente, as regiões temperadas e tropicais. Essa distribuição deve-se à característica específica que apresentam estes animais de depender do calor para efetuar sua termorregulação. Apesar de sofrerem interferências morfológicas adaptativas aos diversos ambientes onde são encontradas, conservaram um padrão bastante homogêneo: o corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular; perda da sínfise mandibular (perda da sutura óssea das hemimandíbulas, substituída por um ligamento constituído por tecido rico em elastina) e perda de pálpebras móveis. Os órgãos internos são como dos demais vertebrados, porém sempre conservando um formato alongado e a principal diferença reside na ausência de bexiga. São quase exclusivamente carnívoras, alimentando-se de presas inteiras, tanto vertebrados quanto invertebrados, e caçam com o auxílio de estruturas quimiossensíveis (WONG *et al.*, 2009).

É possível ainda classificar as serpentes como animais importantes para a manutenção da cadeia ecológica, pois exercem o papel de controle de pragas tais como ratos, insetos e até mesmo outras serpentes. É necessário destacar também que alguns destes animais são dotados de glândulas produtoras de veneno, do qual já foram identificadas mais de 400 proteínas, algumas das quais serviram de base para confecção de colas cirúrgicas e até mesmo de medicamentos (GOULART, 2010).

A produção de veneno não é uma característica exclusiva das serpentes. Os venenos são encontrados em várias espécies de seres vivos, desde organismos unicelulares a pássaros como o pitohui-de-penacho (*Pitohui dichrous*) (DUMBACHER *et al.*, 2000),

contudo, é possível distinguir esses organismos em duas classes de acordo com a presença ou a ausência de estruturas especializadas para inocular o veneno em suas pressas em animais peçonhentos ou não peçonhentos, respectivamente (RUSSEL; DART, 1991).

Nos animais peçonhentos, observa-se a presença de glândulas especializadas para produção de veneno. Este, por sua vez, é um complexo enzimático de finalidade principalmente digestiva, porém, com efeito tóxico que pode neutralizar ou até mesmo matar sua presa durante a captura. Em virtude de sua toxicidade, o veneno também é utilizado como mecanismo de defesa contra predadores (INSTITUTO BUTANTAN, 1996).

Algumas serpentes contam ainda com um órgão sensorial importante, a fosseta loreal, que, localizado entre a narina e os olhos, funciona como um sensor térmico muito desenvolvido que as ajuda a localizar suas presas mesmo em ambientes escuros por meio da captação de calor (NOGUEIRA; SAKATE, 2004).

De acordo com McDowell (1987) estes animais são classificados em 2 subordens, 7 superfamílias e 19 famílias (Quadro 1).

A superfamília *Colubroidea* abrange a maioria das formas viventes que compreende as serpentes mais evoluídas. Merecem destaque, as famílias *Elapidae* e *Viperidae*, uma vez que encerram as serpentes que apresentam glândulas produtoras de venenos e/ou toxinas, bem como aparelhos apropriados para inoculá-los (BRASIL, 2001; MELGAREJO, 2003).

Com cerca de 250 espécies, a família *Elapidae* tem ampla distribuição mundial com representantes em todos os continentes. Na Austrália, todas as serpentes peçonhentas conhecidas pertencem a esta família. As najas do continente asiático, utilizadas tipicamente pelos “encantadores de serpentes”, e as temidas mambas do continente africano, cuja picada é praticamente 100% fatal se não administrado o antiveneno, são representantes desta família. Na América, seus principais exemplares são as popularmente conhecidas “cobras corais”. Na fauna brasileira há cerca de 20 representantes desta família, sendo a maioria pertencente ao gênero *Micrurus* (CAMPBELL; LAMAR, 1989; ROZE, 1996; JORGE DA SILVA, 1997).

A família *Viperidae*, ou víboras, possui cerca de 34 gêneros e mais de 200 espécies de serpentes. A maioria destas espécies pertence ao gênero *Bothrops*, enquanto poucas fazem parte do gênero *Crotalus* e do gênero *Lachesis* (JORGE; RIBEIRO, 1990). As serpentes desta família apresentam, geralmente, cabeça triangular, fossetas loreais e um aparelho venenoso considerado como o mais eficiente de todos os répteis, capaz de produzir principalmente veneno hemotóxico, podendo, por vezes, ser neurotóxico. Os seus dentes curvos, podem injetar veneno profundamente no corpo da presa (CAMPBELL; LAMAR,

1989). Essas características conferem à família *Viperidae* um alto grau de importância do ponto de vista da saúde pública, uma vez que grande parte dos acidentes ofídicos registrados no continente americano envolve suas espécies (BRASIL, 2001).

Quadro 1 – Classificação das serpentes. (*) Famílias representadas no Brasil.

Subordem	Superfamília	Família
<i>Scolecophidia</i>	<i>Typhlopoidea</i>	<i>Anomalepididae</i> (*)
		<i>Typhlopidae</i> (*)
		<i>Leptotyphlopidae</i> (*)
<i>Alethinophidia</i>	<i>Acrochordoidea</i>	<i>Nigeropheidae</i>
		<i>Palaeopheidae</i>
		<i>Anomalopheidae</i>
		<i>Acrochordidae</i>
	<i>Anilioidea</i>	<i>Loxocemidae</i>
		<i>Xenopeltidae</i>
		<i>Aniliidae</i> (*)
		<i>Uropeltidae</i>
	<i>Tropidopheoidea</i>	<i>Tropidopheidae</i> (*)
	<i>Bolyerioidea</i>	<i>Bolyeriidae</i>
<i>Booidea</i>	<i>Pythonidae</i>	
	<i>Boidae</i> (*)	
<i>Colubroidea</i>	<i>Atractaspididae</i>	
	<i>Elapidae</i> (*)	
	<i>Colubridae</i> (*)	
	<i>Viperidae</i> (*)	

Fonte: adaptado de MCDOWELL (1987) e CARDOSO *et al.* (2003).

Na fauna ofídica brasileira há 9 famílias, 75 gêneros e 250 espécies de serpentes, o que corresponde a 10% do total de espécies conhecidas (CARDOSO *et al.*, 2003). A maioria destas espécies está distribuída em quatro famílias principais: *Colubridae* (189 espécies), *Viperidae* (22 espécies), *Elapidae* (18 espécies) e *Boidae* (10 espécies) (ROMANO-HOGE, 1990) com cerca de 70 espécies peçonhentas (LEMOS *et al.*, 2009).

Dentes as espécies de serpentes peçonhentas brasileiras destacam-se duas famílias: a *Elapidae* e a *Viperidae*. A família *Viperidae* é representada por três gêneros: *Crotalus* (Figura 1) que compreende as cascavéis, *Lachesis* (Figura 2) que representa as surucucus e *Bothrops* (Figura 3) que engloba as serpentes conhecidas como jararacas. O gênero *Micrurus*, que compreende as serpentes conhecidas como corais, é o único representante da família *Elapidae* (CARDOSO *et al.*, 2003).

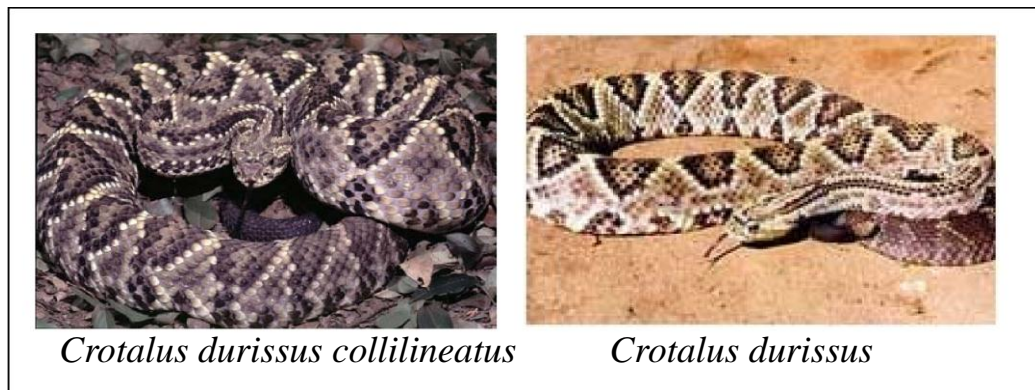


Figura 1 – Serpentes do gênero *Crotalus*
 Fonte: TORRES (2009).



Figura 2 – Serpente do gênero *Lachesis*.
 Fonte: TORRES (2009).

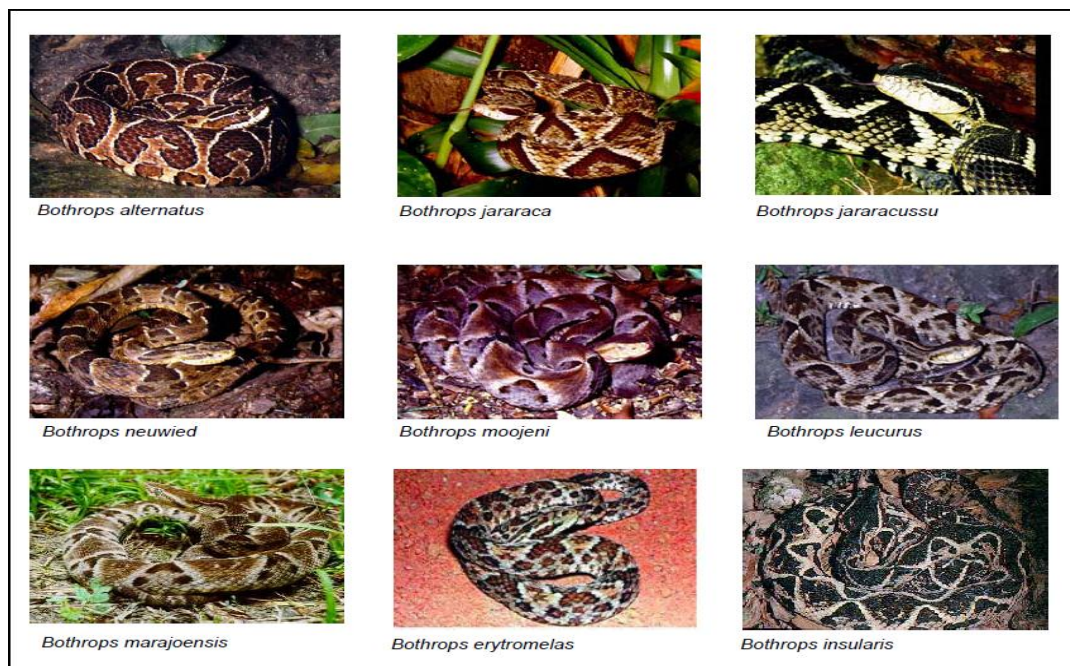


Figura 3 – Serpentes do gênero *Bothrops*, dentre estas a espécie *Bothrops marajoensis*.
 Fonte: TORRES (2009).

1.2 *Bothrops marajoensis*

Em todo o território nacional foram identificadas 17 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (CARDOSO *et al.*, 2003). Devido sua ampla distribuição territorial, estas cobras recebem vários nomes populares; jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçara, dentre outras denominações; o que muitas vezes dificulta a identificação das mesmas.

As serpentes do gênero *Bothrops* têm sido bem estudadas devido a sua predominância e importância médica em vários países da América do Sul como o Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru (HIGUCHI *et al.*, 2007). No Brasil, representam um problema para a saúde pública, pois são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos notificados em todo o país (BRASIL, 2001).

As serpentes pertencentes a este gênero habitam, principalmente, zonas rurais e periferias de grandes cidades. Como habitat preferem ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha etc.). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, apresentam grande variedade de cores, que vão do verde ao negro; de desenhos; de tamanhos, desde 40 centímetros a 2 metros de comprimento; e de hábitos. Podem também ser encontradas penduradas em árvores, enterradas ou entocadas à beira de rios ou dentro d'água (PUORTO, 1992; FRANÇA; FAN, 1992). A composição de seus venenos pode exibir variações associadas com a origem geográfica, habitat, variação sazonal, dieta, idade e gênero (MACKESSY; WILLIAMS; ASHTON, 2003; FURTADO; SANTOS; KAMIGUTI, 2003).

Inicialmente encontrada na ilha de Marajó, no estado do Pará, de onde deriva seu nome, a serpente *Bothrops marajoensis* (Figura 4) é também encontrada na costa do Pará e, questionavelmente, nas regiões equatoriais do Estado do Maranhão (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Apesar de compor um dos gêneros mais importantes e bastante estudados na família dos viperídeos, esta espécie é ainda pouco conhecida, talvez pelas controvérsias em torno de sua classificação, o que tem lhe rendido muita indefinição. Alguns pesquisadores defendem a ideia de que sua classificação precisa ser revista para uma nova avaliação de seu *status* (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Outros autores a consideram como uma espécie *Bothrops atrox* tendo em vista que, em estudo realizado com a finalidade de definir variações de parentesco entre espécies do gênero, foi evidenciada pouca distinção entre estas duas espécies. Foi visto também que a *Bothropos marajoensis* apresenta variações fenotípicas entre

as diversas serpentes do grupo, cuja principal característica está na necessidade de adaptação a diversos ambientes, o que reforça as semelhanças entre as duas espécies e pode refletir-se na filogenia das mesmas (WOLFGANG; ROGER; PUORTO, 1996).



Figura 4 - Serpente *Bothrops marajoensis* em seu habitat natural.
Fonte: http://www.afpmb.org/pubs/living_hazards/B1MARAJO.jpg.

1.3 Acidente ofídico

No mundo, existem cerca de 3.000 espécies de serpentes das quais 10 a 14% são peçonhentas (BARRAVIERA, 1993; PEREIRA; PINHO, 2001). A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram em nível mundial aproximadamente 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1998). A maioria desses casos ocorre principalmente na Ásia, Índia, Paquistão e Birmânia com cerca de 25.000 a 35.000 óbitos por ano (RIBEIRO; JORGE; IVERSSON, 1995).

A letalidade dos acidentados varia em diferentes regiões do mundo. Na Europa, Estados Unidos e Canadá, os acidentes ofídicos são relativamente raros. Cerca de 90% dos 8.000 envenenamentos ocorridos por ano são hospitalizados, resultando entre 15 a 30 casos fatais. Na África, a frequência dos acidentes ofídicos é precariamente documentada. Dos 500.000 casos de acidentes ofídicos, 40% são hospitalizados, resultando em 20.000 óbitos por ano. Na Ásia, principalmente no Paquistão, na Índia e na Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 óbitos por ano, sendo causados por uma das serpentes mais

importante do mundo: a *Vipera russelli*. No Japão a incidência geral é de aproximadamente 1/100.000 habitantes e a letalidade é inferior a 1% (LEMOS *et al.*, 2009).

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes/ano com cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano (PEREIRA; PINHO, 2001). Somente no ano de 2005 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.702 casos (29,52%) (LEMOS *et al.*, 2009).

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

De acordo com o Ministério da Saúde, as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos no país e, no período de 1990 a 1993, foram responsáveis por 90,5% dos 65.911 casos de picadas de serpentes nos quais o gênero foi suspeitado ou reconhecido (BRASIL, 1998), com taxa de letalidade de 0,31%. Insuficiência renal aguda, choque e sepse foram as principais causas de morte nestes acidentes (BRASIL, 2001). No ano de 2009 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 121.217 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 29.670 casos (24,48%) (BRASIL, 2010).

O perfil clínico-epidemiológico dos acidentes ofídicos depende da distribuição das espécies dentro de cada região, dos hábitos destes animais e do grau de exposição das populações humanas a estes agentes. Segundo Bochner e Struchiner (2002), a epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil se manteve inalterada nestes últimos 100 anos. Os dados demonstram que o sexo masculino é o mais acometido. A faixa etária coincide com a idade onde a força de trabalho no campo é maior (BRASIL, 2001).

A notificação dos acidentes ofídicos no estado do Ceará é realizada pela Secretaria de Saúde do Estado (SESA), através da Comissão Estadual de Controle de Zoonoses que captam as informações das microrregionais do estado.

No Ceará ainda existem poucos trabalhos sobre ofidismo. De acordo com Feitosa, Melo e Monteiro (1997) foram notificados à Secretaria de Saúde do Estado, no

período de 1992 a 1995, 688 acidentes causados por serpentes peçonhentas com média anual de 172 casos e coeficiente de incidência variando entre 0,9 a 5,8 por 100.000 habitantes. Dos 473 (68,75%) casos em que houve referência ao gênero da serpente destacou-se a seguinte classificação:

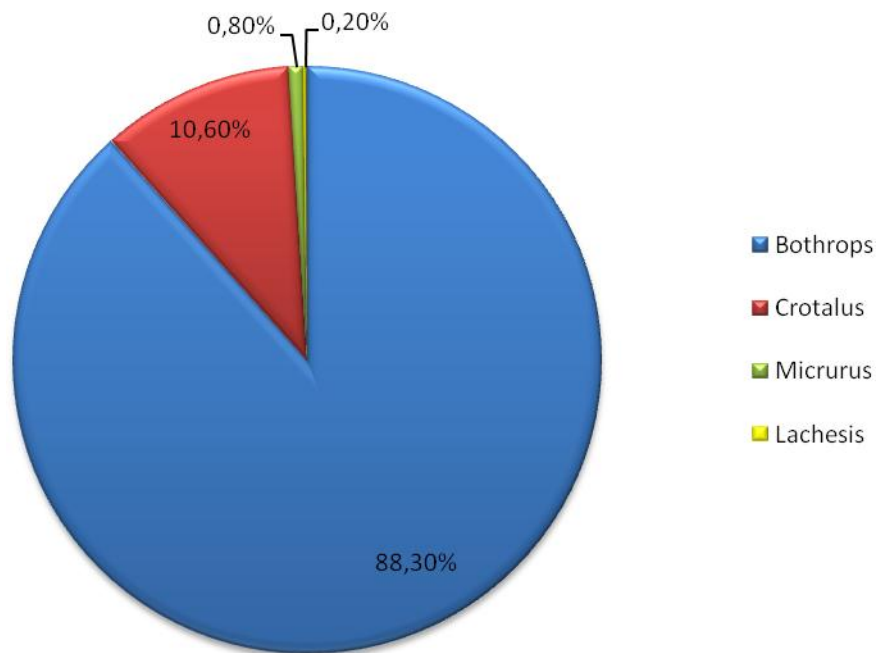


Gráfico 1 – Classificação dos Acidentes Ofídicos ocorridos no Estado do Ceará no período de 1992 a 1995 segundo os gêneros das serpentes.

Fonte: FEITOSA, MELO e MONTEIRO (1997).

Ademais, as vítimas eram, sobretudo, agricultores (62,7%) e a maioria dos casos ocorreu no próprio local de trabalho. Os meses de abril a setembro apresentaram maior incidência. Tendo em vista que o aumento do número de casos coincide com o aumento da atividade do setor agropecuário, os acidentes ofídicos no Estado do Ceará podem ser considerados acidentes de trabalho, acometendo principalmente os trabalhadores rurais e constituindo causa de óbito. Houve predominância de acidentes em relação ao sexo masculino (75,6%) e a faixa etária mais acometida foi aquela entre 10 a 49 anos de idade (72,3%). As regiões anatômicas mais frequentemente picadas foram os membros inferiores (81,9%) e superiores (14,7%). Em 66,9% dos casos, o atendimento na unidade de saúde que notificou o acidente, deu-se decorridas seis horas do acidente e a letalidade registrada foi de 0,7% (FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997).

Em estudo mais recente, também realizado no estado do Ceará, a percentagem de acidentes envolvendo o gênero *Bothrops* praticamente em nada se modificou, ou seja,

manteve-se o predomínio desta espécie nos casos envolvendo humanos (Gráfico 2). Dos 3.877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas registrados no estado no período de 2001 a 2007, 74,2% acometeu pessoas do sexo masculino com faixa etária de 21 a 50 anos e confirma a consideração de que este tipo de acidente está relacionado à atividade agrícola (ROCHA, 2008).

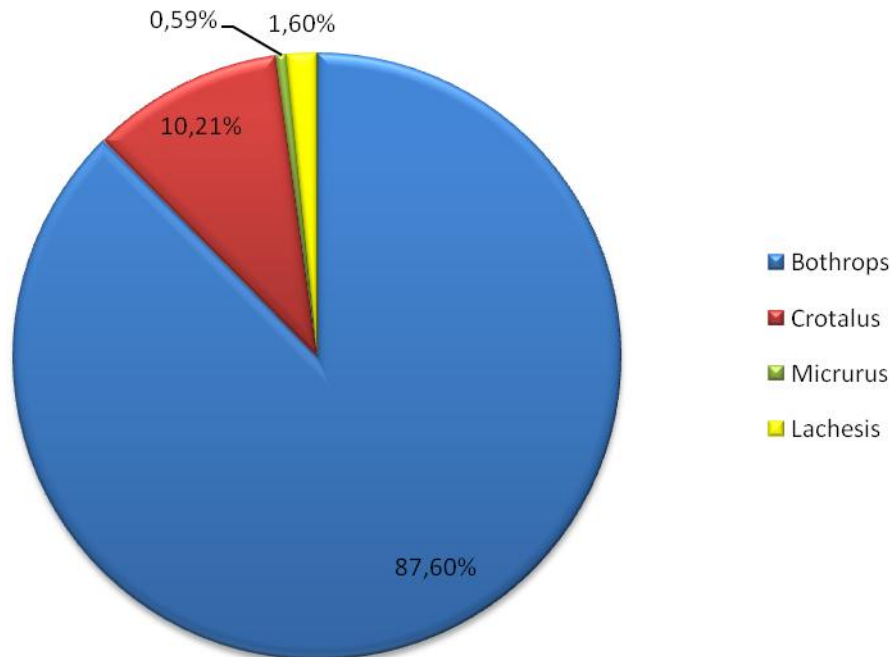


Gráfico 2 – Distribuição dos acidentes ofídicos segundo os gêneros das serpentes envolvidas. Ceará, Brasil, 2001 a 2007.
Fonte: ROCHA, 2008.

A frequência e a gravidade do envenenamento causado pelas serpentes constituem, portanto, um importante problema não só na medicina humana como também na medicina veterinária nos países tropicais. Tal preocupação deve-se ao fato da elevada incidência dos acidentes bem como de sua gravidade e das sequelas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

As alterações clínicas decorrentes dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* vão de complicações no local da picada até alterações sistêmicas. As alterações na região da picada vão desde uma intensa inflamação (MÁLAQUE; FRANÇA, 2003a), destruição tecidual, complicando-se com infecção por bactérias provenientes do próprio veneno da serpente (MÁLAQUE; FRANÇA, 2003b).

Dentre as alterações sistêmicas causadas pelos venenos botrópicos é possível citar uma variedade complexa de componentes que agem sobre o sistema hemostático causando desde lesão endotelial até trombocitopenia. O veneno botrópico é descrito

também como pró-coagulante, uma vez que pode ativar fatores da cascata de coagulação levando à formação de fibrina intravascular (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003) que, por seu turno, culmina no consumo do fibrinogênio circulante causando um prolongamento do tempo de coagulação ou até mesmo incoagulabilidade sanguínea (KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995; SANO-MARTINS; SANTORO, 2003).

Diversas alterações renais foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Dentre estas, pode-se citar glomerulonefrite, glomerulite e nefrite intersticial (SANT; PUNDARE, 1972), arterite e necrose tubular (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979), necrose cortical e insuficiência renal (RAAB; KAISER, 1966; HAVT *et al.*, 2005). Ainda foi descrita também a ocorrência de hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979). Entretanto, entre todas, a mais relatada tem sido a insuficiência renal aguda (BARBOSA *et al.*, 2006), importante causa de letalidade nos pacientes que sobrevivem à ação inicial da peçonha e que possui patogênese multifatorial (REZENDE *et al.*, 1989; BOER-LIMA *et al.*, 1999).

1.4 A Função Renal

O sistema renal exerce múltiplas funções para manter a homeostase do corpo. Talvez, a mais popularmente conhecida é a formação e eliminação da urina, através da qual é excretado o material indesejado que é ingerido ou produzido pelo metabolismo. Outra função renal extremamente importante é o controle do volume e da composição dos líquidos corporais. O mesmo é feito através da filtração do plasma e posterior remoção de substâncias do filtrado em taxas variáveis, dependendo das necessidades do organismo. É por meio desta função regulatória que os rins mantêm o ambiente das células estável o suficiente para realização de suas funções (COVIELLO, 2007).

Dentre outras ações, o sistema renal também é responsável pela regulação do equilíbrio de água e eletrólitos; regulação da osmolalidade dos líquidos corporais e da concentração de eletrólitos; regulação da pressão arterial; regulação do equilíbrio ácido-base; secreção, metabolismo e excreção de hormônios, bem como pela gliconeogênese (GUYTON, 2006). Desta forma, é possível perceber que os rins estão intrinsecamente implicados na manutenção da homeostasia corporal; contudo, para seu bom funcionamento é necessário que seja mantido o arcabouço estrutural e celular deste tão complexo e importante sistema.

Em indivíduos normais a filtração glomerular é da ordem de 110 a 120 ml/min correspondente à função de filtração de cerca de 2.000.000 de néfrons (glomérulos e túbulos

renais). Em pacientes com insuficiência renal crônica, a filtração se reduz, podendo chegar, em casos avançados, até 5-10 ml/min quando o tratamento dialítico ou o transplante renal se fazem necessários (COSTANZO, 2004). A consequência bioquímica dessa redução de função se traduz pela retenção, no organismo, de um sem-número de solutos tóxicos geralmente provenientes do metabolismo proteico, que podem ser avaliados indiretamente através das dosagens da ureia e creatinina plasmáticas, que se elevam progressivamente.

São várias as causas que podem prejudicar a função renal, sendo as mais comuns a glomerulonefrite crônica, nefropatia túbulo-intersticial crônica (pielonefrite), necrose cortical renal, hipertensão arterial grave, processos renais obstrutivos crônicos, diabetes, amiloidose, lúpus eritematoso disseminado e doenças hereditárias tais como rins policísticos, síndrome de Alport e envenenamentos por serpentes peçonhentas (COSTA; VIEIRA NETO; MOYSÉS NETO, 2003).

