

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

**DANIELA NASCIMENTO AMORA**

**ESTUDO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
ISOLADA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* EM RIM  
ISOLADO DE RATO E EM TÚBULOS PROXIMAIS ISOLADOS DE  
COELHO**

**Fortaleza**

**2008**

**DANIELA NASCIMENTO AMORA**

**ESTUDO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
ISOLADA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* EM RIM  
ISOLADO DE RATO E EM TÚBULOS PROXIMAIS ISOLADOS DE  
COELHO**

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

Orientador (a): Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

**Fortaleza**

**2008**

# DANIELA NASCIMENTO AMORA

## ESTUDO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> ISOLADA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* EM RIM ISOLADO DE RATO E EM TÚBULOS PROXIMAIS ISOLADOS DE COELHO

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

### BANCA EXAMINADORA

---

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

---

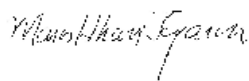
Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará- UFC

---

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo  
Universidade Federal do Ceará- UFC



---

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama  
Universidade Estadual Paulista- UNESP

À Gabriela e à  
Josefa Januária do Nascimento  
*(in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Helena Serra Azul Monteiro pela importante e indispensável participação na minha formação acadêmica e pela amizade.

Ao Dr. Joel M. Weinberg pela inestimável parceria e pelo auxílio incondicional durante a realização do presente trabalho.

À Nancy F. Roeser pelo imprescindível trabalho de transferência de conhecimento, pela prestatividade, pela técnica excelente utilizada nos procedimentos experimentais e pelo companherismo.

À Tiffany Ostrowski pelo auxílio no aprendizado das técnicas utilizadas e pela amizade.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama e Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão por contribuírem na importante fase de conclusão do meu trabalho.

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins pela amizade e pela grande colaboração.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes pela imprescindível contribuição nas análises histopatológicas e nas publicações de trabalhos científicos.

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama por ter fornecido gentilmente parte das toxinas utilizadas na presente tese.

À Dra. Marta Regina Magalhães pela inestimável colaboração e por ter cedido gentilmente fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

À Dra. Rita Maria Dantas Nogueira, minha mentora e eterna fonte de inspiração.

À Ruth Senter e à Sílvia Helena Silva França pelo excelente trabalho nas dosagens bioquímicas.

Ao Dr. Paulo Sérgio Ferreira Barbosa e à Renata de Sousa Alves pela amizade e pela inestimável colaboração nos meus trabalhos.

Ao Dr. Pedro J. C. Magalhães e ao Davi M. Jucá pela ajuda na realização dos estudos cardiovasculares.

À Beatriz Helena Serra Azul e à Emily Iglehart pela valiosa colaboração nos assuntos administrativos e pela amizade.

Aos queridos colegas Adalberto Neto, Antônio Gomes da Silva Neto, Antônio Rafael Coelho Jorge, Claudênio D. Alves, Daniel Freire, Diego G. Maia, Felipe Aragão, Fabíola Carine, Ieda Pereira de Souza, Isadora Oliveira, João Vítor Almeida, Rodrigo T. Dantas e Rene M. Duarte.

Ao Professor Francisco Belmino Romero - Coordenador de Recursos Humanos da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará.

À Rosangela Alves Viana - Diretora da Capacitação de Recursos Humanos da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará Aura Hanes, Fernando Rodrigues Teixeira, Francisco Antônio Terto Nunes, Irislene Ferreira de Assis, Jociê Silva, José Amadeus Souza, Rose Ferreira e Terezinha França.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará Edvaldo de Sousa Siqueira, Flávio Pereira Gadelha, Fco. Eliezer Martins da Silva, João Luis Holanda Façanha, Raimundo Cezar C. do Nascimento, Rosane Maria Costa e Valder C. Maia Mendonça.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro indispensável para a realização do presente trabalho.

À Universidade de Michigan pelo importante apoio financeiro.

À minha família.

“Todas as histórias do mundo são tecidas com a trama de nossa própria vida.  
Remotas, obscuras, são mundos paralelos, vidas possíveis, laboratórios  
onde se experimenta com as paixões pessoais.”

Ricardo Piglia, escritor argentino.

## RESUMO

### ESTUDO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> ISOLADA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* EM RIM ISOLADO DE RATO E EM TÚBULOS PROXIMAIS ISOLADOS DE COELHO

**Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará. Daniela Nascimento Amora, Tese de Doutorado em Farmacologia – UFC, 2008. Orientadora: Dra. Helena Serra Azul Monteiro.**

Apesar de muito se discutir sobre os efeitos citotóxicos dos venenos ofídicos, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos de ação sobre as diversas células, e em especial, sobre as células renais. No caso particular da citotoxicidade dos venenos crotálicos, tem-se postulado a participação de diversos metabólitos da hidrólise de lipídios de membrana, e, mais recentemente, da disfunção mitocondrial. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* sobre rim isolado de rato assim como estudar a toxicidade e as alterações da função mitocondrial induzidas pelas FLA<sub>2</sub>s de pâncreas de porco (PFLA<sub>2</sub>) e de veneno da *C. d. terrificus* (VSFLA<sub>2</sub>) em suspensões de túbulos proximais (TP). No rim isolado foi observado aumento no fluxo urinário, no ritmo de filtração glomerular (RFG) e na pressão de perfusão (PP) enquanto ocorreram decréscimos nos percentuais de transporte total de sódio (%TNa<sup>+</sup>), de potássio (%TK<sup>+</sup>) e de cloreto (%TCl). Na análise histopatológica foi observada a deposição de material proteináceo nos túbulos de rins perfundidos com FLA<sub>2</sub>. No estudo de suspensões de TP tratadas com PFLA<sub>2</sub> e com VSFLA<sub>2</sub> foi observado que estas induziram injúria celular, sugerida pelo aumento na liberação de lactato desidrogenase (LDH), promoveram aumentos nos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e diminuíram o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), sem, no entanto, alterar os níveis de ATP. Em relação ao  $\Delta\Psi_m$ , a PPFLA<sub>2</sub> não produziu efeitos nas concentrações mais elevadas, apesar de ter aumentado, significativamente, na menor concentração. As concentrações mais elevadas da FLA<sub>2</sub> crotálica, entretanto, induziram um decréscimo significativo no  $\Delta\Psi_m$ . A adição de BSA reverteu completamente os efeitos das FLA<sub>2</sub>s sobre o  $\Delta\Psi_m$ . No estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) foi observado que a PFLA<sub>2</sub> e a VSFLA<sub>2</sub> promoveram a liberação da safranina O e, por entanto, induziu a formação de PMT, apesar da leve edema mitocondrial produzido. Conclui-se que as fosfolipases A<sub>2</sub> de pâncreas de porco e do veneno da *C. d. terrificus* produziram um efeito citotóxico em preparações de túbulos proximais evidenciado pelo aumento na liberação de LDH, além de promoverem alterações no potencial mitocondrial de membrana, o que sugere alteração da função mitocondrial por essas enzimas. Em rim isolado, foi observado que a FLA<sub>2</sub> crotálica promoveu alterações da função renal.

**Palavras-chave:** *Crotalus*, fosfolipases A<sub>2</sub>, túbulos proximais renais, ácidos graxos não-esterificados, mitocôndrias, toxicidade, rim



## ABSTRACT

### STUDY OF TOXICITY INDUCED BY PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> ISOLATED FROM *Crotalus durissus terrificus* SNAKE VENOM ON ISOLATED RAT KIDNEY AND ON ISOLATED RABBIT PROXIMAL TUBULES.

Department of Physiology and Pharmacology - Faculty of Medicine - Federal University of Ceara. Daniela Nascimento Amora, Doctoral Thesis - UFC, 2008. Supervisor: Dr. Helena Serra Azul Monteiro.

Although the increasing interest on biological effects of snake venoms, their cytotoxic as well as their nephrotoxic mechanisms are still unknown. In the particular case of crotalic venoms, it has been postulated the participation of several metabolites from membrane phospholipids hydrolysis and more recently, mitochondrial dysfunction. The present work investigated the renal effects promoted by the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in the isolated rat kidney. Addition of PLA<sub>2</sub> increased UF, GFR and PP, while reducing %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup> and %TCI<sup>-</sup>. The histological analysis showed a mild amount of a proteinaceous substance in the renal tubules of kidneys perfused with PLA<sub>2</sub>. In the present study also showed that the phospholipase A<sub>2</sub> isolated from porcine pancreas (PPLA<sub>2</sub>) and from *C d terrificus* snake venom (SVPLA<sub>2</sub>) produced cellular injury suggested by the increase in LDH release and increased nonesterified fatty acid (NEFA) levels from rabbit proximal tubules in suspension. Furthermore, the SVPLA<sub>2</sub> induced a decrease in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) assessed by both JC-1 uptake and safranin O uptake. PPLA<sub>2</sub> produced no effects on  $\Delta\Psi_m$  with the highest concentrations, and an unexpected increase in the group treated with the lowest concentration. Addition of BSA completely reversed the effects induced by phospholipases on  $\Delta\Psi_m$ . It was observed no changes in cell ATP levels. Finally, to determine whether mitochondrial membrane permeability was affected by PPLA<sub>2</sub> and SVPLA<sub>2</sub>, we measured the change safranin O uptake to assess both changes in mitochondrial volume and in  $\Delta\Psi_m$ . The latter was affected by both PLA<sub>2</sub>s although small alterations in the mitochondrial volume were observed. We conclude that the treatment of proximal tubule suspensions with porcine or crotalic PLA<sub>2</sub>s disturbed the membrane integrity as well as the mitochondrial function. Furthermore, crotalic PLA<sub>2</sub> altered renal function in the isolated rat kidney preparation.

**Key words:** *Crotalus*; phospholipases A<sub>2</sub>; kidney tubules, proximal; fatty acids, nonesterified mitochondria; toxicity; kidney

## LISTAS DE FIGURAS

<b>FIGURA 01.</b> Esquema das três principais vias metabólicas do ácido araquidônico.....	23
<b>FIGURA 02.</b> Desenho esquemático da mitocôndria mostrando a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa .....	29
<b>FIGURA 03.</b> Mecanismos de desacoplamento da fosforilação oxidativa induzido por ácidos graxos .....	30
<b>FIGURA 04.</b> Mecanismos de citotoxicidade dos AGNE .....	31
<b>FIGURA 05.</b> Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado .....	40
<b>FIGURA 06.</b> Procedimento cirúrgico para isolamento do córtex renal .....	45
<b>FIGURA 07.</b> Isolamento de túbulos proximais de coelho .....	46
<b>FIGURA 08.</b> Fluorômetro Alphascan.....	52
<b>FIGURA 09.</b> Fluorômetro Deltascan.....	52
<b>FIGURA 10.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> na pressão de perfusão .....	58
<b>FIGURA 11.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> na resistência vascular renal.....	58
<b>FIGURA 12.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> no fluxo urinário .....	59
<b>FIGURA 13.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> no ritmo de filtração glomerular.....	59
<b>FIGURA 14.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> no percentual de transporte tubular total de sódio.....	60
<b>FIGURA 15.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> no percentual de transporte tubular total de potássio.....	60
<b>FIGURA 16.</b> Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> no percentual de transporte tubular total de cloreto .....	61
<b>FIGURA 17.</b> Análise histológica do rim do grupo controle.....	62
<b>FIGURA 18.</b> Análise histológica de rim perfundido com fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da <i>C. d. terrificus</i> revelando a presença de quantidade moderada de material proteináceo nos túbulos renais e glomérulo normal .....	63
<b>FIGURA 19.</b> Níveis de LDH em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática .....	64
<b>FIGURA 20.</b> Níveis de LDH em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica .....	64

<b>FIGURA 21.</b> Conteúdo celular de ATP de Túbulos Proximais Tratados com fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática.....	<b>65</b>
<b>FIGURA 22.</b> Conteúdo celular de ATP de Túbulos Proximais Tratados com fosfolipase A <sub>2</sub> isolada da <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	<b>65</b>
<b>FIGURA 23.</b> Níveis de AGNE em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática .....	<b>66</b>
<b>FIGURA 24.</b> Níveis de AGNE em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 25.</b> Níveis de AGNE totais em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática .....	<b>67</b>
<b>FIGURA 26.</b> Níveis de AGNE totais em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica.....	<b>68</b>
<b>FIGURA 27.</b> Comportamento da recaptação de JC-1 em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 28.</b> Comportamento da recaptação de JC-1 em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica.....	<b>69</b>
<b>FIGURA 29.</b> Decréscimo na recaptação de safranina O induzido pela fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática .....	<b>71</b>
<b>FIGURA 30.</b> Decréscimo na recaptação de safranina O induzido pela fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica .....	<b>72</b>
<b>FIGURA 31.</b> Decréscimo na recaptação de safranina O induzido pela fosfolipase A <sub>2</sub> pancreática .....	<b>74</b>
<b>FIGURA 32.</b> Decréscimo na recaptação de safranina O induzido pela fosfolipase A <sub>2</sub> crotálica .....	<b>75</b>
<b>FIGURA 33.</b> Expressão da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) em suspensões de túbulos proximais induzida por cálcio.....	<b>77</b>
<b>FIGURA 34.</b> Alteração do potencial de membrana mitocondrial induzida por fosfolipases A <sub>2</sub> pancreática e crotálica em suspensões de túbulos proximais .....	<b>78</b>
<b>FIGURA 35.</b> Alteração do potencial de membrana mitocondrial induzida por fosfolipases A <sub>2</sub> pancreática na presença e na ausência de cálcio.....	<b>79</b>
<b>FIGURA 36.</b> Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais na presença de poro de permeabilidade mitocondrial de transição .....	<b>80</b>
<b>FIGURA 37.</b> Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais na ausência do poro de permeabilidade mitocondrial de transição .....	<b>80</b>
<b>FIGURA 38.</b> Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais após adição de fosfolipase A <sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco.....	<b>81</b>
<b>FIGURA 39.</b> Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais após adição de fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	<b>81</b>

<b>FIGURA 40.</b> Ausência do poro de permeabilidade mitocondrial de transição em suspensão de túbulos proximais tratada com cálcio .....	<b>82</b>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

## LISTAS DE TABELAS E QUADROS

<b>TABELA 01.</b> Características de alguns dos principais ácidos graxos encontrados em tecidos de mamíferos .....	26
<b>TABELA 02.</b> Fórmulas utilizadas para cálculo dos parâmetros renais .....	43
<b>TABELA 03.</b> Efeitos da fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre os percentuais de transportes proximais de eletrólitos .....	61
<b>TABELA 04.</b> Efeitos da fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre o <i>clearance</i> osmótico .....	62
<b>QUADRO 01.</b> Resumo dos efeitos biológicos da fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> em rim isolado de rato .....	83
<b>QUADRO 02.</b> Resumo dos efeitos biológicos observados em túbulos proximais isolados de coelho .....	83
<b>QUADRO 03.</b> Efeitos biológicos de venenos brutos das serpentes <i>Crotalus durissus sp</i> em rim isolado de rato .....	85
<b>QUADRO 04.</b> Efeitos biológicos de crotoxinas das serpentes <i>Crotalus durissus sp</i> em rim isolado de rato .....	86
<b>QUADRO 05.</b> Efeitos biológicos de venenos brutos e frações crotoxina e fosfolipase A <sub>2</sub> das serpentes <i>Crotalus durissus sp</i> em rim isolado de rato .....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Bovina Sérica
CsA	Ciclosporina A
CTX	Crotoxina
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
INDO	Indometacina
28P-FLA <sub>2</sub>	28U/mL de FLA <sub>2</sub> pancreática
100P-FLA <sub>2</sub>	100U/mL de FLA <sub>2</sub> pancreática
150P-FLA <sub>2</sub>	150U/mL de FLA <sub>2</sub> pancreática
7VS-FLA <sub>2</sub>	7U/mL de FLA <sub>2</sub> isolada de veneno de serpente
14VS-FLA <sub>2</sub>	14U/mL de FLA <sub>2</sub> isolada de veneno de serpente
28 VS-FLA <sub>2</sub>	28U/mL de FLA <sub>2</sub> isolada de veneno de serpente
LDH	Lactato desidrogenase
P-AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados do sedimento ( <i>pellet</i> )
S-AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados do sobrenadante
PMT	Permeabilidade Mitocondrial de Transição
PTP	Poros Mitocondrial de Transição
HETE	Ácidos hidroieicosatetraenóicos
ETT	Ácidos epoxieicosatrienóicos

## SUMÁRIO

Resumo .....	8
<i>Abstract</i> .....	9
Lista de Figuras .....	10
Lista de Tabelas e Quadros .....	12
Lista de Abreviaturas .....	13
1. Introdução .....	17
2. Objetivos .....	37
3. Materiais e Métodos .....	39
3.1. Perfusão de Rim Isolado de Rato .....	39
3.1.1. Animais .....	39
3.1.2. Materiais .....	39
3.1.3. Descrição do sistema de perfusão de rim isolado .....	40
3.1.4. Técnica Cirúrgica .....	41
3.1.5. Ensaio experimentais .....	41
3.1.5.1. Estudo dos efeitos renais da fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	41
3.1.6. Procedimento experimental .....	41
3.1.7. Análise histológica .....	42
3.1.8. Cálculo dos parâmetros renais .....	42
3.2. Avaliação de Parâmetros Funcionais em Suspensão de Túbulos Proximais .....	44
3.2.1. Materiais .....	44
3.2.2. Cirurgia .....	44
3.2.3. Isolamento de Túbulos Proximais .....	46
3.2.4. Procedimento Experimental .....	47
3.2.5. Ensaio Experimentais .....	47
3.2.6. Mensuração da liberação de lactato desidrogenase (LDH) .....	48
3.2.7. Mensuração dos níveis de ATP .....	49
3.2.8. Ensaio de Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE) .....	49
3.2.9. Análise das Alterações no Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) através da captação de JC-1 e de Safranina O .....	50
3.2.9.1. Fluorescência JC-1 .....	50

3.2.9.2. Captação de Safranina O .....	50
3.2.10. Estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) .....	53
3.2.10.1. Ensaio Experimentais.....	54
3.3. Análise Estatística .....	55
3.4. Aspectos Éticos .....	55
4. Resultados.....	57
4.1. Avaliação dos Parâmetros Renais no Rim Isolado de Rato .....	57
4.1.1. Estudo dos efeitos renais da fosfolipase A <sub>2</sub> isolada do veneno da <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	57
4.2. Análise Histológica .....	62
4.3. Mensuração da liberação da lactato desidrogenase (LDH) .....	63
4.4. Mensuração dos níveis de ATP .....	65
4.5. Ensaio de Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE) .....	66
4.6. Fluorescência JC-1 .....	68
4.7. Captação de Safranina O .....	70
4.8. Estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) .....	76
5. Discussão.....	85
6. Conclusões.....	96
7. Considerações finais.....	97
8. Referências Bibliográficas.....	99
Anexos .....	118

## **INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

A importância dos estudos dos venenos ofídicos no contexto da saúde pública assim como no da experimentação animal tem direcionado trabalhos nas mais diversas áreas de pesquisa.

Os relatos mais antigos de avaliação de atividade biológica de venenos ofídicos remontam ao final do século XVIII (Geoffroy & Hunault, 1737; Fontana, 1781 *apud* Sells, 2003).

No Brasil, os trabalhos pioneiros de Vital Brazil com a cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Brazil, 1911) representam o antigo interesse no desenvolvimento da terapêutica dos envenenamentos ofídicos. Esta serpente tem importância histórica pelo fato de, em 1938, ter sido purificada, a partir do seu veneno, a crotoxina - primeira substância isolada de veneno de serpentes (Gralén & The Svedberg, 1938).

A utilização de modelos animais para o estudo dos efeitos sistêmicos e locais produzidos pelos venenos ofídicos tem auxiliado no diagnóstico e tratamento de pacientes picados por serpentes além de contribuir para a implementação de medidas preventivas de tais envenenamentos (Chippaux *et al.*, 1991; Aird, 2002; Sells, 2003).

Além disso, os venenos de animais são fontes importantes de agentes farmacológicos e ferramentas de pesquisa para as áreas biomédicas assim como de agentes com potencial uso terapêutico. Como exemplo de fármaco desenvolvido a partir de estudo de substâncias isoladas de venenos ofídicos, tem-se o captopril que foi produzido à semelhança de um inibidor de enzima conversora de angiotensina encontrado no veneno de *Bothrops jararaca* (Ferreira *et al.*, 1970; Cushman *et al.*, 1977; Aird, 2002; Sells, 2003).

Mais recentemente, os estudos de citotoxicidade de toxinas do veneno da cascavel têm fornecido dados promissores para uma futura utilização destas no tratamento de câncer. Como exemplo tem-se o produto natural, VRCTC-310-ONCO, resultante da combinação de duas toxinas da *Crotalus durissus terrificus*, que se encontra em fase de investigação clínica como um agente antitumorigênico (Stanchi *et al.*, 2002). Outro estudo sugere um potencial uso de toxinas isoladas de outra subespécie de cascavel, a *C.d. cascavella*, no tratamento de leishmaniose (Passero *et al.*, 2007). Têm sido observadas ainda ações analgésicas do veneno

crotálico assim como das suas frações crotóxina e crotamina (Mancin *et al.*, 1998; Picolo & Cury, 2004).

Os acidentes crotálicos apresentam a maior taxa de mortalidade entre as serpentes peçonhentas brasileiras (Brasil – MS, 2001; Pinho *et al.*, 2005), sendo as subespécies *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, estas últimas objetos de estudo da presente tese, os espécimes comumente envolvidos em tais acidentes. Esta classificação em subespécies é baseada na distribuição geográfica e em várias características morfológicas das serpentes, como o padrão das linhas longitudinais sobre o pescoço (*C.d. collilineatus*), a presença de manchas rombóides mais ou menos contrastantes, a forma e intensidade das linhas paravertebrais nucais e a presença de escamas loreais entre outras (Echeverrigaray *et al.*, 2000).

Além da diversidade morfológica e da distribuição geográfica particular das subespécies *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*, as toxinas isoladas dos venenos destas serpentes têm mostrado atividades biológicas distintas em rim isolado de rato (Martins *et al.*, 1998, 2002; Monteiro *et al.*, 2001, Amora *et al.*, 2006) e em coração isolado de cobaia (Santos *et al.*, 1990, Nogueira *et al.*, 2002).

Os diferentes componentes de venenos assim como a variação de suas atividades biológicas (Chippaux *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1992; Santoro *et al.*, 1999; Sano-Martins *et al.*, 2001; Rangel-Santos *et al.*, 2004) podem ter implicações fisiopatológicas e terapêuticas importantes.

#### ❖ **Composição e Toxicidade dos Venenos das Cascavéis Brasileiras**

Apesar do interesse conspícuo no estudo dos venenos de cascavel, somente uma fração de seus componentes tóxicos tem sido bem caracterizada.

A peçonha crotálica apresenta-se como um complexo tóxico-enzimático, sendo a crotóxina, a crotamina, a convulxina e a giroxina as principais toxinas isoladas e estudadas até o momento (Bercovici *et al.*, 1987; Rangel-Santos *et al.*, 2004; Tamietti *et al.*, 2007).

A crotóxina apresenta um perfil eletroforético semelhante nas subespécies *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*,

apesar de serem observadas diferenças nas suas propriedades biológicas e farmacológicas assim como na sua letalidade, talvez relacionadas à existência de isoformas das subunidades dessa proteína (Santoro *et al.*, 1999; Faure *et al.*, 2003; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Além de representar de 50 a 60% do peso seco dos venenos crotálicos, a crotoxina tem sido relacionada à grande parte das atividades tóxicas do veneno (Beghini *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2001; Ponce-Soto *et al.*, 2002).

O envenenamento crotálico se caracteriza principalmente por ações neurotóxicas, miotóxicas e nefrotóxicas e por distúrbios da coagulação (Ribeiro *et al.*, 1998; Sano-Martins, *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2005).

Num estudo recente sobre envenenamentos por cascavéis foi observada uma prevalência extremamente elevada de insuficiência renal aguda nas vítimas destes acidentes (Pinho *et al.*, 2005). No referido trabalho, destacou-se o efeito nefrotóxico direto induzido pelo veneno considerando-se a instalação precoce dessa patologia.

A ação neurotóxica é provocada em grande parte pela crotoxina, um dímero formado por uma fosfolipase A<sub>2</sub> ou subunidade CB e por crotapotina, uma subunidade ácida (CA) que funciona como uma proteína carreadora da CB (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971).

A crotoxina foi isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por Slotta e Frankel-Conrat em 1938 e, posteriormente, do veneno da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* por Lennon e Kaiser em 1990. Ela atua em nível pré-sináptico, nas junções neuromusculares, diminuindo a liberação da acetilcolina (Faure *et al.*, 2000). É o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular, provocando paralisias motoras e respiratórias (Ribeiro *et al.*, 1998; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Tem sido demonstrada a capacidade de crotoxina de bloquear a liberação de acetilcolina induzida pelo veneno do escorpião *Tityus serrulatus* em íleo de cobaia assim como a de inibir a captação de colina marcada em plexo mioentérico de músculo liso (De Lima & Diniz, 1985; Kattah *et al.*, 2000).

Postula-se que a toxicidade induzida em células susceptíveis à crotoxina seja decorrente da ruptura da membrana celular ou de vias de sinalização intracelulares desencadeadas pela ligação da toxina a um receptor de superfície celular (Valentim & Lambeau, 2000; Yan *et al.*, 2006).

A formação do complexo CB-CA inibe a atividade da FLA<sub>2</sub>, apesar de aumentar a toxicidade da crotoxina ao impedir a ligação não-específica da subunidade B às membranas (Križaj *et al.*, 1996; Cura *et al.*, 2002). Portanto, a crotoxina circularia na forma não-dissociada até que, uma vez em contato com a membrana alvo, se dissociaria permitindo a ligação de CB ao seu sítio de ação e a liberação da crotapotina no meio (Cura *et al.*, 2002).