Ao nível do parênquima renal, todas essas entidades provocam, por mecanismos iniciais diversos, proliferação celular (endotelial, mesangial e tubular), aumento da matriz mesangial, fibrose e obliterações glomerulares, dilatações e obstruções tubulares, fibrose intersticial generalizada, além da eventual deposição renal de substâncias estranhas ao rim como é o caso da amiloidose (DRAIBE, 2002).

É importante destacar que a lesão renal pode ter caráter progressivo, ocorrendo até mesmo na ausência da causa inicial que a determinou. Acredita-se que com a redução inicial de um determinado número de néfrons, aqueles remanescentes tornam-se hiperfiltrantes, hipertrofiam-se, sofrem alterações da superfície glomerular e modificações de permeabilidade da membrana glomerular às proteínas. Essas alterações levam à produção renal de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tais como IGF-I (*Insulin-like Growth Factor - I*), IL1 e IL6 (interleucinas 1 e 6), TGF- α e β (*Transforming Growth Factor - α e β*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TNF - α (*Tumoral Necrosis Factor - α*), endotelina, Fator Natriurético Atrial, angiotensina II, etc. Esses agentes seriam responsáveis pelos processos de proliferação celular renal, coagulação intraglomerular, recrutamento e proliferação de células imunitárias, aumento da matriz celular, proliferação colágena e fibrose. Desse modo a continuidade da presença de lesões fibróticas glomerulares e intersticiais acabaria por determinar perda progressiva dos néfrons e da filtração glomerular (DRAIBE, 2002).

O organismo adapta-se continuamente a esta situação no sentido de manter a homeostase: os néfrons remanescentes aumentam a excreção fracional de muitos solutos, que continuam a ser produzidos a taxas normais. A própria elevação de um determinado soluto no plasma, aumenta a sua excreção renal pelos néfrons remanescentes devido à elevação de sua

carga filtrada. Excetuando-se excessos ou privações, o balanço de sódio, potássio e água são mantidos até fases avançadas da insuficiência renal crônica. Vários solutos, entretanto, mantêm sua concentração plasmática em níveis normais, graças à elevação progressiva de hormônios reguladores. É o caso, por exemplo, da maior excreção fracional de sódio que fica progressivamente dependente, entre outros, do aumento da concentração plasmática do fator natriurético atrial. As concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo são mantidas em níveis normais às custas, quase exclusivamente, da progressiva elevação do paratormônio (PTH). Perdas de função renal de até 50% não se manifestam clinicamente de forma consistente. Reduções maiores causam a síndrome urêmica, constelação de sinais, sintomas e complicações que atingem praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo e que resultam da retenção de solutos tóxicos ou do excesso de ação de mecanismos homeostáticos, reguladores da concentração plasmática de solutos vitais ao organismo (ZATZ, 1996).

1.5 Insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico

O sistema renal, embora represente menos de 1% da superfície corporal de um indivíduo, recebe, em repouso, fluxo sanguíneo para os dois rins correspondente a 22% do débito cardíaco ou 1.100 mL/min. Como o volume plasmático total é de apenas 3 litros, enquanto a taxa de filtração glomerular é de cerca de 180 L/dia, o plasma pode ser filtrado e processado cerca de 60 vezes a cada dia (GUYTON, 2006). Estas características tornam o leito renal vulnerável à ação lesiva de produtos químicos ou biológicos, uma vez que a superfície endotelial glomerular é exposta às substâncias tóxicas presentes na circulação, e o processo de filtração dessas moléculas causa grande oferta de toxinas ao tecido renal (BURDMANN; VIEIRA; VIDAL, 2003).

A perda da função renal, de maneira súbita, independentemente da etiologia ou mecanismos, provocando acúmulo de substâncias nitrogenadas (uréia e creatinina), acompanhada ou não da diminuição da diurese, é denominada de insuficiência renal aguda (IRA) (COSTA; VIEIRA NETO; MOYSÉS NETO, 2003). Em ambiente hospitalar, mais especificamente na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), este problema acomete cerca de 5% dos pacientes admitidos e tem taxa de mortalidade de 60% (MARINO, 2008).

A classificação da IRA é feita de acordo com sua etiologia e é, portanto, definida como pré-renal, pós-renal e renal. Na IRA classificada como pré-renal, não há defeito estrutural nos rins, mas tão somente falta de perfusão sanguínea adequada no leito capilar renal, podendo levar os rins à lesão denominada de necrose tubular aguda (NTA). Já a

obstrução da via de saída do trato urinário caracteriza a IRA como pós-renal. No terceiro tipo de IRA, cuja etiologia é denominada de renal, incluem-se todas as formas de lesões recentes ao parênquima renal (COSTA; VIEIRA NETO; MOYSÉS NETO, 2003).

A IRA, causada por fatores intrínsecos ao rim, pode ainda ser classificada de acordo com o principal local afetado: túbulos, interstício, vasos ou glomérulo. A causa mais comum de dano tubular é de origem isquêmica ou tóxica. Entretanto, a necrose tubular isquêmica pode ter origem pré-renal como uma consequência da redução do fluxo, especialmente se houver comprometimento suficiente para provocar a morte das células tubulares. Assim, o aparecimento de necrose cortical irreversível pode ocorrer na vigência de isquemia severa, particularmente se o processo fisiopatológico incluir coagulação microvascular, como por exemplo, nas complicações obstétricas, acidentes ofídicos e na síndrome hemolítica e urêmica (SANTOS; BOIM; SCHOR, 2003).

As nefrotoxinas representam, depois da isquemia, a causa mais frequente de IRA. Os antibióticos aminoglicosídeos, os contrastes urográficos e os quimioterápicos, como, por exemplo, a cisplatina, estão entre as drogas que podem causar dano tubular diretamente (SANTOS; BOIM; SCHOR, 2003). Também já foi descrita a ocorrência de IRA como uma das complicações graves dos envenenamentos produzidos por ofídios (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*), abelhas (*Apis mellifera*), aranhas (gênero *Loxosceles*) e largatas urticantes (gênero *Lonomia*) e sua patogênese ainda não está completamente elucidada (SITPRIJA; CHAIYABUTR, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2008).

Acredita-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos, desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (DE SOUZA *et al.*, 2008). Previamente foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, que o veneno de *B. jararacussu* (HAVT; FONTELES; MONTEIRO, 2001), *B. moojeni* (BARBOSA *et al.*, 2002) e *B. erythromelas* (MARTINS *et al.*, 2005) alteram os parâmetros de função renal. Desta forma, a IRA caracteriza-se como uma importante causa de letalidade nos pacientes que sobrevivem à ação inicial da peçonha (BARBOSA *et al.*, 2002).

Em virtude da frequência com que ocorrem, os acidentes ofídicos constituem importante problema nas medicinas veterinária e humana nos países tropicais, por causa de sua elevada incidência, gravidade e das sequelas, exigindo até mesmo notificação obrigatória ao Ministério e às Secretarias Estaduais de Saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Embora a insuficiência renal seja a principal complicação do paciente que sobrevive às ações iniciais da peçonha crotálica, com prevalência descrita em torno de 9 a

31%, picadas de serpentes do gênero *Bothrops* também podem induzi-la. É importante destacar que acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* são cerca de 10 vezes mais frequentes que aqueles envolvendo o gênero *Crotalus*, somando muitas vezes, mais de 90% do número total de casos (PINHO; VIDAL; BURDMANN, 2000).

A prevalência de IRA após acidente botrópico é cerca de 2-10% (BURDMANN; VIERIA; VIDAL, 2003) e são vários os fatores que contribuem para sua maior ou menor ocorrência: idade do paciente, tamanho e espécie da serpente, quantidade de veneno injetada, tempo entre a picada e administração de soro antiofídico (MAROTTA *et al.*, 2006).

1.6 Fisiopatologia da insuficiência renal aguda (IRA) após acidente botrópico

O veneno botrópico, após a sua inoculação, permanece na pele (mais de 50% do volume total), sendo este o primeiro órgão acometido, agindo posteriormente em músculos e rins, não alcançando neste último órgão concentrações maiores do que em músculos. A alta concentração na pele é condizente com os efeitos clínicos causados pelo veneno, incluindo inchaço, dor, pústulas, equimoses e hemorragia, podendo causar necrose local. Outros efeitos do veneno incluem: choque cardiovascular, mioglobínúria, e mais especificamente nos rins, glomerulonefrite, necrose tubular aguda e necrose cortical (FEITOSA *et al.*, 1997).

A fisiopatologia da IRA após envenenamento botrópico ainda não foi totalmente elucidada, entretanto, alguns autores sugerem que a mesma decorre das principais ações coagulante, proteolítica e hemorrágica do veneno botrópico (MARROTA *et al.*, 2006). Segundo Burdman, Vieira e Vidal (2003) as lesões renais também podem ser atribuídas à nefrotoxicidade direta da peçonha, miólise, hemólise, hipotensão, coagulação capilar glomerular, ação tóxica vascular e, em alguns casos, à reações de hipersensibilidade à toxina ou até mesmo ao soro antiofídico.

Sabe-se também que a ocorrência da insuficiência renal aguda se dá em processos de envenenamento em que há comprometimento circulatório intenso, bem como o da hemostasia, levando a formação de trombos principalmente pela ação da hemorragina (KAMIGUTI *et al.*, 1991). Ocorre também a participação das miotoxinas e das frações proteolíticas do veneno sobre o rim (BARBOSA *et al.*, 2002; BOER-LIMA *et al.*, 2002).

A lesão mais frequente na análise histologia é a necrose tubular aguda, mas casos de necrose cortical também são descritos, bem como nefrite intersticial aguda, alterações glomerulares, arterite e necrose de papila em menor frequência. A evolução clínica depende

da precocidade do diagnóstico e tratamento com soroterapia, hidratação e diálise (MAROTTA *et al.*, 2006).

O comprometimento renal por acidentes ofídicos, em especial a necrose tubular aguda, tem a patogênese ainda não bem estabelecida. Verifica-se que diversos fatores poderiam contribuir para a instalação de IRA, entretanto, ainda não foi demonstrado um possível efeito tóxico direto da peçonha sobre túbulos renais, nem se a soroterapia antiofídica poderia prevenir estes efeitos tóxicos tubulares diretos (CASTRO, 2006).

Amaral *et al.* (1986) estudando as alterações renais provocadas em acidentes humanos com as serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* descreveram a ocorrência de necrose cortical sem, contudo, desvendar sua patogênese. Sabe-se que duas horas após a picada já ocorre deposição glomerular de trombos e necrose tubular aguda. Os autores sugerem então, que a necrose cortical deve ser causada por coagulação intravascular, ação direta de enzimas proteolíticas no endotélio vascular ou por espasmos nos vasos provocados por substâncias vasoativas, o que pode ocasionar o aparecimento de uma síndrome denominada de injúria por isquemia-reperusão renal.

Atualmente, é bem conhecida a relação entre a síndrome de injúria por isquemia-reperusão renal e o desenvolvimento de IRA, sendo esta síndrome apontada como a maior causa desta patologia tanto em rins previamente sadios quanto em rins transplantados (DEVARAJAN *et al.*, 2003). A injúria infligida às células pode desencadear uma variedade de respostas incluindo adaptação, reparação, proliferação e morte celular na forma de apoptose e/ou necrose (HEALY *et al.*, 1998).

A apoptose tem sido implicada como um importante mecanismo patogênico na doença renal (SAVILL; MOONEY; HUGHES, 1996) e é reportada como um processo natural que ocorre tanto durante o desenvolvimento renal fisiológico quanto após lesões renais como aquelas observadas na IRA e na glomerulonefrite crônica.

Araki *et al.* (1993) foram os primeiros a descrever que venenos de serpentes com capacidade de provocar hemorragia induziam apoptose em células vasculares endoteliais sem contudo identificar os componentes ativos destas toxinas. Algum tempo mais tarde, dois grupos independentes (SUHR; KIM, 1996; TORII *et al.*, 1997) descobriram que a fração L-aminoácido oxidase (LAAO), um componente destes venenos, é uma enzima com atividade pró-apoptótica. Vários estudos demonstraram que LAAOs isoladas de veneno de serpentes são capazes de induzir morte celular por diferentes mecanismos, tais como necrose e apoptose, quando incubadas com células em meio de cultura (WEI *et al.*, 2007) ou ainda por depleção da concentração de aminoácidos essenciais do meio de cultivo (ANDE *et al.*, 2006).

1.7 L-Aminoácido oxidase isolada de venenos de serpentes

Ao longo da escala evolutiva, a saliva das serpentes foi sofrendo transformações químicas, adquirindo potencial de neutralizar e digerir suas presas, bem como mecanismo de defesa contra agentes agressores. Qualitativamente, as peçonhas de serpentes são compostas de uma mistura de moléculas de natureza protéica com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A₂, proteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, lectinas, e proteínas ligantes do fator de von Willebrand; peptídios, representados principalmente por potencializadores de bradicinina e desintegrinas; compostos orgânicos de baixo peso molecular como carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos; íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio bem como os inibidores enzimáticos (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Embora possa sofrer variação quantitativa quando comparadas às espécies, o veneno de serpentes é composto majoritariamente de proteínas, as quais perfazem cerca de 90% a 95% do peso seco das peçonhas (DALMORA; VACCARI; PEREIRA, 1992; CHAVES, 2008). As proteínas tóxicas presentes na peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais e funcionais em metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, etc; podendo agir tanto de forma isolada como sinérgica quando inoculadas no organismo de suas vítimas (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As LAAOs são enzimas que despertam grande interesse, atualmente, na área científica, por apresentarem um alto potencial de degradação sobre diversos patógenos, várias linhagens de celulares, fungos, vírus, dentre outros efeitos. Esta versátil classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos, como nas peçonhas de serpentes, insetos, fungos (DU; CLEMETSON, 2002), bactérias (IZIDORO *et al.*, 2006) e até mesmo plantas, onde um de seus produtos de catálise, a amônia, é utilizada como fonte de nitrogênio, essencial no desenvolvimento da mesma (NISHIZAWA; SHERMAN, 2005).

Até a década de 90 pouco se conhecia sobre a enzima LAAO e os estudos publicados sobre a mesma reportavam somente às suas propriedades enzimáticas e fisicoquímicas, tais como mecanismo de reação e inativação após alterações no pH ou após congelamento e descongelamento da mesma (DU; CLEMETSON, 2002). Atualmente, sabe-se que esta enzima é largamente encontrada em vários organismos e que venenos de serpentes são fontes abundantes da mesma. Em algumas espécies, a LAAO pode representar até mais de

30% do total de proteínas presente no veneno (ZELER, 1977; PONNUDARI; CHUNG; TAN, 1994).

As LAAOs pertencem à classe das oxidorreduções e catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L- aminoácidos. Durante sua meia reação de redução, o substrato aminoácido é oxidado até iminoácido, com uma concomitante redução do cofator flavina (Flavina Adenina Dinucleotídeo, FAD). O iminoácido sofre, em seguida, uma hidrólise não enzimática originando α -cetoácido e amônia. Uma outra meia reação oxidativa completa o ciclo catalítico reoxidando o FADH_2 com oxigênio molecular, gerando assim o peróxido de hidrogênio (MOUSTAFA *et al.*, 2006), conforme esquema descrito na Figura 5.

As LAAOs apresentam especificidade catalítica preferencial por L- aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos como L-fenilalanina, L-triptofano, L- tirosina e L-leucina, enquanto sua afinidade pelos polares e básicos é bem mais reduzida. São consideradas flavoenzimas, por apresentarem como grupo prostético a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou flavina mononucleotídeo (FMN) (IWANAGA;SUZUKI, 1979; BUTZKE *et al.*, 2005). Este cofator encontra-se mergulhado profundamente dentro da enzima (Figura 6) através de interações fortes com os átomos da proteína e moléculas de água conservadas unidas por pontes de hidrogênio (PAWELEK *et al.*, 2000). A coloração amarela das peçonhas viperídeas está relacionada com a presença de riboflavina que faz parte do grupo prostético (FAD ou FMN) das LAAOs, o que facilita sua purificação (TAKATSUKA *et al.*, 2001; MANRIQUE, 2005).

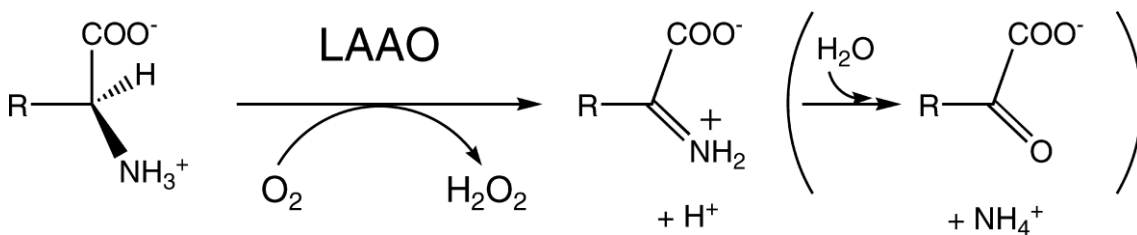


Figura 5 – Desidrogenação de L-aminoácidos catalisada pela LAAO. Os produtos desta reação, os α -iminoácidos, hidrolizam espontaneamente a α -cetoácido e amônia. Os equivalentes reduzidos derivados da desidrogenação são transferidos para o co-fator FAD, o qual é prontamente oxidado pelo oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio.

Fonte: ANDE *et al.* (2006).

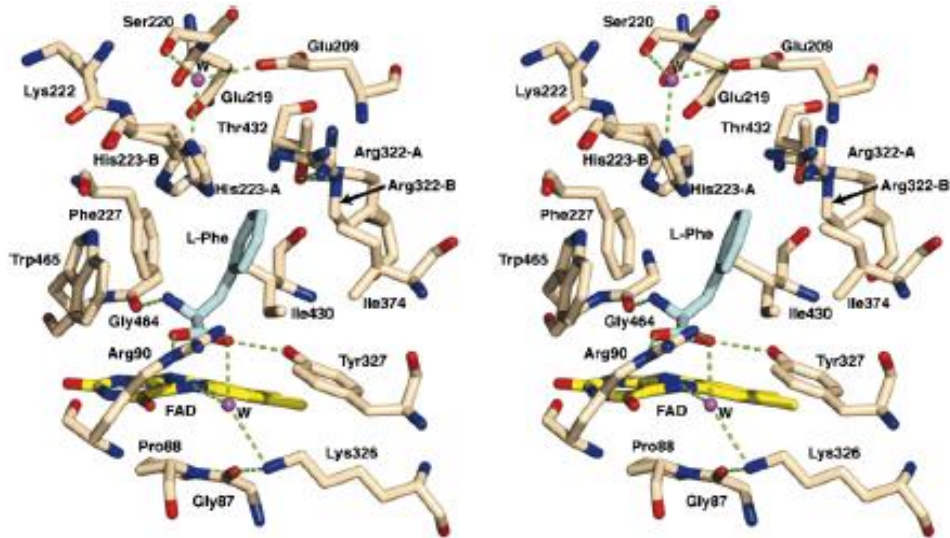


Figura 6 – Estéreovisão do sítio catalítico mostrando uma interação entre LAAO e L- fenilalanina. As conformações alternativas de His223 e Arg322 são designadas como A e B. Pontes de hidrogênio estão sendo mostradas em linhas tracejadas. O substrato é mostrado em ligações cinzentas, FAD em azul e amarelo. Moléculas de água em esferas na cor magenta e simbolizadas como W. Fonte: MOUSTAFA *et al.* (2006).

A compreensão da contribuição destas enzimas para a toxicidade do veneno começou a ser revelado quando foi demonstrado que as LAAOs isoladas dos venenos das serpentes *Crotalus adamanteus* e *Crotalus atrox* podem ligar-se especificamente a células endoteliais de mamíferos (CURTI; MASSEY; ZMUDKA, 1968; TORII *et al.*, 2000). Ademais, estudos envolvendo LAAOs isoladas do veneno de serpentes têm revelado efeitos biológicos capazes de prejudicar e induzir a agregação plaquetária bem como, apoptose de células vasculares endoteliais, eventos que contribuem para o sangramento profuso dos vasos lesados após o acidente ofídico (MACHEROUX *et al.*, 2001; DU; CLEMETSON, 2002).

Recentemente diversas LAAOs têm sido purificadas e caracterizadas. A análise das mesmas tem revelado diferenças entre seu peso molecular, substrato de ação, interação plaquetária, indução de hemorragia, apoptose e outras características (TEMPONE *et al.*, 2000; ALI *et al.*, 2000). Apesar destas diferenças, alguns autores afirmam que o mecanismo geral de toxicidade destas enzimas está baseado na geração de quantidades citotóxicas de H_2O_2 (TORII; NAITO; TSURUO, 1997).

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

desintegração do nucléolo e redução do volume da célula, as bioquímicas, seria a produção de enzimas oxidantes, já as moleculares, a degeneração do material genético (SOUZA *et al.*, 1999). A fragmentação do DNA nuclear durante o processo de apoptose também é bastante evidenciada (SOUZA *et al.*, 1999; TORRI *et al.*, 2000; ALI *et al.*, 2000; IJIMA *et al.*, 2003; KANZAWA *et al.* 2004; IZIDORO *et al.*, 2006), enquanto o consumo de aminoácidos do meio aconteceria devido à oxidação dos mesmos. Butzke *et al.* (2005), ao incubarem uma LAAO purificada de *Aplysia punctata* com células Jurkat T em meio de cultura sem substratos para a formação de peróxido de hidrogênio, observaram ausência de citotoxicidade, portanto, estes autores acreditam que a perda da atividade citotóxica esteja relacionada com a ausência de peróxido de hidrogênio, já que as condições eram desfavoráveis para seu surgimento.

Tempone *et al.* (2001) demonstraram que o peróxido de hidrogênio foi um forte indutor de apoptose na forma promastigota de *Leishmania* ssp. O efeito leishmanicida observado pelas LAAOs purificadas de peçonhas de serpentes teria sido provocado, portanto, por um estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio nas células infectadas, gerando uma atividade proteolítica nas mesmas. Posteriormente a função mitocondrial destas células estaria comprometida devido a um influxo de cálcio ativando outras enzimas, como óxido nítrico sintetase, fosfolipases; culminando com um aumento na produção de radicais livres e uma conseqüente destruição do material genético levando a célula a entrar em apoptose. Neste caso, células submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio podem ativar proteínas do choque térmico e iniciar uma desorganização da membrana e/ou citoplasma celular, fragmentação do DNA, apoptose e, por conseguinte, morte celular (IZIDORO *et al.*, 2006; IZIDORO, 2007).

Por sua vez, Suhr e Kim (1996) demonstraram o efeito citotóxico da LAAO sobre diferentes linhagens celulares (Tabela 1). Portanto, nos últimos anos a apoptose induzida pela LAAO tornou-se um assunto de grande interesse entre os pesquisadores (SUHR; KIM, 1996; TORII *et al.*, 1997; ABE *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1999; SUHR; KIM, 1999; SUN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; SAMEL *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Efeito citotóxico da L-aminoácido oxidase sobre diversas linhagens celulares

Linhagem Celular	% de Viabilidade
L1210 (células murinas de leucemia linfoblástica aguda)	8.9
MOLT-4 (células de leucemia linfoblástica aguda humana)	23.9
HL 60 (células de leucemia mielóide aguda)	43.1
RPMI 1788 (linfócitos humanos)	40.7
Splenocyte (esplenócitos murinos)	65.8
HeLa (células epiteliais de carcinoma de colo de útero humano)	93.1

Fonte: SUHR; KIM (1996).

1.8 Apoptose

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação constante entre as diversas células que constituem seus tecidos e órgãos. Durante o desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, um processo através do qual ocorre a formação dos diversos órgãos e sistemas que compõem os seres vivos (MEIER; FINCH; EVAN, 2000).

Por muitos anos, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorria em situações onde havia lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Nestas situações, como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas (YU; CHOI, 2000), um processo que passou a ser denominado de necrose.

A necrose representa uma forma acidental de morte celular cujas principais características morfológicas são aumento do volume celular, agregação de cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática lise celular precoce consequente ruptura celular (Figura 7) com consequente liberação do conteúdo citoplasmático causando dano às células vizinhas além de uma reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), ou seja, nesta condição um grande número de células são lesadas ao mesmo tempo, e devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Entretanto, embora considerada uma resposta passiva à injúria celular, estudos recentes já sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006).

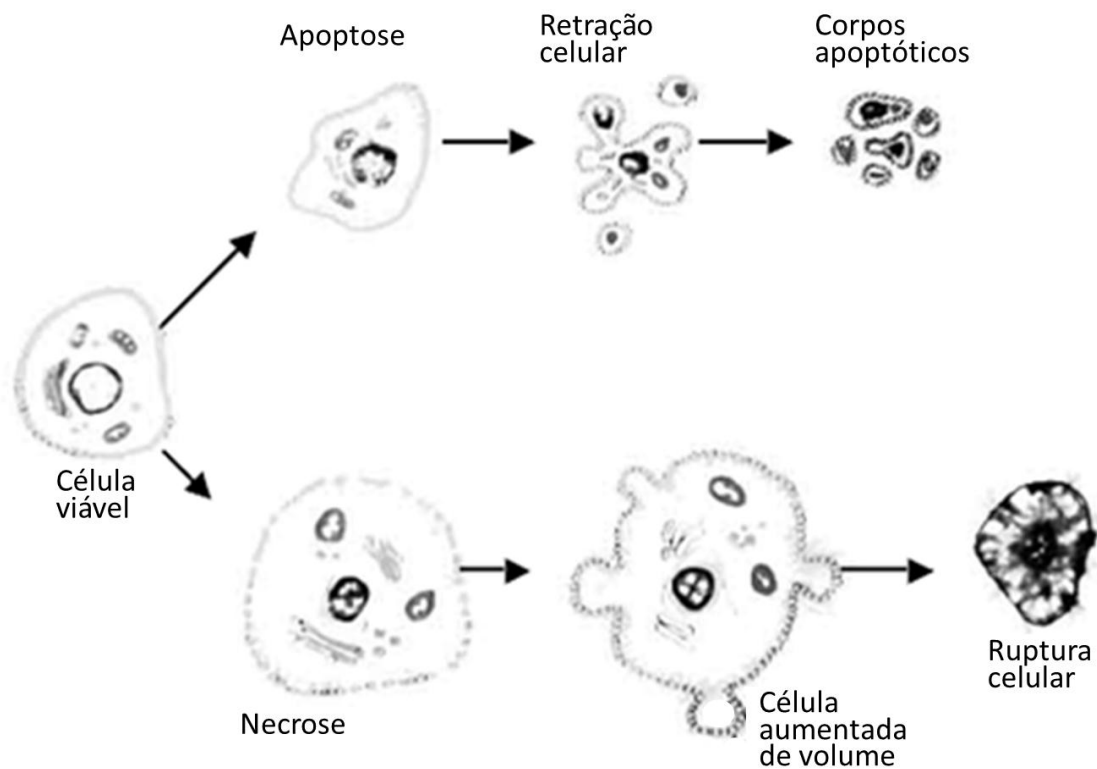


Figura 7 – Características morfológicas da apoptose e da necrose. O processo de morte celular por apoptose culmina na formação dos corpos apoptóticos, e na fase final da morte celular induzida por necrose há a perda da integridade celular.