Alguns estudos sugerem, ainda, que parte das propriedades farmacológicas da crotoxina está dissociada da atividade catalítica do componente fosfolipásico (Soares *et al.*, 2001; Mebs & Ownby, 1990).

#### ❖ Nefrotoxicidade dos Venenos Crotálicos

Como mencionado anteriormente, a insuficiência renal aguda (IRA) é uma das complicações sistêmicas mais comuns após o envenenamento ofídico (Amaral *et al.*, 1986; Amorim *et al.*, 1951; Silva *et al.*, 1979; Ribeiro, *et al.*, 1998; Pinho *et al.*, 2005).

Em termos morfológicos a IRA nefrotóxica humana tem sido caracterizada por alterações mais proeminentes nos túbulos proximais e com necrose tubular renal menos pronunciada quando comparada com a insuficiência renal isquêmica (Brady & Brenner, 1998).

A grande susceptibilidade dos túbulos proximais renais às injúrias, e em especial à injúria nefrotóxica, tem sido relacionada à intensa permeabilidade à água, à alta capacidade de concentração de substâncias, inclusive toxinas, à alta fluidez das membranas apicais e à baixa reserva metabólica (Lieberthal & Nigam, 1998).

A insuficiência renal, tanto a crônica quanto a aguda, está relacionada a altos índices de morbi-mortalidade, apesar dos avanços nos transplantes e no tratamento com diálise (Fissell *et al.* 2001). Na atualidade, a terapia da IRA têm se limitado, principalmente, à prevenção e à diálise (Dagher *et al.*, 2003; Schrier *et al.*, 2004).

Inúmeros estudos têm corroborado os achados clínicos acerca da nefrotoxicidade induzida por venenos crotálicos, no entanto, o mecanismo de ação renal da crotoxina e da sua subunidade FLA<sub>2</sub>, o(s) possível (is) agente (s) nefrotóxico (s) do veneno, ainda é desconhecido (Bucarechi *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 1998; Sano-Martins, *et al.*, 2001).

De um modo geral, os efeitos desses venenos têm sido relacionados com a modulação da síntese e liberação intrarenal de mediadores como óxido nítrico, prostanóides, fator de necrose tumoral, endotelina e adenosina (Kuan *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2002, 2004; Ruschitzka *et al.*, 1998; Schrier *et al.*, 2004).

Estudos utilizando o método de rim isolado de rato mostraram que a fosfolipase A<sub>2</sub> e as prostaglandinas têm uma participação crucial na mediação das alterações funcionais e hemodinâmicas renais induzidas pelos venenos de diferentes subespécies de cascavel (Martins *et al.* 1998, 2003; Amora *et al.*, 2006).

Foi observado, por exemplo, que inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub>, de ciclooxigenase e de canais de cálcio foram capazes de bloquear parcial ou completamente os efeitos renais do veneno de *C. d. cascavella*, indicando que os metabólitos do ácido araquidônico assim como o cálcio estavam provavelmente envolvidos no processo (Martins *et al.*, 1998).

#### ❖ Fosfolipases A<sub>2</sub>

As enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) são os componentes protéicos mais amplamente encontrados nos venenos de serpentes (Chacur *et al.*, 2003; Valentim & Lambeau, 2000). Elas catalisam a hidrólise da ligação éster da posição *sn*-2 dos fosfolipídios de membrana produzindo ácidos graxos e lisofosfolipídios.

Historicamente as FLA<sub>2</sub>s são classificadas em: (1) citosólicas (cFLA<sub>2</sub>), de alto peso molecular (31-110kDa) e dependentes de concentrações micromolares de cálcio para sua atividade enzimática; (2) independentes de cálcio (iFLA<sub>2</sub>), estas também intracelulares e com peso molecular entre 29-85kDa e (3) secretórias (sFLA<sub>2</sub>), que são extracelulares, de baixo peso molecular (14-18kDa) e que requerem concentrações milimolares de cálcio (Forte-Dias *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000; Montecucco & Rosseto, 2000). Neste último grupo estão incluídas as enzimas digestivas e as inflamatórias assim como as toxinas provenientes de venenos animais (Forte-Dias *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000; Montecucco & Rosseto, 2000).

As FLA<sub>2</sub>s são ainda classificadas em grupos de I a X com base nas suas estruturas primárias, com destaque para os grupos I, II, III, V, IX e X, onde estão incluídas as FLA<sub>2</sub>s de venenos de animais (Forte-Dias *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000).

Algumas das suas funções biológicas das FLA<sub>2</sub>s são mediadas por receptores que têm sido encontrados em várias espécies (Valentim & Lambeau, 2000). Esses receptores são classificados em tipo neuronal, que são altamente expressos no tecido cerebral, e tipo muscular, identificado pela primeira vez em músculo esquelético de coelhos (Dunn & Broady, 2001; Valentim & Lambeau, 2000).

O receptor do tipo muscular é altamente expresso em rim, coração, pulmão e fígado humanos e tem estrutura semelhante ao receptor de manose dos macrófagos (Valentin & Lambeau, 2000). Tem sido postulado que a ligação de FLA<sub>2</sub> ao receptor do tipo muscular poderia (1) desencadear eventos de transdução de sinais específicos que, por sua vez, produziriam as atividades biológicas associadas a essas enzimas ou (2) promover a rápida internalização da enzima e/ou inibição da sua atividade catalítica (Valentin & Lambeau, 2000). Camundongos “nocaute” para esse receptor, por exemplo, apresentam resistência ao processo inflamatório induzido por lipossacarídeos, indicando, possivelmente, que a FLA<sub>2</sub> secretória dos camundongos é um ligante endógeno desse receptor (Valentin & Lambeau, 2000).

As fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de venenos ofídicos variam consideravelmente em termos de toxicidade e complexidade estrutural (Santoro *et al.*, 1999; Rangel-Santos *et al.*, 2004, Beghini *et al.*, 2000).

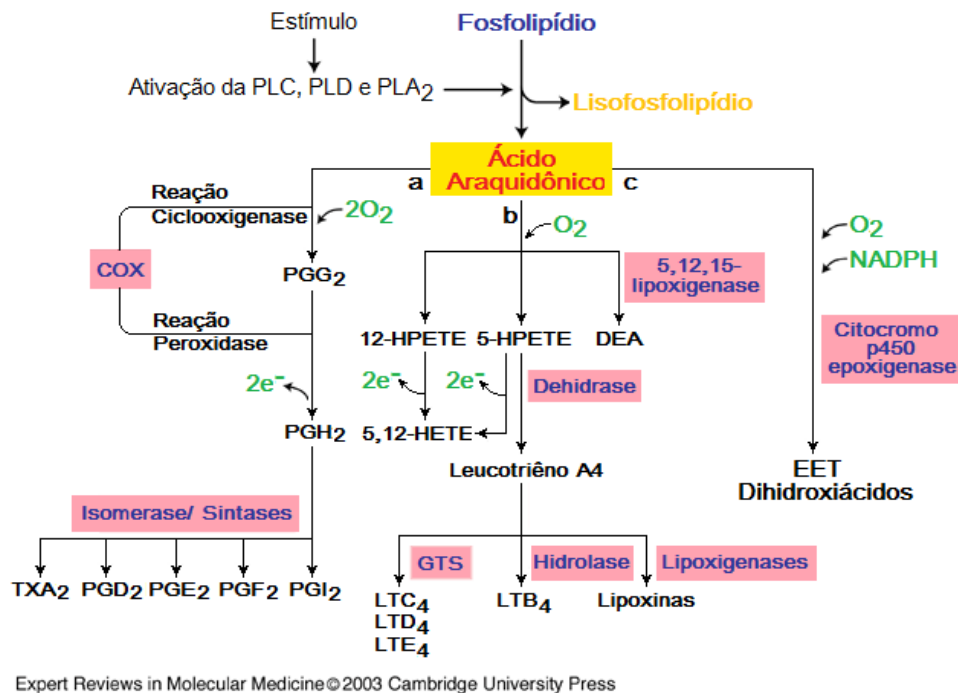
Inúmeras atividades inflamatórias têm sido descritas para as fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos como indução de edema, recrutamento de células inflamatórias, desgranulação de mastócitos entre outras (Chacur *et al.*, 2003, Câmara *et al.*, 2003). Além disso, tem sido relatada a participação crucial da fosfolipase A<sub>2</sub> e das prostaglandinas, entre outras substâncias endógenas, na mediação dos efeitos deletérios induzidos pelo veneno de cascavel sobre a função renal (Martins *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2003).

Foi relatado que FLA<sub>2</sub>s isoladas de venenos de serpentes ou abelhas possuem efeitos tóxicos diretos sobre túbulos proximais renais, em condições normais de oxigenação, enquanto induzem injúria substancial durante hipóxia seguida de re-oxigenação (Zager *et al.*, 1996). As FLA<sub>2</sub>s exógenas poderiam atuar por vias seletivas que levariam à morte da celular tubular renal, uma vez que a FLA<sub>2</sub> é um dos mediadores da necrose tubular aguda (Zager *et al.*, 1996).

### ❖ Efeitos Biológicos de Metabólitos da Fosfolipase A<sub>2</sub> sobre a Função Renal

A ação das fosfolipases enzimaticamente ativas sobre as diferentes células, incluindo as células renais, leva à liberação de ácido araquidônico (AA) que pode ser posteriormente metabolizado por três vias principais: a via da enzima ciclooxigenase que resulta na formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; a via da lipooxigenase levando à produção de leucotrienos; e a do citocromo P450 com produção dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) (Natarajan & Reddy, 2003).

Os principais metabólitos da fosfolipase A<sub>2</sub> estão representados na Figura 1.



**Figura 1. Esquema das três principais vias metabólicas do ácido araquidônico.**

Alguns estudos têm sugerido que as FLA<sub>2</sub>s são importantes durante o processo de apoptose em decorrência da liberação de ácido araquidônico que, por sua vez, seria convertido em prostaglandinas ou leucotrienos apoptóticos (Penzo *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2006).

No ducto coletor, uma região crítica para a regulação hormonal da excreção de água e de eletrólitos, a manutenção da integridade estrutural e funcional da medula renal é controlada, em parte, pelas prostaglandinas (Yang, 2003).

Tanto a medula renal quanto o córtex renal sintetizam prostaglandinas, porém a capacidade de síntese da medula é significativamente maior (Foegh e Ramwell, 2001). Algumas delas, particularmente PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, causam vasodilatação no rim e aumentam a liberação de renina (Kramer *et al.*, 1985; Foegh e Ramwell, 2001).

Em coelhos, as células renais capazes de produzir PGE<sub>2</sub> em quantidades significativas incluem: mácula densa, ductos coletores medulares e corticais e células intersticiais medulares, enquanto que os túbulos proximais produzem pouca PGE<sub>2</sub> (Schneider *et al.*, 2004).

Apesar de bem estudados e caracterizados os efeitos dos metabólitos da ciclooxigenase sobre a função renal, as pesquisas mais recentes têm direcionado os seus estudos para os mediadores produzidos pelo citocromo P450, em especial o 20-HETE, que adquiriu o *status* de principal eicosanóide renal (Imig & Navar, 1996; Ogungbade *et al.*, 2003; Oyekan *et al.*, 1999; Roman, 2002; Sacerdoti *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que nos microvasos, glomérulos, túbulos proximais e ramo ascendente espesso da alça de Henle, o ácido araquidônico é primariamente metabolizado a 20-HETE e a EETs (Maier & Roman, 2001).

Nos rins, os metabólitos do citocromo P450 têm importantes funções fisiopatológicas ao modular o transporte de íons, o tônus e a reatividade vasculares em respostas inflamatórias (Gu & Wang, 2002; Natarajan & Reddy, 2003). Foi demonstrado, por exemplo, que o metabolismo de ácido araquidônico via monooxigenases dependentes do citocromo P450, a ativação de canais de potássio dependentes de cálcio assim como a liberação de óxido nítrico estão envolvidos na vasodilatação induzida pela bradicinina no rim isolado de rato (Pompermayer *et al.*, 2002).

Os EETs apresentam atividade vasodilatadora *per se*, além de modular a resposta vascular a muitos mediadores endógenos como a angiotensina II, endotelina-1 e bradicinina (Cheng *et al.*, 2004). Em células de músculo liso vascular e em miócitos, os EETs ativam os canais de K<sup>+</sup>, além de inibir os canais de Na<sup>+</sup> (Roman, 2002).



O 20-HETE tem um papel primordial nos mecanismos vascular e tubular de regulação da hemodinâmica renal e do volume de fluido extracelular ao produzir constrição dos microvasos pré-glomerulares e, particularmente, das arteríolas aferentes (Carrol & McGiff, 2000). Foi relatada ainda a sua contribuição na constrição das arteríolas aferentes induzidas por ATP (Cheng *et al.*, 2004) e no bloqueio do canal de  $K^+$  da membrana apical do ramo ascendente espesso da alça de Henle (Sacerdoti *et al.*, 2003).

Há relatos ainda de efeitos deletérios de AA independentes da síntese de eicosanóides que seriam decorrentes da (1) despolarização rápida de membranas celulares e um possível influxo de cálcio que desregularia a atividade de canais iônicos e da (2) abertura irreversível de um poro regulado por cálcio presente na membrana mitocondrial interna com conseqüente alteração das funções mitocondriais (Pompéia, 2002; Maia *et al.*, 2006).

#### ❖ Ácidos Graxos Livres e Função Mitocondrial

Além dos efeitos dependentes da liberação de eicosanóides, o ataque à camada lipídica induzida por fosfolipases  $A_2$ , com o conseqüente acúmulo de lisofosfolípidios e ácidos graxos não esterificados ou livres, têm sido extensamente relacionadas às injúrias renais agudas tóxica e isquêmica (Zager *et al.*, 2001).

Esses metabólitos têm sido implicados na progressão de injúria celular, com múltiplos efeitos sobre a função mitocondrial, incluindo desde a atuação como “detergentes” das estruturas das membranas, desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição do transporte de nucleotídeos de adenina, promoção da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) e ativação de vias apoptóticas (Feldkamp *et al.*, 2006; Zager *et al.*, 1999; Petronilli *et al.*, 2001; Penzo *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) são ácidos carboxílicos representados pela fórmula  $RCO_2H$ , onde R é um grupamento alquila. O tamanho da cadeia hidrocarbônica e a presença ou ausência de duplas ligações são características utilizadas para a classificação desses ácidos (Graziola *et al.*, 2002).

São encontrados de dois a quatro átomos de carbono, nos AGNE de cadeia curta, de seis a dez nos de cadeia média, enquanto os de cadeia longa possuem acima de doze átomos de carbono (Graziola *et al.*, 2002). A maioria dos AG em humanos possui de 16, 18

ou 20 átomos de carbono. A presença ou ausência de duplas ligações diferencia os AGNE em insaturados e saturados, respectivamente (McGarry, 1997).

Os principais ácidos graxos estão representados na Tabela 01.

**Tabela 01. Características de alguns dos principais ácidos graxos encontrados em tecidos de mamíferos**

Nome Comum	Nome sistemático	Átomos de Carbono	Duplas Ligações
<b>Palmítico</b>	Hexadecanóico	16	0
<b>Esteárico</b>	Octadecanóico	18	0
<b>Oléico</b>	Octadecanóico	18	1
<b>Linoléico</b>	Octadecadienóico	18	2
<b>Araquidônico</b>	Eicosatetraenóico	20	4

Tabela adaptada de Graziola *et al.*, 2002.

Sabe-se que *in vivo* os AGNE circulantes, em sua maioria, estão ligados à albumina enquanto os AGNE intracelulares estão ligados às proteínas de ligação de ácidos graxos. Os níveis de AGNE não-ligados, circulantes e intracelulares variam entre 5-10 nM tanto no plasma quanto no citosol (Feldkamp *et al.*, 2004, 2007).

Cerca de 30% do volume intracelular é composto por mitocôndrias, particularmente em células com elevada demanda de energia, como as células dos túbulos proximais renais e os miócitos cardíacos (Agarwal, 2005).

As mitocôndrias estão envolvidas em funções celulares importantes como síntese de ATP, regulação intracelular de cálcio, termogênese, oxidação de ácidos graxos e metabolismo de esteróides, fosforilação oxidativa e morte celular (Kowaltowski, 2000; Fernandez-Gomez *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2006).

O papel central das mitocôndrias como integradores dos mecanismos efetores de morte celular é sugerido pelo fato de que vários sinais derivados tanto de estímulos externos

quanto do citosol ou núcleo convergem para a mitocôndria onde desencadeiam a morte celular por apoptose e/ou necrose (Kowaltowski, 2000; Petronilli *et al.*, 2001; Risso *et al.*, 2002).

Citando Andrew Halestrap (2005):

*“Like Jekyll to Hyde, mitochondria can change from acting as the cell's powerhouses to become merciless killers. Mice lacking this mechanism develop normally, and their hearts are resistant to pathological damage.”*

*(Como o Jekyll de Hyde, as mitocôndrias podem deixar de agir como casa-de-máquinas das células para se tornarem assassinas impiedosas. Camundongos desprovidos desse mecanismo desenvolvem-se normalmente e seus corações são resistentes aos danos patológicos).*

A necrose mediada por mitocôndrias tem sido observada principalmente em injúria induzida por isquemia-reperusão (Kowaltowski, *et al.*, 2000), enquanto que em doenças muitas renais, independentemente do insulto inicial, a apoptose parece ser o mecanismo final de morte celular (Morais *et al.*, 2005). De um modo geral, agentes com uma ação lesiva intensa sobre mitocôndrias desencadeiam a necrose, enquanto os menos tóxicos induzem a apoptose (Pompéia & Curi, 2002).

Um dos sinais precoces do desenvolvimento de apoptose é a ativação de caspases, também conhecidas como cisteinil aspartato-proteases. Estudos recentes têm fornecido evidências de que as células que sofrem apoptose apresentam alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) que muitas vezes precede a própria ativação das caspases (Ghafourifar *et al.*, 1999; Pompéia & Curi, 2002; Penzo *et al.*, 2004).

O  $\Delta\Psi_m$  é gerado pela cadeia de transporte de elétrons que direciona o fluxo de prótons a partir da matriz através da membrana mitocondrial interna até o citoplasma criando, assim, um gradiente eletroquímico responsável pela formação de ATP (Pompéia & Curi, 2002).

Outro passo importante na cascata de sinalização que leva à morte celular por apoptose é a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), um fenômeno caracterizado por um aumento não seletivo na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, mediada por cálcio e inúmeros agentes indutores, entre eles, espécies reativas de oxigênio, radiação ultravioleta, toxinas e ácidos graxos (Barbosa Jr *et al.*, 2000; Siemen *et al.*, 2005). O fechamento subsequente do PTP permite os níveis de ATP sejam conservados garantindo que morte celular siga a via apoptótica e não a necrótica (Halestrap *et al.*, 2000).

A abertura do PTP têm sido implicada também na morte celular por excitotoxicidade, por isquemia e, mais recentemente, na etiologia da diabetes tipo 1 e em algumas formas da diabetes do tipo 2 (Koshkin *et al.*, 2004). Em condições fisiológicas, no entanto, a permeabilidade mitocondrial de transição contribui para a regulação da fosforilação oxidativa e para o metabolismo de cálcio (Kowaltowski, 2000; Koshkin *et al.*, 2004).

O PTP, que é iniciado pelo aumento no nível intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , participa da liberação de proteínas pró-apoptóticas através de, pelo menos, dois mecanismos: (1) ruptura da membrana mitocondrial externa induzida por edema osmótico da organela e eventual perda das proteínas mitocondriais e (2) remodelamento das cristas mitocondriais que facilitaria, por sua vez, a liberação de citocromo *c* e ativação das caspases o que amplificaria o processo de morte celular (Kowaltowski *et al.*, 2000; Petronilli *et al.*, 2001; Penzo *et al.*, 2004). A apoptose que ocorre no hipocampo após insulto hipoglicêmico ou isquêmico é desencadeada desta forma (Halestrap *et al.*, 2000).

Outros estímulos apoptóticos como a presença de citocinas ou a ausência de fatores de crescimento também envolvem a liberação de citocromo *c*, no entanto, há controvérsias sobre a participação ou não do PTP (Halestrap *et al.*, 2000). O fator de necrose tumoral alfa, por exemplo, induz apoptose através de liberação de citocromo *c* (Ghafourifar *et al.*, 1999). Essa citocina tem sido implicada ainda na nefrotoxicidade induzida por sobrenadante de macrófagos ativados com veneno de *C.d.cascavella* em rim isolado de rato (Martins *et al.*, 2004).

Têm sido relatados ainda diminuição do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio como conseqüências da abertura do PTP (Kowaltowski *et al.*, 2000). A adição de inibidores da alteração de  $\Delta\Psi_m$ , geralmente, bloqueia as alterações citotóxicas (Pompéia & Curi, 2002).

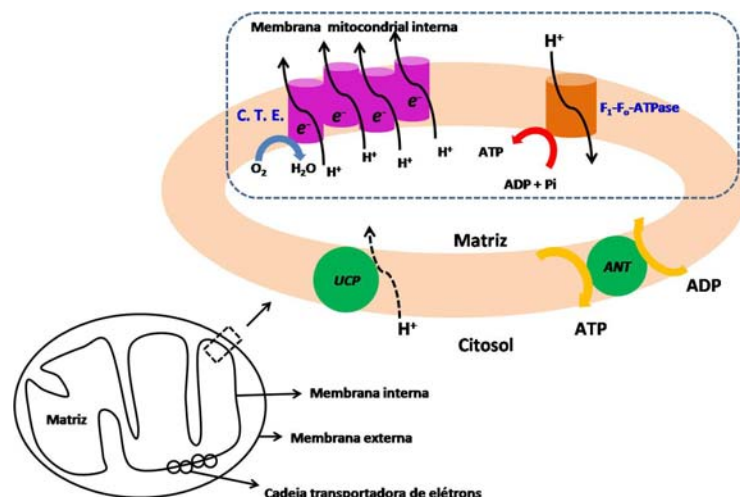
A abertura do PTP, no entanto, nem sempre é seguida de morte celular, sendo esta associada mais ao tempo em que o poro permanece aberto (Petronilli *et al.*, 2001).

Em resumo, a abertura do PTP, em resposta a insultos nocivos às células, resulta em (1) intumescimento mitocondrial que pode gerar ruptura da membrana externa e a liberação de citocromo *c* e/ou (2) diminuição do potencial de membrana mitocondrial que interfere com as funções da organela e com o destino celular.

Com relação aos AGNE, tem sido descrita a capacidade destes de promoverem o desenvolvimento de PTP em túbulos proximais isolados (Feldkamp *et al.*, 2007). Tem sido observado também um efeito direto do AA sobre as mitocôndrias em causar a abertura irreversível do PTP levando a uma perda do potencial da membrana mitocondrial, à liberação de citocromo *c* e à inibição da respiração mitocondrial (Maia *et al.*, 2006).

Como mencionado anteriormente, a transferência de elétrons da cadeia respiratória para dentro da membrana mitocondrial interna é acoplada ao transporte de prótons a partir da matriz para o citosol (Figura 2). O gradiente eletroquímico resultante favorece a reentrada de prótons através (1) da  $F_0F_1$ -ATPase, uma enzima responsável pela síntese de ATP a partir de ADP e Pi (fosfato inorgânico) ou (2) através de outras proteínas que comandam o transporte de íons e substratos, entre elas a proteína desacopladora (UCP; do inglês *uncoupling protein*), a translocase de nucleotídeos de adenina (ANT; do inglês *adenine nucleotide translocase*) e o co-transportador glutamato/aspartato (Cadenas, *et al.*, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002).

Entretanto, esse gradiente eletroquímico pode ser dissipado através de vias endógenas de condutância de prótons presentes nas mitocôndrias que permitem a reentrada de prótons independentemente da fosforilação oxidativa de forma que o consumo de oxigênio torna-se desacoplado da síntese de ATP (Cadenas, *et al.*, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002; Olson, 1997; St-Pierre *et al.*, 2000).



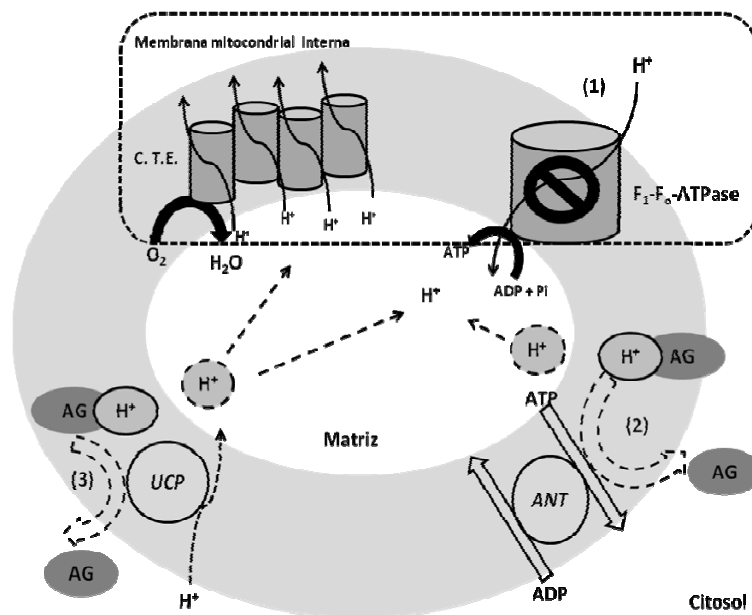
**Figura 2.** Desenho esquemático da mitocôndria mostrando a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa. Nota: UCP- proteína desacopladora, do inglês *uncoupling protein*; ANT- translocase de nucleotídeos de adenina, do inglês *adenine nucleotide translocase*.

Os AGNE são clássicos desacopladores da fosforilação oxidativa (Wojtczak, 1976; Valente *et al.*, 1998; Feldkamp *et al.*, 2006).

De acordo com um dos mecanismos propostos, os AGNE poderiam agir como desacopladores protonofóricos reversíveis ao entrarem na matriz mitocondrial na sua forma protonada, não polar, de forma que ao fim do transporte através da membrana plasmática, ocorreria dissociação do próton, que permaneceria na matriz, sendo o AGNE iônico resultante transportado para o citosol através de carreadores de ânions, como a translocase de nucleotídeos de adenina, o co-transportador glutamato/aspartato ou as proteínas desacopladoras, entre outros transportadores (Wojtczak, 1976).

Como resultado, ocorreria decréscimo na produção de ATP, apesar da respiração mitocondrial intacta, i.e., desacoplamento (Nicholls & Ferguson, 2002; Wojtczak, 1976).

O referido mecanismo é representado na Figura 3.



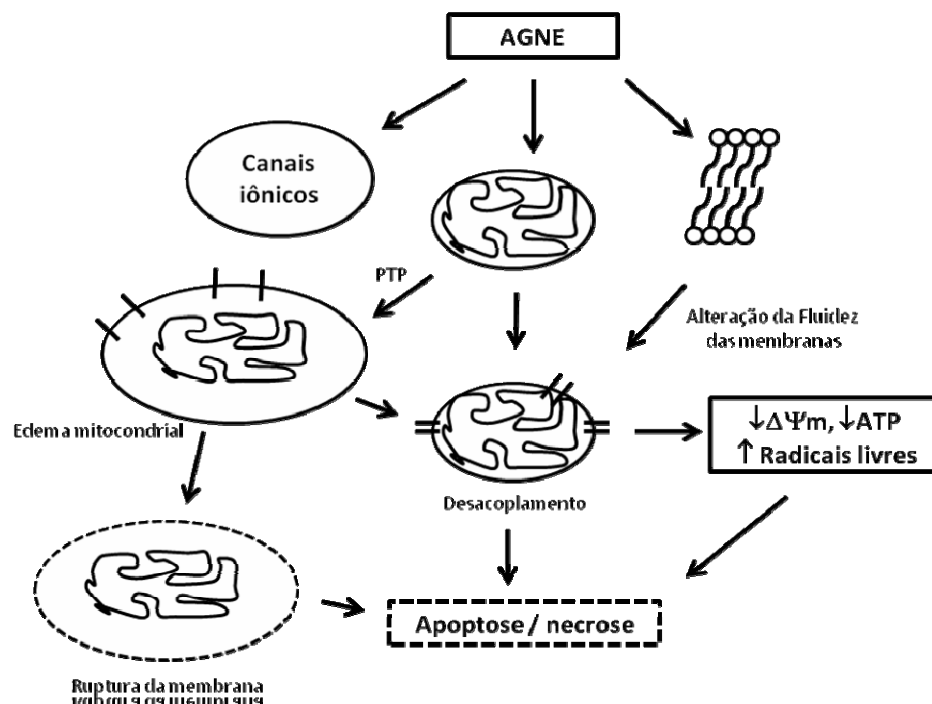
**Figura 3. Mecanismos de desacoplamento da fosforilação oxidativa induzido por ácidos graxos. Os AG entram na matriz mitocondrial na sua forma protonada,  $H^+$ -AG, ocorre dissociação do próton para a matriz, o AG resultante retorna ao citosol através de carreadores de ânions, como o ANT ou UCPs. Como resultado, a entrada de prótons acoplada à síntese de ATP (1), que ocorre normalmente, é inibida pela entrada de prótons através da ANT e/ou da UCP (2 e 3, respectivamente), com conseqüente bloqueio da produção de ATP.**

Além das atividades citotóxicas mediadas pela formação do PTP e pela ação desacopladora, os AGNE e os produtos de seu metabolismo também podem induzir citotoxicidade ao alterar a fluidez das membranas celulares (Humes *et al.*, 1989; Zager *et al.*, 1999).

Os AGNE estão envolvidos ainda na regulação de canais iônicos em diversos tipos celulares (Zager *et al.*, 1996; Giebisch, 2001). Foi demonstrado, por exemplo, que em miócitos cardíacos de ratos e de humanos, os AG inibem a atividade e a expressão de canais de sódio e que, em células epiteliais da vias aéreas, inativam os canais de cloreto (Ximenes *et al.*, 2002).

Tem sido postulado também que os AG poderiam agir diretamente sobre os canais iônicos através da alteração da fluidez da bicamada lipídica onde os canais são encontrados ou, indiretamente, ao liberar metabólitos do ácido araquidônico, como a PGI<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub> que, por exemplo, inibem os canais de potássio em células renais de rato (Ximenes *et al.*, 2002).

A Figura 4 resume as ações citotóxicas dos AGNE.



**Figura 4. Mecanismos de citotoxicidade dos AGNE.**  $\Delta\Psi_m$  = potencial de membrana mitocondrial e ATP= adenosina trifosfato e PTP= poro de transição de permeabilidade.

### ❖ Disfunção Mitocondrial e Venenos de Serpentes

A disfunção mitocondrial induzida por venenos de serpentes tem sido bem documentada em diversos sistemas experimentais (Nygaard *et al.*, (1954) *apud* Augustyn *et al.*, 1970; Santos *et al.*, 1990; Mebs & Ownby, 1990; Barraviera 1995; Valente *et al.*, 1998).

Tem sido postulado que a disfunção mitocondrial promovida após o tratamento com o veneno bruto da *C. d. terrificus* e/ou com as suas toxinas está estreitamente relacionada com a citotoxicidade destes (Mebs & Ownby, 1990; Valente *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2006; Tamietti *et al.*, 2007).

As ações inotrópicas negativas observadas em coração isolado de cobaia após adição de crotoxina, por exemplo, têm sido associadas ao desacoplamento da fosforilação oxidativa (Santos *et al.*, 1990).

Além disso, tem sido observado edema em mitocôndrias isoladas de fígado de rato a partir da incubação com o veneno bruto da *C. d. terrificus* e com a fração fosfolipase A<sub>2</sub> isolada deste (Barraviera, 1995; Valente *et al.*, 1998).

Os dados obtidos por Valente e colaboradores (1998) sugerem que as sFLA<sub>2</sub>s de serpentes, bem como aquelas ativadas endogenamente, poderiam atuar como agentes desacopladores, num processo irreversível. Isso, como representado na Figura 4, poderia induzir à apoptose mitocondrial.

Augustyn e colaboradores (1970), por sua vez, demonstraram que a FLA<sub>2</sub> purificada do veneno de *Agkistrodon piscivorus* apresentava um efeito bifásico sobre mitocôndrias isoladas de hepatócitos, induzindo em baixas doses o desacoplamento da cadeia respiratória enquanto que em altas doses inibia o consumo de oxigênio. Foi sugerido que tais efeitos poderiam estar relacionados à liberação de ácidos graxos livres em decorrência do ataque da FLA<sub>2</sub> à membrana mitocondrial.

Alterações ultraestruturais mitocondriais têm sido observadas também nos epimastigotos do *Trypanosoma cruzi* incubados com veneno de *Bothrops jararaca* (Deolindo *et al.*, 2005).



### ❖ O Potencial da Membrana Mitocondrial

O potencial da membrana mitocondrial, simbolizado por  $\Delta\Psi_m$ , é um importante parâmetro da função mitocondrial que pode ser avaliado através da utilização de marcadores fluorescentes sensíveis às alterações do  $\Delta\Psi_m$ , como o iodeto 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazocarbocianino (JC-1) e a safranina O (Agarwal, 2005; Risso *et al*, 2002).

Sabe-se que, após a captação mitocondrial, o JC-1 encontra-se na forma monomérica, que emite luz verde, em situações em que há diminuição do  $\Delta\Psi_m$ ; enquanto que o  $\Delta\Psi_m$  elevado resulta em acúmulo de quantidades maiores do JC-1 na mitocôndria, onde este forma agregados que alteram a fluorescência para a cor vermelha (Feldkamp *et al*, 2004, 2006). A formação lenta dos agregados de JC-1 e a sua dissociação incompleta aos seus monômeros, durante a desenergização mitocondrial, inviabilizam a sua utilização em estudos que acompanham a dinâmica das mudanças do potencial de membrana (Feldkamp *et al*, 2005).

A captação mitocondrial de safranina O também é dependente do  $\Delta\Psi_m$ , apesar de ter a vantagem de permitir a avaliação de alterações no potencial da membrana por períodos prolongados e por poder ser usada em ciclos de energização, desenergização e re-energização mitocondrial, o que não é possível com o uso de JC-1 (Agarwal, 2005; Feldkamp *et al*, 2004, 2005). Além disso, ao contrário do que ocorre com o JC-1, a captação da safranina O pelas mitocôndrias é uma função linear do  $\Delta\Psi_m$  (Feldkamp *et al*, 2006).

Num trabalho recente foi demonstrada a indução do colapso do  $\Delta\Psi_m$  e morte celular por apoptose em células leucêmicas K562 tratadas com crotoxina, o principal componente do veneno crotálico (Yan *et al.*, 2006). Este seria mais um indício da possível relação entre citotoxicidade de venenos crotálicos e disfunção mitocondrial. Em outro trabalho recente, foram observadas fragmentação nuclear e corpos apoptóticos além de severas alterações no retículo endoplasmático em células CHO-K1 incubadas com veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Tamietti *et al.*, 2007).

### ❖ Justificativa

Nos últimos 50 anos, ocorreram avanços significativos no entendimento da patogênese da IRA nefrotóxica e isquêmica, principalmente através de modelos experimentais, no entanto, ocorreram poucas mudanças em termos de diminuição da mortalidade (Schrier *et al.*, 2004).

Apesar de muito se discutir sobre os efeitos citotóxicos dos venenos ofídicos, pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos de ação sobre as diversas células, e em especial, sobre as células renais.

No caso particular da citotoxicidade dos venenos crotálicos, tem-se postulado a participação de diversos metabólitos da hidrólise de lipídios de membrana, entre eles os eicosanóides (Martins *et al.*, 2002, 2004) e os ácidos graxos não esterificados (Valente *et al.*, 1998) e, mais recentemente, da disfunção mitocondrial (Yan *et al.*, 2006; Tamietti *et al.*, 2007).

O interesse recente nas pesquisas envolvendo a disfunção mitocondrial no contexto dos diversos mecanismos de morte celular advém do fato de que a alteração funcional dessas organelas tem sido relacionada à etiologia de doenças como a diabetes, ao estado metabólito diferenciado das células tumorais e de certos parasitas (Kowaltowski, 2000; Fernandez-Gomez *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2006, Yan *et al.*, 2006; Tamietti *et al.*, 2007; Passero *et al.*, 2007).

Além disso, a utilização de sistemas de órgãos isolados tem contribuído para o estudo de eventos celulares e/ou teciduais (Sells, 2003; Taft, 2004). O uso de túbulos proximais renais isolados permite o estudo dos eventos metabólicos das células tubulares que têm papel importante tanto no dano estrutural reversível quanto na progressão da injúria letal, considerando-se que os túbulos isolados retêm a mesma susceptibilidade às injúrias que ocorrem *in vivo* (De Castro *et al.*, 2004; Feldkamp *et al.*, 2004; Agarwal, 2005).

Através da utilização de túbulos proximais renais isolados tem sido possível estudar os efeitos diretos de substâncias potencialmente nefrotóxicas sem a interferência de efeitos sistêmicos e hemodinâmicos (De Castro *et al.*, 2004; Zager *et al.*, 2001). Os túbulos proximais renais *in vivo* são dependentes do metabolismo mitocondrial para a síntese de ATP, em decorrência da sua capacidade glicolítica mínima (Balaban & Mandel, 1988; Wirthensohn & Guder, 1986).

O desenho experimental do presente estudo baseou-se na avaliação da função mitocondrial e da integridade de membranas plasmáticas além dos parâmetros de funcionalidade renal sem interferência de mediadores sistêmicos, investigados através do uso de túbulos proximais isolados e de rim isolado de rato, respectivamente.

Os estudos utilizando rim isolado de rato foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET), onde, desde 1993, têm sido desenvolvidos estudos importantes com venenos de serpentes brasileiras, entre elas *Bothrops jararacaca* (Monteiro e Fonteles, 1999), *Bothrops jararacussu* (Havt *et al.*, 2001), *Bothrops moojeni* (Barbosa *et al.*, 2002, 2006), *Crotalus durissus terrificus* (Monteiro *et al.*, 2001), *Crotalus durissus cascavella* (Martins *et al.*, 1998, 2002), *Crotalus durissus collilineatus* (Amora *et al.*, 2006), *Bothrops insularis* (Braga *et al.*, 2006a, 2006b, 2008a, 2008b), assim como com venenos de peixe (*Thalassophryne nattereri*; Facó *et al.*, 2003), de escorpião (*Tityus serrulatus*; Alves *et al.*, 2005), e de anêmona *Bunodosoma caissarum*, além dos estudos com outros produtos naturais como as lectinas vegetais (Teixeira, 2001).

A parte experimental com túbulos proximais isolados foi realizada na Universidade de Michigan, no Departamento de Nefrologia, sob a orientação do Doutor Joel Martin Weinberg, professor de Medicina Interna da referida instituição.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de injúria celular renal induzida pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* em túbulos proximais isolados e em rim isolado de rato, na perspectiva de elucidação dos processos fundamentais envolvidos tanto na injúria renal aguda quanto na injúria celular de outros órgãos.

**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Estudar a fração fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* na perspectiva de elucidação do mecanismo de ação renal e de descoberta de novas ferramentas farmacológicas.

### Objetivos específicos

- Estudar os efeitos da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a função renal.
- Investigar os efeitos das fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de pâncreas de porco e do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em relação aos níveis de ácidos graxos não-esterificados, aos níveis celulares de nucleotídeos de adenina, à liberação de lactato desidrogenase e às alterações no potencial de membrana mitocondrial em túbulos proximais isolados.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental com rim isolado de rato utilizada nos estudos da presente tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará enquanto a parte experimental com túbulos proximais isolados foi realizada na Universidade de Michigan, no Departamento de Nefrologia, sob a orientação do Doutor Joel Martin Weinberg, professor de Medicina Interna da referida instituição.

#### 3.1. Perfusão de Rim Isolado de Rato

##### 3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 260 e 300g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum 24 horas antes de cada experimento com água *ad libitum*.

##### 3.1.2. Materiais

Solução perfusora composta das seguintes substâncias: NaHCO<sub>3</sub> (Synth), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Synth), NaCl (Synth), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Reagen), uréia (Reagen), KCl (Merck), glicose (Squibb), penicilina G potássica cristalina (Squibb), fração V de albumina bovina (SIGMA) e inulina (SIGMA). No procedimento cirúrgico foram utilizados pentobarbital sódico (SIGMA) a 3%, manitol (Reagen) e heparina (Cristália). A fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* utilizada no modelo de rim isolado de rato foi gentilmente cedidas pelo Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade Estadual Paulista (UNESP). De acordo com Oliveira e colaboradores (2002), a isoforma da FLA<sub>2</sub> isolada da *C. d. terrificus* apresenta a seqüência de aminoácidos: HLLQFNKMLKFETRKNAPFYAFGCYCGWGGQRRPKDATDRCCFVHDCCYEKVT KCNTKWDFYRYSLSKSGYITCGKGTWCKEQICECDRVAECLRRSLSTYKNEYMFYP DSRCREPSETC. A homologia com outras fosfolipases A<sub>2</sub> citadas na literatura varia de 60 a 90% e o peso molecular é de, aproximadamente, 14664,14 (Oliveira *et al.*, 2002).

### 3.1.3. Descrição do sistema de perfusão de rim isolado

Foi utilizado o sistema de perfusão de rim isolado de rato que permite o estudo da função renal na ausência de influências sistêmicas (Nizet, 1975). Essa técnica tem sido utilizada para investigar os aspectos da fisiologia, farmacologia e farmacocinética renais (Wang *et al.*, 2004).

O sistema utilizado é constituído dos seguintes componentes: banho-maria – para a manutenção de uma 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 Watson – que bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema; catabolhas – que evita a entrada de bolhas nos rins; coletor de urina; condensador; filtro Millipore 5 µm para filtração da solução perfusora; fluxômetro – para medição do fluxo de perfusão (mL/hora); manômetro de mercúrio – para medição da pressão de perfusão (mmHg); pulmão tipo silástico – para a promoção das trocas gasosas (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e seringa coletora de perfusato (Figura 5).

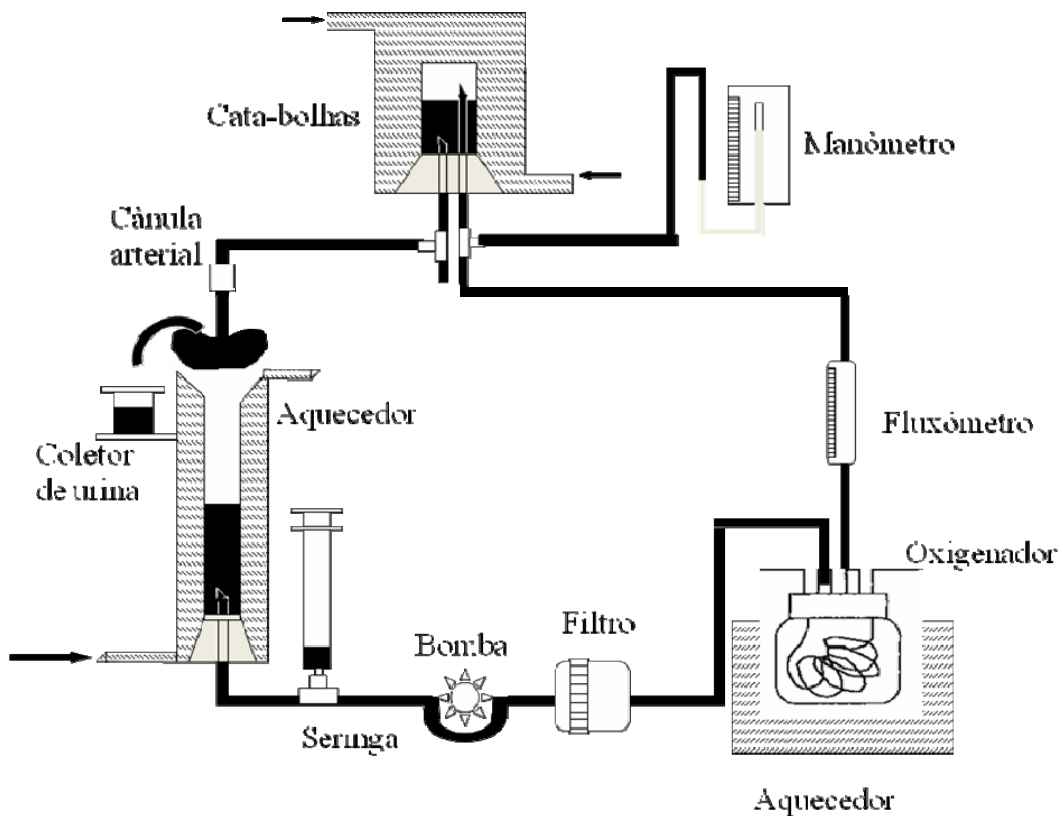


Figura 5. Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.



### 3.1.4. Técnica cirúrgica

O rim direito foi exposto sob anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg) através de uma incisão mediana no abdômen. Administrou-se 3 mL de manitol a 20% pela veia femoral durante a cirurgia. Efetuou-se o isolamento da adrenal direita e posterior descapsulação do rim correspondente. O ureter direito foi canulado, para a coleta de urina, através de tubo de polietileno (PE50). A artéria renal foi canulada através da artéria mesentérica para evitar a interrupção do fluxo segundo o método descrito por Balhlmann *et al.* (1967), Nishiitsutji-Uwo *et al.* (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). O rim foi isolado e transferido para um sistema fechado e perfundido com 100 mL de perfusato mantido a 37 °C.

### 3.1.5. Ensaio experimentais

#### 3.1.5.1. Estudo dos efeitos renais da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*

O estudo dos efeitos renais da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (CTFLA<sub>2</sub>) foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos, e as observações dos parâmetros renais foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

1. Grupo controle - perfusão somente com solução de Krebs-Henseleit (n=6);
2. Perfusão com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de veneno da *Crotalus durissus terrificus* (CTFLA<sub>2</sub>) na concentração de 10µg/mL (n=6).

### 3.1.6. Procedimento experimental

A pressão de perfusão e o fluxo foram mantidos constantes durante os 30 minutos iniciais. Após esse período, considerado como controle interno, a substância-teste foi adicionada e observadas as mudanças nos parâmetros renais até os 120 minutos. A variabilidade funcional de cada rim foi avaliada através do ritmo de filtração glomerular, que foi determinado pela depuração renal de inulina, pelo fluxo urinário e pela percentagem de

reabsorção tubular de água, sódio, potássio e cloreto. Para a análise da reabsorção tubular foram coletadas amostras de perfusato e urina em intervalos de 10 minutos, durante um período total de 120 minutos. O volume urinário foi medido, pelo método gravimétrico, em recipientes de vidro previamente pesados. Amostras de perfusato (1,5mL) foram coletadas em recipientes de vidro no ponto médio de cada intervalo de coleta de urina. As amostras de urina e de perfusato foram analisadas através do método da espectrofotometria de chama. As leituras fotométricas foram realizadas em fotômetro de chama (*Flame Photometer* - modelo 443 IL); o kit LabTest foi utilizado para a dosagem de cloreto; a inulina foi determinada seguindo o método descrito por Fonteles e Leibach (1982); e a medida de osmolalidade através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer*- modelo 5100c ESCOR). Todas as dosagens bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas.

### **3.1.7. Análise histológica**

Os fragmentos dos rins direitos, utilizados no sistema de perfusão, como dos rins esquerdos (controle externo) foram retirados ao final de cada experimento e acondicionados numa solução de formal a 10%, para posterior análise através de microscopia óptica. Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia-BIOPSE, e analisadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes.

### **3.1.8. Cálculo dos parâmetros renais**

Para a determinação dos parâmetros renais foram utilizadas as fórmulas descritas na tabela da página seguinte.

Tabela 02. Fórmulas utilizadas para cálculo dos parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula	Unidade
<b>FU - fluxo urinário</b>	$FU = \text{peso do volume urinário} / \text{peso do rim esquerdo} \times 10$	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>FPR - fluxo de perfusão renal</b>	$FPR = \text{fluxo registrado a cada } 10\text{min} / \text{intervalo de tempo} \times \text{peso do rim}$	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>RVR - resistência vascular renal</b>	$RVR = PP^*/FPR$	$\text{mmHg/mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>RFG - ritmo de filtração glomerular</b>	$RFG = \text{DOU}_{in} / \text{DOP}_{in} \times FU$ , onde $\text{DOU}_{in}$ = densidade ótica da inulina na urina e $\text{DOP}_{in}$ = densidade ótica da inulina no perfusato	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>FNa<sup>+</sup> - sódio filtrado</b>	$FNa^+ = RFG \times PNa^+$ , onde $PNa^+$ = concentração de sódio no perfusato	$\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>ENa<sup>+</sup> - sódio excretado</b>	$ENa^+ = FU \times UNa^+$ , onde $UNa^+$ = concentração de sódio na urina	$\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>TNa<sup>+</sup> - sódio transportado</b>	$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$	$\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>%TNa<sup>+</sup> - percentual de sódio transportado</b>	$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$	
<b>C<sub>osm</sub> - clearance osmótico</b>	$C_{osm} = (U_{osm} / P_{osm}) \times FU$ , onde $U_{osm}$ = osmoticidade urinária e $P_{osm}$ = osmoticidade de perfusato	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>C<sub>H2O</sub> - clearance de água livre</b>	$C_{H2O} = FU - C_{osm}$	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>dTNa<sup>+</sup> - transporte distal de sódio</b>	$dTNa^+ = C_{H2O} \times PNa^+$	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>Ad Na<sup>+</sup> - aporte distal de sódio</b>	$Ad Na^+ = dTNa^+ + ENa^+$	$\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>pTNa<sup>+</sup> = transporte proximal de sódio</b>	$pTNa^+ = FNa^+ \times AdNa^+$	$\mu\text{Eq} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>%pTNa<sup>+</sup> = percentual de transporte proximal de sódio</b>	$\%pTNa^+ = pTNa^+ \times 100 / FNa^+$	

\*Pressão de Perfusão. Tabela Baseada no trabalho de Pitts, 1971.

Todos os cálculos realizados para a determinação dos parâmetros acima citados foram repetidos para o potássio e o cloreto.

## 3.2. Avaliação de Parâmetros Funcionais em Suspensão de Túbulos Proximais

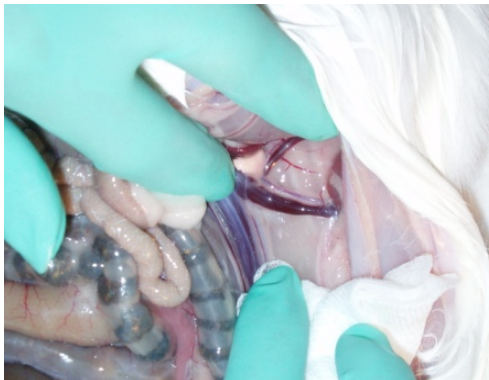
### 3.2.1. Materiais

Coelhos *New Zealand* foram obtidos do Biotério de Harlan (Indianápolis, IN). A colagenase do tipo IV foi adquirida da Worthington Biochemical (Lakewood, NJ) e o Percoll da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). A acetonitrila para HPLC foi obtida da Fischer Scientific (Pittsburg, PA). O iodeto 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazocarbocianino (JC-1) foi fornecido pela Molecular Probes (Eugene, OR). A digitonina de alta pureza foi obtida da Calbiochem (catálogo no. 300411; San Diego, CA). Os kits de NEFA-C foram adquiridos da WAKO Diagnostics (Richmond, VA). Albumina bovina sérica desprovida de lipídios (dBSA) foi fornecida pela Sigma-Aldrich (catálogo no. A-6003; St. Louis, MO). As fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de pâncreas de porco e do veneno da *Crotalus durissus terrificus* utilizadas na experimentação com túbulos proximais isolados foram compradas da Sigma-Aldrich (P-0861, lote 125K1428 e P5910, lote 65F8590, respectivamente; St. Louis, MO).