Fonte: GRIVICICH, REGNER e ROCHA (2007).

Atualmente, sabe-se que organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A apoptose foi reconhecida morfológicamente há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Durrie (1972) sendo denominada, atualmente, como um tipo de morte celular programada que ocorre individualmente e, portanto, sem causar danos às células vizinhas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual regulado por proteínas que são expressadas pelas próprias células durante o processo de injúria (ANAZETTI; MELO, 2007).

Em outras palavras, a apoptose é um mecanismo rigidamente controlado pela expressão de genes decorrente da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfológicamente por condensação, fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (Figuras 7 e 8). Estes prolongamentos da membrana celular aumentam de tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular que são chamadas de corpos apoptóticos (ISRAELS; ISRAELS, 1999). A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como o colapso endometrial durante a

menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese, a maturação e manutenção do sistema renal dentre outros (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

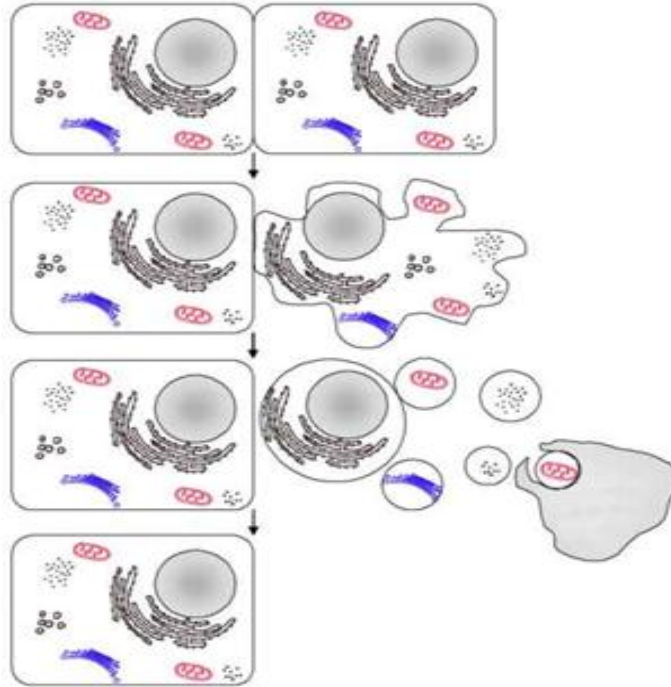


Figura 8 – Etapas do processo de morte celular por apoptose: condensação, fragmentação e liberação dos corpos apoptóticos.

Fonte: <http://www.artigosobre.com/Apoptose>.

A ativação da morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 9). A primeira é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o fator de necrose tumoral (TNF) e o Fas (membro da família dos receptores de TNF) os mais conhecidos. A via intrínseca depende da participação da mitocôndria, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF), ATP e proteínas de choque térmico. Como resultado final de ambas as vias ocorre a ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (FISHER, 2001; GESKE; GERSCHENSON, 2001; LORO; VINTERMYR; JOHANNESSEN, 2003).

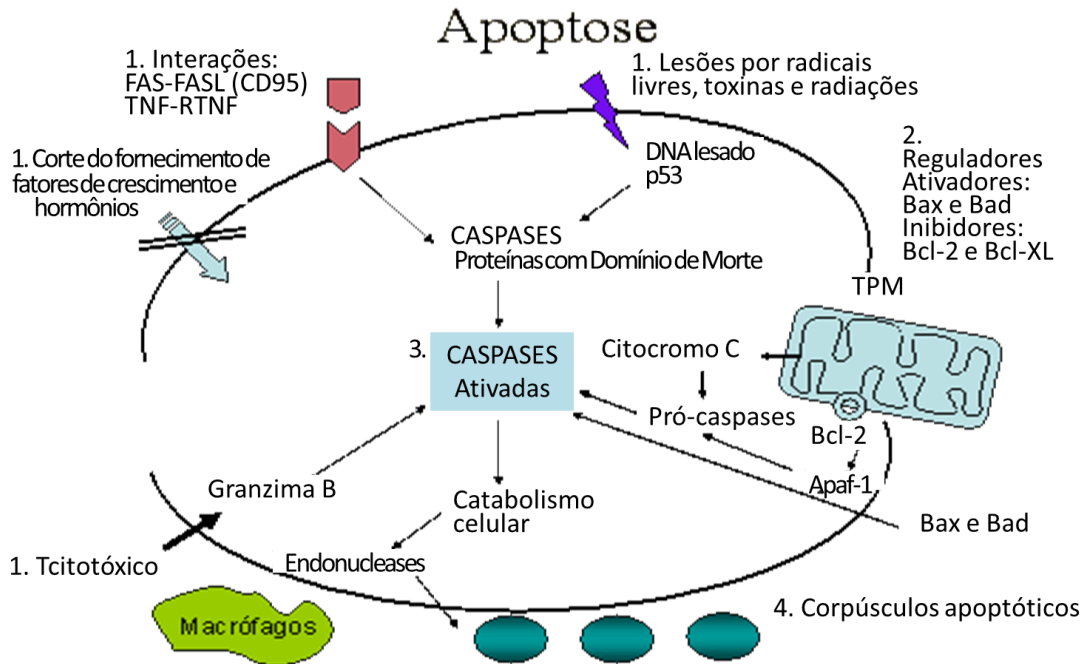


Figura 9 – Vias de sinalização da apoptose. Na via extrínseca há ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática. A via intrínseca é mediada pela participação da mitocôndria. TPM: transição da permeabilidade mitocondrial.

Fonte: http://www.sistemanevoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=202&materiaver=1#.

Diversos genes estão envolvidos no controle da apoptose, alguns desempenham funções anti-apoptóticas como o gene *TBcl-2*, *TMcl-1* e *TAI*. Outros, como o *tbx*, o *TBak* e o *TBad*, agem como promotores da morte celular programada. O gene *TBcl-x*, sintetiza dois produtos, as proteínas *bcl-X_S* e *bcl-X_L* que funcionam como indutora e inibidora da apoptose, respectivamente. O gene supressor de tumor, o *TP53*, encontra-se implicado na interrupção do ciclo celular e indução de apoptose nas células com danos irreversíveis no DNA, sendo um regulador positivo da expressão da proteína *bax* e negativo da proteína *bcl-2* (HALE; SMITH; SUTHERLAND, 1996).

Durante o desenvolvimento, a maturação renal é devida a um aumento da proliferação de células epiteliais tubulares e glomerulares. Em seguida, há um aumento fisiológico no tamanho destas células. Assim, a homeostasia renal é preservada, na ausência de condições adversas, a expensas de um equilíbrio no número de células mantido pelo contínuo balanço entre a proliferação de novas células e sua morte por apoptose. Há pouca alteração no arcabouço celular renal sob condições fisiológicas, entretanto, alterações no número ou no tamanho de células podem ocorrer de várias formas após injúria renal. Um decréscimo no número de células tubulares epiteliais é visto inicialmente associado com aumento de marcadores pró-apoptóticos após obstrução ureteral e necrose tubular aguda (SHANKLAND; WOLF, 2000).

Em tecido renal normal existe a presença de raríssimas células positivas para o Fas e para a proteína Bcl-2. Contudo, em pacientes com doenças glomerulares foram identificadas células positivas para o Fas tanto no mesângio quanto ao longo dos capilares glomerulares. Assim, dados experimentais existentes até o momento são altamente sugestivos de que a apoptose mediada pelo sistema Fas é responsável pela perda deletéria de células glomerulares na evolução dessas afecções (BONINI; MOURA; FRANCO, 2000). Em relação à proteína Bcl-2, durante o desenvolvimento renal normal, sua expressão no condensado de néfrons é essencialmente necessária para evitar altos níveis de apoptose e está relacionada com a formação estrutural da morfogênese tubular e do metanéfron (LIN *et al.*, 1999).

Os epitélios desempenham um papel crucial como barreira de difusão delimitando dois compartimentos de composições químicas distintas, permitindo o transporte transepitelial de nutrientes, eletrólitos e água entre os compartimentos (MADARA, 1990). Células tubulares renais são células epiteliais morfologicamente e funcionalmente especializadas para transporte de íons, água e macromoléculas através da membrana celular. A reabsorção e secreção das várias moléculas por meio destas células são processos seletivos e dependentes de energia, portanto, estes processos são prejudicados quando há lesão renal como, por exemplo, na injúria isquêmica.

Foi demonstrado que as células epiteliais dos túbulos proximais renais são um alvo para a morte celular apoptótica em decorrência de isquemia ou injúria tóxica (LIEBERTHAL; TRIACA; LEVINE, 1996; HAGAR; UEDA; SHAH, 1996a; HAGAR; UEDA; SHAH, 1996b) e, na verdade, a apoptose foi descrita como tendo um papel crucial no crescimento e diferenciação das células tubulares proximais renais em cultura primária (TANG; CHENG; LIN, 1996). Portanto, qualquer tipo de injúria celular pode desencadear uma variedade de respostas de adaptação, reparação, proliferação ou morte celular por necrose e/ou apoptose no tecido epitelial renal culminando no desenvolvimento de injúria renal.

Pesquisas experimentais com cultura de células evidenciaram que a exposição destas a um agente tóxico, como um pró-oxidante, por exemplo, pode desencadear morte celular das mesmas por necrose ou apoptose, a depender da dose e do tempo de exposição ao agente indutor (DYPBUKT, *et al.*, 1994; BONFOCO *et al.*, 1995). De acordo com ANDE *et al.* (2006), sendo as LAAOs isoladas de veneno de serpentes potentes citotoxinas, quando incubadas com células em cultura, agem primariamente pela produção de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio promovendo, portanto, morte celular por necrose. Contudo, estas enzimas mantêm sua citotoxicidade mesmo na presença de antioxidantes e, neste caso, a

morte celular se dá por apoptose. Vários trabalhos já foram publicados reportando-se à capacidade da LAAO em induzir apoptose em várias linhagens celulares (Quadro 2).

Quadro 2 – Comparação de frações L-Aminoácido Oxidase Isoladas de Venenos de Serpentes.

Espécies	Indução de Apoptose	Outros Efeitos	Referências
<i>Phragmites australis</i>	Não determinada	Atividade antibacteriana	STILES <i>et al.</i> (1991)
<i>Ophiophagus hannah</i>	Não determinada	Induz agregação plaquetária, citotoxicidade	LI <i>et al.</i> (1994), AHN <i>et al.</i> (1997).
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Sim	Induz hemólise	ABE <i>et al.</i> (1998).
<i>Agkistrodon Controtix laticinctus</i>	Sim	Induz hemorragia	SOUZA <i>et al.</i> , 1999.
<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	Sim	Inibe agregação plaquetária	SUHR, KIM (1996), e TAKATSUKA <i>et al.</i> (2001).
<i>Bothrops moojeni</i>	Não determinada	Atividade antileishmanicida	TEMPONE <i>et al.</i> (2001).
<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Sim	Potencial atividade anti-HIV	ZHANG <i>et al.</i> , 2003.
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Sim	Necrose	ANDE <i>et al.</i> , 2006.
<i>Vipera berus berus</i>	Sim	Inibe agregação plaquetária	SAMEL <i>et al.</i> , 2006.
<i>Agkistrodon acutus</i>	Sim	Citotoxicidade	ZHANG, CUI, 2007.

Portanto, parece claro que a LAAO presente no veneno de serpentes é o componente responsável pela indução de morte celular por necrose e/ou apoptose e a extensão deste efeito é variável de acordo com o tipo linhagem celular estudada (SUHR; KIM, 1996).

2 JUSTIFICATIVA

Desde que Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949) descobriram a bradicinina utilizando o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, toxinas animais têm sido largamente utilizados na medicina como ferramentas farmacológicas ou para diagnóstico e também como modelos no estudo de diversos processos de biologia celular e molecular (SAMEL *et al.*, 2006). Em virtude disso, a toxinologia, ciência que se dedica ao estudo de toxinas, está em contínua expansão no Brasil e no mundo.

Dentre os animais venenosos e peçonhentos, uma das classes mais estudadas é a *Reptilia*, mais especificamente a subordem das *Serpentes*. Uma vez que a função do veneno produzido por estes animais vai além de sua ação digestiva, servindo também como mecanismo de defesa contra predadores, essa substância exerce seus efeitos em quase todas as células e tecidos assumindo caráter letal em muitos casos.

Os venenos de serpentes correspondem a um complexo conjunto de enzimas e polipeptídios biologicamente ativos (ROODT *et al.*, 2000). A composição dos mesmos apresenta características particulares tanto na intensidade como nos tipos de ações, para cada espécie de serpente (FURTADO; COLLETO; DIAS DA SILVA, 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992). A peçonha das serpentes botrópicas possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, além de efeito sobre a função renal (KAMIGUTI *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, um representante da classe das oxidorreduções, a L-aminoácido oxidase, tem tornado-se um atrativo objeto de estudos da enzimologia, biologia molecular e farmacologia. Tendo em vista que a LAEO constitui grande parte da composição total do veneno de serpentes, em algumas serpentes chegando a constituir mais de 30% do total de proteínas do veneno, esta enzima tem tornado-se assunto de grande interesse de diversos estudos farmacológicos e de biologia molecular. Suas propriedades como indução de apoptose, citotoxicidade, hemólise, agregação plaquetária, indução de hemorragia ou edema e, atividades antibacteriana e antiparasitária têm sido alvo de pesquisas em todo o mundo (STÁBELI *et al.*, 2007).

Entretanto, apesar de décadas de estudos, o mecanismo preciso de ação da LAEO e seu papel no envenenamento ainda não foram bem esclarecidos. Pouco foi estudado sobre a LAEO da serpente *Bothrops marajoensis*, entretanto, sabe-se que LAEOs de diferentes fontes exibem diferenças na especificidade, estabilidade e em outras diversas atividades biológicas como citotoxicidade, hemorragia, hemólise e atividade antibactericida e antiparasitária.

Muitos estudos visam descobrir a ação de toxinas animais, bem como, o mecanismo pelos quais estas causam seus efeitos locais e sistêmicos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos busca, na biodiversidade, ferramentas farmacológicas e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos (PEIXOTO, 2003). Com isso, é cada vez maior a procura por moléculas ativas que possam atuar mimetizando hormônios, ou ainda, com uso potencial nos diversos sistemas biológicos (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

Tendo em vista que a Insuficiência Renal Aguda (IRA) é uma complicação grave dos envenenamentos produzidos por ofídios (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*), abelhas (múltiplas picadas), aranhas (gênero *Loxosceles*) e lagartas urticantes (gênero *Lonomia*) e diante da importância clínica desta patologia, esta dissertação se propõe a estudar os efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* no modelo de perfusão de rim isolado, bem como sobre a linhagem de células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

✚ Avaliar os efeitos renais da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*.

3.2 Objetivos específicos

✚ Estudar os efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* no sistema de perfusão de rim isolado;

✚ Analisar as alterações histopatológicas no rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*;

✚ Determinar a ação da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a viabilidade e proliferação de células MDCK;

✚ Avaliar o possível mecanismo pró ou antiapoptótico promovido pela fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre células MDCK.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET), Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), ambos da Faculdade de Medicina; e no Laboratório de Cultivo Celular (LCC), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos em ambiente climatizado entre $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec[®]) e água “*ad libitum*”. Cerca de 8 a 12 horas antes dos experimentos de perfusão renal, os mesmos foram mantidos em jejum, recebendo apenas água “*ad libitum*”.

4.2 Células MDCK

As células MDCK foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra. Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo - USP).

4.3 Purificação da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*

A fração L-aminoácido oxidase da serpente *Bothrops marajoensis* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente.

Sua purificação foi realizada por meio de técnicas cromatográficas, em três fases. Inicialmente, o veneno total da serpente *Bothrops marajoensis* foi fracionado através de HPLC (Protein Pack SP 5PW Waters) de acordo com protocolo descrito por TOYAMA *et al.* (2001) e BONFIM *et al.* (2001). Aproximadamente 5 mg do veneno total foi dissolvido em 250µL de bicarbonato de amônia (50 mM), pH 7,8 (Tampão A1), homogeneizado, centrifugado a 4500g por 5 minutos, e aplicado na coluna de troca iônica catiônica (Protein Pack SP 5PW, Waters). O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com tampão A1 por 30 minutos antes da injeção da amostra. A eluição da fração do veneno foi conduzida usando tampão B1 (1 M de bicarbonato de amônia, pH 7,9). O sistema foi ligado em um fluxo constante de 1,0 mL/min e o perfil cromatográfico foi determinado através da leitura da absorbância a 280nm. A atividade da LAAOBM foi então analisada pelo ensaio em microplaca.

Na segunda fase, a fração de LAAOBM obtida, foi submetida a uma segunda cromatografia usando a coluna Protein Pack DEAE 5PW (Waters). A maior quantidade de LAAOBM obtida (10mg) foi dissolvida em 400 mL de tampão bicarbonato de amônia (0,05M), pH 7,8. A amostra obtida na primeira fase da cromatografia foi submetida a uma centrifugação de alta-rotação e o sobrenadante aplicado à coluna protéica, previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas foram eluídas em um fluxo constante de 1,0 mL/min, usando um gradiente linear (0,05-1,0 M) de bicarbonato de amônia e o perfil de eluição da amostra foi monitorado a 280nm. As frações contendo LAAOBM foram misturadas e estocadas a -20 °C.

Na última fase, a maior quantidade de LAAOBM purificada da segunda fase, foi dissolvida em 400 mL de bicarbonato de amônia (0,3 M), pH 7,9, foi submetida a ultracentrifugação de 4500g por 2 minutos. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de 1 x 30 cm de Superdex 200 (Pharmacia). A principal fração da LAAOBM foi submetida a um processo de dessanilização por meio de ultra-filtração com filtros *millipore* e limite de peso molecular de 30 kDa. A fração concentrada foi recuperada e estocada a -20 °C (Figura 10).

Para a realização dos ensaios foi preparada uma solução stock (1mg/mL) da substância em estudo diluída em tampão fosfato salina (PBS), pH 7.4, estéril.

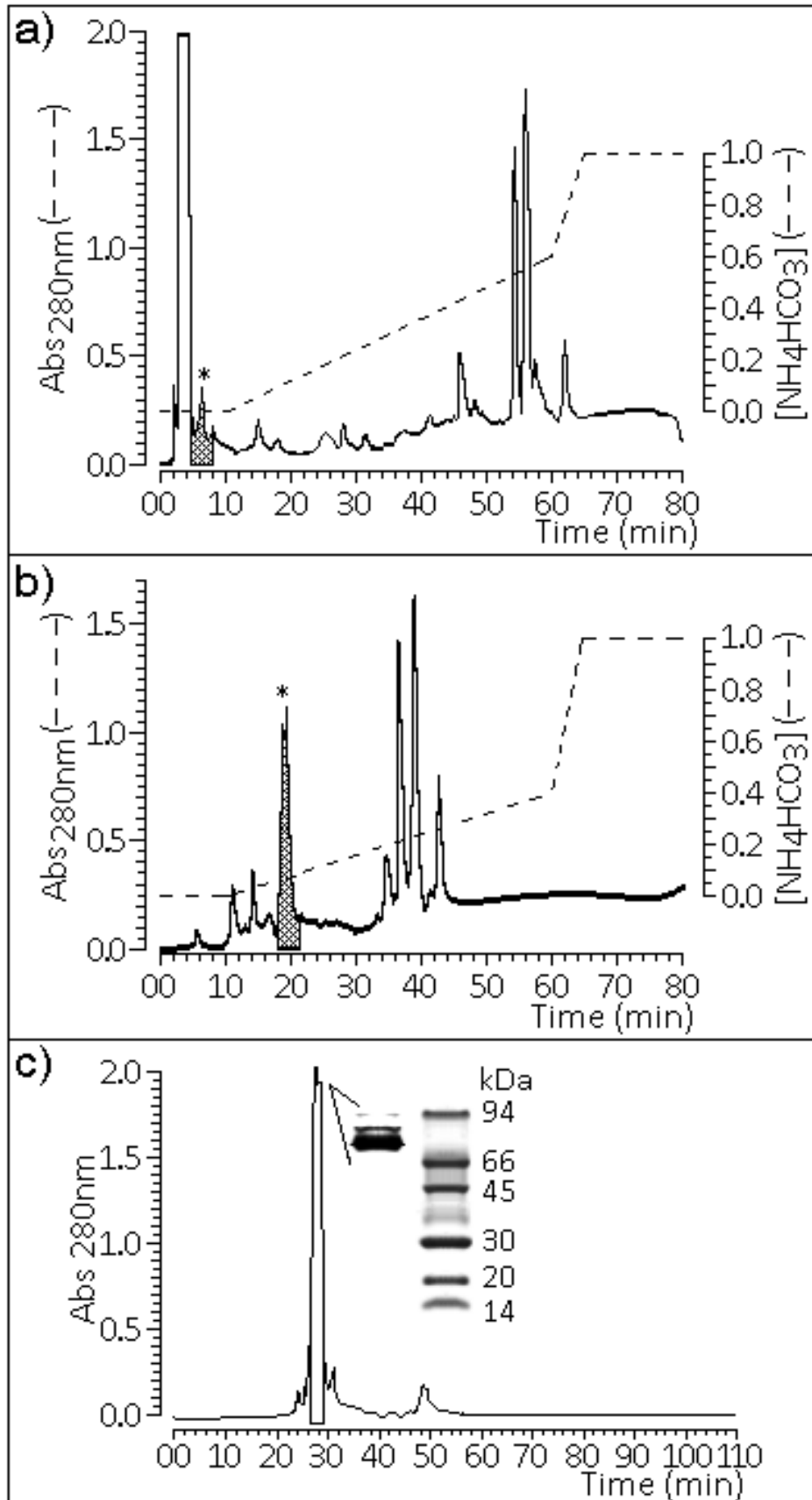


Figura 10 – Esquema de Purificação da LAAOBM. **A:** Fase 1 – cromatografia do veneno bruto aplicado na coluna de troca iônica catiônica (Protein Pack SP 5PW, Waters); **B:** Fase 2 – isolamento da LAAOBM em coluna Protein Pack DEAE 5PW (Waters); **C:** Fase 3 – Determinação do peso molecular da LAAOBM em coluna de 1 x 30 cm de Superdex 200 (Pharmacia).

Quadro 3 – Comparação da sequência N-terminal aminoácido da LAAOBM com outras frações LAAO extraídas de veneno de serpentes obtidas da pesquisa de similaridade BLAST (PubMed, MEDLINE).

Gênero da Serpente	Sequências
LAAO – <i>Bothrops marajoensis</i>	AHDGNPLEECFREDDEEFFLEIAKNGLTATSNPKRVVIV...
LAAO – <i>Bothrops insularis</i>	ADDKNPLEEDFREDDYEFFLEIAKNGLSTTSNPKRVVIVGAG...
LAAO – <i>Bothrops moojeni</i>	ADDRNPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLSTTSNPKRVVIVGAG...
LAAO – <i>Crotalus adamanteus</i>	AHDRNPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLTATSNPKRVVIVGAG...
LAAO – <i>Bothrops neuwiedi</i>	ADDGNPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLSATSNPKHVIVGAG...
LAAO – <i>Agkistrodon piscivorus</i>	ADDRNPLEECFRET DYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAG...
LAAO – <i>Trimeresurus stejnegeri</i>	ADDRNPLEECFRET DYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAG...
LAAO – <i>Bothrops pirajai</i>	ADDKNPLEEFRETNYEVFLEIAKNGLKATSNPKRVVIVGAAG...

Fontes: BRAGA *et al.* (2008); IZIDORO *et al.* (2006).

4.4 Perfusão de rim isolado

4.4.1 Sistema utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. Este sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983; MONTEIRO; FONTELES, 1999) composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*. Esse sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina 6g% na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação (95% O₂/ 5% CO₂) adaptada ao próprio sistema (Figuras 11 e 12).



Figura 11 - Foto do sistema de perfusão de rim isolado.
Fonte: LAFAVET – UFC.