### 3.2.2. Cirurgia

Coelhos *New Zealand* foram inicialmente anestesiados com administração de cetamina (25-35mg/kg, I.M.), diazepam (5-10 mg/kg, I.M.) e xilazina (10 mg/kg, I.M.) e suplementados, quando necessário, com doses adicionais de 15-20 mg/kg de cetamina e 0.25-0.5 mg/kg de diazepam para obter anestesia completa para a realização da laparotomia. Uma incisão na linha mediana abdominal foi realizada de forma a expor os órgãos internos (Figuras 6A e 6B). Um cateter foi introduzido na artéria renal e iniciada a perfusão *in situ* de colagenase do tipo IV (1,25 mg/mL) numa solução contendo (em mM): 115 NaCl, 3,9 KCl, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 5 glicose, 5 lactato de sódio, 1 alanina, 1 butirato de sódio e 25 manitol e aerada com 95% ar/5%CO<sub>2</sub> em pH 7,15 (Figuras 6C e 6D). O rim completamente perfundido foi então retirado através da dissecação dos órgãos e tecidos adjacentes. O córtex renal foi então separado da medula remanescente (Figuras 6E e 6F). O procedimento descrito anteriormente também foi realizado com o rim direito. A eutanásia ocorreu por exsanguinação decorrente da remoção dos rins, uma vez que o

procedimento foi realizado sem hemostasia. Por precaução, foi realizada ainda punção bilateral do diafragma de acordo com recomendações Protocolo de Eutanásia da Associação Americana de Medicina Veterinária.

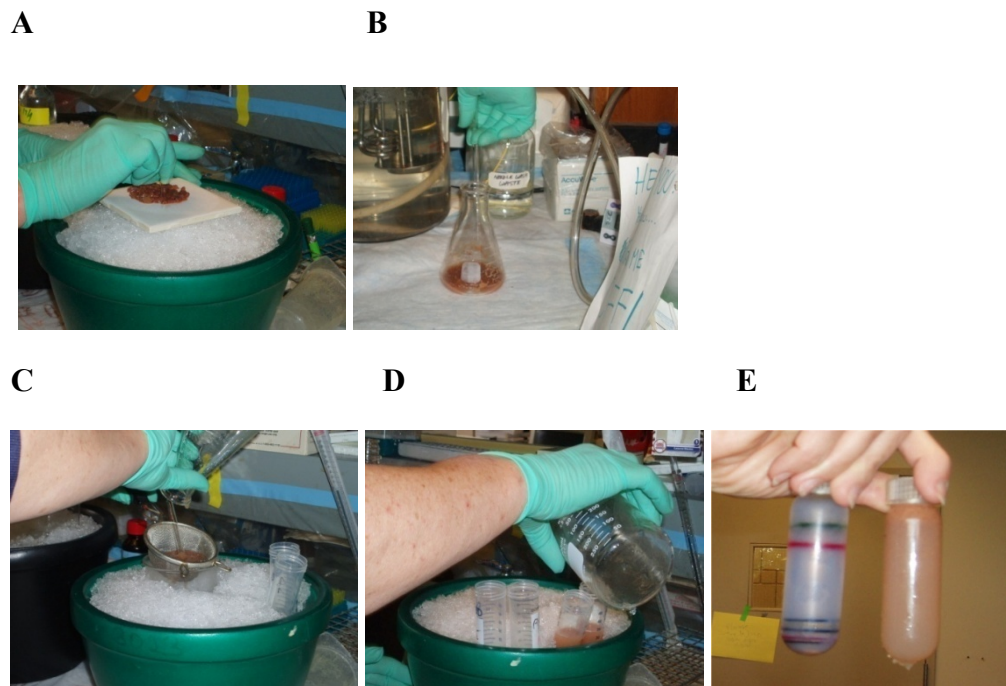
**A****B****C****D****E****F**

**Figura 6. Procedimento cirúrgico para isolamento do córtex renal.**

### 3.2.3. Isolamento de Túbulos Proximais

O córtex renal foi triturado sobre uma placa de cerâmica resfriada e a seguir transferido para um Erlenmeyer (Figura 7A). Após aerado com uma mistura de ar /5% CO<sub>2</sub>, ele foi colocado num banho-maria a 37°C por 15-20min (Figura 7B). O córtex renal triturado foi peneirado utilizando-se uma solução contendo 110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM glicose, 4 mM lactato de sódio, 0,3 mM alanina, 5,0 mM butirato de sódio, 3% dextranso dializado (T-40; Amersham Pharmacia) e 2 mg/mL gelatina bovina.

O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi lavado e ressuspendido na solução previamente citada. A separação e o enriquecimento dos túbulos proximais (TP) foram realizados através do uso de gradientes de Percoll (Figuras 7C, 7D e 7E).



**Figura 7. Isolamento de túbulos proximais de coelho.**

### 3.2.4. Procedimento Experimental

A incubação foi realizada como descrito a seguir. Os sedimentos finais de túbulos foram ressuspensos a uma concentração de 3,0–5,0 mg de proteína/mL numa solução contendo (em mM): 110 NaCl, 3,9 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 5 glicose, 5 lactato de sódio, 5 glicina, 0,3 alanina, 5 butirato de sódio; 2mg/mL de gelatina bovina e aerada com ar/5%CO<sub>2</sub>. Após 15 min de preincubação a 37°C, os túbulos foram ressuspensos em um meio recém-preparado contendo as substâncias-teste (fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco ou de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*) em diferentes concentrações e então reaeradas com uma mistura de 95% ar/5% CO<sub>2</sub>. A utilização da enzima pancreática foi realizada a título de comparação, tendo em vista a sua reconhecida atividade citotóxica (Humes *et al.*, 1989; Zager *et al.*, 1996). Para o grupo controle nenhuma adição foi feita após os túbulos serem ressuspensos. Após 60 min, amostras foram removidas para análise. A determinação protéica foi realizada através do método de Lowry e colaboradores (1951). Níveis de ATP e de AGNE assim como liberação de LDH foram mensurados e a avaliação das alterações no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) foi realizado como descrito a seguir.

### 3.2.5. Ensaio Experimentais

Sete suspensões de túbulos proximais, divididas em alíquotas de 6mL e recolocadas em Erlenmeyers de 25mL foram tratadas da seguinte forma:

- **Grupo controle:** oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado);
- **Grupo 28PFLA<sub>2</sub>:** oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 28U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco (28P-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min;

- **Grupo 100PFLA<sub>2</sub>**: oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 100U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco (100P-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min;
- **Grupo 150PFLA<sub>2</sub>**: oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 150U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco (150P-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min;
- **Grupo 7SVFLA<sub>2</sub>**: oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 7U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (7VS-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min;
- **Grupo 14SVFLA<sub>2</sub>**: oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 14U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (14VS-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min;
- **Grupo 28SVFLA<sub>2</sub>**: oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5% CO<sub>2</sub> a 37°C em banho-maria agitado) com adição de 28U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (28VS-FLA<sub>2</sub>) nos últimos 60 min.

A escolha das concentrações utilizadas foi baseada em estudos preliminares com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco (Zager *et al.*, 1993, 1996 e 1999) e com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Valente *et al.*, 1998).

### 3.2.6. Mensuração da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A injúria celular pode ser analisada através da quantificação do dano ou ruptura da membrana plasmática. O ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima



citoplasmática presente na maioria das células, permite mensurar o dano à membrana plasmática que é um marcador da injúria celular.

O LDH presente no sobrenadante de suspensões de túbulos proximais, incubadas com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco ou de veneno da *Crotalus durissus terrificus* A<sub>2</sub>, participa da seguinte reação de conversão: piruvato + NADH ↔ lactato + NAD<sup>+</sup>.

A atividade da LDH foi determinada, então, a partir da mensuração da oxidação de NADH num meio antes e depois da adição de Triton X-100 0.1%, agente capaz produzir 100% de morte celular. A atividade de LDH foi calculada a partir da taxa de decaimento da fluorescência do NADH a 460 nm (Weinberg *et al.*, 1989).

### 3.2.7. Mensuração dos níveis de ATP

Para a análise dos níveis de ATP, amostras de suspensão de túbulos proximais foram imediatamente desproteinadas em ácido tricloroacético e, a seguir, neutralizadas com trioctilamina: CFC 113 e estocadas a -20°C de acordo com método descrito por Weinberg *et al.*, (1997). Nucleotídeo de purina e seus metabólitos obtidos de alíquotas de 20µL dos extratos neutralizados foram separados e quantificados usando o método de HPLC em fase reversa com pareamento iônico como descrito por Feldkamp *et al.*, (2004).

### 3.2.8. Ensaio de Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE)

Para a determinação dos níveis de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) no sobrenadante e no sedimento de suspensões de túbulos proximais utilizou-se um método colorimétrico enzimático.

Para tanto, amostras de 3 mL de túbulos proximais foram extraídas com 2,5 – 7,5 mL de 1:2 de clorofórmio:metanol e evaporadas a volumes menores, aproximadamente 80 µL, com o auxílio de nitrogênio. As amostras foram então estocadas em nitrogênio a -80°C até o momento do ensaio quando foram reconstituídas com a adição do volume apropriado do solvente do extrato tecidual usando o protocolo da WAKO Diagnostics.

Os AGNE foram analisados enzimaticamente com volumes de 20 $\mu$ L de amostras para conversão de coenzima A (CoA) em ésteres de acil-CoA usando-se acil-CoA sintetase seguido por oxidação do acil-CoA pela acil-CoA oxidase com produção de peróxido de hidrogênio que, na presença de peroxidase adicionada ao meio, promove a oxidação do 3-metil-N-etil-N-( $\beta$ -hidroxietil)-anilina (MEHA) com a 4-aminoantipirina formando um composto de coloração roxa que é mensurado colorimetricamente (kit NEFA-C, WAKO Chemicals).

### **3.2.9. Análise das Alterações no Potencial de Membrana Mitocodrial ( $\Delta\Psi_m$ ) através da captação de JC-1 e de Safranina O**

#### **3.2.9.1. Fluorescência JC-1**

Os túbulos proximais foram incubados com JC-1 (9,0  $\mu$ g/mL; Molecular Probes) por 15 min a 37°C. Os túbulos então foram centrifugados e os sedimentos lavados três vezes com uma solução isotônica gelada de salina-HEPES. O  $\Delta\Psi_m$  foi analisado através da mensuração da intensidade da fluorescência de comprimentos de onda de 535 e 595nm usando um fluorômetro Alphascan (Fig. 8; Photon Technology, Monmouth Junction, NJ) e calculando a razão 595/535. Os potenciais de membrana elevados apresentam valores altos para as razões 595/535. Os túbulos foram mantidos em gelo até o momento das medições (Feldkamp *et al.*, 2005).

#### **3.2.9.2. Captação de Safranina O**

A captação de safranina O pelas mitocôndrias em túbulos permeabilizados com digitonina foi usada para mensurar o  $\Delta\Psi_m$  dos túbulos ao final das manobras experimentais. Resumidamente, uma alíquota de 0,3 mL de suspensão celular foi centrifugada por 5 segundos, o sobrenadante removido e sedimento celular ressuspendido a um volume total 2,3 mL em uma solução tampão intracelular que consistia de (mM): 120 KCl, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 EGTA e 10 K-Hepes; 5 $\mu$ M safranina O e com pH 7,2 a 37°C. As células foram permeabilizadas usando-se digitonina (100 $\mu$ g/mg proteína). Succinato de potássio (4mM) ou glutamato + malato (4mM cada) foi usado como substrato para manter o  $\Delta\Psi_m$ .

As medições de fluorescência foram realizadas utilizando-se os fluorômetros Alphascan e Deltascan (Photon Technology International - Lawrenceville, NJ; Figuras 8 e 9, respectivamente) equipados com controladores de temperatura e com suportes para cubetas magneticamente agitadas. As cubetas foram iluminadas com luz de 485 nm para excitar o indicador fluorescente, safranina O. A fluorescência emitida foi coletada em comprimentos de onda de 586 nm. A recaptação de safranina O na matriz da mitocôndria energizada, que é uma função linear do potencial de membrana mitocondrial, resulta em extinção da sua fluorescência de forma que o sinal mensurável decresce.



**Figura 8. Fluorômetro Alphascan**



**Figura 9. Fluorômetro Deltascan**

### 3.2.10. Estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT)

Com o intuito de avaliar o envolvimento da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) nos efeitos citotóxicos das fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica, estudou-se a ocorrência de edema mitocondrial, concomitantemente à mensuração do potencial de membrana mitocondrial, em suspensões de túbulos proximais.

Para tanto, uma alíquota de 0,3 mL de suspensão túbulos proximais foi centrifugada por 5 segundos, o sobrenadante removido e sedimento celular ressuspenso a um volume total 2,3 mL em uma solução tampão intracelular que consistia de (mM): 120 KCl; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 40 μM EGTA, 5μM safranina O e 10 K-Hepes, pH 7,2 a 37°C. As células foram permeabilizadas usando-se digitonina (100μg/mg proteína). Succinato de potássio (4mM) foi usado como substrato para manter o ΔΨ<sub>m</sub>. As medições de fluorescência foram realizadas utilizando-se os fluorômetros Deltascan e Alphascan (Photon Technology International - Lawrenceville, NJ), sendo as mudanças no volume mitocondrial observadas com emissão de luz de 520 nm e excitação do indicador fluorescente em comprimentos de onda de 520 nm.

A escolha das concentrações utilizadas de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco e de veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi baseada em estudos com concentrações crescentes de cada fosfolipase A<sub>2</sub> até que fosse observada a diminuição máxima da recaptção da safranina O, ou seja, colapso do ΔΨ<sub>m</sub> (desenergização). As suspensões de túbulos proximais das fosfolipases foram suplementadas com cálcio, necessário para a atividade dessas enzimas. Para garantir que o efeito observado em tais suspensões era decorrente da atividade da enzima e não do cálcio, avaliou-se o efeito da adição desse íon na ausência das fosfolipases.

Para o grupo PMT, utilizou-se o cálcio que em excesso induz o PMT e, concomitantemente, o colapso do ΔΨ<sub>m</sub>. A dose de cálcio foi determinada através do mesmo procedimento utilizado para as fosfolipases. Para o grupo controle (grupo onde não ocorreu indução de PMT) foi utilizada apenas a solução tampão da suspensão de túbulos proximais.

Para bloquear o PMT induzido pelos diferentes agentes utilizados (cálcio e fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica) foram utilizados albumina bovina (BSA, 0,5mg/mL), ciclosporina A (CsA, 1μM), um agente imunossupressor utilizado experimentalmente por sua

capacidade de inibir o PMT, assim como a adenosina difosfato (ADP, 0,5 mM) e o magnésio ( $Mg^{2+}$ , 1 mM). Apesar da BSA *per se* não melhorar a dissipação do  $\Delta\Psi_m$  induzida pelo cálcio, a sua utilização aumenta o efeito subsequente à adição da combinação de ADP/CsA/ $Mg^{2+}$ , ou seja, a re-energização mitocondrial.

### 3.2.10.1. Ensaios Experimentais

Após oxigenação contínua por 75min (incubação numa mistura de ar/5%  $CO_2$  a  $37^\circ C$  em banho-maria agitado) as suspensões de túbulo proximais (TP) foram levadas ao fluorômetro onde foram submetidas aos seguintes protocolos:

- **Grupo Controle (sem  $Ca^{2+}$ ):** adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O seguida por adição da solução tampão utilizada na suspensão de TP aos 500 segundos;
- **Grupo PMT:** adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O seguida por adição de  $30 \mu M$  de  $Ca^{2+}$  aos 500 segundos, de BSA aos 800 segundos e da combinação de ADP/CsA/ $Mg^{2+}$  aos 1050 segundos;
- **Grupo 45U/mL P-FLA<sub>2</sub> (com  $Ca^{2+}$ )** = adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O e de  $10 \mu M$   $Ca^{2+}$  seguida por adição de 45U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada de pâncreas de porco (P-FLA<sub>2</sub>) aos 500 segundos, de BSA aos 1000 segundos e da combinação de ADP/CsA/ $Mg^{2+}$  aos 1250 segundos;
- **Grupo 45U/mL P-FLA<sub>2</sub> (sem  $Ca^{2+}$ )** = adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O seguida por adição de 45U/mL de P-FLA<sub>2</sub> aos 500 segundos, de BSA aos 1000 segundos e da combinação de ADP/CsA/ $Mg^{2+}$  aos 1250 segundos;
- **Grupo 4U/mL VS-FLA<sub>2</sub> (com  $Ca^{2+}$ )** = adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O e de  $10 \mu M$   $Ca^{2+}$  seguida por adição de 4U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub>

isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VS-FLA<sub>2</sub>) aos 500 segundos, de BSA aos 1000 segundos e da combinação de ADP/CsA/Mg<sup>2+</sup> aos 1250 segundos;

- **Grupo Controle com Cálcio:** adição de suspensão de TP em presença do marcador safranina O seguida por adição de 10µM Ca<sup>2+</sup> aos 500 segundos.

### 3.3. Análise Estatística

Todos os valores são apresentados como médias ± E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de Student não-pareado. A significância foi considerada para valores de P menores que 0,05. A correção de Whitney-Mann foi utilizada quando necessário. A análise da variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foram utilizados para análises comparativas de mais de dois grupos.

### 3.4. Aspectos Éticos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará.





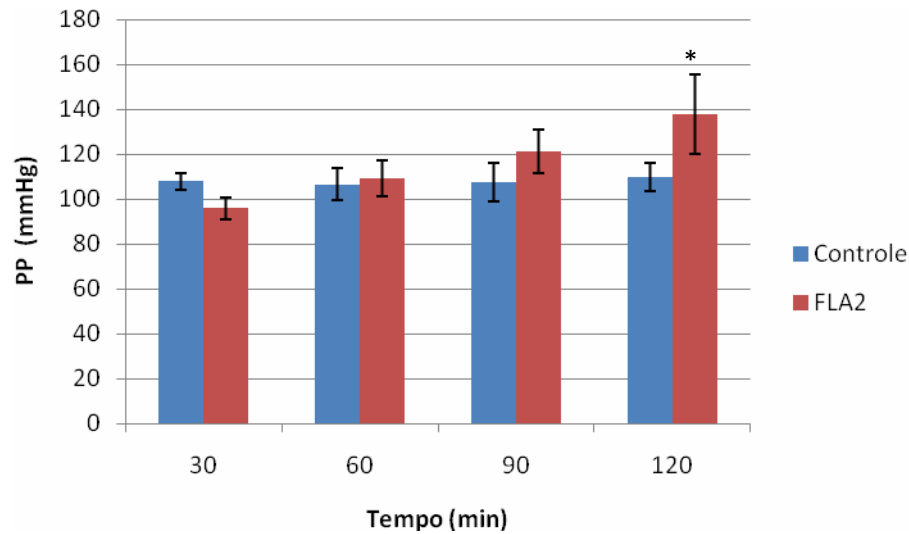
## 4.1. Avaliação dos Parâmetros Renais no Rim Isolado de Rato

### 4.1.1. Estudo dos efeitos renais da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*

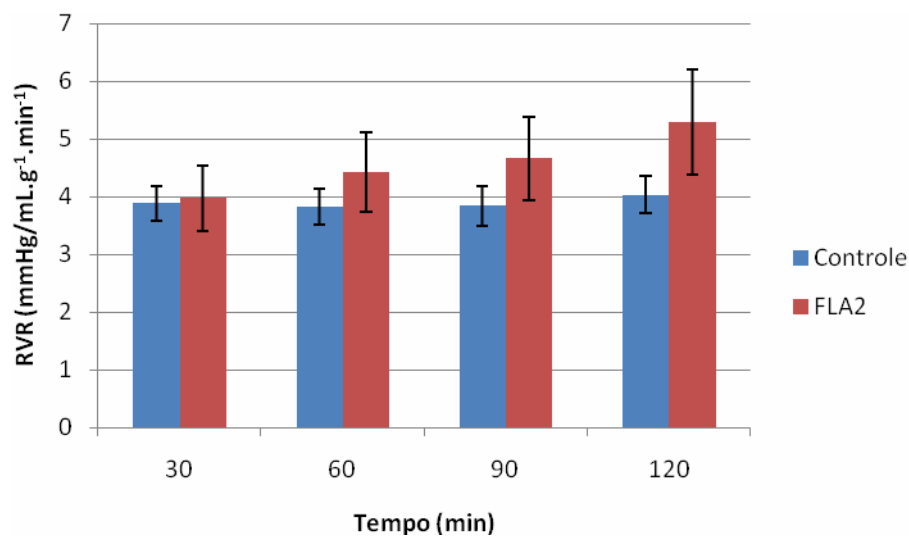
A adição de fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* em rins isolados de rato promoveu aumento significativo na pressão de perfusão (PP), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG) aos 120 minutos de perfusão (Figuras 10, 12 e 13, respectivamente).

Em relação aos transportes totais de sódio, potássio e cloreto foram observadas reduções significativas aos 90 minutos para todos os eletrólitos, enquanto os transportes de potássio e de cloreto mostraram reduções a partir dos 60 minutos (Figuras 14, 15 e 16, respectivamente). Os percentuais de transportes proximais mostraram reduções semelhantes aos dos transportes totais para todos os eletrólitos analisados (Tabela 03).

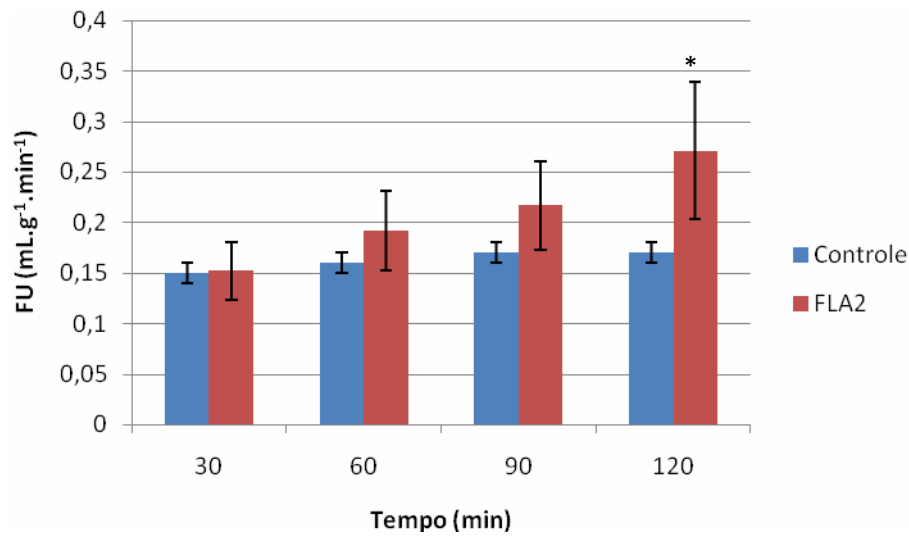
Não foi observada alteração na depuração osmótica após a adição de fosfolipase A<sub>2</sub> (Tabela 04).



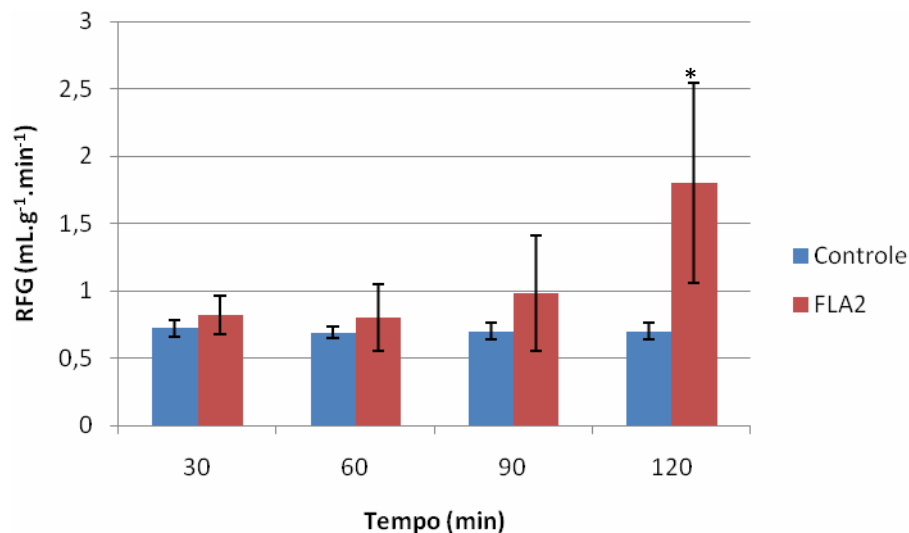
**Figura 10. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* na pressão de perfusão (PP).** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados ( $n=6$ ) e o grupo controle ( $n=6$ ). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10 $\mu$ g.



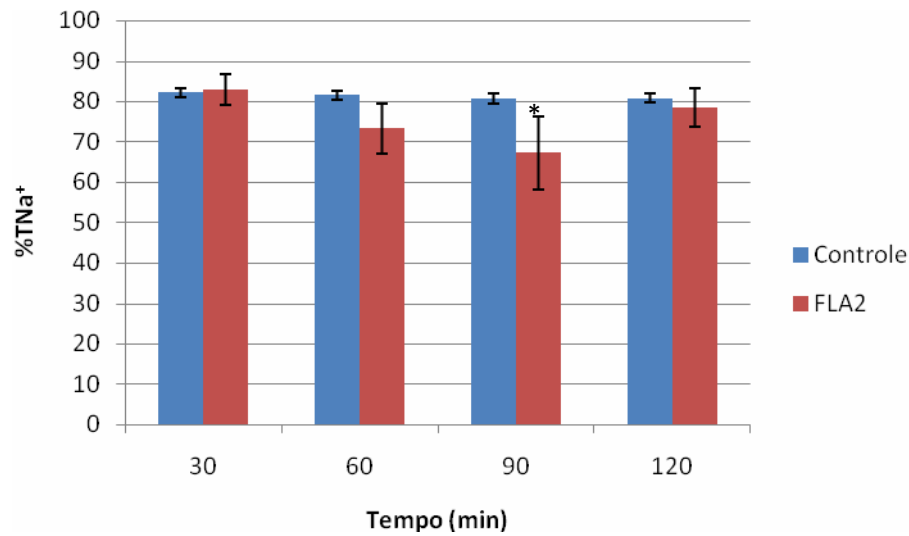
**Figura 11. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* na resistência vascular renal (RVR).** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados ( $n=6$ ) e o grupo controle ( $n=6$ ). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10 $\mu$ g.