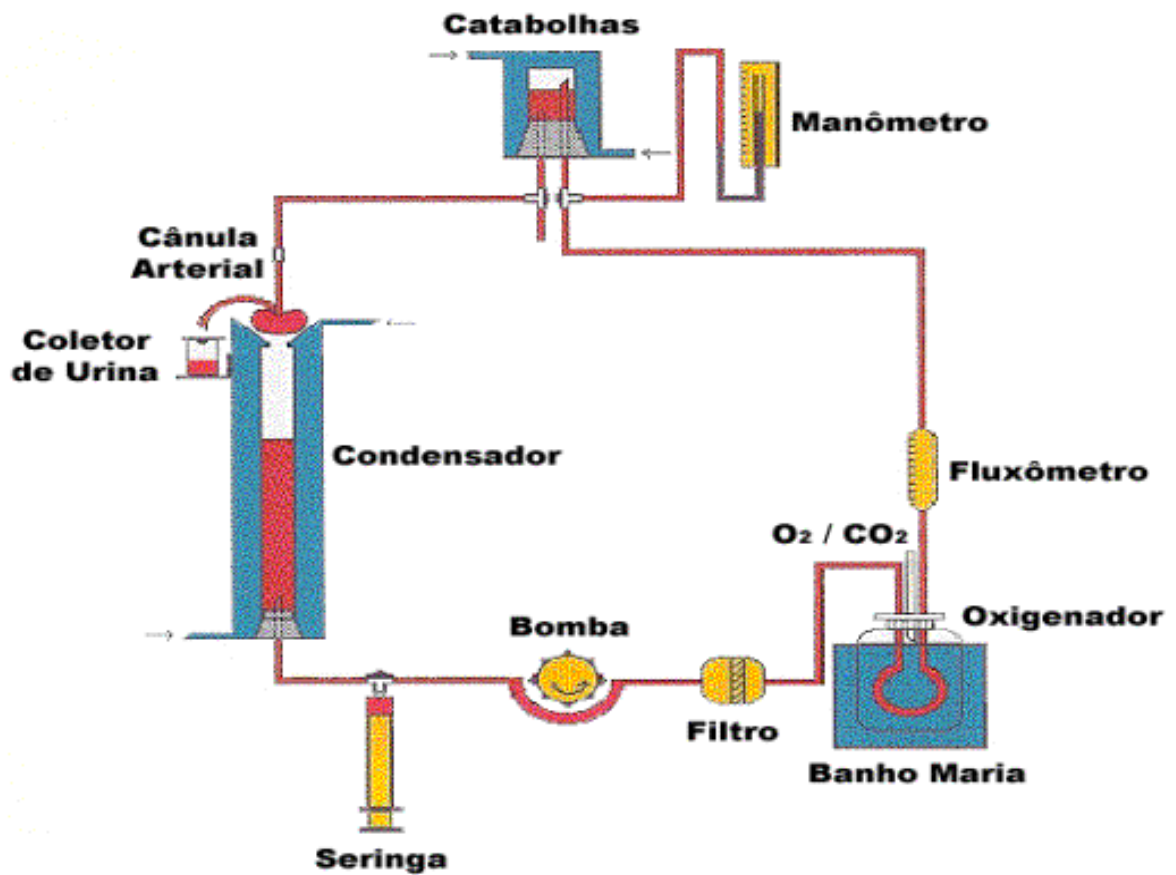


Figura 12 - Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.
Fonte: LAFAVET – UFC.

O sistema utilizado é constituído pelos seguintes componentes:

- **Banho-maria** - para a manutenção da temperatura constante do pulmão tipo silástico entre 36 e 37 °C;
- **Bomba aquecedora com termostato** - para manutenção de uma temperatura constante no sistema entre 36 e 37 °C;
- **Bomba de perfusão de Watson** - bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema;
- **Catabolhas** - evita a entrada de bolhas nos rins;
- **Coletor de urina** – frasco que coleta a urina;
- **Condensador** – reservatório da solução perfusora;
- **Filtro Millipore 5 µm** – filtra a solução perfusora;
- **Fluxômetro** – para mensurar o fluxo de perfusão (mL/hora);
- **Manômetro de mercúrio** – para mensurar a pressão de perfusão (mmHg);
- **Pulmão tipo silástico** – promove as trocas gasosas (95% O₂ e 5%CO₂);
- **Seringa coletora** – seringa coletora de perfusato.

4.4.2 Calibração do sistema

A calibração do sistema foi realizada antes de cada experimento com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foram registrados para cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5) a pressão de perfusão (mmHg), o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um min (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As Figuras 13, 14 e 15 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

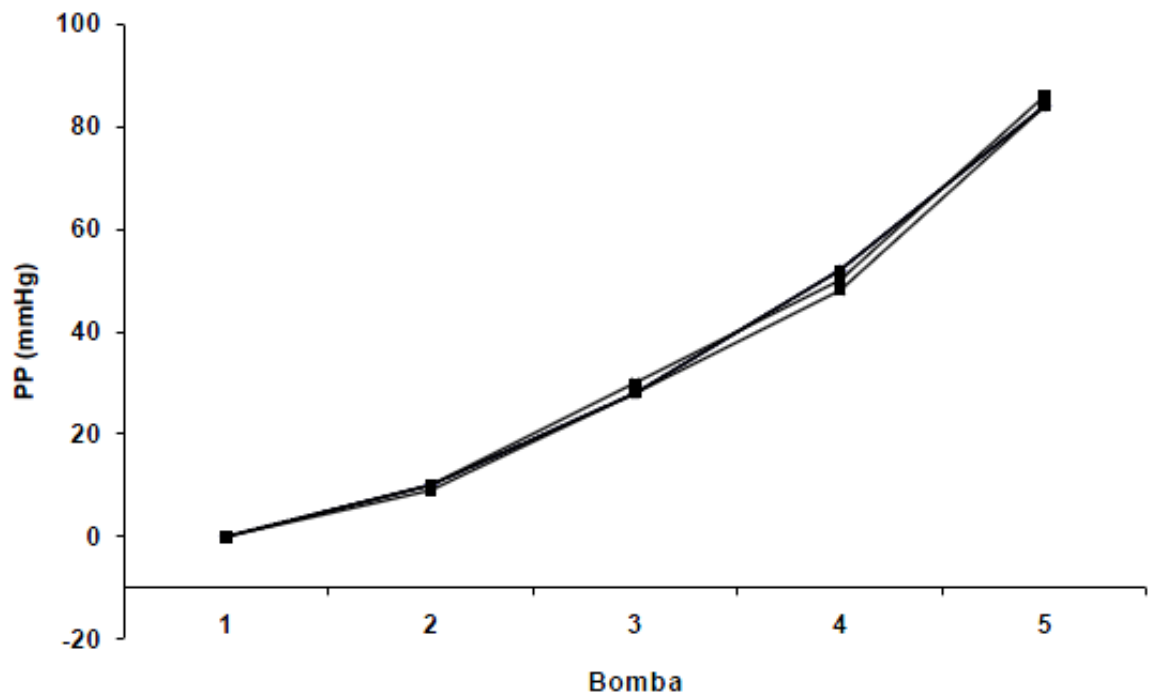


Figura 13 – Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

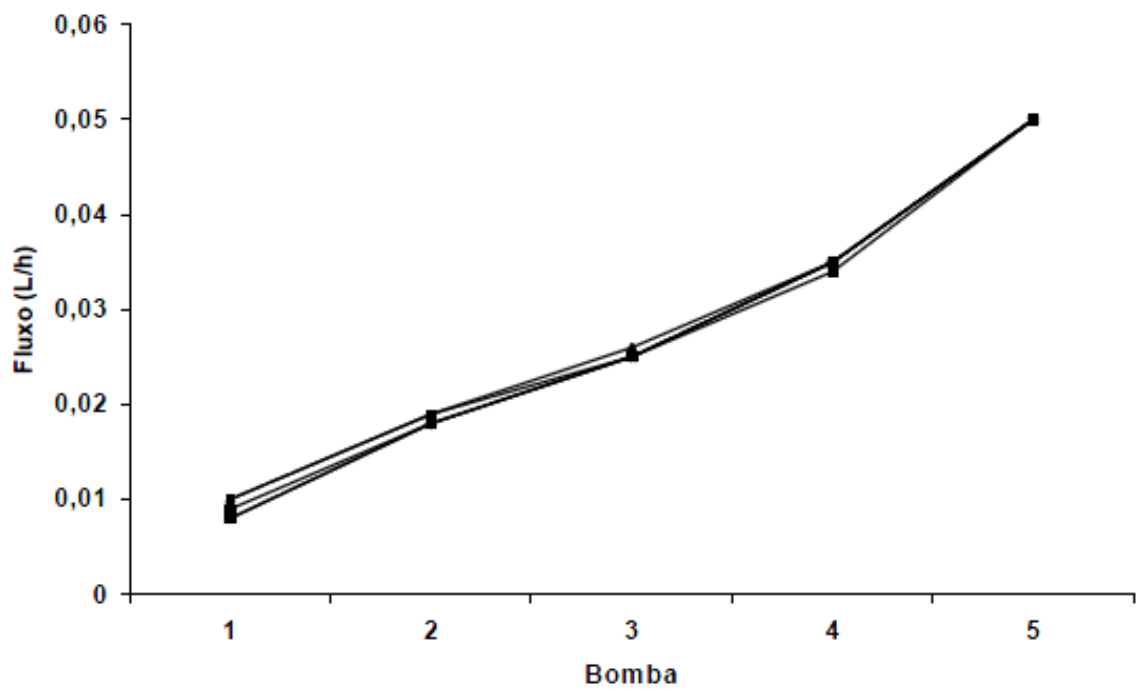


Figura 14 – Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

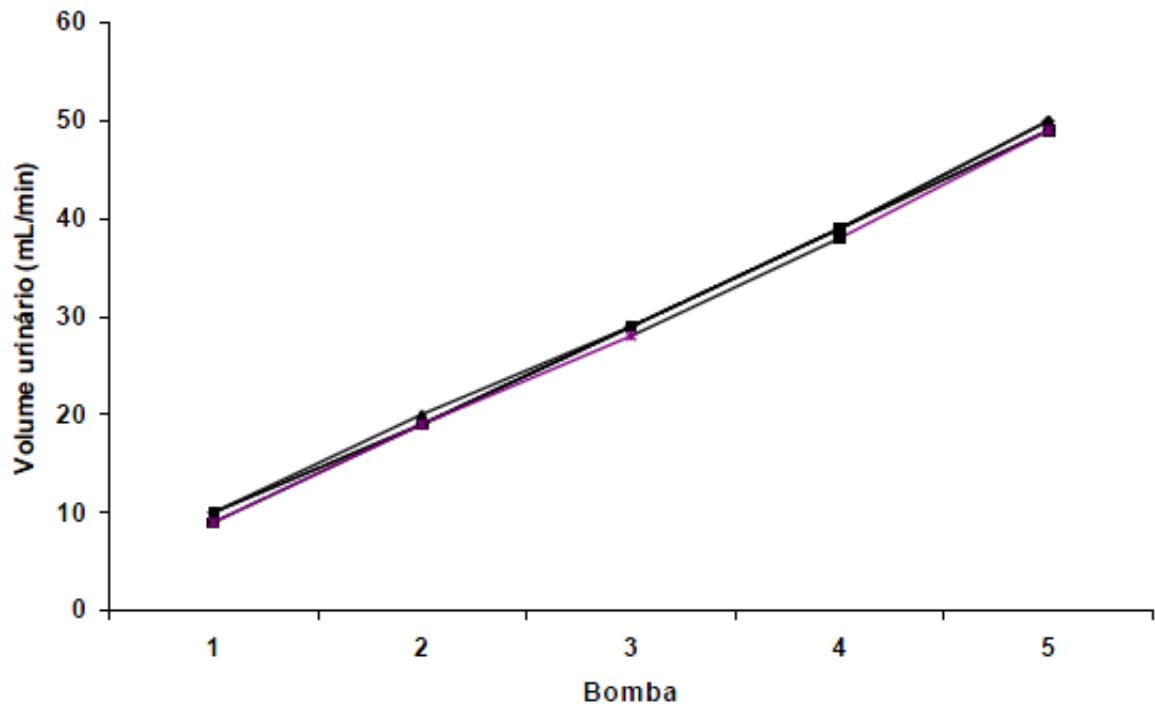


Figura 15 – Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

4.4.3 Solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH₂PO₄.H₂O = 3,2g; MgSO₄.7H₂O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO₃ = 4,2g; CaCl₂.2H₂O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual adicionou-se albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada auxiliada por homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

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

4.4.4 Técnica cirúrgica

As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhnamann, Giebisch e Ochwaldt (1967), Nishiitsutji-Uwo *et al.* (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Os animais (n=4) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL, independentemente do peso; Figura 16a) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Com uma lupa (aumento de 7 x) o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30 (Figura 16b).

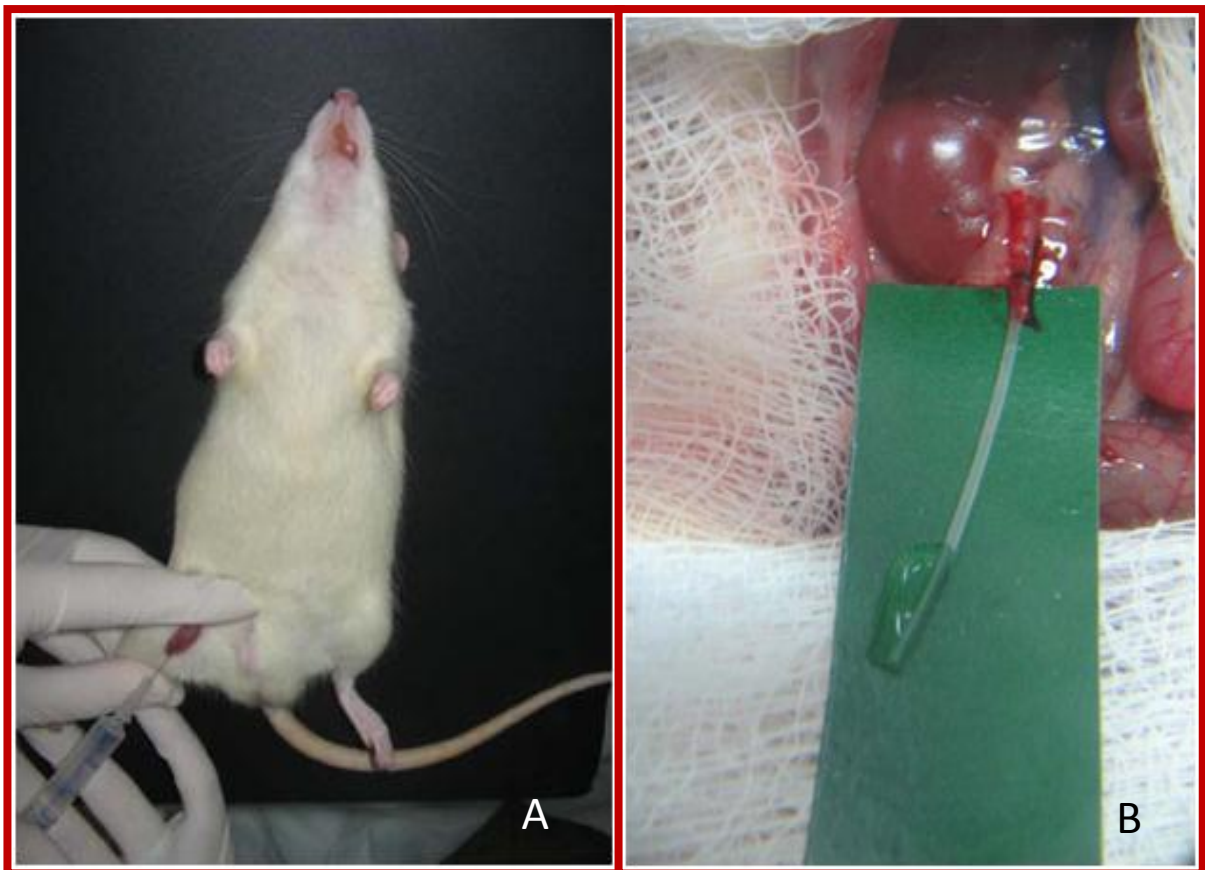


Figura 16 – Etapas iniciais do procedimento cirúrgico para exérese renal. **A:** administração de manitol pela veia femoral no animal anestesiado; **B:** canulação do ureter.

Fonte: LAFAVET – UFC.

A artéria renal foi isolada (Figura 17a) e canulada (Figura 17b) através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*,

evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (Figura 18).

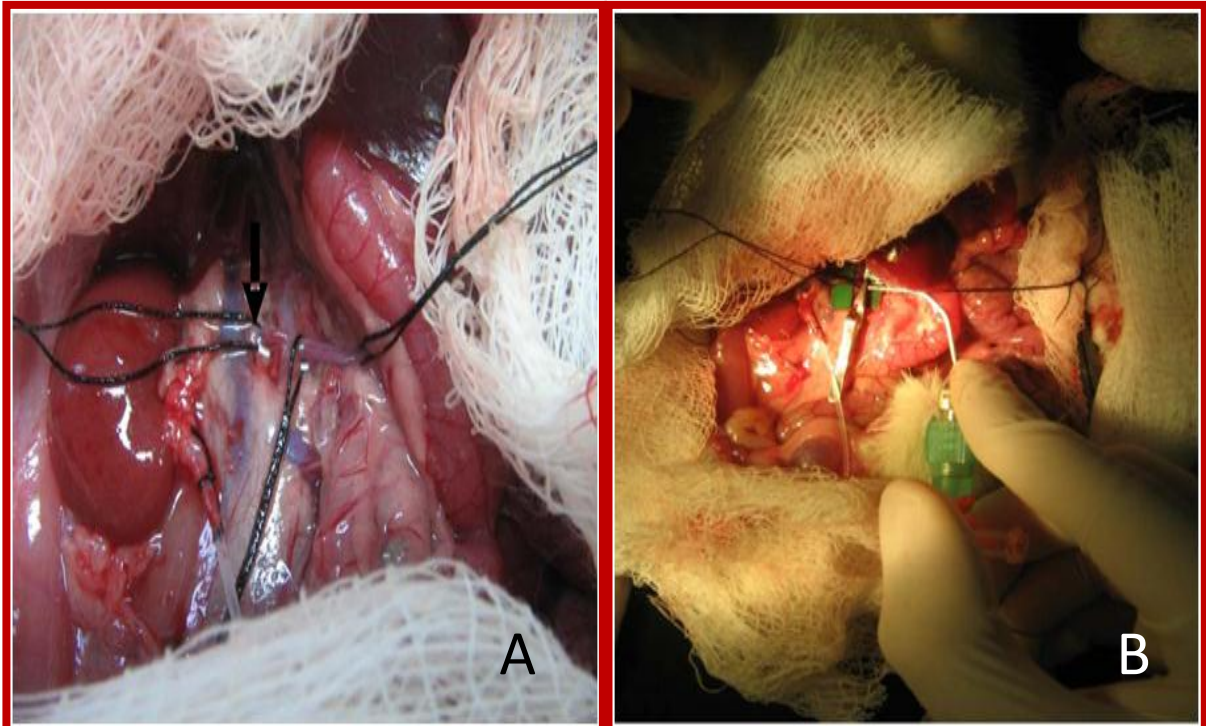


Figura 17 – Etapas finais do procedimento cirúrgico para exérese renal. **A:** visualização da artéria renal; **B:** canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.
Fonte: LAFAVET – UFC.



Figura 18 – Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão.
Fonte: LAFAVET – UFC.

4.4.5 Grupos experimentais

O estudo com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a função renal foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

- Grupo controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (n = 6);
- Grupo tratado com fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* na concentração de 10µg/mL (1mg em 100mL; n = 4).

4.4.6 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 minutos iniciais foram utilizados como controle interno. Após este período, foi adicionada a substância teste ao sistema e, a cada cinco minutos, foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. Amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e determinação da osmolaridade, importantes na delimitação dos seguintes parâmetros de função renal: pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCl⁻).

4.4.7 Análises bioquímicas dos perfusatos e urinas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer[®] diagnostica).

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

4.4.8 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

O Quadro 4 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Quadro 4 – Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula
1. PP (mmHg) – Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
2. FU (mL.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3. RFG (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} / DOP _{in} x FU) sendo DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato.
4. FPR (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
5. RVR (mmHg/mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Resistência vascular renal.	RVR = PP (mmHg) / FPR
6. FNa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio filtrado	FNa⁺ = RFG x PNa ⁺
7. ENa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio excretado	ENa⁺ = FU x UNa ⁺
8. TNa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio transportado	TNa⁺ = FNa ⁺ - ENa ⁺
9. %TNa⁺ – Percentual de sódio transportado	%TNa⁺ = TNa ⁺ x 100/ FNa ⁺
10. FKa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio filtrado	FKa⁺ = RFG x PKa ⁺
11. EK⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio excretado	EK⁺ = FU x UKa ⁺
12. TK⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Potássio transportado	TK⁺ = FK ⁺ - EK ⁺
13. %TK⁺ – Percentual de potássio transportado	%TK⁺ = TK ⁺ x 100/ FK ⁺
14. TCI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto transportado	TCI⁻ = FCI ⁻ - ECI ⁻
15. %TCI⁻ – Percentual de cloreto transportado	%TCI⁻ = TCI ⁻ x 100/ FCI ⁻
16. FCI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto filtrado	FCI⁻ = RFG x PCI ⁻
17. ECI⁻ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Cloreto excretado	ECI⁻ = FU x UCI ⁻
18. Cosm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) – Clearance osmótico	[U _{osm} / Posm] x FU (onde U _{osm} = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)

4.4.9 Análise histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon) em colaboração com o Professor Dr. Dalgimar Beserra de Menezes do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará.

4.5 Ensaaios com cultura de células

4.5.1 Cultivo das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

As células *Madin-Darby canine kidney* (MDCK; Figura 19) são o melhor modelo estabelecido de células renais tubulares distais e, portanto, são amplamente utilizadas em diversos protocolos experimentais (WIEGELE; BRANDIS; ZIMMERHACKL, 1998; FÜLLEKRUG *et al.*, 2006).

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992, Figura 20).

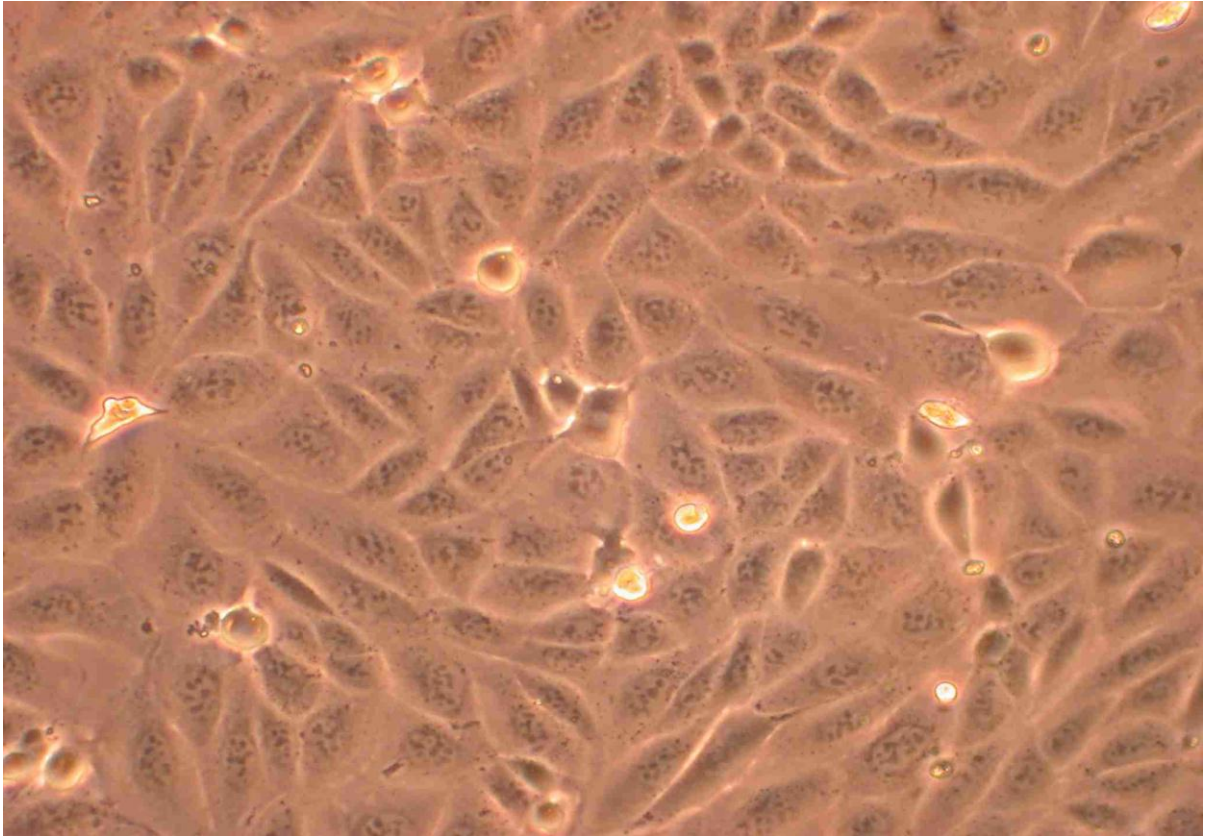


Figura 19 – Microfotografia de células MDCK em cultura (aumento de 400x).
Fonte: Laboratório de Cultivo Celular (LCC - UFC).

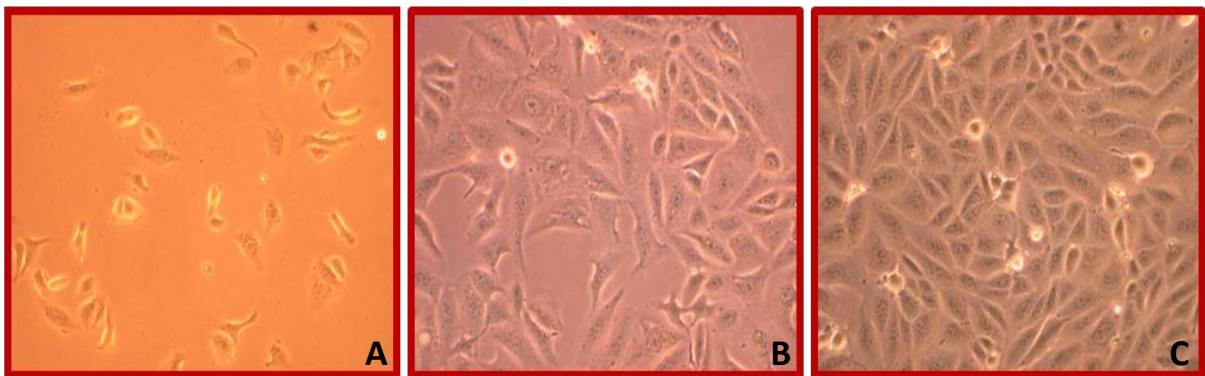


Figura 20 – Microfotografias de células MDCK após **A:** 6 horas, **B:** 36 horas e **C:** 60 horas do cultivo (aumento de 400x).
Fonte: Laboratório de Cultivo Celular (LCC - UFC).

4.5.2 Ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar a porcentagem de células vivas.

Este método baseia-se, portanto, na atividade mitocondrial das células viáveis que são capazes de reduzir o MTT e formar um produto colorido insolúvel em água, o sal de formazan.

A citotoxicidade foi estimada também, por curva de interpolação, como a concentração da fração L-aminoácido oxidase do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* capaz de inibir 50% das células (CI_{50}), correlacionando a média do percentual de células mortas com a concentração de veneno e examinadas por análise de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism 5 versão 5.0, o qual gerou um gráfico de absorbância X concentração da substância-teste.

4.5.2.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Para realização do ensaio com MTT, as células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas para sincronizá-las na fase G_0 do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10 min em estufa de CO_2 a $37^\circ C$, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram adicionadas em cada poço da placa de 96 poços na quantidade de 200 μL de uma solução contendo 1×10^5 células/mL (Figura 21). Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25; e 50 $\mu g/mL$). Após mais 24 horas do tratamento com a substância-teste, foi removido 100 μL do sobrenadante do meio de cultura e a seguir, adicionou-se 10 μL da solução do sal de tetrazolium (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO_2 à $37^\circ C$, adicionou-se 90 μL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. Mantidas em estufa com 5% de CO_2 à $37^\circ C$ por 17 horas, as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm (Figura 22).

Foram realizados três experimentos independentes e em triplicada para cada concentração. Controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição da substância teste, e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983). Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão.

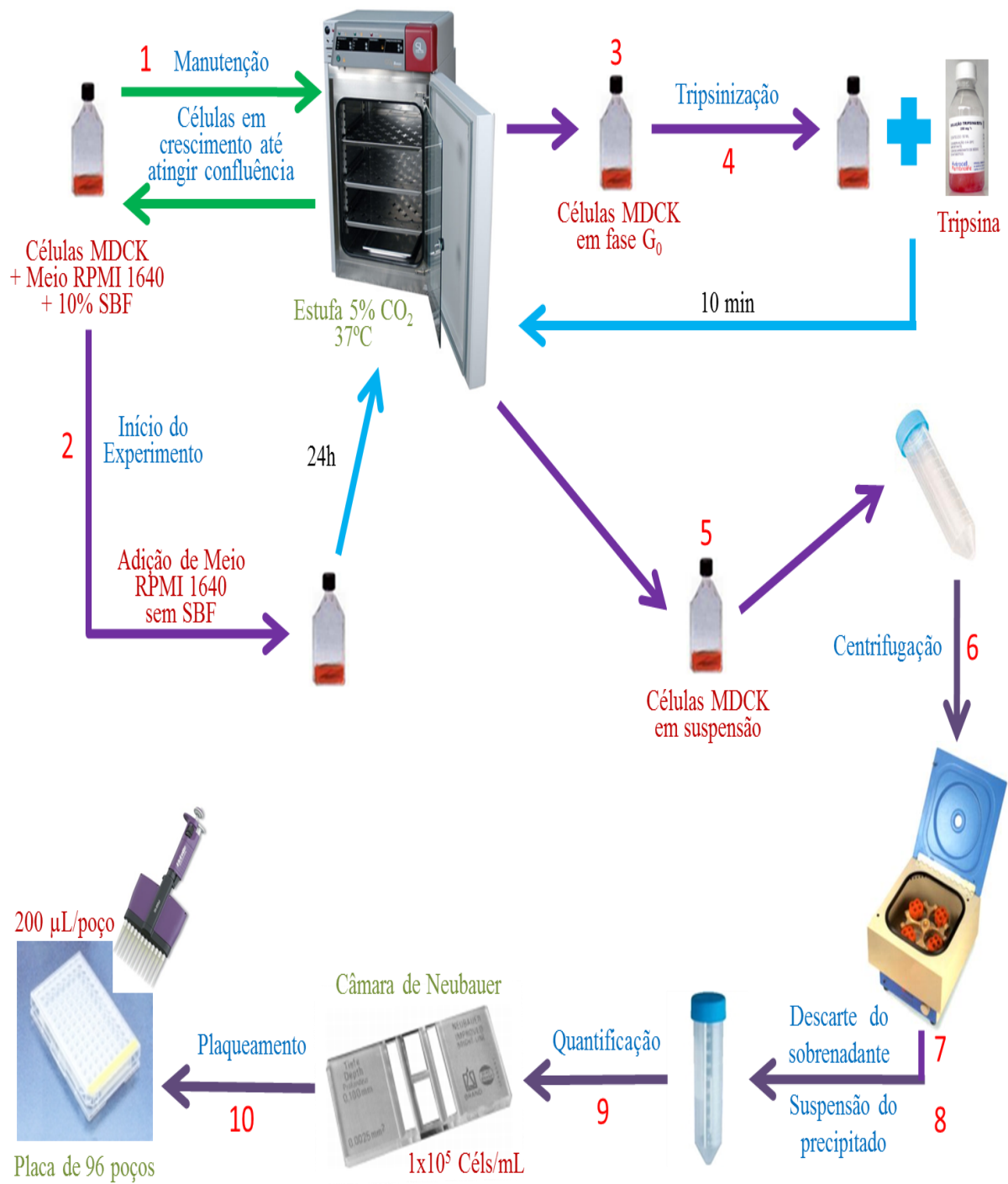


Figura 21 – Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK.

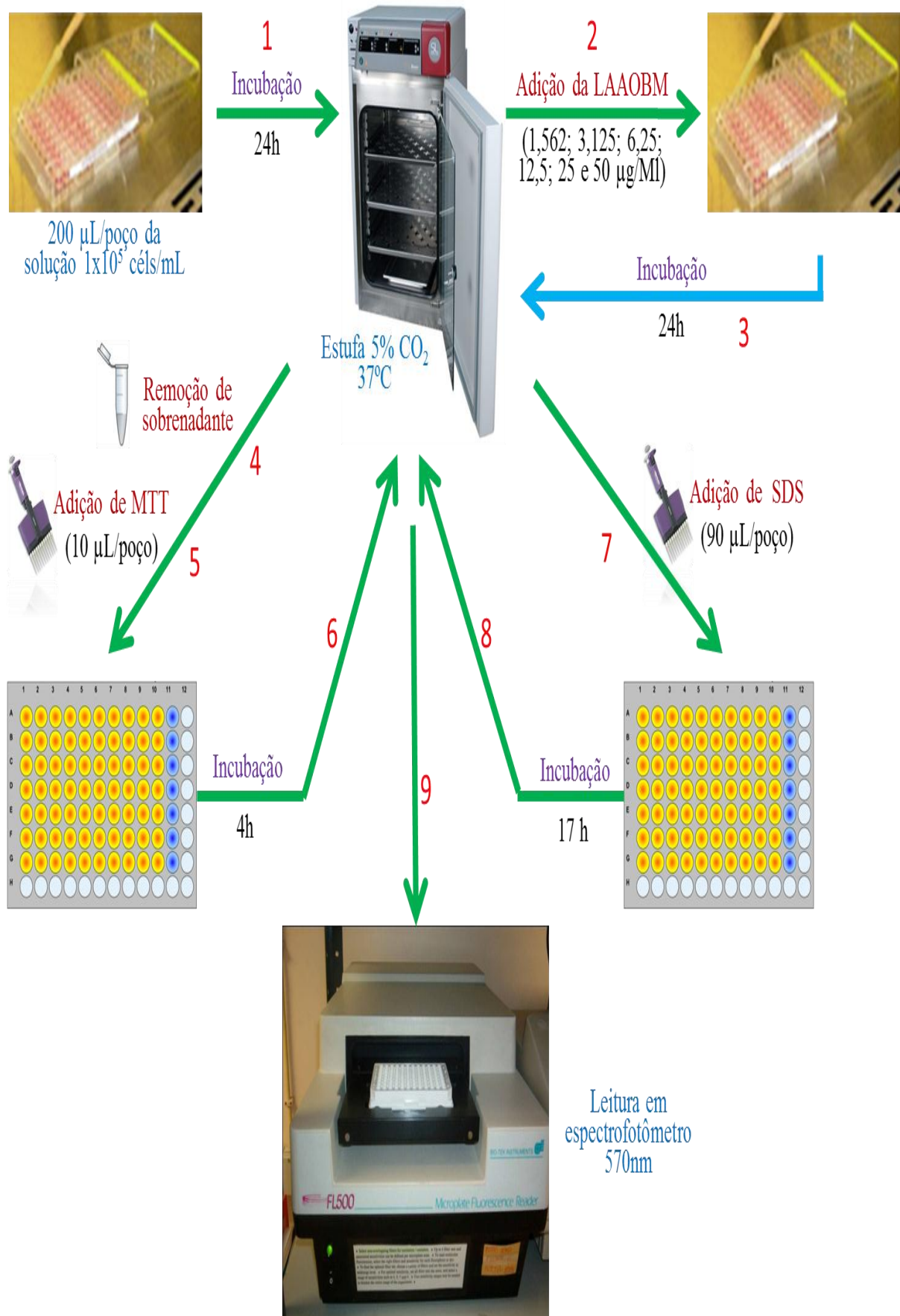


Figura 22 – Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação celular.

4.6 Ensaios para avaliação de expressão gênica

Para os ensaios de avaliação da expressão gênica, as células MDCK foram cultivadas em placas de cultivo de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL/poço. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, adicionou-se em cada poço a fração LAAO isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* nas concentrações de 2,5µg/mL; 1,25µg/mL e 0,625µg/mL em hexaplicata e incubou-se as células novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Decorridas 24 horas, as células foram deslocadas dos poços por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v), centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Para cada concentração da substância-teste foram obtidos seis precipitados, os quais foram misturados para obter-se apenas uma amostra de cada concentração. O experimento teve sequência com os procedimentos de isolamento de RNA total utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen) e automação pelo equipamento Qiacube. Foram realizados três experimentos independentes (n = 3), porém nas mesmas condições.

4.6.1 Isolamento de RNA total

Para o isolamento do RNA total, adicionou-se ao precipitado de células o volume de 350 µL do tampão de lise contendo B-mercaptoetanol. As células foram lisadas quando submetidas ao êmbolo de agulha hipodérmica (13x4,5cm). A solução com as células lisadas foi centrifugada a 14.000 xg por 3 minutos e o sobrenadante foi aplicado a um tubo eppendorf de 2,0 mL que foi aplicado ao equipamento QiaCube (Qiagen). A partir de então todo o isolamento foi realizado automaticamente, seguindo o protocolo descrito pelo kit e já programado ao equipamento. A Figura 23 demonstra as etapas realizadas automaticamente pelo equipamento QiaCube.

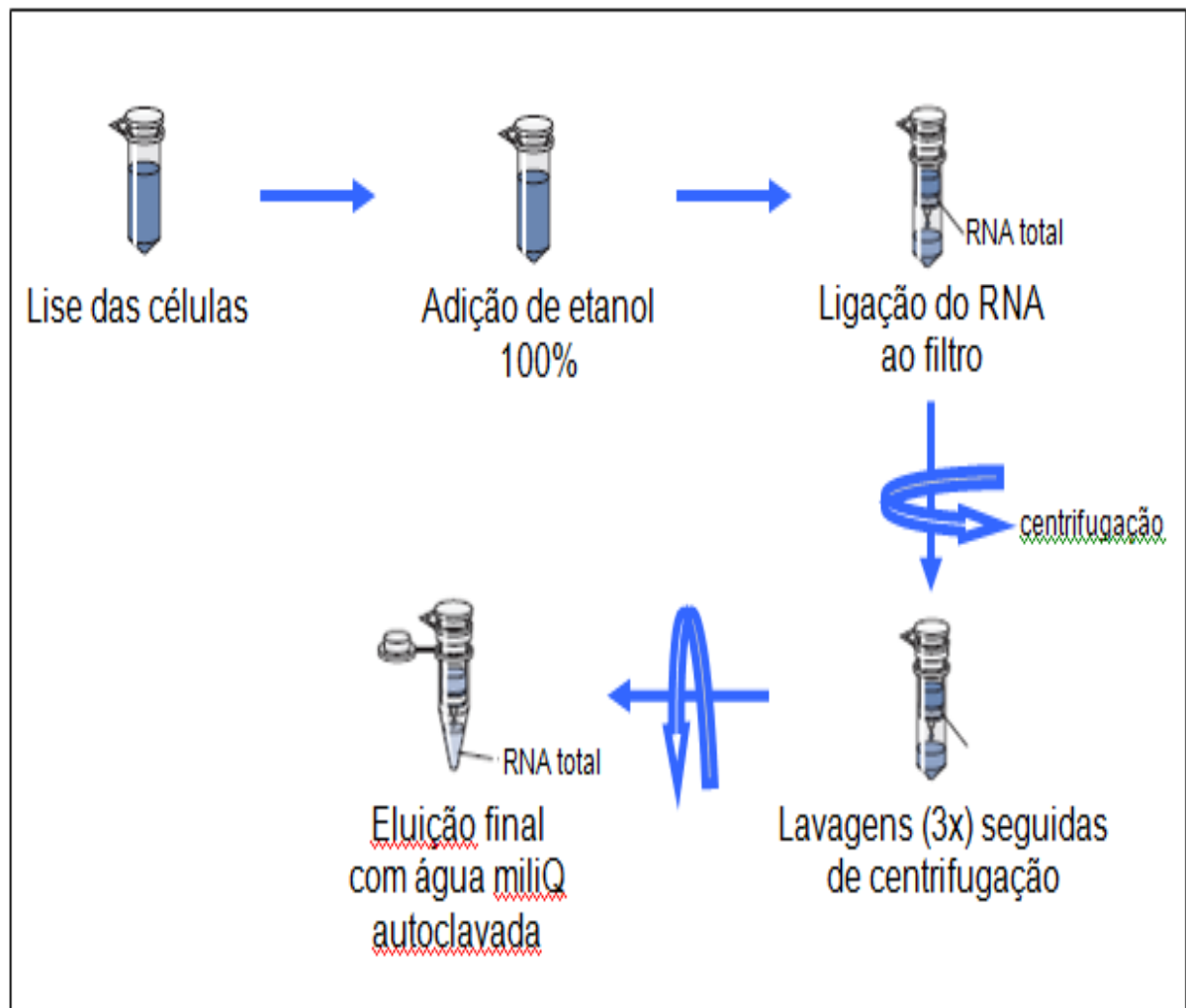


Figura 23 – Esquema gráfico do isolamento de RNA total com automação pelo equipamento QiaCube (Qiagen).

4.6.2 Reação de transcriptase reversa

Com a finalidade de analisar a expressão gênica de alguns dos marcadores apoptóticos e anti-apoptóticos envolvidos nos efeitos causados pela L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* nas células renais MDCK, o RNA total foi transformado em DNA complementar (cDNA) através da reação de Transcriptase reversa. Para tanto, utilizou-se a enzima do kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase System (Invitrogen, USA).

Resumidamente, uma quantidade de 1 µg de RNA total extraído foi adicionado a um tubo eppendorf (0.2 µL) contendo 1 µL de primer oligo(dT)₂₀ (50 µM), 1 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (dNTP mix, 10 mM) e água miliQ foi adicionada para completar um volume de 10 µL. Essa primeira mistura (reação A) foi aquecida à 65 °C para a desnaturação do RNA e anelamento do primer oligo(dT)₂₀ com a cauda polyA do RNA

mensageiro por 5 minutos. Imediatamente após este período, a reação foi resfriada em gelo por pelo menos 1 minuto e, a esta solução, foi adicionada uma reação B que continha: 2µL de tampão de síntese de cDNA (10X), 4 µL de MgCl₂ (25mM), 2µL de DTT (0,1M), 1µL de uma solução RNaseOUT (40U/µL), e 1µL da enzima SuperScriptTM III RT (200 unidades/µL). O tubo contendo as duas misturas (20µL) foi levado a um termociclador onde permaneceu inicialmente por 50 minutos a uma temperatura de 50°C. Passado este período, a reação foi aquecida a uma temperatura de 85°C por 5 minutos e então resfriada imediatamente a uma temperatura de 4°C. Finalizando o processo, o cDNA sintetizado foi acrescido de 1µL de RNase H e incubado por 20 minutos a 37°C. O cDNA sintetizado foi mantido em freezer -20°C até a realização de sua amplificação pela técnica de PCR em tempo Real (qPCR).

4.6.3 Reação de polimerase de cadeia em tempo real (qPCR)

Analisou-se a expressão dos genes pró-apotóticos e anti-apotóticos BAX, BCL-XL e MCL-1 utilizando o equipamento iQ5 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de PCR. Através dessa tecnologia é possível a quantificação das amostras de cDNA na fase exponencial da cinética de amplificação, período no qual a PCR pode ser quantificado. Isto foi possível com a utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR Green, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores (Quadro 5) de DNA (*primers*) aqui utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos genes investigados acima descritos obtidas no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Todas as reações de PCR em tempo Real foram realizadas num volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de iQ Supermix (solução padrão de amplificação contendo tampão salino, uma mistura de deoxinucleotídeos, enzima amplificadora e corante SYBR Green onde todas estavam em concentrações otimizadas pelo fabricante), 200 nM dos iniciadores e 2 µL de cDNA das amostras. Amostras negativas foram também testadas onde o cDNA era substituído por água mili-Q autoclavada. As condições da PCR foram empregadas da seguinte forma: um período de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 40 ciclos para as reações de amplificação dos genes testes descritos acima. Cada ciclo continha uma fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma fase de anelamento a 60°C por 30 segundos, e

uma fase de extensão da cadeia de DNA a 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos submetemos as amostras a uma extensão final na temperatura de 72°C por 3 minutos.

Quadro 5 – Sequência dos iniciadores usados na reação de qPCR.

Genes	Sequência dos Iniciadores (5'-3') senso (F) e antisenso (R)
BAX	F – CGAGCTGATCAGGACCATCA R – CACGTGGGTGTCCCAAAGTA
MCL-1	F – AACAAACTGGGGCAGGATTG R – AAACCCATCCCAGCCTCTT
BCL-XL	F – GGCCTTTTTCTCCTTCGGTG R – CTCTCGGCTGCTGCATTGT

Fonte: NCBI.

Com o intuito de analisar a especificidade das amplificações, ou seja, saber se os produtos formados eram específicos para os genes testados, foi realizada, após cada reação, uma curva de fusão (*Melting Curve*) onde a temperatura da reação era acrescida em 1°C a cada 20 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento de cada iniciador e terminando a 95°C. Os dados obtidos pelo iQ5 Optical System Software (Version 2.0) foram baseados no valor do ciclo limiar (C_T – Threshold cycle), ou ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 x maior que a fluorescência basal. A avaliação da expressão gênica foi obtida utilizando o método matemático descrito por Pfaffl (2001).

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), onde n representa o número de experimentos. Para as comparações estatísticas entre dois grupos utilizou-se teste *t-Student* pareado ou não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A CI_{50} foi estimada por curva de interpolação como a concentração inibitória média capaz de provocar 50% de inibição celular, correlacionando os percentuais médios de células mortas e a concentração da substância em estudo avaliada por análises de regressão não linear. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatísticos *Graph Pad Prism 5.0* (USA).

4.7 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado sob o número 79/08.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre o rim isolado

O grupo tratado apenas com a solução perfusora Krebs-Henseleit modificada (n=6) não apresentou alterações significativas nos parâmetros de função renal durante os 120 minutos do experimento.

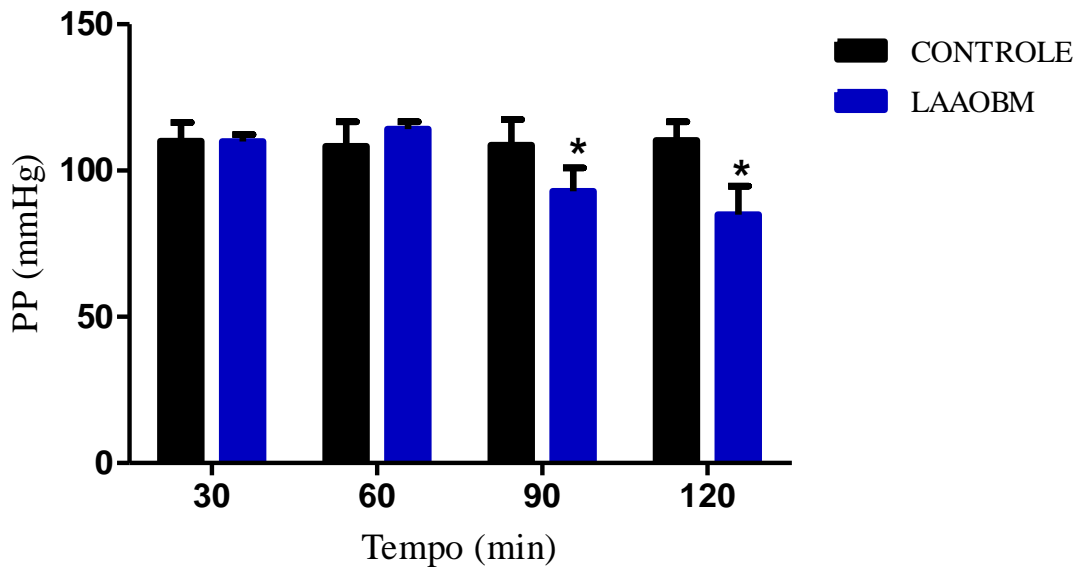
A fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (LAAOBM) foi adicionada ao sistema de perfusão, na concentração de 10 µg/mL (n=4), após 30 minutos do início de cada experimento, período estabelecido como controle interno.

Observou-se uma redução da pressão de perfusão aos 90 e 120 minutos após adição da LAAOBM ao sistema de perfusão quando comparada ao grupo controle (Figura 24). Houve também uma redução da resistência vascular renal aos 120 minutos (Figura 25).

A Figura 26 mostra uma queda abrupta e acentuada do fluxo urinário aos 90 minutos que, apesar da tendência à recuperação observada aos 120 minutos, ainda mostrou-se bastante reduzido quando comparado ao grupo controle.

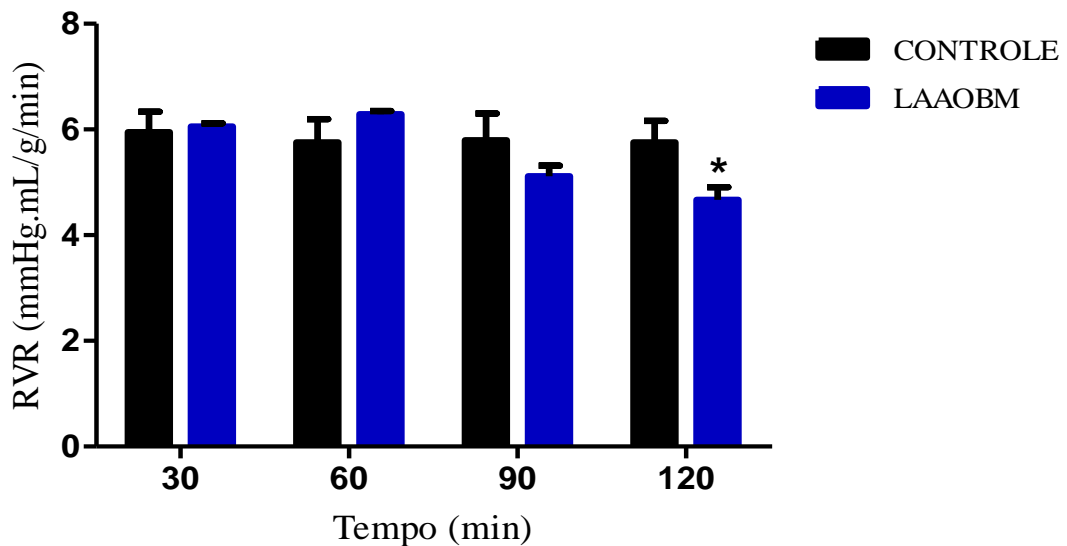
A infusão da LAAOBM promoveu uma queda do ritmo de filtração glomerular aos 90 e 120 minutos quando comparada ao grupo controle (Figura 27). Não foram observadas alterações significativas no percentual de transporte tubular proximal de sódio (Figura 28) e no percentual de transporte tubular de potássio (Figura 29).

A LAAOBM reduziu gradativamente o percentual de transporte tubular de sódio aos 90 e 120 minutos quando comparados ao grupo controle (Figura 30), no entanto, observou-se uma redução do percentual de transporte tubular de cloreto em decorrência do uso da LAAOBM nos tempos de 60, 90 e 120 minutos quando comparados ao grupo controle (Figura 31).