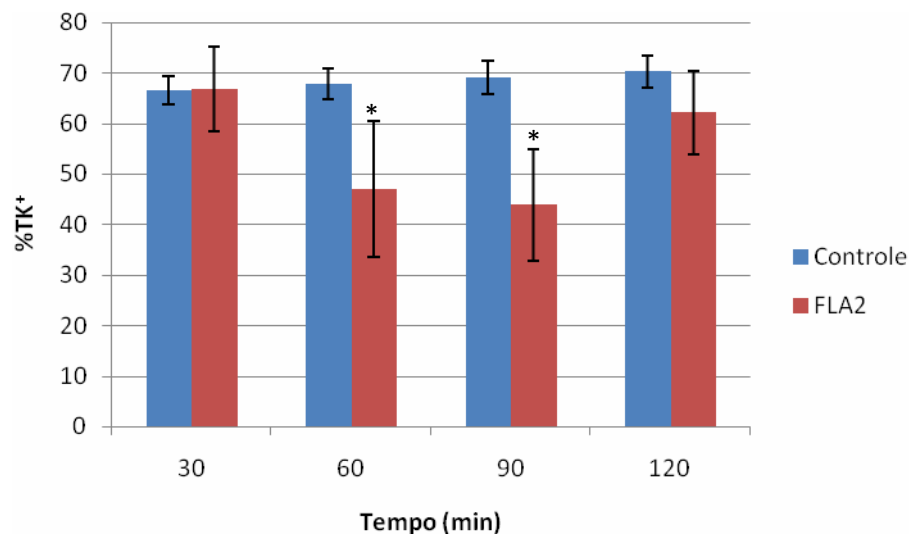
**Figura 12. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* no fluxo urinário (FU).** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10 $\mu$ g.



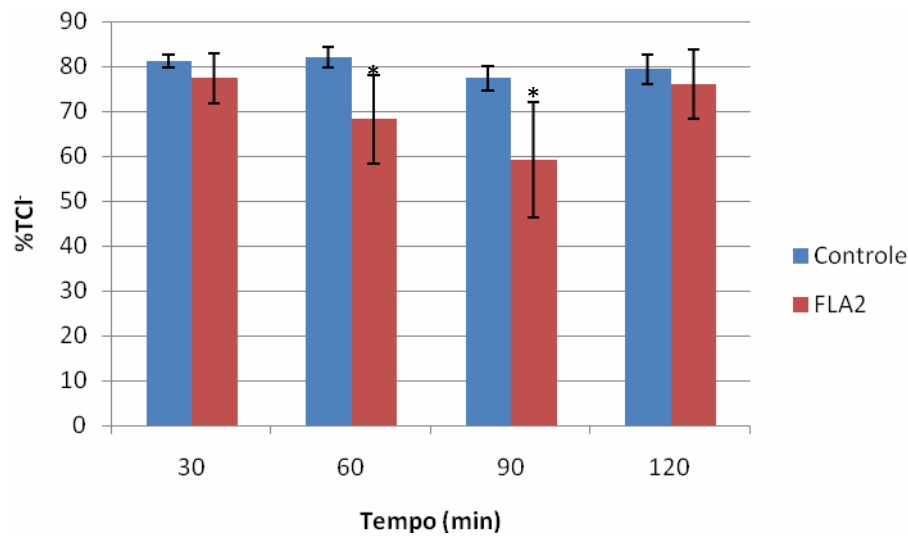
**Figura 13. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* no ritmo de filtração glomerular (RFG).** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10 $\mu$ g.



**Figura 14. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>).** Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10μg.



**Figura 15. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>).** Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados (n=6) e o grupo controle (n=6). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub> na dose de 10μg.



**Figura 16. Efeitos renais promovidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCl).** Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com  $p < 0,05$ . \* = comparação entre os grupos tratados ( $n=6$ ) e o grupo controle ( $n=6$ ). FLA<sub>2</sub> = adição de fosfolipase A<sub>2</sub>, na dose de 10 $\mu$ g.

**Tabela 03. Efeitos da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre os percentuais de transportes proximais de eletrólitos**

Parâmetros Renais	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>% pTNa<sup>+</sup></b>				
Controle	79,99 $\pm$ 1,83	78,13 $\pm$ 1,65	71,76 $\pm$ 1,99	79,27 $\pm$ 2,39
FLA <sub>2</sub>	80,79 $\pm$ 3,91	68,13 $\pm$ 7,38	62,97 $\pm$ 9,44*	75,20 $\pm$ 5,48
<b>% pTK<sup>+</sup></b>				
Controle	66,64 $\pm$ 3,08	66,61 $\pm$ 3,35	67,07 $\pm$ 3,76	69,85 $\pm$ 3,96
FLA <sub>2</sub>	64,75 $\pm$ 9,17	41,91 $\pm$ 14,36*	39,58 $\pm$ 11,56*	58,97 $\pm$ 8,83
<b>% pTCl</b>				
Controle	79,37 $\pm$ 1,57	80,3 $\pm$ 2,67	78,94 $\pm$ 0,5	78,27 $\pm$ 3,39
FLA <sub>2</sub>	75,08 $\pm$ 6,0	63,66 $\pm$ 11,26*	54,91 $\pm$ 13,23*	72,56 $\pm$ 8,71

Os dados são expressos por média  $\pm$  E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). A análise estatística foi feita por teste *t* de Student com \* $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

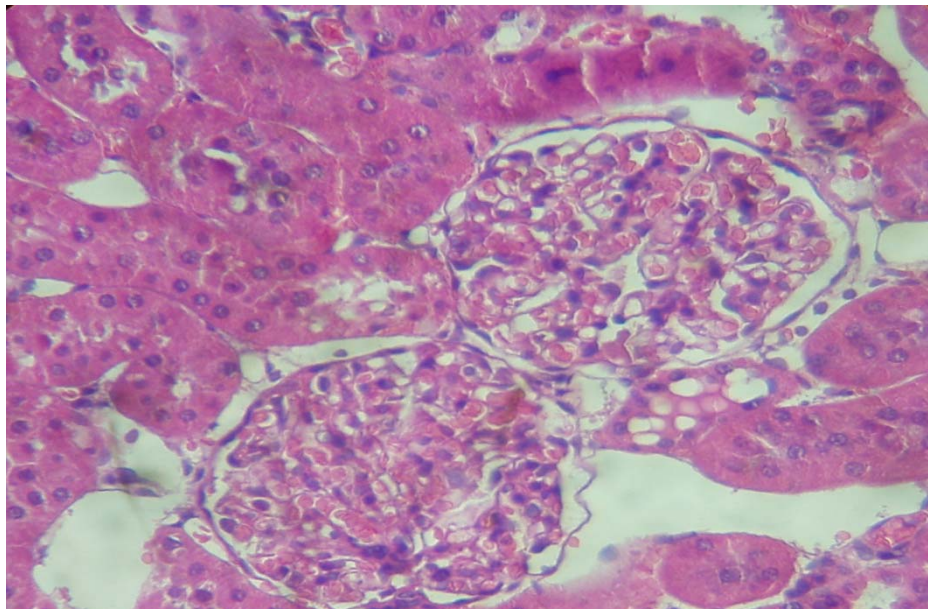
**Tabela 04.** Efeitos da fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre o *clearance* osmótico (C<sub>osm</sub>)

Tempo (min)	Controle	FLA <sub>2</sub>
30	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,04
60	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,06
90	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,06
120	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,08

Os dados são expressos por média ± E.P.M. compilados em quatro períodos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 minutos). C<sub>osm</sub> = mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

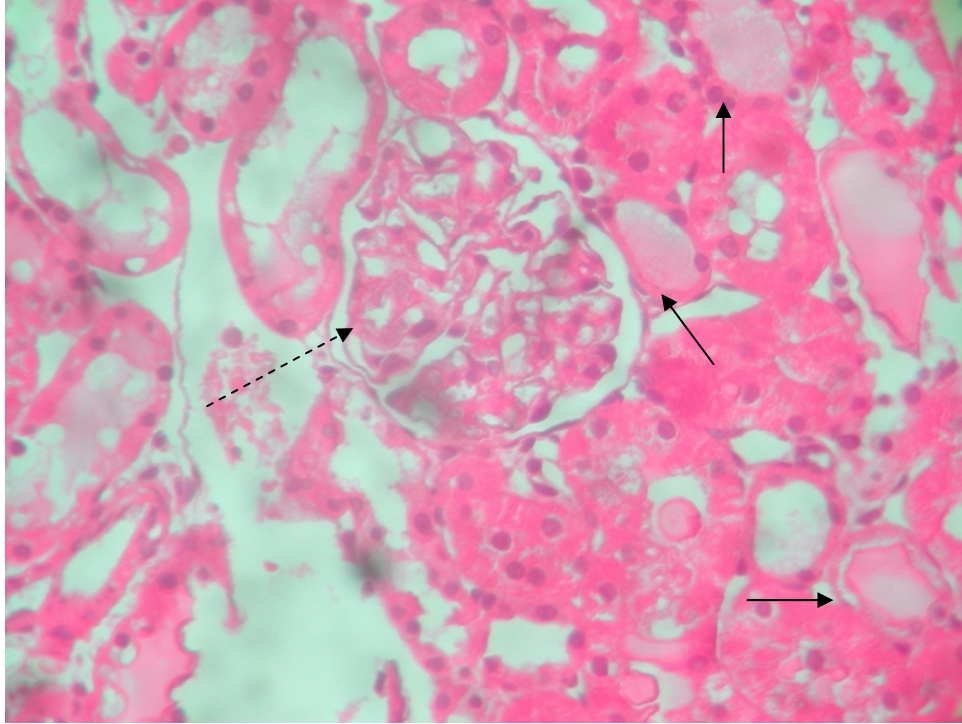
#### 4.2. Análise Histológica

Na análise histológica dos rins perfundidos com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi observada a presença de quantidade moderada de material proteináceo nos túbulos renais (Figura 18). No entanto, os glomérulos, vasos e interstício apresentaram aspectos normais. Não foram observadas alterações nos rins contralaterais (rins controle, Figura 17).



**Figura 17.** Análise histológica do rim do grupo controle

(aumento de 400x; coloração H.E.).



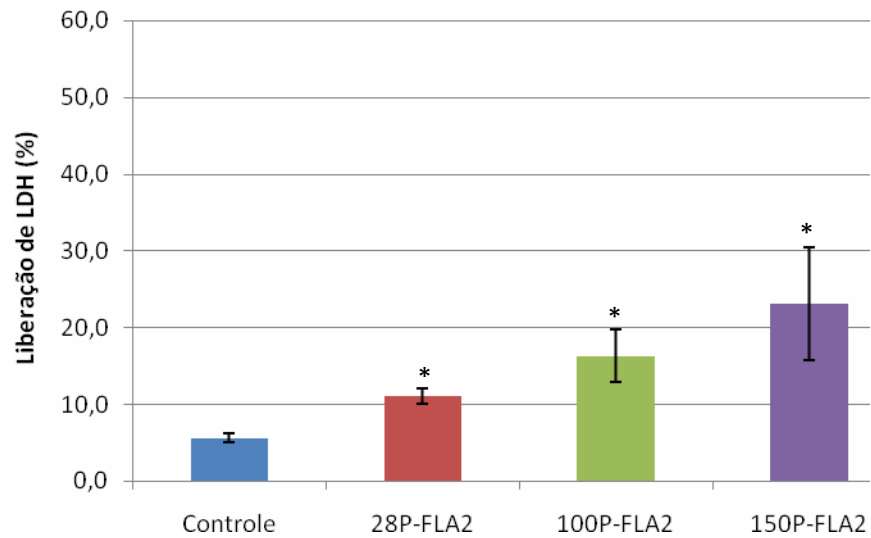
**Figura 18.** Análise histológica de rim perfundido com fosfolipase  $A_2$  isolada do veneno da *C. d. terrificus* revelando a presença de quantidade moderada de material proteináceo nos túbulos renais (setas) e glomérulo normal (seta tracejada) (aumento de 400x; coloração H.E.).

#### 4.3. Mensuração da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

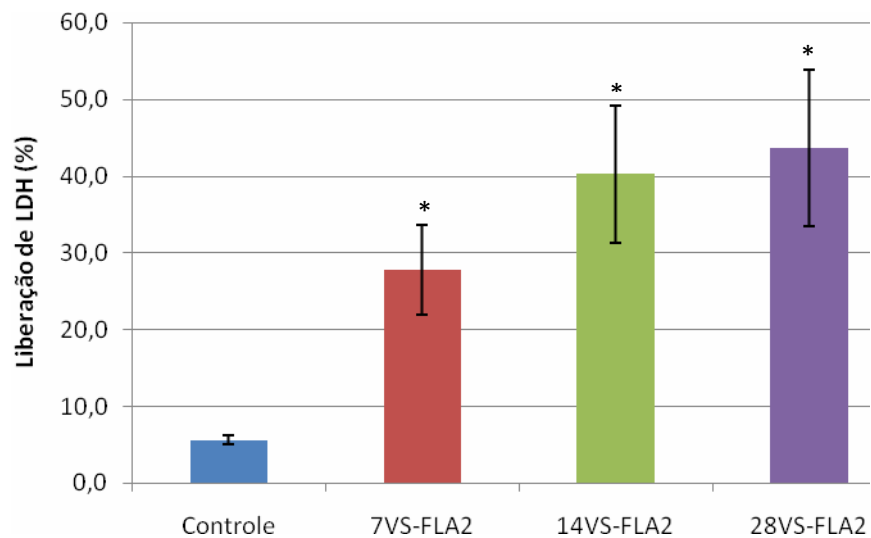
A habilidade das fosfolipases  $A_2$  (FLA $_2$ ) isoladas a partir de pâncreas de porco (PP-FLA $_2$ ) ou do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VS-FLA $_2$ ) de produzir injúria celular foi investigada através da mensuração da lactato desidrogenase (LDH) liberada a partir de suspensões de túbulos proximais.

Foi observado que ambas FLA $_2$ s induziram aumentos dose-dependentes na liberação de LDH com valores marcantes para a FLA $_2$  crotálica (Figuras 19 e 20).

O percentual basal de LDH liberado foi de  $5,4 \pm 0,89\%$  e para 28, 100 e 150U/mL de PP-FLA $_2$  houve um aumento na liberação de LDH tubular de  $14,5 \pm 3,6\%$ ,  $21,2 \pm 3,6\%$  e  $23,1 \pm 7,4\%$ , respectivamente, enquanto os valores para 7, 14 e 28U/mL de VS-FLA $_2$  foram  $27,8 \pm 5,8\%$ ,  $40,3 \pm 8,9\%$  e  $48,5 \pm 11,48\%$ , respectivamente (Figuras 19 e 20).



**Fig.19.** Níveis de LDH em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (P-FLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL; N=4, \*:  $P < 0,05$  vs. Controle).

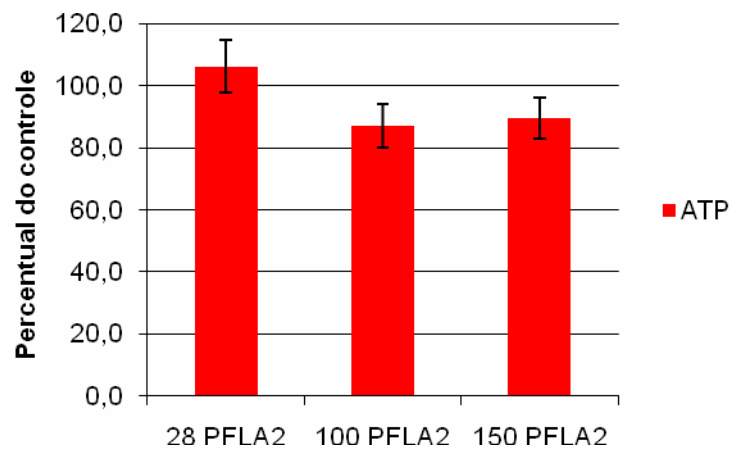


**Fig.20.** Níveis de LDH em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica (VS-FLA<sub>2</sub>; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL, 14U/mL e 28U/mL; N=4, \*:  $P < 0,05$  vs. Controle).

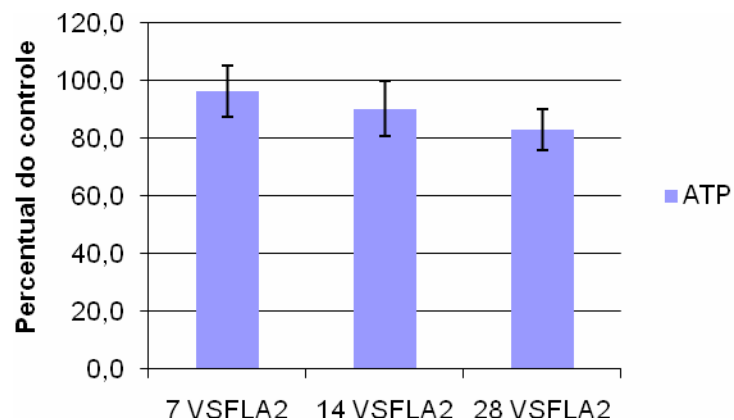


#### 4.4. Mensuração dos níveis de ATP

Ambas fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica induziram um decréscimo no conteúdo celular de ATP, apesar de não ser um efeito estatisticamente significativo (Figuras 21 e 22).



**Fig.21.** Conteúdo celular de ATP de Túbulos Proximais Tratados com fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (P-FLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL; N=4).



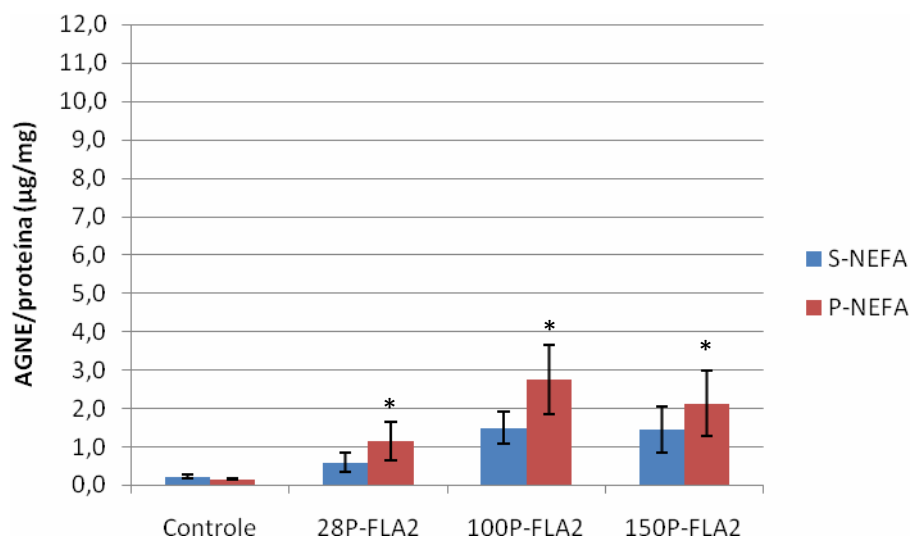
**Fig.22.** Conteúdo celular de ATP de Túbulos Proximais Tratados com fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da *Crotalus durissus terrificus* (VS-FLA<sub>2</sub>: 7U/mL, 14U/mL e 28U/mL; N=4).

#### 4.5. Ensaio de Ácidos Graxos Não-Esterificados (AGNE)

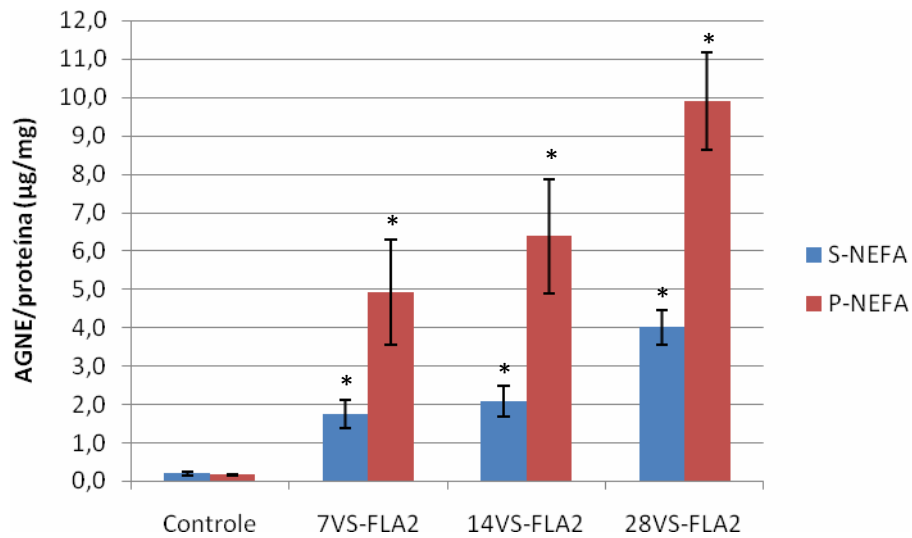
Ambas fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica induziram aumentos nos níveis de AGNE ( $\mu\text{g}$  de AGNE/ mg de proteína tubular), sendo o maior incremento produzido pela VS-FLA<sub>2</sub> (Figuras 23 e 24). A FLA<sub>2</sub> pancreática produziu um aumento significativo nos níveis de AGNE da fração sobrenadante somente nas concentrações de 100U/mL e 150U/mL (Figura 23).

Foi observado que os níveis de AGNE do sedimento foram maiores do que os do sobrenadante para ambas FLA<sub>2</sub>s, sendo um efeito dose-dependente aquele induzido pela enzima crotálica (Figura 24).

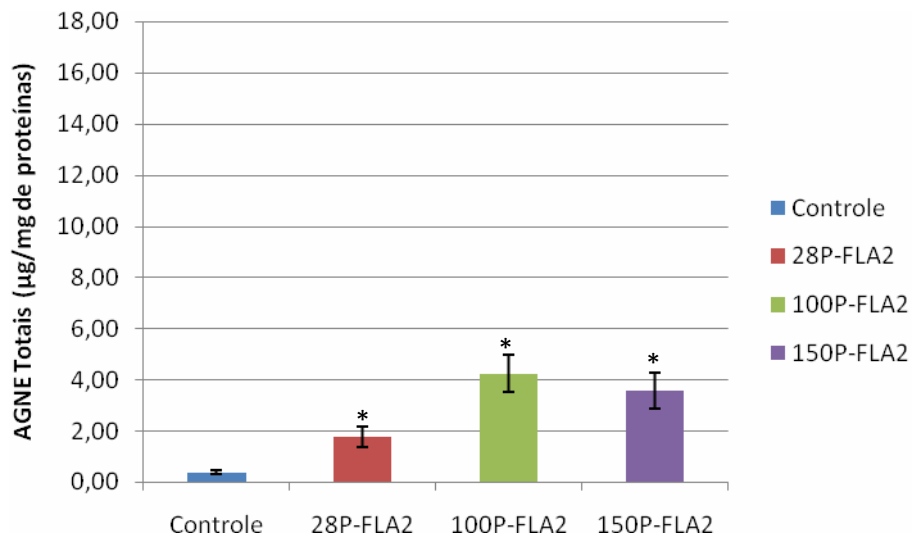
Os valores de AGNE totais apresentaram-se também elevados para os grupos tratados com as fosfolipases pancreática e crotálica (Figuras 25 e 26).



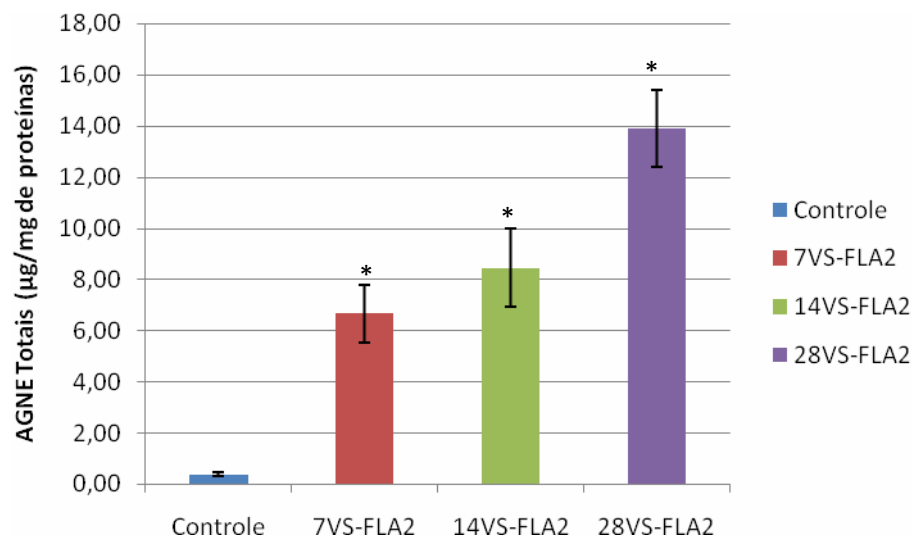
**Fig.23.** Níveis de AGNE em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (P-FLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL). S-AGNE= AGNE do sobrenadante; P-AGNE= AGNE do sedimento (*pellet*). Os valores são uma média em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. N=4, \*:  $P < 0.05$  vs. controle.



**Fig.24.** Níveis de AGNE em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica (VS-FLA<sub>2</sub>; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL, 14U/mL and 28U/mL). S-AGNE= AGNE do sobrenadante; P-AGNE= AGNE do sedimento (*pellet*). Os valores são uma média em µg/mg de proteína. N=4, \*:  $P < 0,05$  vs. controle.