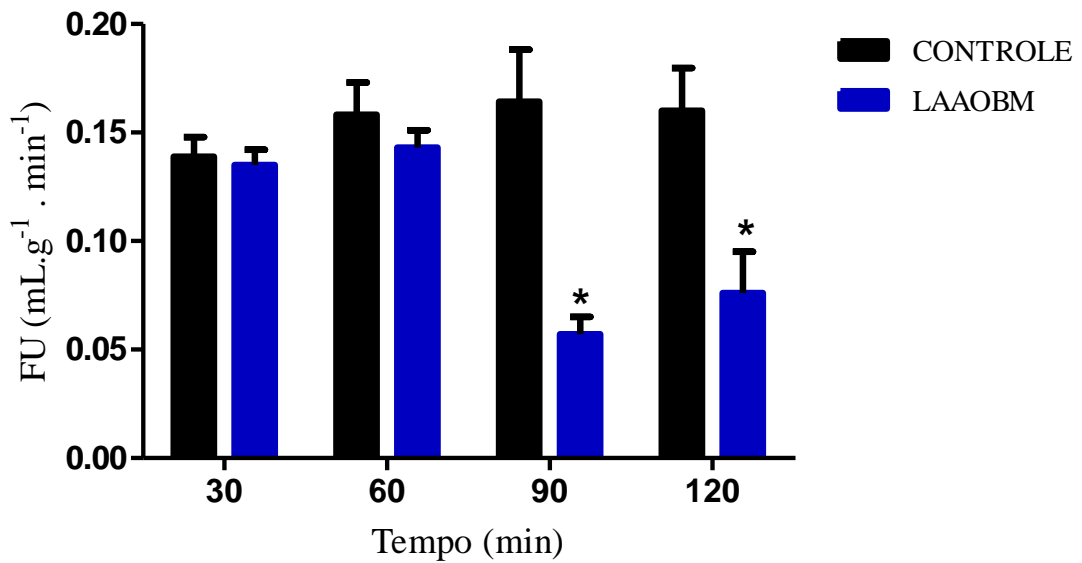
Tempo (min)	30	60	90	120
PP (mmHg) Controle	110.10 ± 3.68	108.27 ± 4.88	108.69 ± 5.08	110.28 ± 3.69
PP (mmHg) LAAOBM	109.9 ± 1.1	114.2 ± 1.1	92.9 ± 3.6	84.9 ± 4.4

Figura 24 – Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



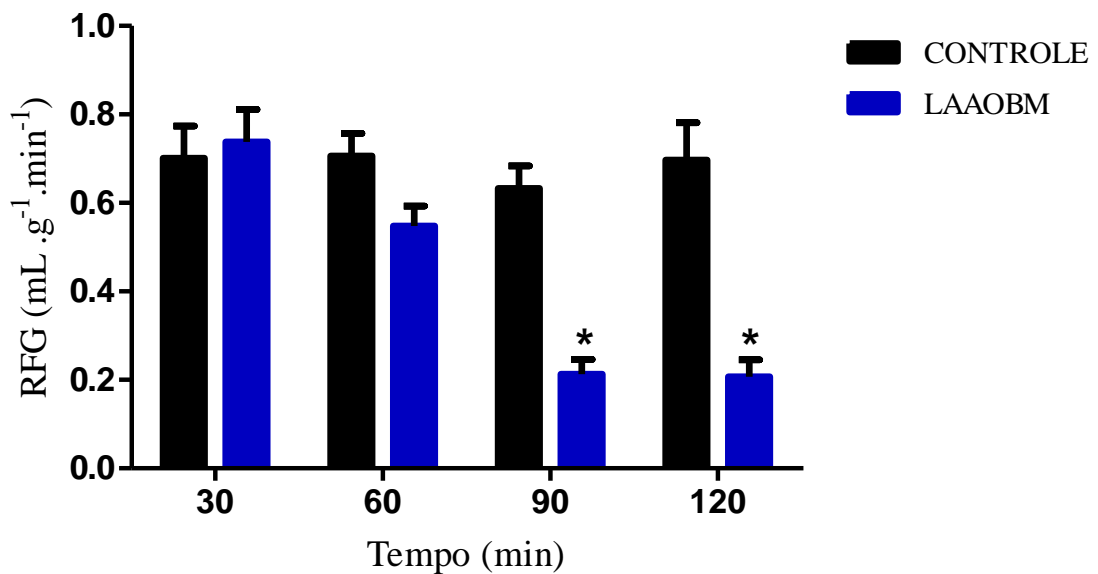
Tempo (min)	30	60	90	120
RVR (mmHg.mL/g/min) Controle	5.94 ± 0.38	5.75 ± 0.44	5.79 ± 0.50	5.75 ± 0.40
RVR (mmHg.mL/g/min) LAAOBM	6.06 ± 0.06	6.29 ± 0.06	5.12 ± 0.20	4.67 ± 0.24

Figura 25 – Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



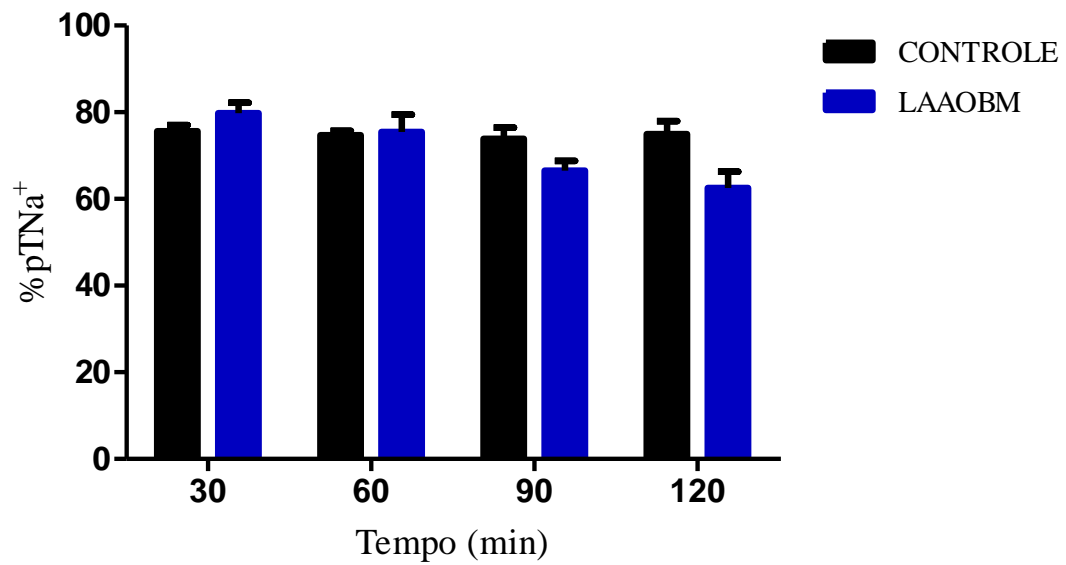
Tempo (min)	30	60	90	120
FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) Controle	0.138 ± 0.008	0.158 ± 0.014	0.164 ± 0.024	0.160 ± 0.019
FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) LAAOBM	0.135 ± 0.007	0.143 ± 0.008	0.057 ± 0.008	0.076 ± 0.019

Figura 26 – Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



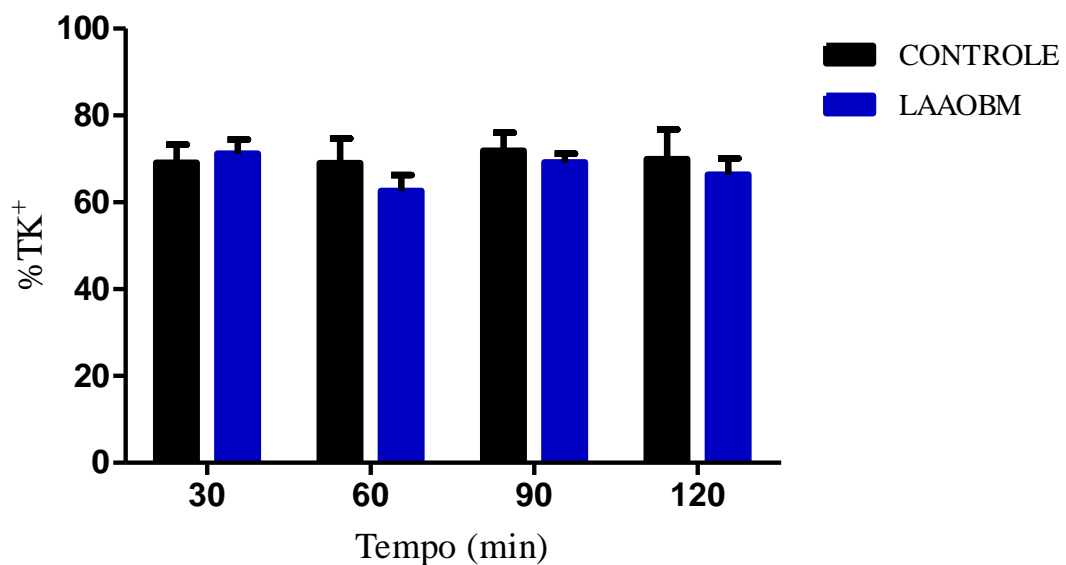
Tempo (min)	30	60	90	120
RFG (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) Controle	0.701 ± 0.072	0.706 ± 0.050	0.632 ± 0.050	0.697 ± 0.084
RFG (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) LAAOBM	0.738 ± 0.073	0.548 ± 0.045	0.213 ± 0.033	0.207 ± 0.038

Figura 27 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



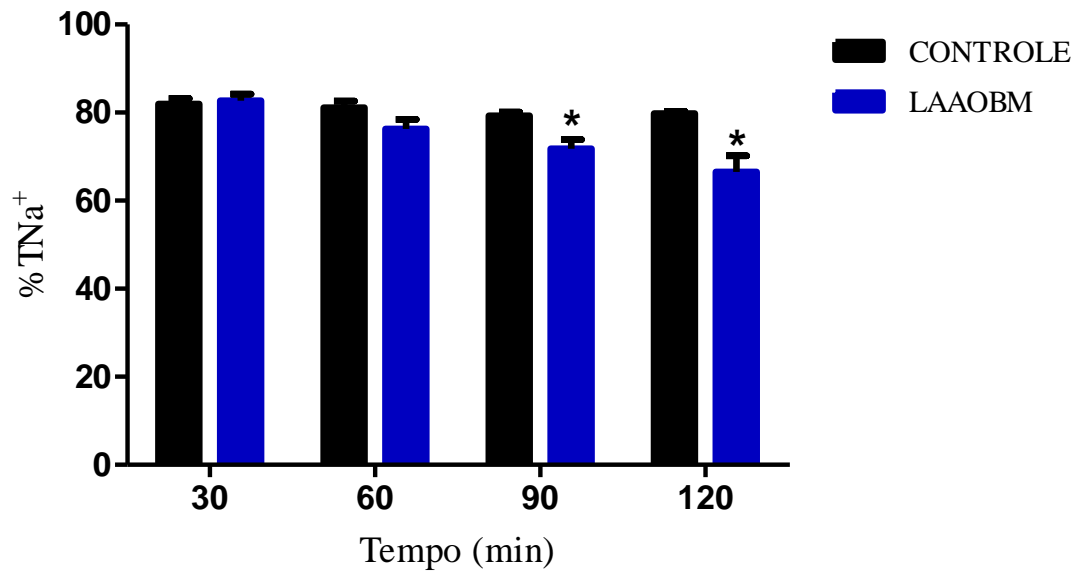
Tempo (min)	30	60	90	120
%TNa ⁺ Controle	75.64 ± 1.41	74.69 ± 0.98	73.84 ± 2.64	74.94 ± 3.02
%TNa ⁺ LAAOBM	79.76 ± 2.44	75.47 ± 3.96	66.58 ± 2.17	62.55 ± 3.74

Figura 28 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



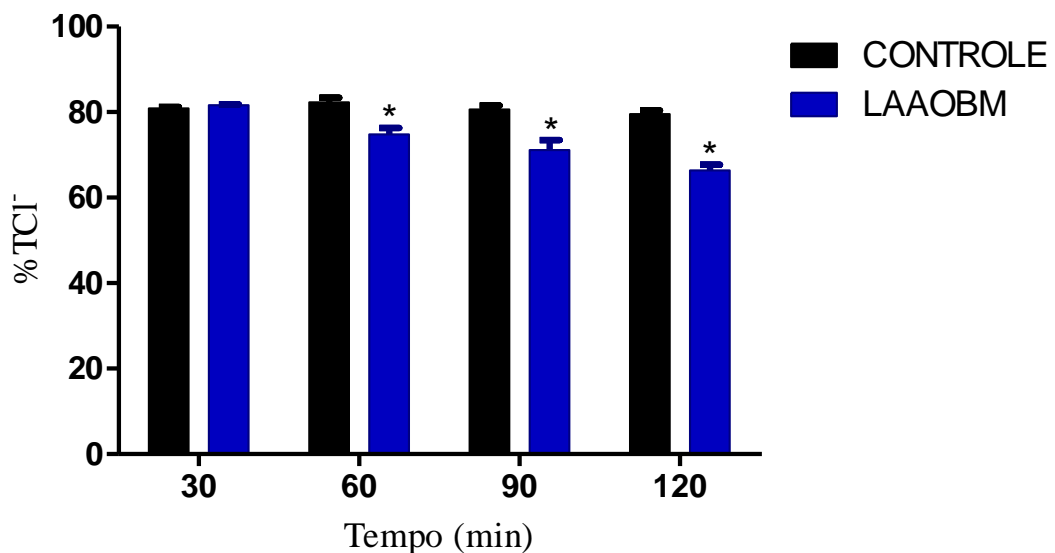
Tempo (min)	30	60	90	120
%TK ⁺ Controle	69.13 ± 4.14	69.03 ± 5.68	71.84 ± 4.21	69.94 ± 6.85
%TK ⁺ LAAOBM	71.17 ± 3.31	62.62 ± 3.66	69.24 ± 1.96	66.35 ± 3.76

Figura 29 – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



Tempo (min)	30	60	90	120
%TNa ⁺ Controle	81.93 ± 1.24	81.11 ± 1.51	79.26 ± 0.90	79.75 ± 0.56
%TNa ⁺ LAAOBM	82.74 ± 1.45	76.33 ± 2.09	71.76 ± 2.09	66.58 ± 3.61

Figura 30 – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.



Tempo (min)	30	60	90	120
%TCl ⁻ Controle	80.90 ± 0.34	82.25 ± 1.08	80.65 ± 0.89	79.53 ± 0.80
%TCl ⁻ LAAOBM	81.62 ± 1.80	74.77 ± 1.50	71.10 ± 2.38	66.34 ± 1.33

Figura 31 – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n = 6) e tratado (n = 4) com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* (LAAOBM: 10 µg/mL). Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05.

5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*

A Figura 32 mostra um corte histológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit mostrando que não há alterações provocadas pelo veículo. As lâminas analisadas demonstraram que glomérulos, túbulos, vasos e interstícios normais.

Os rins esquerdos serviram como grupo controle não apresentando também qualquer alteração em glomérulos, túbulos, vasos e interstício (Figura 33).

A análise histológica dos rins perfundidos com LAAOBM mostrou a presença de alterações morfológicas significativas.

Os rins direitos, perfundidos com LAAOBM na concentração de 10 µg/mL, evidenciaram alterações na arquitetura renal, exceto em espaço intersticial e vascular (Figura 34). Foi encontrado, também na análise histológica, deposição de abundante material proteináceo nos túbulos (Figura 35) e espaço urinário (glomerular, Figura 36).

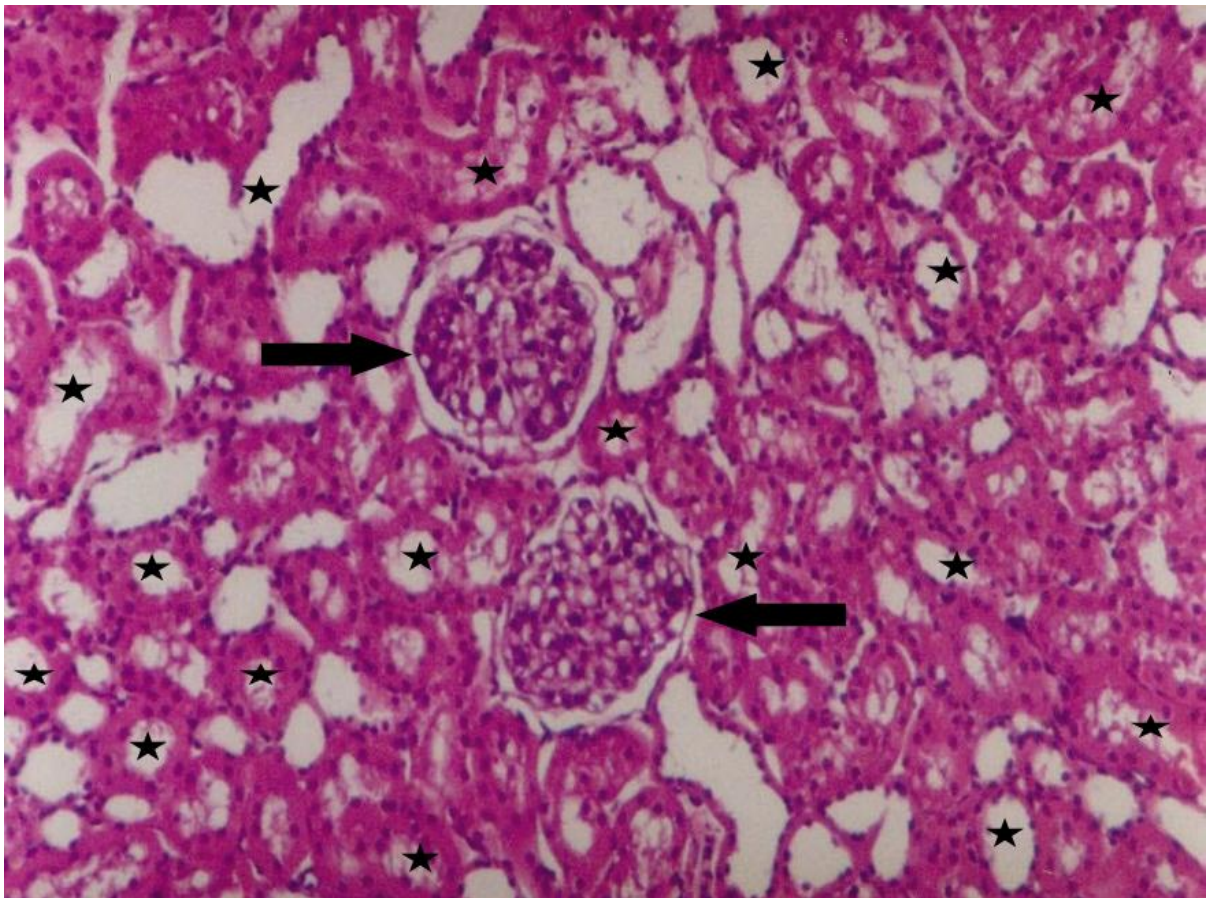


Figura 32 – Fotomicrografia de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada, mostrando que a perfusão não altera a fisiologia renal: glomérulos (setas), túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=6).

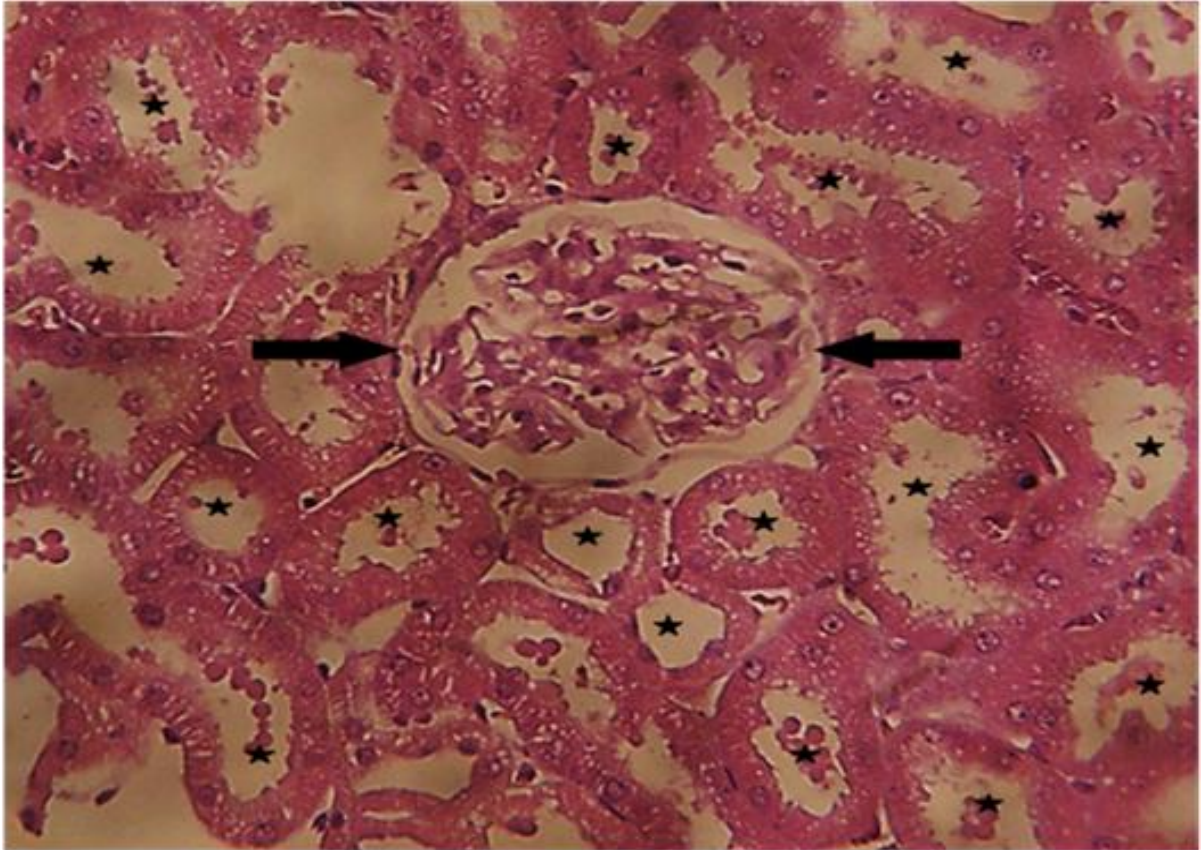


Figura 33 – Fotomicrografia de rim esquerdo não perfundido: glomérulos (setas), túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=4).

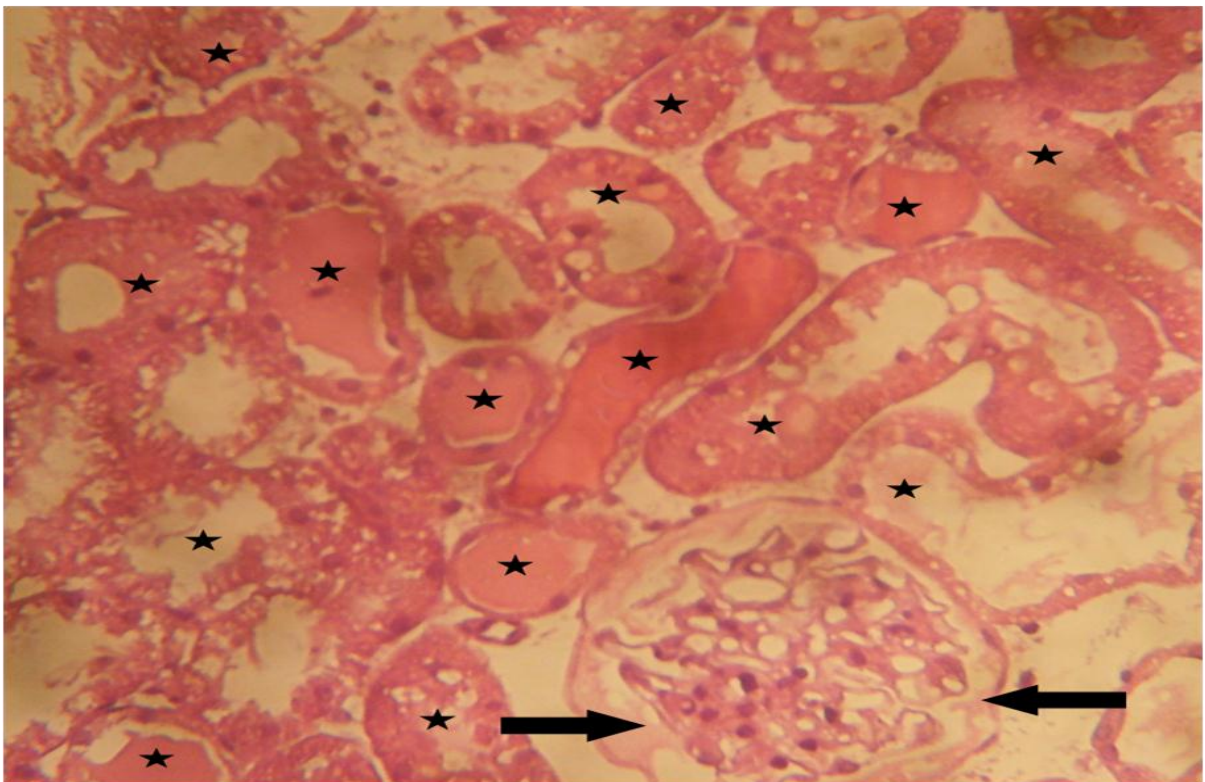


Figura 34 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando alterações na arquitetura renal: glomérulos (setas), túbulos contorcidos distais e proximais (estrelas). (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=4).

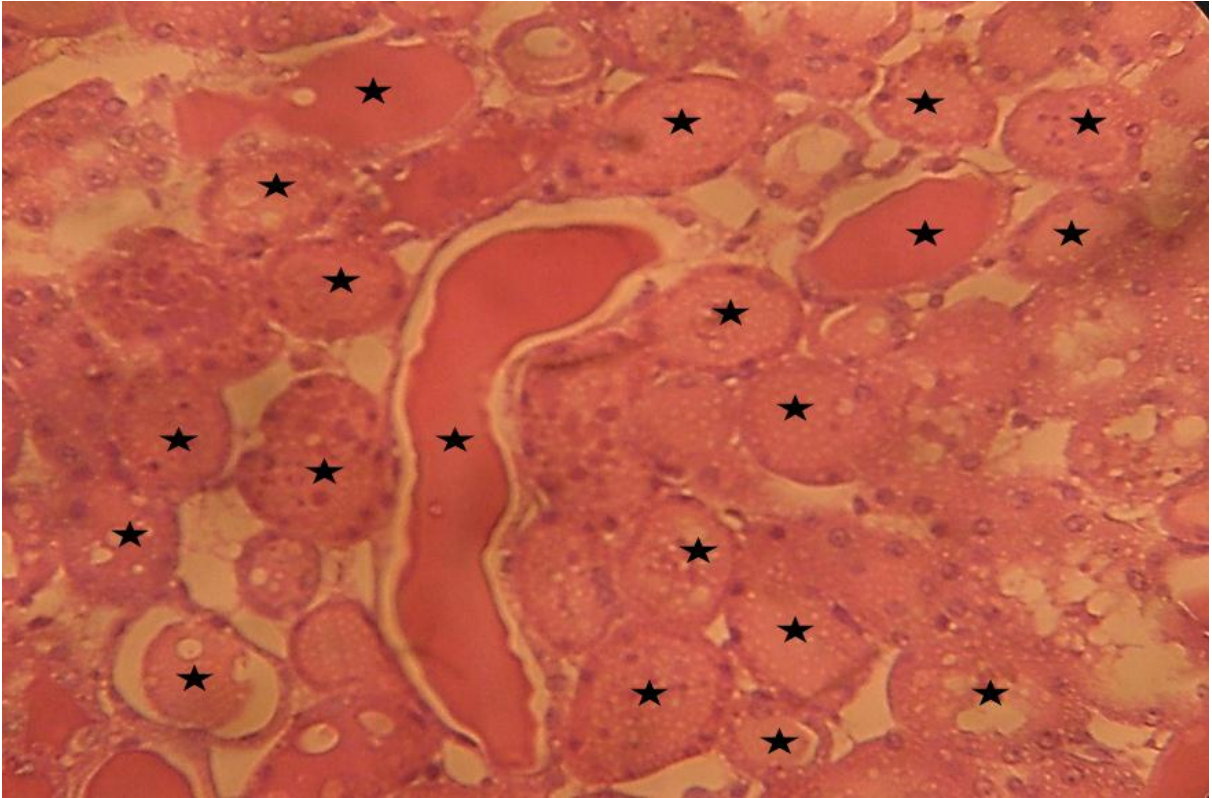


Figura 35 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* na concentração de 10 µg/mL, demonstrando depósito acentuado de material proteico nos túbulos (estrelas). (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=4).



Figura 36 – Fotomicrografia de rim perfundido com a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* na concentração de 10 µg/mL, demonstrando moderado depósito acentuado de material proteico nos espaços urinários (setas) e acentuado depósito de material proteico nos espaços tubulares (estrelas). (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=4).

5.3 Efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre células tubulares renais MDCK

O efeito da LAAOBM sobre células MDCK foi avaliado nas concentrações de 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. Utilizou-se o método do MTT para determinação da viabilidade destas células após 24 horas de incubação com a LAAOBM. A Figura 37 mostra o efeito citotóxico da LAAOBM sobre esta linhagem celular, o qual pode ser observado a partir da concentração de 3,25 µg/mL até a concentração de 50 µg/mL com valor da CI_{50} de 2,43 µg/mL. Na figura 38, obtidas através de microscópio óptico invertido após 24 horas de incubação das células MDCK com a LAAOBM, são visíveis algumas alterações morfológicas, tais vacuolização citoplasmática, alteração do estado de confluência das células bem como desprendimento das mesmas do substrato de cultura. Vale ainda ressaltar que estas alterações ocorreram de forma dependente da dose utilizada da LAAOBM. As células MDCK consideradas como controle mantiveram seu tamanho e formato normais, bem como seus limites intercelulares bem definidos.

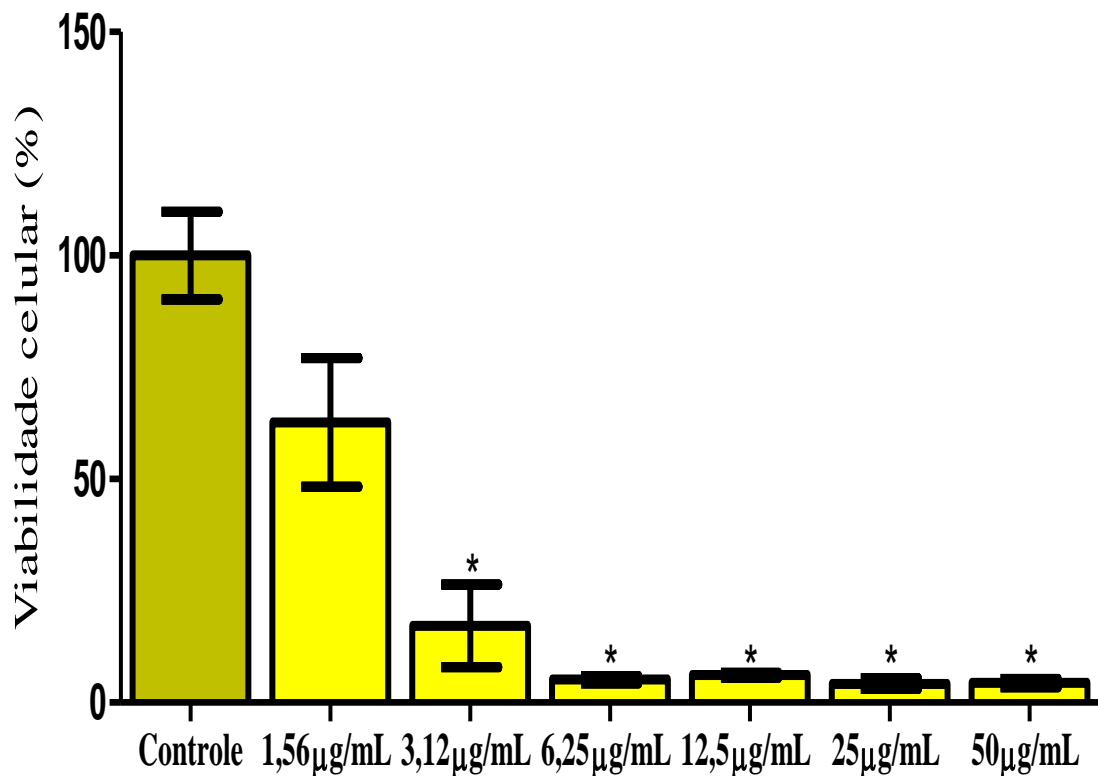


Figura 37 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis* em células tubulares renais MDCK. Valores expressos em média \pm E.P.M. Para análise estatística utilizou-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

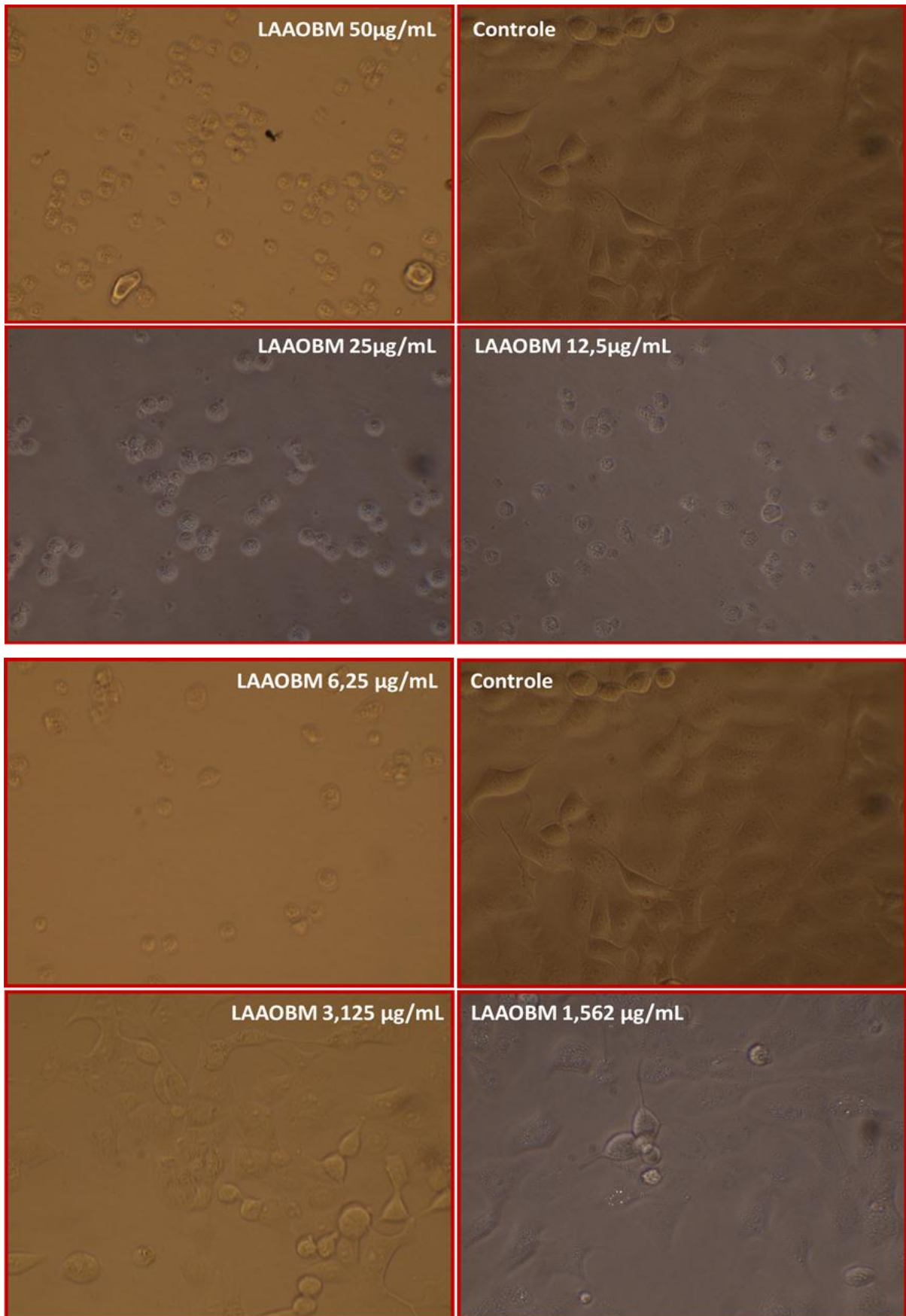


Figura 38 – Fotomicrofotografias de células tubulares renais MDCK expostas à LAAOBM (1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50 µg/mL) e não-expostas (controle) utilizando microscópio óptico invertido.

5.4 Determinação dos efeitos da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a expressão gênica de células tubulares renais MDCK

Tendo em vista o efeito tóxico da LAAOBM sobre a linhagem de células MDCK, foram avaliados os efeitos desta fração em relação à expressão de genes envolvidos no mecanismo de morte celular. Foram selecionados três genes da família da proteína Bcl-2, a qual tem um papel importante na morte celular mediada por apoptose: o gene *BAX*, um membro pró-apoptótico, e dois membros anti-apoptóticos, o gene *BCL-XL* e o gene *MCL-1*.

Nas concentrações estudadas (2,5; 1,25 e 0,625 $\mu\text{g/mL}$), a LAAOBM não apresentou nenhum efeito sobre a expressão dos genes *BAX*, *BCL-XL* e *MCL-1* (Figuras 39, 30 e 41).

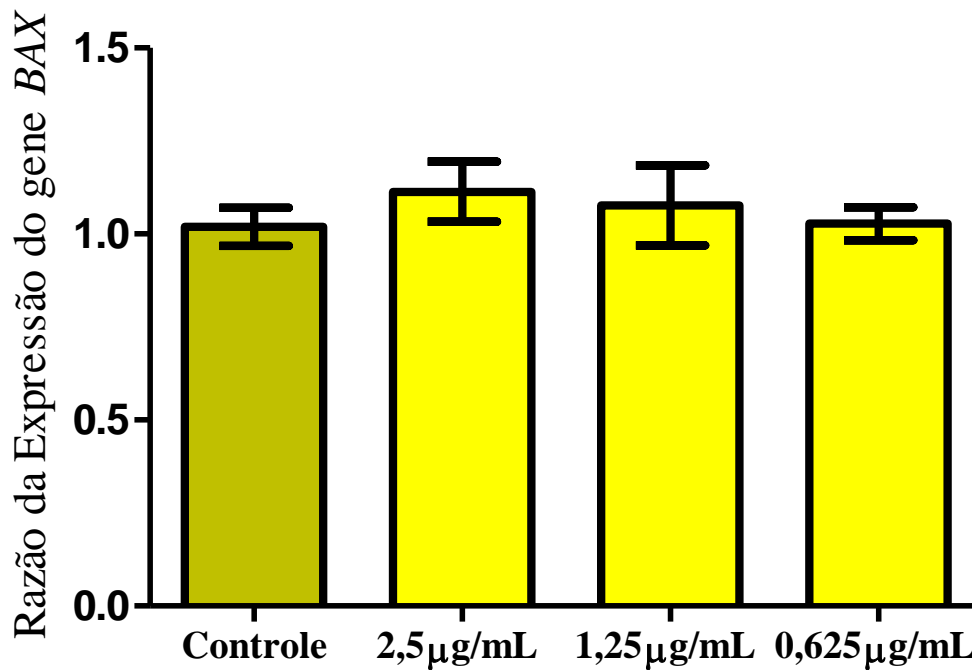


Figura 39 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a expressão relativa do gene pró-apoptótico *BAX* em células MDCK.

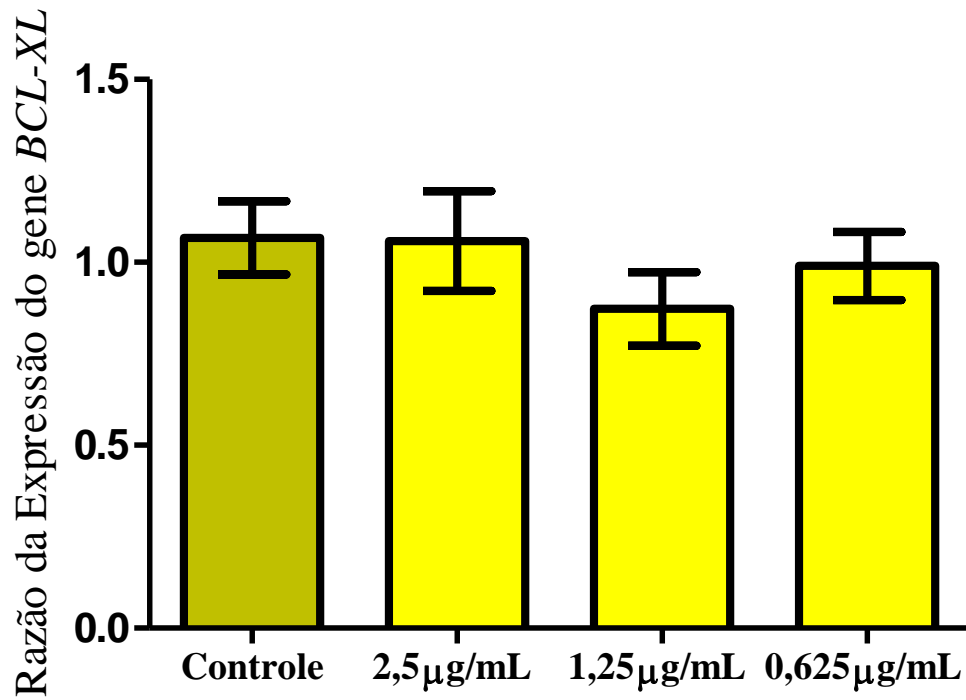


Figura 40 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a expressão relativa do gene anti-apoptótico *BCL-XL* em células MDCK.

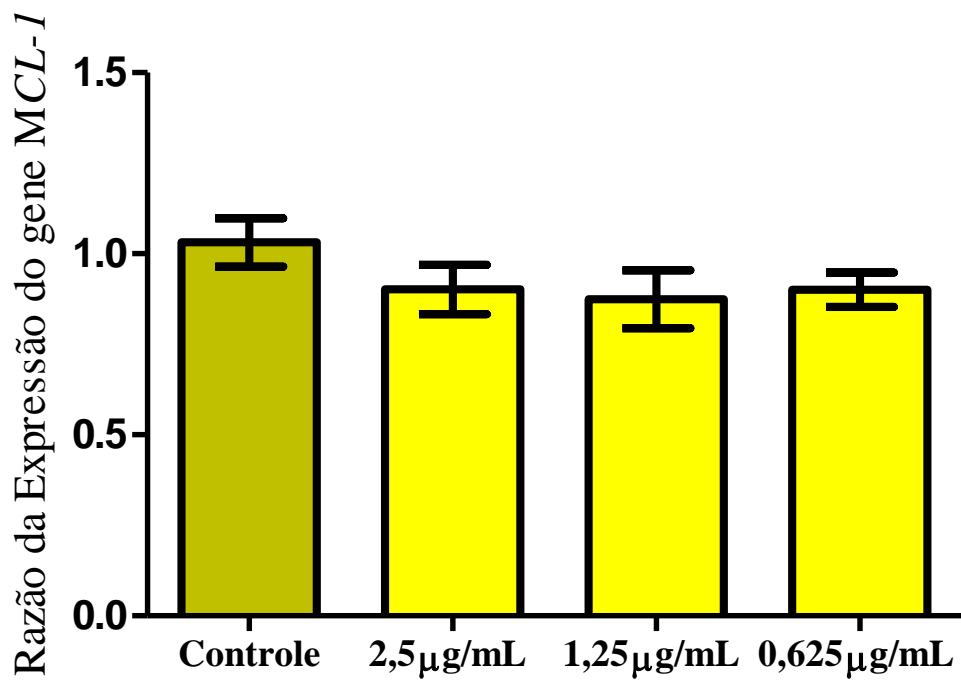


Figura 41 – Efeito da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* sobre a expressão relativa do gene anti-apoptótico *MCL-1* em células MDCK.

6 DISCUSSÃO

O Brasil, um país tropical com dimensões continentais, possui um grande número de espécies de serpentes e, em virtude dos inúmeros casos de acidentes ofídicos, as abordagens farmacológicas e toxicológicas envolvendo o veneno destes animais ou seus componentes têm sido tema de estudos de grande relevância (CHANDRASHEKARA *et al.*, 2009).

O gênero *Bothrops*, com cerca de 17 espécies identificadas em todo o território brasileiro (CARDOSO *et al.*, 2003), é responsável por mais de 90% dos acidentes ofídicos notificados em todo o país (BRASIL, 2001). Apesar de grande parte da peçonha botrópica permanecer na pele após o acidente ofídico e causar alterações predominantemente locais, efeitos sistêmicos como insuficiência renal aguda podem ocorrer em alguns pacientes (SANTOS; FERANI; ROCHA, 2009).

A patogênese da lesão renal no acidente botrópico não está bem elucidada. Através de estudos experimentais foi demonstrado que a peçonha botrópica é capaz de provocar toxicidade tubular renal (CASTRO *et al.*, 2004). Outros autores sugerem ação proteolítica direta do veneno sobre os glomérulos, acompanhada de alterações morfológicas (VÊNCIO, 1988).

A toxicidade do veneno botrópico é influenciada por diversos fatores, tais como, filogenia, sexo, idade e origem geográfica do animal, dentre outros. É importante ressaltar também que esta toxicidade é decorrente de uma mistura de constituintes protéicos biologicamente ativos (QUEIROZ *et al.*, 2008). Estudos de proteômica e de espectroscopia de massa revelaram que 51,5% e 14% dos componentes protéicos do veneno da *Bothrops jararaca* são metaloproteinases e serinoproteinases, respectivamente (SANZ *et al.*, 2008). Apesar de muitos destes componentes já terem sido isolados e bastante estudados, pouco se sabe sobre a fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (LAAOBM).

O veneno botrópico, em concentração subletal, causa alterações funcionais renais, como diminuição da filtração glomerular, da diurese e do fluxo plasmático renal em ratos. A diminuição dos níveis de fibrinogênio e hematócrito e a presença de hemólise intravascular são bem marcantes. O aumento da enzima lactato desidrogenase plasmática e da hemoglobina livre também são observadas, ficando evidenciada a participação massiva da deposição de fibrina nos capilares glomerulares e da hemólise intravascular como os fatores

mais importantes na etiopatogenia da insuficiência renal aguda por acidente botrópico (BURDMANN *et al.*, 1993; CASTRO, 2006).

Na experimentação em rim isolado de rato, a análise da urina, do perfusato, dos parâmetros funcionais e da histologia é útil para estabelecer um perfil dos efeitos funcionais e morfológicos de uma substância sobre o rim. Com as informações obtidas dessas análises, pode-se estabelecer a identificação do local, da natureza e da extensão da lesão nefrotóxica.

No presente estudo, a infusão da LAAOBM (10µg/mL) no sistema de perfusão de rim isolado promoveu reduções significativas, aos 90 e 120 minutos, da pressão de perfusão, do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular. Foi observada também redução significativa da resistência vascular renal aos 120 minutos.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Havt, Fonteles e Monteiro (2001), que descreveram também, para o veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (10 µg/mL) em sistema de perfusão de rim isolado, redução da pressão de perfusão renal e resistência vascular renal aos 90 e 120 minutos.

Monteiro e Fonteles (1999) e Braga (2006) estudando, respectivamente, o veneno total das serpentes *Bothropos jararaca* e *Bothrops insulares* nas mesmas condições, observaram uma queda nos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal; nos parâmetros funcionais renais, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular; e nos parâmetros eletrolíticos relativos ao sódio e cloreto, sem alteração significativa no percentual de transporte tubular de potássio.

Em relação ao transporte iônico, a LAAOBM (10 µg/mL) promoveu uma redução no percentual de transporte tubular de sódio e de cloreto; contudo, não foram observadas alterações nem no percentual de transporte tubular de potássio nem no percentual de transporte tubular proximal de sódio.

O veneno bruto da *Bothrops moojeni*, também na concentração de 10 µg/mL, induziu redução significativa da pressão de perfusão, da resistência vascular renal e dos transportes de sódio, cloreto e de potássio (BARBOSA *et al.*, 2002). Estas alterações foram mais pronunciadas que aquelas observadas com o veneno da *Bothrops jararaca*, mas, em contraste, o veneno da *Bothrops moojeni* induziu uma diurese intensa que não foi observada quando da perfusão com o veneno da *Bothrops jararaca*.

A administração do veneno bruto da *Bothrops marajoensis* (3 µg/mL) no sistema de perfusão renal demonstrou um decréscimo significativo dos parâmetros vasculares a partir dos 90 minutos. Foi também observado um decréscimo dos parâmetros funcionais renais: houve redução do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular a partir dos 60

minutos de perfusão. Entretanto, houve um aumento do fluxo urinário aos 120 minutos. Em relação aos parâmetros eletrolíticos, os transportes de sódio e de cloreto apresentaram uma redução a partir dos 90 minutos de perfusão, contudo, não houve alterações em relação ao transporte de potássio (EVANGELISTA, 2009).

A administração da fração fosfolipase A₂ isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (3 µg/mL) no sistema de perfusão renal apresentou resultados diferentes daqueles observados com o veneno total. A pressão de perfusão, a resistência e o fluxo urinário não sofreram alterações significativas. Porém, observou-se um decréscimo na reabsorção de sódio, cloreto e potássio (EVANGELISTA, 2009). Com base nestes resultados podemos inferir que a LAAOBM contribui para os efeitos do veneno total da *Bothrops marajoensis*.

Estes achados da perfusão renal corroboram com vários outros resultados descritos na literatura. Ademais, é possível observar que os efeitos induzidos pela LAAOBM sobre a perfusão renal são semelhantes àqueles observados quando da infusão do veneno bruto da *Bothrops marajoensis* (EVANGELISTA *et al.*, 2010).

Parece claro que a lesão renal ocorre independentemente da mioglobínúria e de outros fatores inflamatórios sistêmicos. Os túbulos proximais renais perdem a capacidade funcional, demonstrada pela maior excreção de sódio (MONTEIRO; FONTELES, 1999). Já se sabe que a hipotensão é uma complicação comum do envenenamento botrópico e que essa hipotensão pode, por sua vez, reduzir a pressão capilar renal e induzir necrose tubular aguda (CASTRO, 2006), o que poderia explicar as alterações observadas no transporte tubular de sódio em decorrência da administração da LAAOBM no sistema de perfusão de rim isolado. Vale ressaltar que os potenciadores de bradicinina presentes nos venenos botrópicos, identificados por Ferreira *et al.* (1992), influenciam na produção renal de bradicinina seguida da produção local de óxido nítrico e que também podem estar envolvidos nas alterações observadas nos parâmetros vasculares e de função renal. Em adição, de acordo com AIRD, 2002, em relação à fração LAAO, sua primeira função é provavelmente a de promover hipotensão à vítima pela ativação de guanilato ciclase solúvel na presença de superóxido dismutase.

Neste trabalho, o ritmo de filtração glomerular foi determinado pelo clearance de inulina, um marcador glomerular que é livremente filtrado através dos capilares glomerulares, não é reabsorvido nem secretado pelo túbulo renal e que não altera o ritmo de filtração glomerular (WINSTEN; DALAL, 1972). Portanto, provavelmente, os efeitos da LAAOBM na pressão de perfusão e na resistência vascular renal estão envolvidos na

diminuição do ritmo de filtração glomerular por meio de um decréscimo nas forças que favorecem a ultrafiltração.

Outro possível mecanismo responsável por estes resultados pode ser explicado por possíveis alterações na membrana basal induzidas pela LAAOBM. De acordo com Guyton (2006) uma redução no fluxo plasmático renal sem nenhuma alteração na taxa de filtração glomerular tenderia a aumentar o ritmo de filtração glomerular que, por sua vez, elevaria a pressão coloidosmótica nos capilares glomerulares e reduziria por fim a taxa de filtração glomerular. Entretanto, em certas doenças renais, as cargas negativas na membrana basal são perdidas e algumas proteínas passam a ser filtradas e eliminadas na urina (proteinúria), reduzindo assim a pressão coloidosmótica nos capilares glomerulares e interferindo negativamente no mecanismo de controle do ritmo de filtração glomerular. Esse processo de perda das cargas negativas na membrana basal pode acontecer antes mesmo de ocorrerem alterações histológicas notáveis. Em um estudo de caso envolvendo acidente botrópico, Marotta *et al.* (2006) observaram presença de proteinúria 2+ em uma escala de até 4+.

Na análise histopatológica observamos presença de abundante quantidade de material proteico nos túbulos renais e glomérulos nos rins perfundidos com LAAOBM na concentração de 10 µg/mL, além de alterações na arquitetura renal. Embora não tenhamos visualizados indícios de morte celular, estes dados sugerem que a função de barreira da membrana basal estava prejudicada já que houve extravasamento de proteínas.

Um estudo com o veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu* demonstrou, na análise histológica, a ocorrência de dilatação de túbulos proximais e necrose tubular aguda. Interessante notar que a indometacina, inibidor da ciclooxigenase, não teve nenhum efeito em reverter a perda funcional dos túbulos proximais (HAVT *et al.*, 2001).