**Fig.25.** Níveis de AGNE totais em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (PFLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL). Os valores são uma média em µg/mg de proteína. N=4, \*:  $P < 0,05$  vs controle.

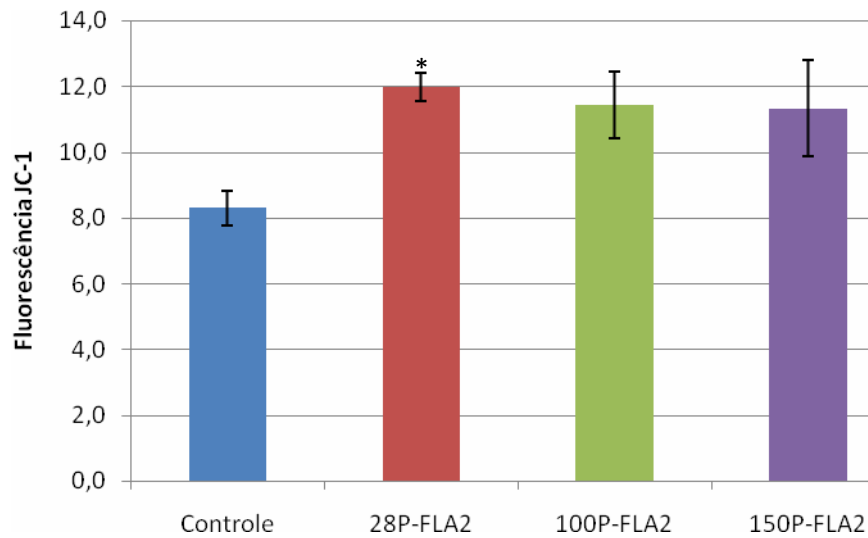


**Fig.26.** Níveis de AGNE totais em túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica (VSFLA<sub>2</sub>; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL, 14U/mL and 28U/mL). Os valores são uma média em µg/mg de proteína. N=4, \*:  $P < 0,05$  vs controle.

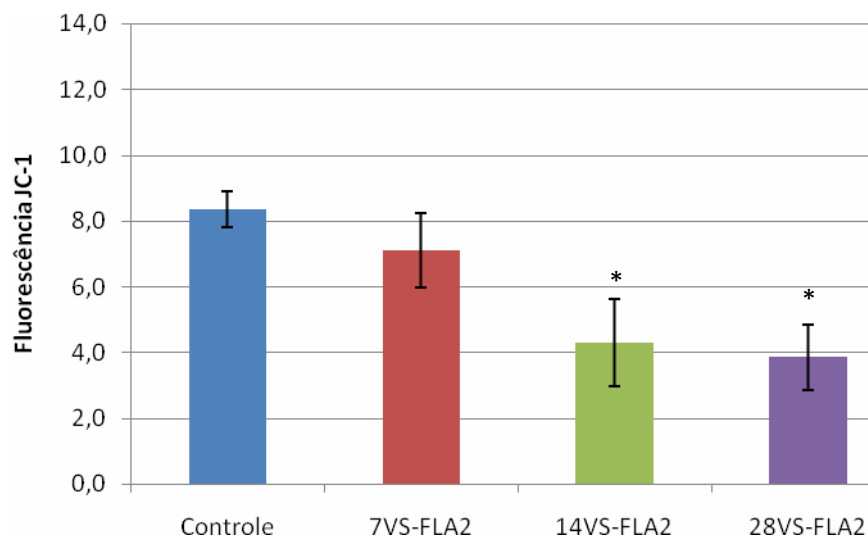
#### 4.6. Fluorescência JC-1

A FLA<sub>2</sub> pancreática não produziu efeitos no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) avaliado pela captação do JC-1 com as concentrações mais elevadas apesar de ter induzido um aumento inesperado no grupo tratado com a menor concentração, 28U/mL (Figura 27). As concentrações mais elevadas da FLA<sub>2</sub> crotálica, entretanto, induziram um decréscimo na captação do JC-1 o que poderia refletir um decréscimo no  $\Delta\Psi_m$  (Figura 28).

A razão da fluorescência JC-1 aos 60 min para as concentrações de 14 e de 28 U/mL de VS-FLA<sub>2</sub> ( $4,3 \pm 1,3$  e  $3,9 \pm 1,0$ , respectivamente) foram distintamente menores do que aquelas dos túbulos desenergizados com FLA<sub>2</sub> pancreática nas concentrações de 100 e de 150U/mL ( $11,4 \pm 1,0$  e  $11,3 \pm 1,5$ , respectivamente) os quais apresentaram valores próximos ao do grupo controle ( $8,3 \pm 0,5$ , Figuras 27 e 28).



**Fig.27.** Captação de JC-1 em células intactas de túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (PFLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL) sob condições normóxicas. N=4, \*:  $P < 0.05$  vs. controle.

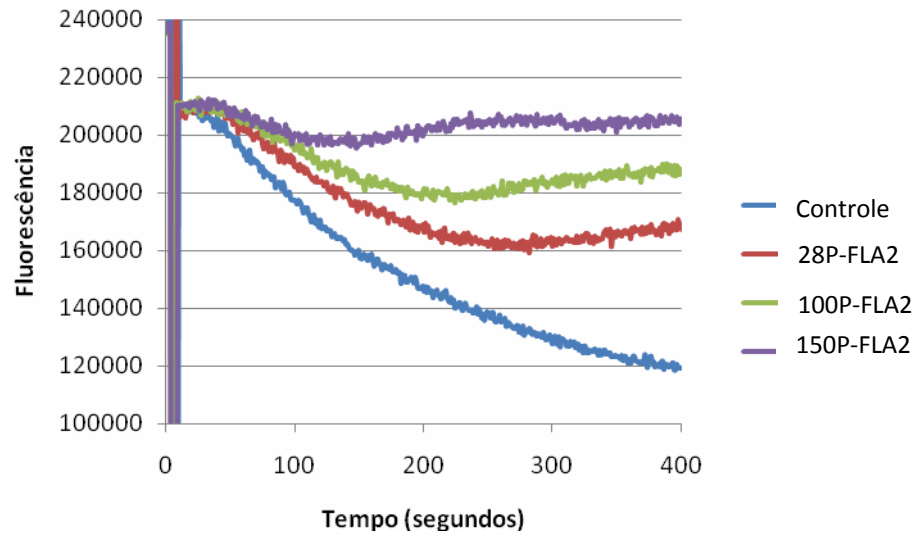


**Fig.28.** Captação de JC-1 em células intactas de túbulos proximais isolados tratados com concentrações diferentes de fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica (VSFLA<sub>2</sub>; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL, 14U/mL and 28U/mL) sob condições normóxicas. N=4, \*:  $P < 0.05$  vs. controle.

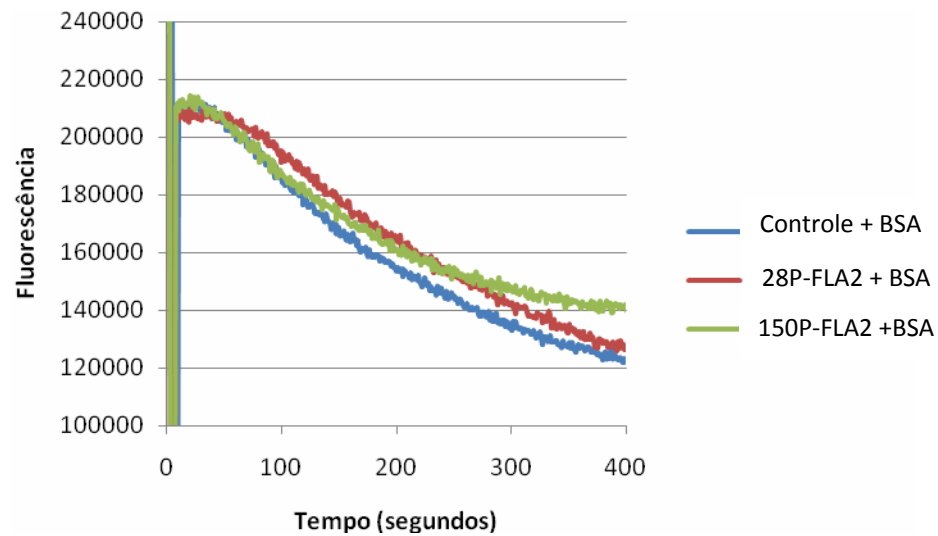
#### 4.7. Captação de Safranina O

A Figura 29A mostra os efeitos da FLA<sub>2</sub> pancreática sobre o  $\Delta\Psi_m$  mensurado através da captação de safranina O. Este parâmetro apresentou um decréscimo marcante em relação ao controle. Foi observado que o decréscimo no  $\Delta\Psi_m$  induzido pela FLA<sub>2</sub> pancreática foi revertido pela adição de BSA, utilizada para remoção de ácidos graxos da suspensão de túbulos proximais (Figura 29B). Os maiores efeitos foram observados com a FLA<sub>2</sub> crotálica que apresentou um padrão dose-dependente (Figuras 30A e 30B).

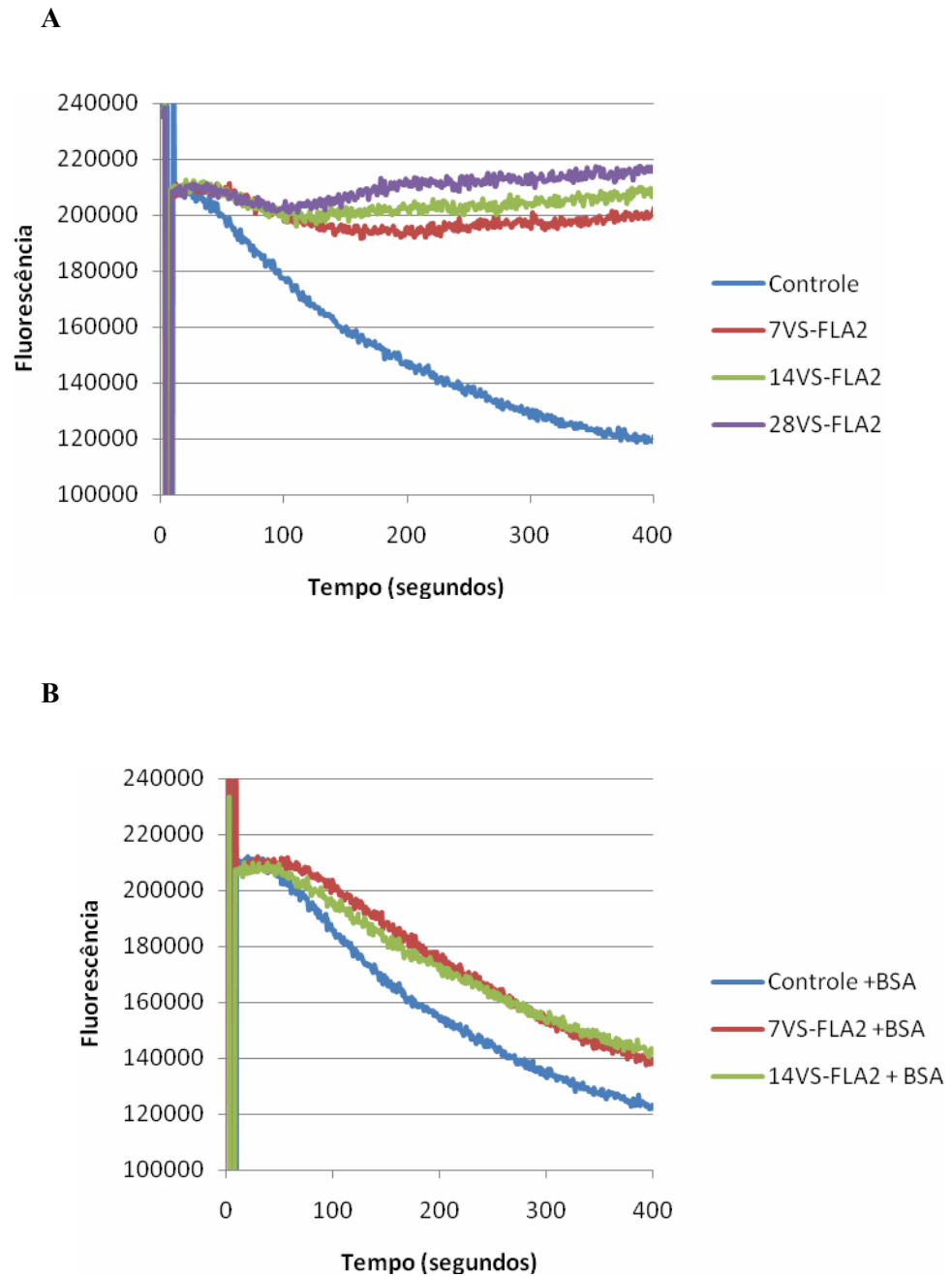
A



B



**Fig.29. Decréscimo na captação de safranina O induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática. Traçados representativos da fluorescência da captação de safranina O pelas mitocôndrias em túbulos permeabilizados tratados com fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (P-FLA<sub>2</sub>: 28U/mL, 100U/mL e 150U/mL. A. Suspensão de túbulos proximais (STP) suplementados com succinato. B. STP suplementados com succinato mais adição de Albumina Bovina (BSA) no tempo 0 (zero).**

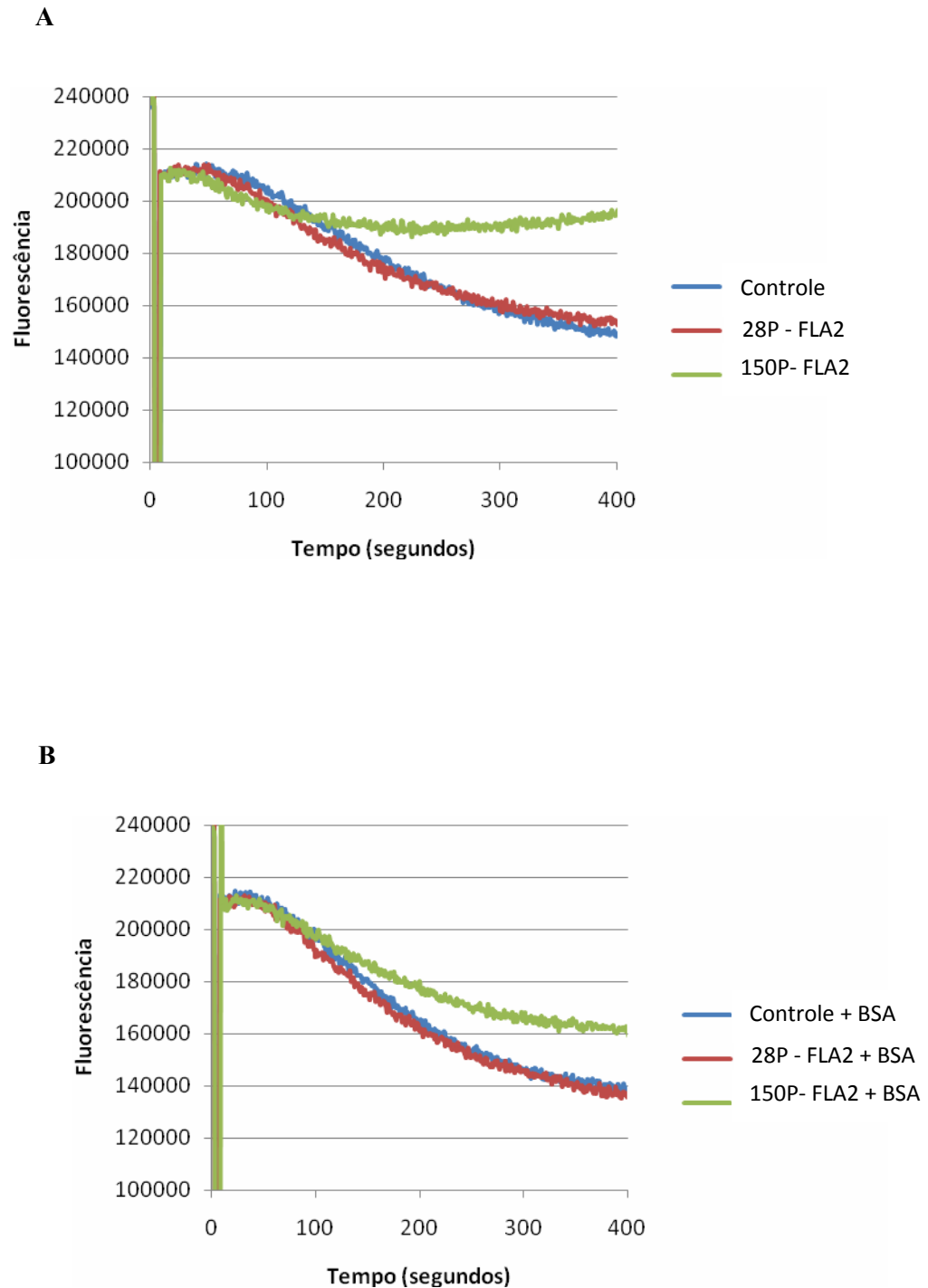


**Fig.30. Decréscimo na captação de safranina O induzido pela fosfolipase  $A_2$  crotálica. Traçados representativos da fluorescência da captação de safranina O pelas mitocôndrias em túbulos permeabilizados tratados com fosfolipase  $A_2$  crotálica (VS-FLA $_2$ ; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL, 14U/mL and 28U/mL). A. Suspensão de túbulos proximais (STP) suplementados com succinato. B. STP suplementados com succinato mais adição de Albumina Bovina (BSA) no tempo 0 (zero).**

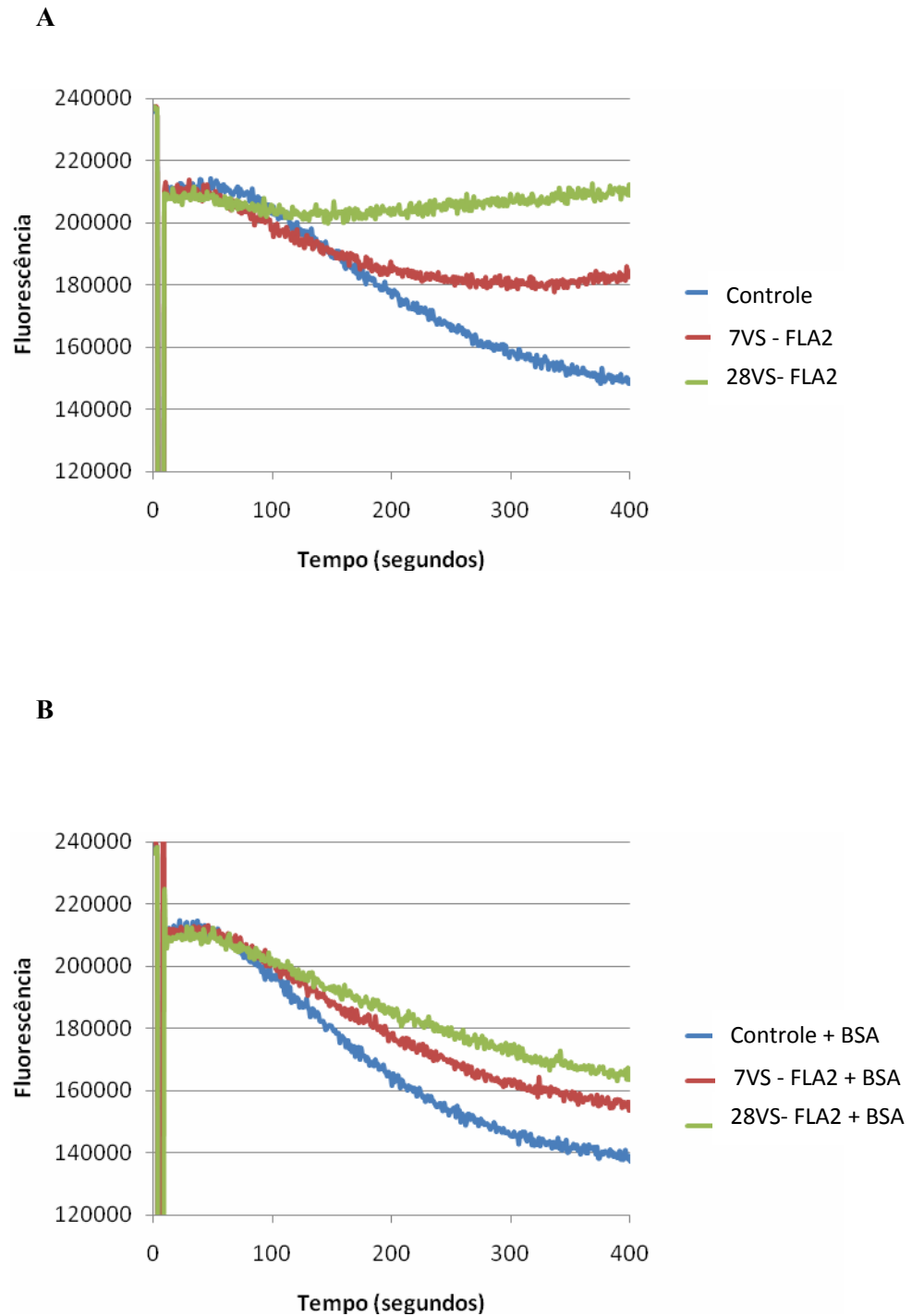


A Figura 31A mostra que a energização auxiliada por glutamato-malato foi menos afetada do que aquela auxiliada por succinato na ausência de BSA. Esse efeito foi parcialmente revertido pela adição de BSA para o grupo tratado com 150U/mL de FLA<sub>2</sub> pancreática (Figura 31B), apesar de não ser tanto quanto com o succinato (Figura 29B).

A adição de BSA reverteu completamente o decréscimo no  $\Delta\Psi_m$  para o grupo de 28U/mL FLA<sub>2</sub> crotálica (Figura 32B). O grupo tratado com a FLA<sub>2</sub> crotálica também apresentou um  $\Delta\Psi_m$  diminuído tendo este efeito atingido os valores mais elevados quando comparados com os da fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (Figuras 31A e 31B).



**Fig.31. Decréscimo na captação de safranina O induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática. Traçados representativos da fluorescência da captação de safranina O pelas mitocôndrias em túbulos permeabilizados tratados com fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (P-FLA<sub>2</sub>: 28U/mL e 150U/mL. A. Suspensão de túbulos proximais (STP) suplementados com glutamato+malato. B. STP suplementados com glutamato+malato mais adição de Albumina Bovina (BSA) no tempo 0 (zero).**



**Fig.32. Decréscimo na captação de safranina O induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica. Traçados representativos da fluorescência da captação de safranina O pelas mitocôndrias em túbulos permeabilizados tratados com fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica (VS-FLA<sub>2</sub>; *Crotalus durissus terrificus*: 7U/mL e 28U/mL). A. Suspensão de túbulos proximais (STP) suplementados com glutamato+malato. B. STP suplementados com glutamato+malato mais adição de Albumina Bovina (BSA) no tempo 0 (zero).**

#### 4.8. Estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT)

A ocorrência de permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) em suspensões de túbulos proximais (TP) foi avaliada pela liberação do marcador safranina O previamente captados pelas mitocôndrias da preparação. De forma concomitante, pode-se mensurar a formação de PMT através da diminuição da absorbância da suspensão resultante do edema mitocondrial.

Foi observado no grupo PMT que a adição de 30 $\mu$ M de cálcio induziu a formação do poro de permeabilidade mitocondrial de transição, indicada pela diminuição na captação da safranina O, ou seja, colapso do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e pela diminuição da absorbância da suspensão de TP (Figuras 33 e 36, respectivamente). O PMT induzido por cálcio foi bloqueado adição de albumina bovina (BSA), ciclosporina A (CsA), adenosina difosfato (ADP) e o magnésio ( $Mg^{2+}$ ). Apesar da BSA *per se* não ter melhorado a dissipação do  $\Delta\Psi_m$  induzida pelo cálcio, a sua utilização aumentou o efeito subsequente à adição da combinação de ADP/CsA/ $Mg^{2+}$  (Figura 33).

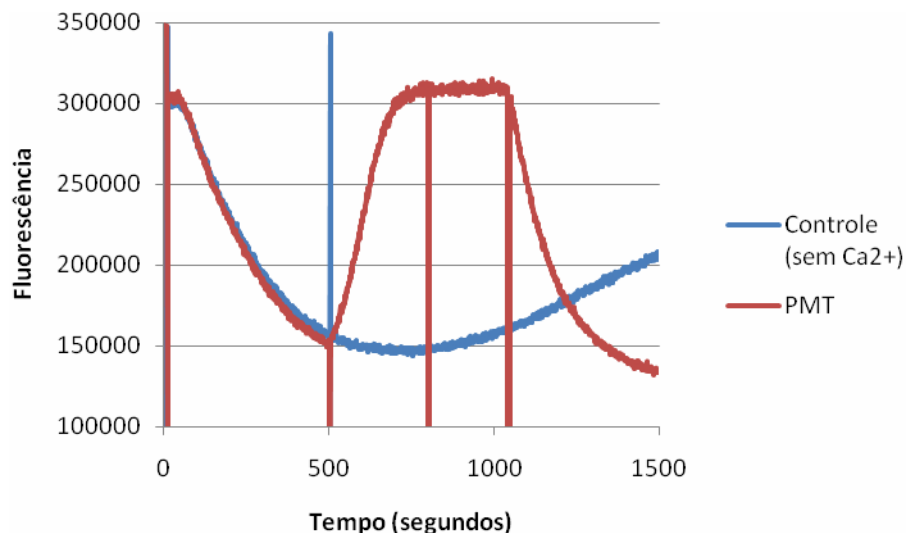
No grupo controle (sem  $Ca^{2+}$ ) foi observado que a adição solução tampão aos 500 segundos não promoveu alterações no  $\Delta\Psi_m$  ou no volume mitocondrial (Figuras 33 e 37).