A patogênese da lesão renal é complexa. Nos acidentes ofídicos há várias explicações possíveis para os mecanismos de ação da peçonha, dentre estas: ação direta do veneno no rim e/ou os efeitos inflamatórios resultantes da liberação de várias citocinas e mediadores (FERREIRA *et al.*, 1992). Foi demonstrado também que componentes isolados do veneno, como fosfolipases, promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores. Metaloproteinases dependentes do zinco induzem a liberação inicial de fator de necrose tumoral. Todos esses mediadores são o passo inicial para o desenvolvimento de complicações teciduais renais, incluindo a IRA (SITPRIJA, 2006).

Diversos autores descrevem a necrose tubular aguda como a lesão mais

frequentemente encontrada em cortes histológicos renais após acidente ofídico envolvendo serpentes do gênero botrópico (AMARAL *et al.*, 1986; BURDMANN; VIEIRA JR; VIDAL, 2003), seguida de necrose cortical (MAROTTA *et al.*, 2006). Outras alterações menos comuns descritas na literatura são nefrite intersticial aguda, alterações glomerulares, arterite e necrose de papila (CASTRO; BURDMANN; YU, 1999; SITPRIJA; CHAIYABUTR, 1999).

A mácula densa, um grupo de células especializadas nos túbulos distais, está em íntimo contato com as arteríolas aferentes e eferentes e é sensível à concentração de NaCl, cuja redução provoca a secreção de renina. A renina liberada completa toda sua cascata até ativação da angiotensina II que, por sua vez, contrai as arteríolas eferentes, aumentando a pressão hidrostática glomerular e retornando a taxa de filtração glomerular ao normal (GUYTON, 2006). Entretanto, Vikrant *et al.* (2005) observaram que danos diretos nos túbulos renais, a depender de sua intensidade, podem ser irreversíveis e levariam ao desenvolvimento de insuficiência renal. Assim, em nosso estudo, a redução do percentual de transporte de sódio sugere que a LAAOBM exerça efeitos sobre os túbulos renais.

Para esclarecer este efeito incubamos a LAAOBM em diferentes concentrações com células tubulares renais MDCK. Neste ensaio observamos uma redução expressiva da viabilidade celular acompanhada de alterações morfológicas caracterizadas por perda do contato intercelular, alteração de seu formato típico, visto que as células tornaram-se arredondadas, encolhidas, com condensação do núcleo e vacuolização citoplasmática. Estes resultados são convergentes com aqueles observados no sistema de perfusão de rim isolado, como a redução do percentual de transporte de sódio observada após infusão da LAAOBM no sistema, uma vez que as células MDCK são uma linhagem celular de túbulos renais distais.

Outros estudos *in vitro* com túbulos renais isolados e, portanto, na ausência de fatores hemodinâmicos e sistêmicos, possibilitou a demonstração de efeitos tóxicos diretos do veneno também em células epiteliais imortalizadas MDCK, em que o veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* aumentou a liberação da enzima de lactato desidrogenase, um marcador de morte celular por necrose, e diminuiu a incorporação do Vermelho Neutro. Este efeito lesivo sobre a viabilidade celular veio acompanhado de alterações do citoesqueleto, especificamente sobre ocludinas e caderinas, envolvidas nas junções entre as células (COLLARES-BUZATO; DE PAULA; CRUZ-HOFLING, 2002).

É importante destacar que frações LAAO têm sido caracterizadas com funções distintas como preferência de substrato, indução de apoptose, citotoxicidade, hemólise, agregação plaquetária, indução de hemorragia, edema e atividades bactericidas (ALI *et al.*, 2000; DU; CLEMETSON, 2002; COOPER; PINTO, 2005; TORRES *et al.*, 2010) e atividade

anti-HIV (KOMMOJU *et al.*, 2007). Entretanto, todos parecem concordar que a fração LAAO produz peróxido de hidrogênio durante sua reação enzimática e que muitos de seus efeitos são devidos à ação secundária deste agente oxidante.

Diversos autores já demonstram que a LAAO isolada do veneno de serpentes é capaz de induzir ou inibir a agregação plaquetária. Embora esses resultados sejam controversos, todos estão certos de que estes efeitos são devidos à liberação de H_2O_2 (NATHAN *et al.*, 1982; DU; CLEMETSON, 2002; MELO, 2007).

Durante o estresse oxidativo, H_2O_2 em níveis baixos tem uma função de ativação e transcrição de alguns genes que poderiam prevenir a morte celular. Contudo, um aumento na concentração de H_2O_2 induz um atraso no crescimento e morte celular por apoptose (SOUZA *et al.*, 1999, DU; CLEMETSON, 2002). Alguns estudos demonstraram que a indução de apoptose por LAAO envolvida nas vias das caspases é secundária à produção de H_2O_2 (MELO, 2007).

Desta forma, de acordo com a análise do efeito citotóxico da LAAOBM sobre as células MDCK pode-se sugerir que esta atividade é devida à ação do peróxido de hidrogênio.

Os efeitos citotóxicos de LAAO de venenos de serpentes, bem como indução de apoptose/necrose têm sido demonstrados em diversas linhagens celulares. Recentemente foi demonstrado que LAAO do veneno de *Crotalus adamanteus* induziu apoptose em células endoteliais de cordão umbilical humano, bem como em alguns tipos de células tumorais. Apoptose tem sido definida como morte celular programada, caracterizada pelo ilustre exemplo de eventos celulares morfológicos e bioquímicos (SOUZA *et al.*, 1999).

Samel *et al.* (2006) descreveram uma LAAO de *Vipera berus berus* que, em baixas concentrações e pouco tempo de incubação, em células K562 (leucemia mielóide crônica humana) não induziu apoptose. No entanto, após 24 horas de incubação, ocorreu indução de apoptose e inibição da mesma quando incubada com catalase, indicando a função do peróxido de hidrogênio no processo.

A LAAO isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox* induziu efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral JURKAT (leucemia de células T); B16F10 (melanoma de células de camundongo) e PC12 (célula tumoral - feocromocitoma de glândula adrenal de rato) e não apresentou efeito citotóxico quando incubada com células de células mononucleares do sangue (MELO, 2007).

Araki *et al.* (1993) demonstraram que venenos de serpentes com atividade hemorrágica induzem apoptose em células endoteliais vasculares. Muitos outros estudos

relatam a indução de apoptose por LAAO de vários venenos de serpentes, incluindo víboras, em diferentes linhagens celulares como células de leucemia T humanas (MOLT-4) (SUHR; KIM, 1996), células de leucemia humana promielocítica (HL-60) (TORII *et al.*, 1997), células monocíticas humanas (MM6) com confirmação da apoptose pela fragmentação do DNA das células tratadas com LAAO (ALI *et al.*, 2000).

Torii *et al.* (2000) descreveram que a fração LAAO isolada do veneno de serpente *Crotalus atrox* induziu apoptose em células embrionárias de rim humano (293T). O número de células no organismo humano, e também no rim, reflete o equilíbrio entre a proliferação de novas células e a morte celular por apoptose. Muitas formas de injúrias celulares tubulares ou glomerulares estão associadas com um ou ambos os processos. Um acréscimo na taxa de apoptose após obstrução ureteral ou necrose tubular aguda está inicialmente associado com um decréscimo no número de células tubulares epiteliais. A apoptose de células tubulares epiteliais distais e proximais também tem sido reportada em muitos tipos de doenças renais tubulointersticiais tanto agudas quanto crônicas (SHANKLAND; WOLF, 2000).

Diversos genes estão envolvidos no controle da apoptose. Alguns dentre estes desempenham funções antiapoptóticas, como os genes *BCL-XL*, *MCL-1* e *A1*, e outros, como o *BAX*, *BAK* e *BAD*, agem como promotores da morte celular programada (HALE; SMITH; SUTHERLAND, 1996). Esta, por sua vez, pode ocorrer por duas vias principais: a via extrínseca, mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática; e a via intrínseca, dependente da participação da mitocôndria (FISHER, 2001).

Para avaliarmos o papel da apoptose nos efeitos da LAAOBM em relação a sua citotoxicidade sobre as células MDCK, pesquisamos a expressão de três genes envolvidos no processo de morte celular programada: os genes *BAX*, *BCL-XL* e *MCL-1*. Estes genes pertencem à família de proteínas BCL-2 que está envolvida na via intrínseca deste tipo de morte celular (DEVARAJAN *et al.*, 2003). Entretanto, não houve alteração significativa na expressão destes genes após 24 horas de incubação das células MDCK com a LAAOBM. Diante deste resultado podemos inferir que a redução da viabilidade das células MDCK após incubação com a LAAOBM pode ser mediada por genes envolvidos na via extrínseca da apoptose ou ainda ser decorrente de um processo necrótico.

Necrose e apoptose são dois processos distintos de morte celular tanto em sua morfologia quanto em seu mecanismo. Apoptose é regulada geneticamente e caracterizada por redução do tamanho da célula, condensação da cromatina, compactação das organelas, clivagem sistemática do DNA. Em contraste, na necrose, a membrana plasmática é o principal

sítio do dano celular levando à intumescimento da célula que resultará no rompimento de sua membrana (HEALY *et al.*, 1998). A quantificação da apoptose pela microscopia óptica é possível, entretanto a visualização das células apoptóticas torna-se muito difícil pelo processo acontecer em poucas horas e as células serem fagocitadas rapidamente (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992). Portanto, tomando por base nossas observações com microscópio invertido, não é possível distinguirmos o tipo de morte celular induzida pela LAAOBM nas células MDCK.

7 CONCLUSÃO

A fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* (LAAOBM) foi capaz de induzir alterações nos parâmetros renais em modelo de perfusão de rim isolado, promovendo redução da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular.

A LAAOBM quando incubada com células tubulares renais MDCK promoveu uma redução significativa da viabilidade destas células e na análise histopatológica dos rins perfundidos com a LAAOBM foi observado deposição abundante de material proteico nos túbulos renais e glomérulos, embora sem indícios de morte celular.

Sugere-se, então, que os resultados observados com a infusão da LAAOBM em perfusão de rim isolado devem-se, provavelmente, a seu efeito citotóxico direto sobre as células tubulares renais distais, estando esta fração envolvida no efeito nefrotóxico do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*, tendo em vista que, a exemplo do veneno bruto, a LAAOBM também promoveu uma redução da percentagem de transporte tubular de sódio e cloreto.

Esperamos dar continuidade a esta pesquisa buscando mais respostas para os resultados encontrados, tais como o papel da participação do peróxido de hidrogênio e da via extrínseca da apoptose nos efeitos nefrotóxicos induzidos pela LAAOBM.

Diante do exposto, podemos considerar que a fração LAAO isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* é um tipo de enzima multifuncional que pode servir de ferramenta para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos dos acidentes ofídicos e, devido ao seu potencial biotecnológico, pode também ser usada como modelo para agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 924–927, 1998.
- AHN, M. Y.; LEE, B. M.; KIM, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p. 911-919, 1997.
- ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmohoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 216–226, 2000.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, O. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp. Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
- ANDE, R. S. ; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.
- APOPTOSE. Disponível em:<<http://www.artigosobre.com/Apoptose>>. Acesso em: 8 July 2010.
- ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, p. 148-153, 1993.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: 1. Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACO P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, London, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, 2002.

BARBOSA, P. S.; MARTINS, A. M.; ALVES, R. S.; AMORA, D. N.; MARTINS, R. D.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NASCIMENTO, N. R.; ROCHA, V. L.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 837-837, 2006.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **J. Bras. Med.**, v. 65, p. 209-250, 1993.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 735-746, 2003.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Histologic and unctional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 698-706, Nov. 1999.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A., CRUZ-HOFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 2, p. 217-222, Aug. 2002.

BONFIM, V. L.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; OLIVEIRA, C. R. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Protein Chem.**, v. 20, p. 239-245, 2001.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

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

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S.; DE SOUZA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 199–207, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Agravos de Notificação. **Estatística 2009**. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 11 out. 2010.

_____. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998.

_____. **Manual de diagnóstico e tratamento por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B.; BARRETO, O. C.; MARCONDES, M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 1, p. 82-88, 1993.

BURDMANN, E. A.; VIEIRA, J. R.; VIDAL, E. C. Nefropatia tóxica e tubulointersticial. In: RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios eletrolíticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. p. 472-474.

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

BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new γ -amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, v. 46, p. 479-489, 2005.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

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

CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; YU, L. *Bothrops* snake venom causes direct tubular nephrotoxicity. **Renal Fail.**, v. 21, p. 571-572, 1999.

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

CHANDRASHEKARA, K. T.; NAGARAJU, S.; USHA NONDINI, S.; BASAVAIHAH; KEMPARAJU, K. Neutralization of local and systemic toxicity of *Daboia russeli* venom by *Morus Alba* plant leaf extract. **Phytother. Res.**, v. 23, n. 8, p. 1082-1087, 2009.

CHAVES, T. S. Ação do veneno de *Bothrops leucurus* e da radiação laser De (gaalas, 780nm) em músculo tibial de ratos inoculados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 21., Salvador, 2008. **Resumo...** Salvador, 2008. p. 1131-1134

CHIPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p.1270-1303, 1991.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103-121, 1977.

COOPER, A. J. L.; PINTO, J. T. Aminotransferase, L-amino acid oxidase and b-lyase reactions involving L-cysteine S-conjugates found in allium extracts. Relevance to biological activity? **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 209-220, 2005.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência renal aguda. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 307-324, 2003.

COSTANZO, L. S. Fisiologia renal. In: _____. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

COVIELLO, A. Fisiologia do rim. In: CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia humana de Houssay**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 452-481.

CUPO P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S.E.; MENEZES, J. B. Acidentes ofídicos: análise de 102 casos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 21., São Paulo, 1985. **Resumo...** São Paulo, 1985.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **J. Biol. Chem.**, v. 243, n. 9, p. 2306-2314, 1968.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, n. 265, p. 49-72, 2002.

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

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

DEVARAJAN, P.; MISHRA, J.; SUPAVEKIN, S.; PATTERSON, L. T.; POTTER, S. S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. **Mol. Gen. Metabol.**, v. 80, p. 365-376, 2003.

DRAIBE, A. S. Insuficiência renal crônica. In: AJZEN, H.; SCHOR, N. **Nefrologia: guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. Barueri: Manole, 2002. p. 179-80.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, p. 659-665, 2002.

DUMBACHER, J. P.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowwaldi*) from New Guinea. **PNAS**, v. 97, n. 24, p. 12970-12975, 2000.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCROMA, M.; BURKITT, M.; SJOHOLM, A.; STROM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 30553-30560, 1994.

EVANGELISTA, I. L. **Caracterização das atividades cardiorenal e neural de *Bothrops marajoensis* e suas frações**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2009.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M.; NASCIMENTO, N. R.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S.; DE NORÕES, T. B.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Renal and cardiovascular effects

of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 295-301, jul./ago. 1997.

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

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

FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci.**, v. 33, n. 5, p. 431-436, 1983.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2, p. 191-197, 1998.

FISHER, D. E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 15, n. 5, 2001.

FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos.** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

FÜLLEKRUG, J.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Identification of glycosylated marker proteins of epithelial polarity in MDCK cells by homology driven proteomics. **BMC Biochem.**, v. 7, n. 8, p. 1-9, 2006.

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

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, A. M.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activiy

of south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **J. Venom. Anim. Toxin. Incl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 186-201, 2003.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell. Biol.**, v. 119, n. 3, p. 493-502, 1992.

GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Hum. Pathol.**, v. 32, p. 1029-1038, 2001.

GOULART, C. E. S. **Ofidismo.** Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/artig146.htm>>. Acesso em: 12 maio 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUYTON, A. C. Formação de urina pelos rins. In: _____. **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 307-326.

HAGAR, H.; UEDA, N.; SHAH, S. V. Endonuclease induced damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells. **Kidney Int.**, v. 49, p. 355-361, 1996a.

_____. Role of oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 209-215, 1996b.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; STONEMAN, V. E.; LONGTHORNE, V.; CULHANE, A. C.; WILLIAMS, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, p. 1-26, 1996.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of Bothrops jararacussu venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, n. 12, Dec. 2001.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A new C-type animal lectin isolated from Bothrops pirajai is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HEALY, E.; DEMPSEY, M.; LALLY, C.; RYAN, M. P. Apoptosis and necrosis:

mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1955-1966, 1998.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (White-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. L-amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 27, p. 505-512, 2003.

INSTITUTO BUTANTAN. **O Butantan e as serpentes do Brasil**. São Paulo, 1996. 1 CD-ROM.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, n. 17, p. 306-313, 1999.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in the snake venoms. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology (snake venom)**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. v. 52, p. 75-84.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biogarnic. Med. Chem.**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

IZIDORO, L. F. M. **Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de serpente *Bothrops pirajai***. 74 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

JORGE DA SILVA, N. Micurus. In: NICOLELLA, BARROS, E.; TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B. (Ed.). **Acidente com animais peçonhentos: consulta rápida**. Porto Alegre, 1997.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 34, p. 347-354, 1992.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; SANO-MARTINS, I. S.; HUTTON, R. A.; RUGMAN, F. P.; WARRELL, D. A.; HAY, C. R. M. Coagulopathy and hemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. **Toxicon**, v. 29, n. 8, p. 961-972, 1991.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. **Toxicon**, v. 14, p. 359-374, 1995.

KANZAWA, N.; SHINTANI, S.; OHTA, K.; KITAJIMA, S.; EHARA, T.; KOBAYASHI, H.; KIZAKI, H.; TSUCHUYA, T. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 422, p. 103-109, 2004.

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

KOMMOJU, P. R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Protein Expr. Purif.**, v. 52, p. 89-95, 2007.

LEMO, J. C.; ALMEIDA, T. A.; FOOK, S. M. L.; PAIVA, A. A.; SIMÕES, M. O. S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 12, n. 1, p. 50-59, 2009.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349-1358, 1994.

LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J. S. Potential consequences of ATP depletion in proximal tubular cells in culture: sublethal injury, necrosis and apoptosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p. 1828, 1996.

LIN, H-H.; YANG, T-P.; JIANG, S-T.; YANG, H-Y.; TANG, M-J. Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced madin-darby canini kidney simple epithelial cyst formation. **Kidney Int.**, v. 55, p. 168-178, 1999.

LORO, L. L.; A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, p. 125-138, 2003.

MACHEROUX, P.; SETH, O., BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARTS, M.; KURFÜST, M.; AU, L.; GHISLA, S. L-amino acid oxidase from the Malayan Pit Viper *Calloselasma rhodostoma*: Comparative sequence analysis and characterization of active forms of the enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 1679-1686, 2001.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganos* concolor: a case of venom paedomorphosis? **Copeia**, v. 4, p. 769-782, 2003.

MÁLAQUE; C. M. S.; FRANÇA, F. O. S. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. (Ed). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003a. p. 6-12.

MÁLAQUE; C. M. S.; FRANÇA, F. O. S. Acidente Botrópico. In: ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. (Ed). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003b. p. 33-59.

MADARA, J. L. Contributions of the paracellular pathway to secretion, absorption, and barrier function in the epithelium of the small intestine. In: LEBENTHAL, E.; DUFFEY, M. (Ed.). **Textbook of secretory diarrhea**. New York: Raven Press, 1990. p. 125-138.

MANRIQUE, F. E. L. **Purificación, caracterización y actividad biológica de una L-aminoácido oxidase presente em el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “jergon”**. Tese (Doutorado) - Universidade Nacional Mayor de Marco, Lima, 2005.

MARINO, P. L. Oligúria e insuficiência renal aguda. In: _____. **Compêndio de UTI**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 479-490.

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

MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C.; BARBOSA, P. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; APRÍGIO, C. C.; QUEIROZ, M. G.; GUARNIERI, M. C.; HAVT, A.; DE MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 595-599, 2005.

MCDOWELL, S. Systematics. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: McGraw-Hill, 1987. p. 3-50.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

MELO, R. A. **Isolamento e Caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, p. 198-200, 1999.

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

MOUSTAFA, I. M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A. Y.; VRIELINK, A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 991-1002, 2006.

NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of a platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. **Thromb. Haemost.**, v. 48, p. 277-282, 1982.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 8 July 2010.

NISHITSUTSUJI-UWO, J. W.; ROSS, B. D.; KREBS, H. A. Metabolic activities of the isolation perfused rat kidney. **Biochem. J.**, v. 103, n. 3, p. 852-862, 1967.

NISHIZAWA, T. C. C. A.; SHERMAN, D. H. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieira aerocolonigenes* ATCC 39243. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2084-2092, 2005.

NOGUEIRA, R. M.; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Rev. Cons. Fed. Med. Vet.**, v. 31, p. 47-56, 2004.

OLIVEIRA, A. L.; PINTO, J. L. F.; FONSECA, A. L. A., CAPUTTO, L. Z.; FONSECA, F. L. A. Avaliação Epidemiológica e Laboratorial de Pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). **Rev. Patol.Trop.**, v. 37, n. 3, p. 268-274, jul./set. 2008.

PATOLOGIA Geral e Citopatologia: mecanismos da apoptose. Disponível em:<http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=202&materiaver=1#>. Acesso em 08/07/2010.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PAWELEK, P. D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structural of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO J.**, v. 19, p. 4204-4215, 2000.

PEIXOTO, E. B. M. I. **Modulação *in vitro* da função de barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK.** 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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

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

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

PUORTO, G. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos.** São Paulo: Sarvier, 1992. p. 143-149.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RAAB, W.; KAISER, E. Nephrotoxic action of snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p. 1017-1020, 1966.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. Toxicol. Pharmacol.*, v. 142, n. 3/4, p. 328-346, Mar./Apr. 2006.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F.; BAMBIIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, n. 3, p. 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, n.5, 1995.

ROCHA, I. C. A. **Estudo Epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 216, 1949.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente Americano. In: SOERENSEN, B. (Ed.). **Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. p. 1-46.

ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETJIAN, J. C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J. C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 865-73, 2000.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.

ROZE, J. A. Coral snakes of the Americas. In: _____. **Biology, identification, and venoms**. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996.

RUSSEL, F. E.; DART, R. C. Toxic effects of animal toxins. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poison**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 354-382.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 707–714, 2006.

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

SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamento por Animais Peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 289-309.

SANT, S. M.; PUNDARE, N. M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to the renal lesions. **J. Postgrad. Med.**, v. 18, p.181-188, 1972.

SANTOS, M. F. L.; FERANI, M. C.; ROCHA, P. N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp e *Crotalus* sp: revisão e análise crítica da literatura. **J. Bras. Nefrol.**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 2009.

SANTOS, O. F. P.; BOIM, M. A.; SCHOR N. Insuficiência renal aguda. In: RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos**. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003. p. 388-401.

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETTI, M.; BISCOGLIO, M. J.; RIVERA, E.; CRESCENTI, E. J.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **J. Proteomics**, v. 71, p. 46-60, 2008.

SAVILL, J.; MOONEY, A.; HUGHES, J. Apoptosis and renal scarring. **Kidney Int.**, v. 54 Suppl., p. 14-17, 1996.

SERPENTE *Bothrops marajoensis*. Disponível em: <http://www.afpmb.org/pubs/living_hazards/B1MARAJO.jpg>. Acesso em: 7 July 2010.

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

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. In: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. cap. 28, p. 997-1018.

SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins**, v. 8, n. 2, p. 271-277, 1999.

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

SOUZA, D. H.; EUGENIO, L. M.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 368, p. 285–290, 1999.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni* biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 132-140, 2007.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substrate that induce apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, p. 134–139, 1996.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 125, p. 305–309, 1999.

SUN, L. K.; YOSHII, Y.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H.; SAITO, A.; HARAKUNI, T. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicol. In Vitro**, v. 17, p. 169–177, 2003.

TAKATSUKA, Y.; SAKURAI, A.; YOSHIKA, T.; KOKUBO, Y.; USAMI, M.; SUZUKI, T.; MATSUI, K.; TITANI, H.; YAGI, M.; MATSUMOTO, Y. FUJIMURA, Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffi* with special reference to platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 267- 277, 2001.

TANG, M. J.; CHENG, Y. R.; LIN, H. H. Role of apoptosis in growth and differentiation of renal proximal tubule cells in primary cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, p. 658-664, 1996.

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

TORRES, A. F. C. **Ação Antibacteriana, Antifúngica e Antiparasitária dos Venenos das Serpentes *Bothrops leucurus* e *Bothrops marajoensis* e de suas frações Fosfolipase A₂ e L-Aminoácido Oxidase.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

TORRES, A. F. C.; COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795–804, 2010.

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

TORRI, S.; YAMANE, K.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of Apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 272, p. 3197–3205, 2000.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. de O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

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

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* hypotensis: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 371, p. 515-550, 2008.

VIKRANT, S.; AGARWAL, S. K.; GUPTA, S.; BHOWMIK, D.; TIWARI, S. C.; DASH, S. C.; GULERIA, S.; MEHTA, S. N. Prospective randomized control trial of isoniazid

chemoprophylaxis during renal replacement therapy. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 7, n. 3/4, p. 99-108, 2005.

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

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

WIEGELE, G.; BRANDIS, M.; ZIMMERHACKL. Apoptosis and necrosis during ischemia in renal tubular cells (LLC-PK₁ and MDCK). **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 13, p. 1158-1167, 1998.

WISTEN, S.; DALAL, F. R. **Manual of clinical laboratory procedures for nonroutine problems**. Ohio: The Chemical Rubber Co. Press, 1972.

WOLFGANG, W.; ROGER, S. T.; PUORTO, G. Systematics of the Bothrops atrox complex. **Herpetologica**, v. 52, n. 2, p. 263-271, 1996.

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

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

ZATZ, R. Insuficiência renal crônica: mecanismos de adaptação e progressão. In: RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1996. p. 450-455.

ZHANG, L.; WANG, J. H.; LEE, W. H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y. T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 598–604, 2003.

ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing

activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 60, p. 974–977, 2004.

ZHANG, L.; CUI, L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, p. 1095-1103, 2007.

ZELER, A. E. Snake venom action: are enzymes involved in it? **Experientia**, v. 33, p. 143-150, 1977.

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

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, p. 1-15, 2006.