A Figura 34 mostra os perfis da captação de safranina O em suspensões de TP suplementadas com 10 $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ . Foi observado que a adição de 45U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática (grupo P-FLA<sub>2</sub>) aos 500 segundos promoveu a liberação da safranina O, sendo esta revertida pela adição de albumina bovina (BSA) e de inibidores de PMT (CsA, ADP e  $Mg^{2+}$ ) aos 1000 e 1250 segundos, respectivamente. Por entanto, a fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática foi capaz de induzir a formação de PMT, apesar da pequena diminuição da absorbância da suspensão, ou seja, ocorrência de leve edema mitocondrial (Figura 38).

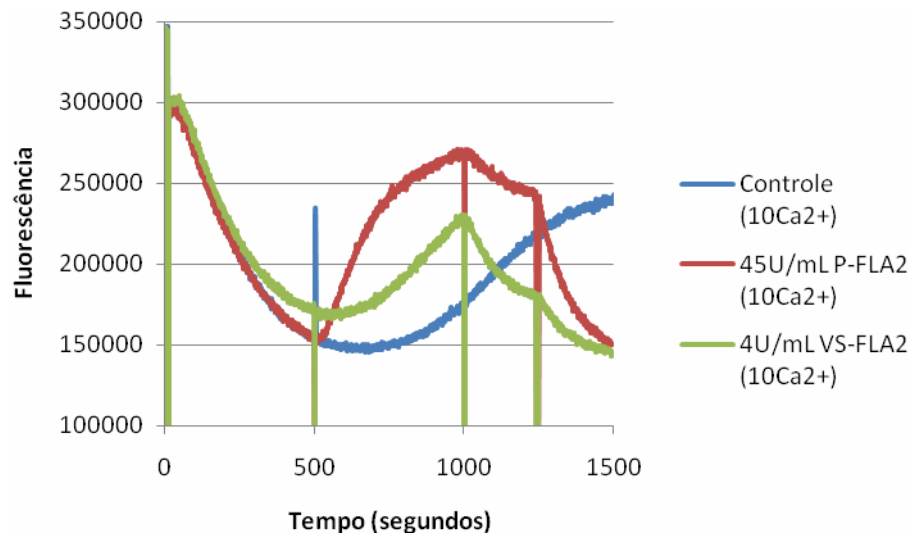
De maneira semelhante, a adição de 4U/mL de FLA<sub>2</sub> isolada de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VS-FLA<sub>2</sub>) promoveu a permeabilidade mitocondrial de transição, sendo este efeito também bloqueado pela adição subsequente de BSA e da combinação de CsA, ADP e  $Mg^{2+}$  aos 1000 e 1250 segundos, respectivamente (Figura 34). Entretanto, não ocorreu alteração significativa na absorbância relativa ao volume mitocondrial após adição da FLA<sub>2</sub> crotálica (Figura 39).

No grupo controle, que só recebeu a adição de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  aos 500 segundos, foi observado que a captação de safranina O não modificada e a absorbância da suspensão de TP não foram modificadas, o que sugere que o potencial de membrana mitocondrial não foi afetado pela adição desse íon na referida dose (Figuras 34 e 40, respectivamente).

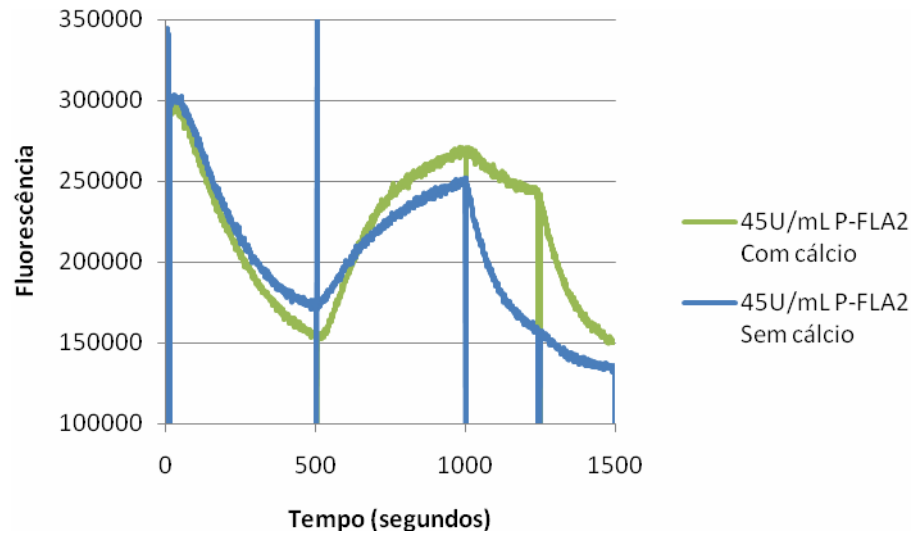
Na Figura 35 observa-se a comparação dos efeitos da adição de  $45\text{U/mL}$  de fosfolipase  $\text{A}_2$  pancreática na presença e na ausência de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste último caso, houve uma pequena diminuição no efeito máximo sobre a captação da safranina, apesar dos efeitos protetores da BSA e da combinação de CsA, ADP e  $\text{Mg}^{2+}$  terem sido muito maiores.



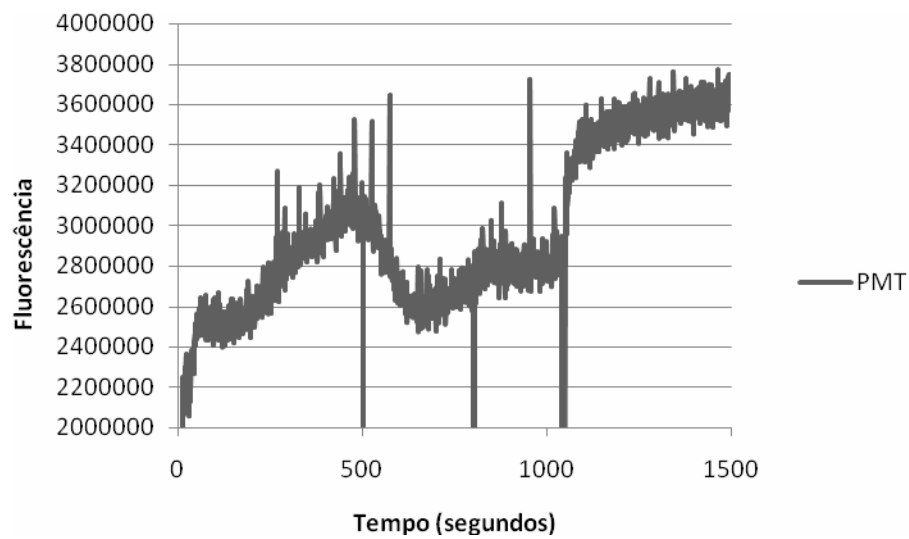
**Figura 33. Expressão da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT) em suspensões de túbulos proximais induzida por cálcio.** Todas as suspensões de túbulos proximais (TP) continham digitonina, succinato, safranina O, solução tampão intracelular (TIC) e  $40\mu\text{M}$  EGTA. O grupo controle (traçado azul) mostra que a adição de TIC, aos 500seg, não altera a captação de safranina O. O grupo PMT (traçado vermelho) mostra a ocorrência de PMT aos 500seg, após adição de  $30\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo modulada pela adição de albumina bovina (BSA) aos 1000seg e bloqueada pela adição de inibidores de PMT, ciclosporina A (CsA), adenina difosfato (ADP) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) aos 1250 seg.



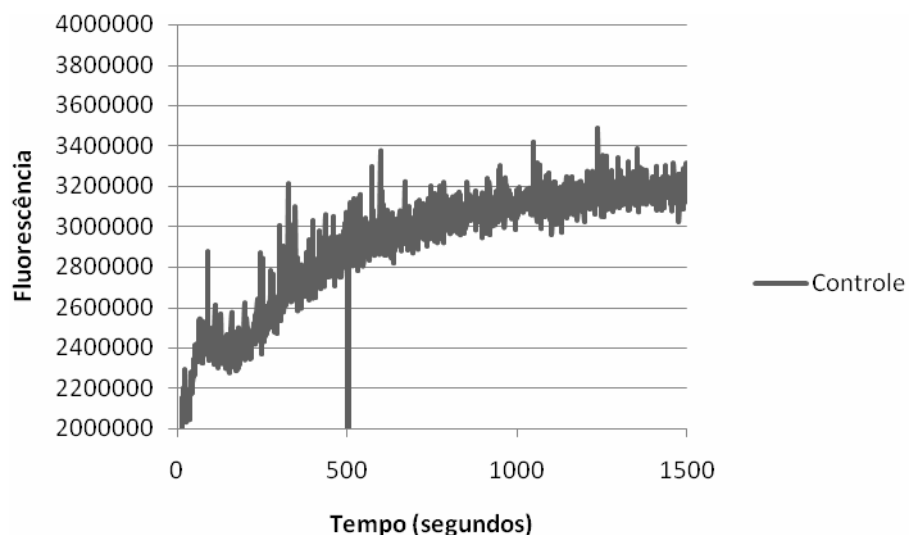
**Figura 34. Alteração do potencial de membrana mitocondrial induzida por fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica em suspensões de túbulos proximais.** Todas as suspensões de túbulos proximais (TP) continham digitonina, succinato, safranina O, solução tampão intracelular (TIC) e 40 $\mu$ M EGTA. O grupo P-FLA<sub>2</sub> (traçado vermelho) mostra a que a adição de 45U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática altera a captação de safranina sendo modulada pela adição de albumina bovina (BSA) aos 1000seg e bloqueada pela adição de inibidores de ciclosporina A (CsA), adenina difosfato (ADP) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>) aos 1250 seg. O traçado verde mostra que adição de 4U/mL de FLA<sub>2</sub> isolada de veneno da serpente *C. d. terrificus*. (VS-FLA<sub>2</sub>) também alterou o potencial de membrana mitocondrial e que a adição de BSA e da combinação de CsA, ADP e Mg<sup>2+</sup> aos 1000 e 1250 seg, respectivamente, também promoveu efeitos protetores. O grupo controle (traçado azul) mostra que a adição de 10 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, aos 500seg, não altera a captação de safranina O.



**Figura 35. Alteração do potencial de membrana mitocondrial induzida por fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática na presença e na ausência de cálcio.** Todas as suspensões de túbulos proximais (TP) continham digitonina, succinato, safranina O, solução tampão intracelular (TIC) e 40 $\mu$ M EGTA. O grupo P-FLA<sub>2</sub> (traçado verde) mostra a que a adição de 45U/mL de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática, na presença de cálcio, altera a captação de safranina sendo modulada pela adição de albumina bovina (BSA) aos 1000seg e bloqueada pela adição de inibidores de ciclosporina A (CsA), adenina difosfato (ADP) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>) aos 1250 seg. O traçado azul a FLA<sub>2</sub> pancreática, na ausência de Ca<sup>2+</sup>, também alterou o potencial de membrana mitocondrial sendo que a adição de BSA e da combinação de CsA, ADP e Mg<sup>2+</sup> aos 1000 e 1250 seg, respectivamente, promoveram efeitos protetores mais pronunciados.

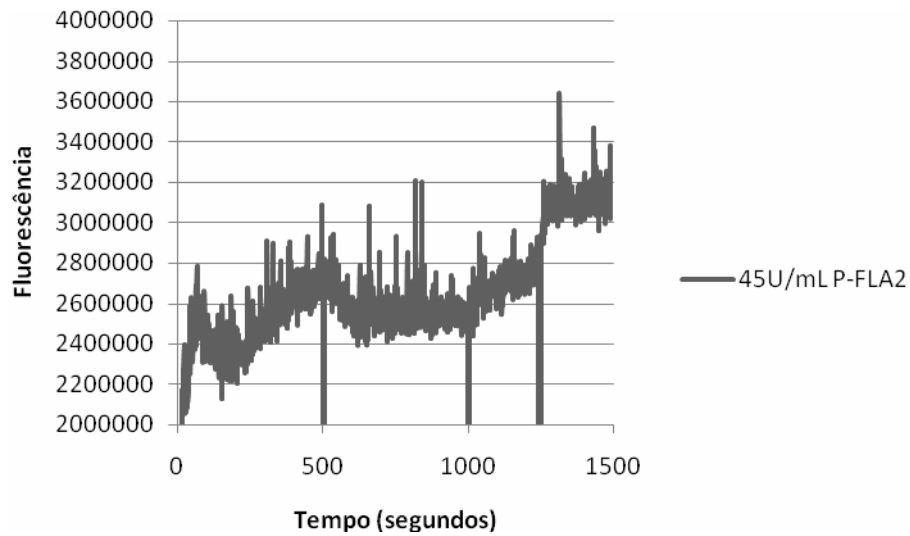


**Figura 36. Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais na presença do poro de permeabilidade mitocondrial de transição.** Observa-se a diminuição da absorvância do marcador safranina O, ou seja, formação do PMT, após adição de  $30\mu\text{M}$  de cálcio aos 500 segundos. Apesar da adição de albumina bovina (BSA), aos 800 segundos, não bloquear o PMT, a sua utilização aumenta o efeito subsequente à adição da combinação de ciclosporina A (CsA), adenosina difosfato (ADP) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) aos 1050 segundos.

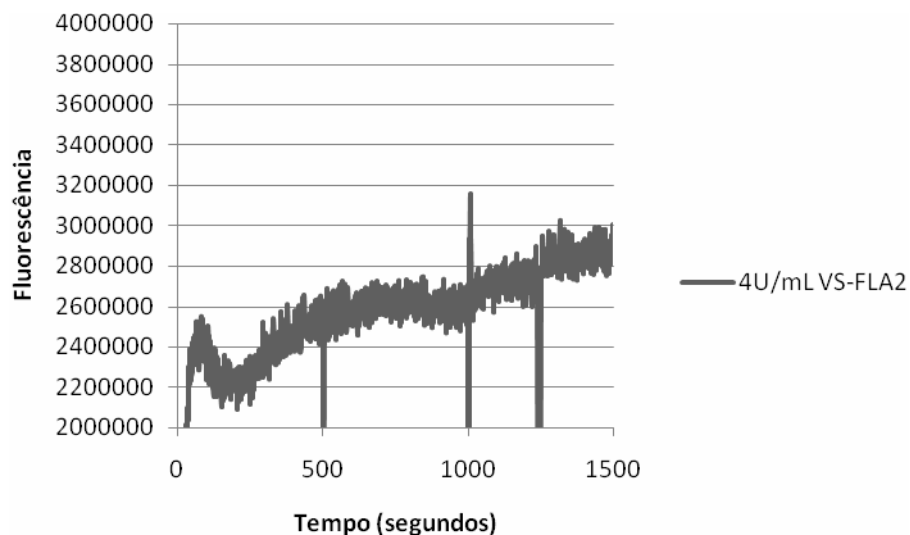


**Figura 37. Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais na ausência do poro de permeabilidade mitocondrial de transição.** Observa-se a absorvância do marcador safranina O não é alterada após adição da solução tampão intracelular (veículo) aos 500 segundos.

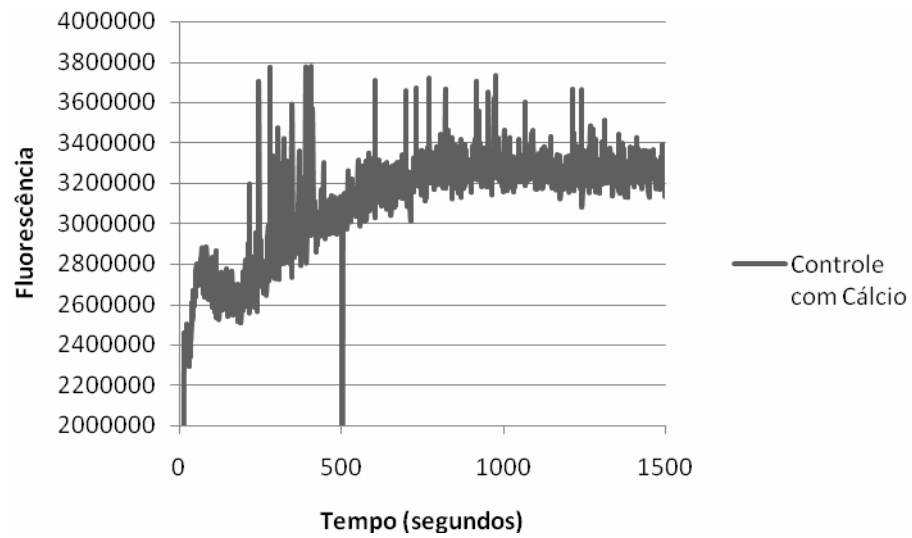




**Figura 38. Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais após adição de fosfolipase  $A_2$  isolada de pâncreas de porco.** Observa-se a absorvância do marcador safranina O em presença de  $10\mu\text{M}$  de cálcio, não é alterada, significativamente, após adição e  $45\text{U/mL}$  de fosfolipase  $A_2$  isolada de pâncreas de porco (P-FLA $_2$ ) aos 500 segundos. A adição de albumina bovina (BSA), aos 1000 segundos, e da combinação de ciclosporina A (CsA), adenosina difosfato (ADP) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), aos 1250 segundos, também não promoveu alterações significativas.



**Figura 39. Perfil da absorvância em suspensão de túbulos proximais após adição de fosfolipase  $A_2$  isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*.** Observa-se a absorvância do marcador safranina O em presença de  $10\mu\text{M}$  de cálcio, não é alterada de forma significativa, após adição e  $4\text{U/mL}$  de fosfolipase  $A_2$  isolada do veneno da *C. d. terrificus* (VS-FLA $_2$ ) aos 500 segundos. A adição de albumina bovina (BSA), aos 1000 segundos, e da combinação de ciclosporina A (CsA), adenosina difosfato (ADP) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), aos 1250 segundos, também não promoveu alterações significativas.



**Figura 40. Ausência do poro de permeabilidade mitocondrial de transição em suspensão de túbulos proximais tratada com cálcio.** Observa-se a absorbância do marcador safranina O não é alterada após adição  $10\mu\text{M}$  de cálcio aos 500 segundos.

**Quadro 01. Resumo dos Efeitos Biológicos da Fosfolipase A<sub>2</sub> Isolada do Veneno de *Crotalus durissus terrificus* em Rim Isolado de Rato**

Parâmetros Funcionais	Efeitos observados	Achados Histopatológicos
PP	↑	
RVR	-	
FU	↑	
RFG	↑	
%TNa <sup>+</sup>	↓	Material proteináceo no espaço urinário e nos túbulos
%TK <sup>+</sup>	↓	
%TCl <sup>-</sup>	↓	
%pTNa <sup>+</sup>	↓	
%pTK <sup>+</sup>	↓	
%pTCl <sup>-</sup>	↓	
C <sub>osm</sub>	-	

**Quadro 02. Resumo dos Efeitos Biológicos Observados em Túbulos Proximais Isolados de Coelho**

Parâmetros Funcionais	FLA <sub>2</sub>	FLA <sub>2</sub>
	( <i>Crotalus durissus terrificus</i> )	Pancreática
LDH	↑↑	↑
AGNE	↑↑	↑
ATP	-	-
ΔΨ <sub>m</sub>	↓↓	↓



#### 4. DISCUSSÃO

Diversos achados clínicos e experimentais têm evidenciado a ação nefrotóxica do veneno crotálico (Amaral *et al.*, 1986; Martins *et al.*, 1998, 2002, 2003; Monteiro *et al.*, 2001; Ribeiro, *et al.*, 1998), sendo extremamente elevada a prevalência de insuficiência renal aguda em vítimas de envenenamentos por cascavéis (Pinho *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços significativos no entendimento da patogênese da insuficiência renal aguda (Dagher *et al.*, 2003; Schrier *et al.*, 2004), pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos de nefrotoxicidade dos venenos ofídicos.

Sabe-se que, em rim isolado de rato, os venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus* e as frações crotoxinas destes produzem atividades biológicas semelhantes, aumentando o fluxo urinário e reduzindo o transporte de sódio, enquanto o ritmo de filtração glomerular é modificado de maneira oposta pelos referidos venenos brutos, mostrando-se reduzido, no primeiro caso, e elevado, no segundo (Quadros 03 e 04).

Por sua vez, reduções no ritmo de filtração glomerular assim como no transporte tubular de potássio são as principais alterações renais induzidas tanto pelo veneno bruto da *C.d. collilineatus* quanto por suas frações crotoxina e fosfolipase A<sub>2</sub>.

#### **Quadro 03. Efeitos biológicos de venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus sp* em rim isolado de rato**

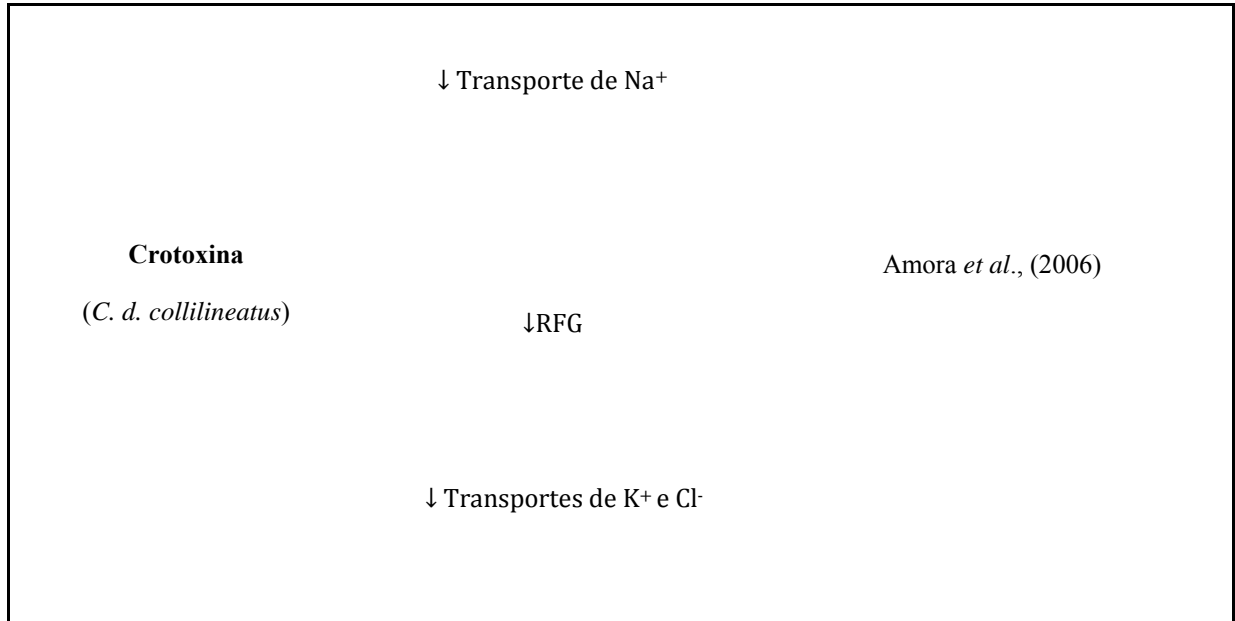
Substância	Efeitos renais	Referência
<i>C. d. cascavella</i>	Vasoconstrição  ↑FU ↓RFG  ↓ Transportes de Na <sup>+</sup>	Martins <i>et al.</i> , (1998)

<i>C. d. terrificus</i>		Monteiro <i>et al.</i> , (2001)
	↑FU ↑RFG	
	↓ Transporte de Na <sup>+</sup>	
<i>C. d. collilineatus</i>	Vasodilatação	Amora <i>et al.</i> , (2006)
	↓FU ↓RFG	

Nota: FU - fluxo urinário e RFG - ritmo de filtração glomerular.

**Quadro 04. Efeitos biológicos de crotoxinas das serpentes *Crotalus durissus sp* em rim isolado de rato**

Substância	Efeitos renais	Referência
<b>Crotoxina</b> ( <i>C. d. cascavella</i> )	Vasoconstrição	Martins <i>et al.</i> , (2002)
	↑FU ↑RFG	
	↓ Transportes de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup>	
<b>Crotoxina</b> ( <i>C. d. terrificus</i> )		Monteiro <i>et al.</i> , (2001)
	↑FU ↑RFG	



Nota: FU - fluxo urinário e RFG - ritmo de filtração glomerular.

No presente trabalho, realizou-se o estudo dos efeitos biológicos da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *C. d. terrificus* em rim isolado de rato e em suspensão de túbulos proximais renais de coelho como uma estratégia para elucidar o mecanismo de ação nefrotóxica induzida por essa toxina.

Em rins isolados as principais alterações funcionais induzidas pela fosfolipase A<sub>2</sub> mostraram foram vasoconstrição renal, diurese e diminuição dos transportes de eletrólitos.

Levando-se em consideração os relatos de uma possível participação de mediadores inflamatórios na injúria celular produzida pelas fosfolipases A<sub>2</sub> secretórias provenientes de venenos de serpentes (Han *et al.*, 1999; Landucci *et al.*, 2000; Rangel-Santos *et al.*, 2004), é possível sugerir que o decréscimo no transporte de potássio seja uma consequência da diminuição no transporte de sódio o que resultaria em grande aporte deste íon para o néfron distal e, subseqüentemente, em indução da secreção de potássio, levando à caliurese (Fonteles *et al.*, 1998).

Outra possibilidade seria um efeito específico da fosfolipase A<sub>2</sub>, ou de seus metabólitos, sobre canais de potássio ou sobre enzimas envolvidas na regulação desse íon. Tal suposição é baseada em relatos de que produtos do metabolismo do ácido araquidônico, via citocromo P450, bloqueiam o canal de potássio da membrana apical da alça de Henle (Sacerdoti *et al.*, 2003) assim como inibem a enzima H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, encontrada nas células tubulares e envolvida na reabsorção de potássio (Beltowski *et al.*, 2003).

Nos rins, os metabólitos do citocromo P450 têm importantes funções fisiopatológicas ao modular o transporte de íons, o tônus e a reatividade vasculares em respostas inflamatórias (Gu & Wang, 2002; Natarajan & Reddy, 2003).

Além disso, nos microvasos, glomérulos, túbulos proximais e ramo ascendente espesso da alça de Henle, o ácido araquidônico é primariamente convertido a 20-HETE, um metabólito que recentemente adquiriu o *status* de principal eicosanóide renal (Imig & Navar, 1996; Ogungbade *et al.*, 2003; Oyekan *et al.*, 1999; Roman, 2002; Sacerdoti *et al.*, 2003).

Por fim, pode-se postular que ácidos graxos livres, reconhecidamente citotóxicos, poderiam atuar diretamente sobre as estruturas renais. Eles seriam produzidos a partir da atividade hidrolítica da fosfolipase A<sub>2</sub>.

Os estudos mais recentes têm fornecido fortes indícios da participação direta dos ácidos graxos na progressão de injúria celular, na alteração da função mitocondrial e das estruturas das membranas e na ativação de vias apoptóticas (Feldkamp *et al.*, 2006; Petronilli *et al.*, 2001; Penzo *et al.*, 2004).

No entanto, a necessidade ou não de metabolização dos ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, em eicosanóides para o surgimento de seus efeitos citotóxicos, é uma questão a ser elucidada.

Através da análise histológica de rins perfundidos com fosfolipase A<sub>2</sub> foi observada a presença de quantidade moderada de material proteináceo nos túbulos renais.

Essas alterações histopatológicas foram condizentes com as demais modificações funcionais renais observadas, especialmente se levadas em consideração a presença de vacúolos e de massas proteináceas nos túbulos, sinais comuns de injúria e disfunção renais (Boer-Lima *et al.*, 1999; Cruz-Höfling *et al.*, 2001).

Através da comparação dos presentes resultados com os da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da *C. d. collilineatus* (Amora *et al.*, 2006; ver Anexo C) foi observado que a diminuição no transporte de potássio foi o único parâmetro renal modificado de forma semelhante por ambas toxinas.



Diferenças na atividade biológica de venenos brutos de subespécies crotálicas assim como das frações crotoxinas destes já foram observadas (Santoro *et al.*, 1999; Câmara *et al.*, 2003; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Foi observado, por exemplo, que tanto o veneno bruto quanto a crotoxina da *C. d. terrificus* apresentaram maior atividade fosfolipásica quando comparados aos das serpentes *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*. No entanto, a comparação das subunidades fosfolipásicas de cada crotoxina revelou que a proveniente da *C. d. cascavella* apresentou a maior atividade enzimática (Santoro *et al.*, 1999; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Num estudo sobre permeabilidade microvascular foi observado que o uso de ciproheptadina, antagonista de receptores histamínicos e serotoninérgicos, reverteu o edema induzido apenas pela fosfolipase A<sub>2</sub> da *C. d. cascavella*, sendo ineficaz para as enzimas da *C. d. collilineatus* e da *C. d. terrificus* (Câmara *et al.*, 2003).

Uma possível explicação para essas diferenças seria a existência de sinergismo ou de antagonismo do efeito de alguns componentes do veneno bruto, enquanto que as diferenças nas atividades biológicas das crotoxinas poderiam estar relacionadas à existência de isoformas das subunidades fosfolipásicas dessa proteína (Santoro *et al.*, 1999; Faure *et al.*, 2003; Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Neste presente trabalho foram estudados ainda os efeitos das fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de pâncreas de porco e do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre a função mitocondrial assim como a citotoxicidade induzida por tais substâncias em preparações de túbulos proximais renais isolados.

Foi observado que ambas fosfolipases A<sub>2</sub> produziram aumentos na liberação de lactato desidrogenase, elevaram os níveis de ácidos graxos não esterificados e promoveram decréscimos na energização mitocondrial sem, no entanto, afetar os níveis de ATP celulares. A partir dos dados obtidos, sugere-se que os metabólitos da fosfolipase A<sub>2</sub> tais como ácidos graxos não esterificados podem ter uma participação nos efeitos deletérios observados.

Normalmente as células mantêm níveis muito baixos de ácidos graxos livres a partir da degradação oxidativa ou da conversão a outros metabólitos da ciclooxigenase ou da lipooxigenase e através da reacilação de intermediários lipídicos para formar triglicerídios ou fosfolipídios de membrana (Zager *et al.*, 1996). A maior parte do ácido araquidônico, por exemplo, é encontrado nas células na forma esterificada (Pompéia, 2002).

Entre os diversos efeitos biológicos dos ácidos graxos descritos tem-se: (1) modificação da fluidez das membranas com possíveis implicações na atividade de proteínas presentes nessas estruturas celulares, como os receptores celulares, canais iônicos e proteínas que participam da transdução de sinais; (2) modulação das vias de transdução de sinais; (3) regulação das concentrações intracelulares de cálcio; (4) metabolismo celular, como no caso das enzimas-chave do metabolismo de glicose que são intensamente afetadas pelas dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados; (5) despolarização e desacoplamento mitocondriais e (6) regulação direta e indireta da transcrição gênica, sendo a ligação dos ácidos graxos aos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, um exemplo do primeiro caso (Portilla *et al.*, 1994; Pompéia & Curi, 2002; Li *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos regulam as concentrações intracelulares de cálcio através da liberação deste a partir do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. Por outro lado, elevadas concentrações citoplasmáticas de cálcio podem ser diminuídas por ácidos graxos que são capazes de estimular a extrusão de cálcio via ativação de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (Pompéia & Curi, 2002).

Os efeitos deletérios dos ácidos graxos sobre as mitocôndrias são conhecidos há mais de 50 anos, no entanto, apenas nos últimos 15 anos têm sido estabelecidos os diversos mecanismos pelos quais esses metabólitos atuam (Wojtczak, 1976; Feldkamp *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos não esterificados têm sido implicados no comprometimento da função mitocondrial que ocorre durante isquemia renal, provavelmente por interferirem com transportadores de ânions da membrana mitocondrial tais como a translocase de nucleotídeos de adenina ou as proteínas desacopladoras (Feldkamp *et al.*, 2006). De acordo com esses autores, os ácidos graxos atravessariam a membrana mitocondrial interna através de carreadores aniônicos causando um distúrbio no gradiente eletroquímico das mitocôndrias com resultante dissipação do potencial de membrana, essencial para a função dessas organelas.

Além disso, durante as injúrias renais agudas isquêmica e nefrotóxica, os defeitos na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos que ocorrem tanto em mitocôndrias quanto em peroxissomos persistem por períodos prolongados (Portilla *et al.*, 1994).

Aumentos no conteúdo de ácidos graxos livres em resposta à adição de fosfolipase A<sub>2</sub> foram previamente observados em suspensão de túbulos proximais normais (Humes *et al.*, 1989; Zager *et al.*, 1993, 1996, 1999).

Sabe-se ainda que incrementos marcantes no conteúdo de ácidos graxos podem ocorrer, em parte, como resultado do ataque à membrana mediado por fosfolipase A<sub>2</sub> (Zager *et al.*, 1993). Considerando-se o possível comprometimento da integridade celular decorrente desse ataque, pode-se sugerir que a atividade fosfolipásica sobre as membranas celulares constitui um determinante crítico para a injúria celular.

Tem-se sugerido ainda a participação das fosfolipases A<sub>2</sub> no processo apoptótico a partir das mitocôndrias como consequência da produção de ácido araquidônico (Penzo *et al.*, 2004).

Foram observadas alterações características de morte celular por apoptose em linhagem de células CHO-K1 incubadas com veneno bruto da *C. d. terrificus* (Tamietti *et al.*, 2007), que possui entre seus principais componentes, a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>.

No presente trabalho foi observado que as fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica induziram aumentos nos níveis de ácidos graxos, sendo o maior incremento produzido pela enzima crotálica.

Como o meio utilizado não possuía ligante de ácidos graxos livres, tais como a albumina, esperava-se que a maioria deles estivesse associada às células e que fosse encontrada nos sedimentos. Este foi o caso dos grupos tratados com fosfolipase crotálica, mas não para a enzima pancreática, com a qual foi observado um aumento distribuição aproximadamente equivalente entre as frações de sedimento e de sobrenadante. O motivo de tal efeito não é inteiramente entendido e a interpretação dos resultados torna-se complicada devido às diferenças na produção total de ácidos graxos observadas entre as duas fosfolipases.

Portanto, é possível postular que as fosfolipases aqui estudadas podem estar relacionadas à injúria celular através de distúrbio na integridade das membranas, evidenciada pelo aumento níveis de lactato desidrogenase, assim como através da liberação de ácidos graxos livres, agentes reconhecidamente citotóxicos.

Foi observado também que os túbulos proximais tratados com fosfolipases tiveram apenas um decréscimo mínimo no conteúdo celular de ATP. Este fato foi inesperado.

O decréscimo de ATP deveria ocorrer por duas razões considerando-se a condições estudadas. Primeiro, as diminuições nas energizações induzidas pelos ácidos graxos em células intactas deveriam ter comprometido a produção de ATP, uma vez que é dependente do potencial de membrana mitocondrial (Cadenas, *et al.*, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002). Segundo, esperava-se que uma vez ocorrido liberação de lactato desidrogenase, a ruptura generalizada do metabolismo celular durante a injúria celular letal deveria ter impedido a produção mitocondrial de ATP, a única fonte de ATP nessas células não-glicolíticas (Balaban & Mandel, 1988; Wirthensohn & Guder, 1986). A razão para esse comportamento inesperado do conteúdo de ATP não é clara.

A energização mitocondrial foi analisada de duas formas no presente estudo. O método de fluorescência JC-1 foi usado em células intactas e o de recaptção de safranina O em células permeabilizadas. Não foram detectados decréscimos na energização em túbulos tratados com a fosfolipase pancreática através do método de JC-1. Na verdade, a menor concentração de enzima pancreática, a fluorescência vermelha do JC-1 foi aumentada. O JC-1 apresentou alterações claramente dose-dependentes com a fosfolipase crotálica. Ao contrário do observado com o método da safranina O que revelou decréscimos na energização com ambas fosfolipases, o que reflete uma maior sensibilidade à presença de níveis elevados de ácidos graxos.

Apesar da fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática também promover um decréscimo marcante sobre o potencial de membrana mitocondrial, mensurado através da recaptção de safranina O, os maiores efeitos foram observados com a enzima crotálica que apresentou um padrão dose-dependente.

Os efeitos das fosfolipases sobre a energização mitocondrial nos estudos com safranina O foram revertidos pela adição de albumina, indicando que essas modificações ocorreram nas células anteriormente aos efeitos não-específicos de dano letal à membrana.

Nesse contexto, deve-se notar que os procedimentos de coleta e de lavagem usados para recuperação dos túbulos a partir das suspensões para as mensurações com a safranina O selecionaram as células intactas. Existe, possivelmente, um componente específico de injúria mitocondrial, já que foi mostrada a habilidade da albumina de reverter completamente tais efeitos.

Num estudo recente, foi relatado que os efeitos iniciais de ácidos graxos sobre as mitocôndrias não foram capazes de produzir danos estruturais irreversíveis considerando-se a reversão desses efeitos após adição de albumina (Feldkamp *et al.*, 2007).

Tanto a fosfolipase pancreática quanto a crotálica tiveram efeitos mais intensos sobre a energização auxiliada pelo succinato do que aquela com glutamato/malato. Além disso, a adição de albumina promoveu uma reversão maior das alterações deletérias na presença de glutamato/malato. O presente estudo sugere que os substratos utilizados modularam, diferentemente, a tendência dos ácidos graxos de induzir desenergização mitocondrial.

Havia sido previamente relatado que nessas preparações de túbulos proximais, os substratos do ciclo do ácido cítrico, tais como succinato e a combinação glutamato-malato, podem melhorar o déficit energético induzido pelos ácidos graxos ao limitar o acúmulo destes (Feldkamp *et al.* 2004). Os autores também correlacionaram os efeitos protetores desses substratos com a sua habilidade de manter baixos níveis de produção mitocondrial anaeróbica de ATP e de energização (Feldkamp *et al.* 2004).

Alterações aqui descritas foram semelhantes àquelas observadas num estudo recente onde células leucêmicas K562 incubadas com crotóxina isolada *C.d.terrificus* apresentaram aumentos na liberação de lactato desidrogenase e diminuição no potencial de membrana mitocondrial (Yan *et al.*, 2006).

Tem sido postulada a participação da permeabilidade mitocondrial de transição na morte celular induzida por diversos agentes citotóxicos (Barbosa Jr *et al.*, 2000; Petronilli *et al.*, 2001; Siemen *et al.*, 2005).

Em condições onde as mitocôndrias são submetidas ao estresse oxidativo e/ou à sobrecarga de cálcio ocorre abertura de um poro na membrana mitocondrial interna que destrói a integridade funcional da mitocôndria produzindo edema e desacoplamento da fosforilação oxidativa com conseqüente morte celular (Halestrap, 2005; Petronilli *et al.*, 2001; Risso *et al.*, 2002). Esse evento de alteração momentânea da permeabilidade da membrana mitocondrial interna é conhecido como permeabilidade mitocondrial de transição.

Como conseqüência da permeabilidade mitocondrial de transição, fatores proapoptóticos, como o citocromo *c*, que estão normalmente confinados à matriz

mitocondrial, poderiam ser liberados para o citoplasma ativando assim a via das caspases, na presença de ATP (Paul *et al.*, 2008; Petronilli *et al.*, 2001).

No presente trabalho foi observado o colapso do potencial de membrana mitocondrial resultante da adição de cálcio, um conhecido indutor de permeabilidade mitocondrial de transição e o característico edema mitocondrial, resultante da formação do poro. Apesar da albumina *per se* não ter melhorado a dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzida pelo cálcio, a sua utilização facilitou o efeito subsequente à adição da combinação de ciclosporina A, adenosina difosfato e o magnésio, clássicos inibidores da formação do poro.

As fosfolipases A<sub>2</sub> pancreática e crotálica também promoveram a formação de permeabilidade mitocondrial de transição, com leves efeitos sobre o volume mitocondrial.

Na comparação dos efeitos da adição de fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática na presença e na ausência de cálcio observou-se que, no segundo caso, houve uma pequena diminuição no efeito máximo sobre a captação da safranina, apesar dos efeitos protetores da albumina e da combinação de ciclosporina A, adenosina difosfato e o magnésio terem sido muito maiores.

Isso sugere que o efeito sobre a energização mitocondrial provavelmente atingiu um platô e que o efeito deletério da fosfolipase A<sub>2</sub> pancreática é potencializado pela adição de cálcio, um fator reconhecidamente determinante para a atividade dessa enzima. No grupo controle, que recebeu somente adição de cálcio, foi observado que a captação de safranina O e a absorvância da suspensão de túbulos proximais não foram modificadas, o que sugere que o potencial de membrana mitocondrial não foi afetado por esse íon.

Considerando-se os dados obtidos, pode-se sugerir que a permeabilidade mitocondrial de transição, um importante evento desencadeador de morte celular, tem participação na citotoxicidade induzida pelas fosfolipases A<sub>2</sub> aqui estudadas. Ainda no contexto da indução de morte celular, um estudo recente relatou a ocorrência de apoptose em células tratadas com veneno bruto da *C. d. terrificus* (Tamietti *et al.*, 2007).

O mecanismo celular pelo qual a fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* induz nefrotoxicidade no modelo de rim isolado de rato não é conhecido. No entanto, a liberação suprafisiológica de ácido graxos livres após a incubação com a fosfolipase A<sub>2</sub> crotálica observada em túbulos proximais isolados permite postular uma

possível participação dos metabólitos da hidrólise fosfolipídica, em especial os ácidos graxos não esterificados, como mediadores da citotoxicidade renal promovida por essa toxina.

**CONCLUSÕES**



## 6. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho conclui-se que os mecanismos de injúria e morte celulares renais induzidos pela fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* são complexos e que, possivelmente, envolvem múltiplos metabólitos derivados da ação enzimática dessa toxina.

Além da ação nefrotóxica direta, revelada tanto pelos achados histopatológicos quanto pelas alterações dos parâmetros funcionais renais, a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* também promoveu alterações na integridade das membranas plasmáticas e no potencial de membrana mitocondrial de túbulos proximais renais de coelho, o que pode ter concorrido para os seus efeitos citotóxicos.

As alterações marcantes no potencial de membrana mitocondrial induzidas pelas fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de pâncreas de porco e do veneno da *Crotalus durissus terrificus* foram, possivelmente, mediadas por ácidos graxos não esterificados. A permeabilidade mitocondrial de transição foi um dos possíveis mecanismos da citotoxicidade induzida pelas fosfolipases A<sub>2</sub> aqui estudadas.

Apesar da toxicidade induzida por venenos crotálicos ser bem documentada em diversos sistemas experimentais, com o presente trabalho tem-se, de forma inédita, indícios de que a disfunção mitocondrial, mediada por ácidos graxos não esterificados, está possivelmente relacionada ao efeito nefrotóxico de um dos componentes principais do veneno crotálico, a fosfolipase A<sub>2</sub>.

Com os dados aqui obtidos, vislumbra-se uma possível utilização das toxinas crotálicas como ferramentas farmacológicas que permitam a elucidação dos processos fundamentais envolvidos tanto na injúria celular renal quanto na injúria celular de outros órgãos.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os estudos sobre a disfunção mitocondrial podem auxiliar o desenvolvimento de fármacos com capacidade de prevenir a morte celular causada por uma variedade de injúrias teciduais tais como aquelas produzidas por toxinas, por isquemia-reperfusão, entre outras, assim como o desenvolvimento de substâncias com potencial quimioterápico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* Apr; 40 (4): 335-93, 2002.

AGARWAL, A. Measuring  $\Delta\Psi_m$  in isolated tubules. *Am J Renal Physiol* 288: F1090-F1091, 2005.

ALVES, R.S., DO NASCIMENTO NR, BARBOSA PS, KERNTOPF MR, LESSA LM, DE SOUSA CM, MARTINS RD, SOUSA DF, DE QUEIROZ MG, TOYAMA MH, FONTELES MC, MARTINS AM, and MONTEIRO HS. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*. Sep 1; 46(3):271-6, 2005.

AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., DA SILVA, O.A, RIBEIRO, M.M.F., MAGALHÃES, R.A., REIS, R.J., CARNEIRO, J.G. and CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 28: 220-227, 1986.

AMORA D.N., SOUSA, T.M., MARTINS, A.M.C., BARBOSA, P.S.F., MAGALHÃES, M.R., TOYAMA, M.H., MENEZES, D.B., FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in isolated rat kidney. *Toxicon*. Mar 47(3): 260-4, 2006.

AMORIN, M.F., MELLO, R.F. e SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Mem Inst Butantã São Paulo* 23: 63-108, 1951.

AUGUSTYN, J.M., PARSA, B. and ELLIOT, W.B. Structural and respiratory effects of *Agkistrodon piscivorus* phospholipase A<sub>2</sub> on rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 197:185-196, 1970.

BALABAN, R. S. and MANDEL, L. J. Metabolic substrate utilization by rabbit proximal tubule. An NADH fluorescence study. *Am J Physiol Renal Physiol* 254: F407-F416, 1988.

BALHLMANN, J., GIEBISCH, G. and OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 212: 77-82, 1967.

BARBOSA, P.S.F. HAVT, A., FACÓ, P.E.G., SOUSA, T.M., BEZERRA, I.S.A.M., FONTELES, M.C., TOYAMA, M.H., NOVELLO, J.C. and MONTEIRO, H.S.A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 40: 1427-1435, 2002.

BARBOSA PS, MARTINS AM, ALVES RS, AMORA DN, MARTINS RD, TOYAMA MH, HAVT A, NASCIMENTO NR, ROCHA VL, MENEZES DB, FONTELES MC, and MONTEIRO HS. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. *Toxicon* Jun 15; 47 (8):831-7, 2006.

BARBOSA JR, A.B., JORDANI, M.C., DE SOUZA, M.E.J., FRANCO, C.F.F, PICINATO, M.A.N.C., e CASTRO E SILVA JR., O. Avaliação do intumescimento osmótico mitocondrial do fígado submetido à isquemia parcial e ao pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir. Bras.* São Paulo 15 (2): 63-64, 2000.

BARRAVIERA, B. LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A., and MEIRA, D. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* spp. and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. *J Venom Anim Toxins* 1:11-22, 1995.

BEGHINI, D.G., TOYAMA, M.H., HYSLOP, S., SODEK, L.C., NOVELLO, J.C. and MARANGONI S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. *J Protein Chem* Nov; 19 (8):679-84, 2000.

BEGHINI DG, RODRIGUES-SIMIONI L, TOYAMA MH, NOVELLO JC, DA CRUZ-HÖFLING MA, and MARANGONI S. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon*. Mar 1; 43 (3):255-61, 2004.

BELTOWSKI, J., MARCINIAK, A., WÓJCICKA, G. and GÓRNY, D. Nitric oxide decreases renal medullary Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity through cyclic GMP - protein kinase G dependent mechanism. *J Physiol Pharmacol* 54 (2): 191-210, 2003.

BERCOVICI D., CHUDZINSKI AM., DIAS WO., ESTEVES MI., HIRAICHI E., OISHI NY., PICARELLI ZP., ROCHA MC., UEDA CMPM., YAMANOUYE N., and RAW I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem. Inst. Butantan*, 49, 70-7, 1987.

BRADY, H.R. & BRENNER, B.M. Acute Renal Failure. *In: Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 206th, 1998.

BRAGA MD, MARTINS AM, AMORA DN, DE MENEZES DB, TOYAMA MH, TOYAMA DO, MARANGONI S, ALVES CD, BARBOSA PS, DE SOUSA ALVES R, FONTELES MC, and MONTEIRO HS. Purification and biological effects of l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. Feb; 51(2):199-207, 2008a.

BRAGA MD, COSTA MARTINS AM, ALVES CD, DE MENEZES DB, MARTINS RD, FERREIRA BARBOSA PS, DE SOUSA OLIVEIRA IM, TOYAMA MH, TOYAMA DO, DOS SANTOS DIZ FILHO EB, RAMOS FAGUNDES FH, FONTELES MC, AZUL and MONTEIRO HS. Purification and renal effects of phospholipase A (2) isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. Feb; 51(2):181-90, 2008b.

BRAGA MD, MARTINS AM, DE MENEZES DB, BARBOSA PS, EVANGELISTA JS, TOYAMA MH, TOYAMA DO, FONTELES MC, and MONTEIRO HS. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. Mar 1; 49 (3):329-38. 2006a.

BRAGA MD, MARTINS AM, AMORA DN, DE MENEZES DB, TOYAMA MH, TOYAMA DO, MARANGONI S, BARBOSA PS, DE SOUSA ALVES R, FONTELES MC, and MONTEIRO HS. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. Jun 15; 47 (8):859-67, 2006b.

BRAZIL, V. Defesa contra o ofidismo. 1911.

BUCARETCHI, F., HERRERA, S.R.F., HYSLOP, S., BACARAT, E.C.E., and VIEIRA, R.J. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44 (3): 133-138, 2002.

CADENAS, S. and BRAND, M.D. Effects of magnesium and nucleotides on the proton conductance of rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem. J.* 348: 209–213, 2000.

CÂMARA PR, ESQUISATTO LC, CAMARGO EA, RIBELA MT, TOYAMA MH, MARANGONI S, DE NUCCI G, and ANTUNES E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon*. Jun; 41(7):823-9, 2003.

CARROLL, M.A. and McGIFF, J.C. A new class of lipid mediators: cytochrome P450 arachidonate metabolites. *Thorax* Oct; 55 Suppl 2: S13-6, 2000.

CHACUR, M., LONGO, I., PICOLO, G., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., GUERRA, J.L., TEIXEIRA, C.F.P. and CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon* 41: 667- 678, 2003.

CHENG, M.K., DOUMAD, A.B., JIANG, H., FALCK, J.R., McGIFF, J.G. and CARROL, M.A. Epoxyeicosatrienoic acids mediate adenosine-induced vasodilation in rat preglomerular microvessels (PGMV) via A<sub>2A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 141 (3): 441-448, 2004.

CHIPPAUX, J.-P., WILLIAMS, V. and WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29 (11): 1279-1303, 1991.

CUPO, P., AZEVEDO-MARQUES, M.M. and HERING, S.H. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Toxicon* 42:741-745, 2003.

CURA, J.E., BLANZACO, D.P., BRISSON, C., CURA, M.A., CABROL, R., LARRATEGUY, L., MENDEZ, C. SECHI, J.C., SILVEIRA, J.S., THEILLER, E., ROODT, A.R. and VIDAL, J.C. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA<sub>2</sub>, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* April (8): 1033–1041, 2002.

CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S., SABO, E.F. and ONDETTI, M.A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin- converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. 16: 5484-5491, 1977.

DAGHER, P.C., HERGET-ROSENTHAL, S., RUEHM, S.G., SANG-KYUNG, S., STAR, R.A., AGARWAL, R. and MOLITORIS, B.A. Newly Developed Techniques to Study and Diagnose Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* 14: 2188-2198, 2003.

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

DE LIMA, M.E. & DINIZ, C.R. Crotoxin inhibits the release of acetylcholine induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 23: 588 (Abstract), 1985.

DEOLINDO, P., TEIXEIRA-FERREIRA, A.S., MELO, E.J.T., ARNHOLDT, A.C.V., SOUZA, W., ALVES, E.W. and DaMATTA, R.A. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswald Cruz* Rio de Janeiro 100 (1):33-38, 2005.

DUNN, R.D. & BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1533: 29-37, 2001.

ECHEVERRIGARAY, S., GRAZZIOTIN, G., GRAZZIOTIN, F. and AGOSTINI, G. Radom Amplified Polymorphisms Between Two South American Subspecies of rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). *Braz Arch Biol Technol* Sept 44 (3): 313-317, 2000.

FACÓ PE, HAVT A, BARBOSA PS, NOBRE AC, BEZERRA GP, MENEZES DB, FONTELES MC, LOPES-FERREIRA M, and MONTEIRO HS. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon* Oct; 42 (5): 509-14, 2003.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochimie* 82: 833-840, 2000.



FAURE G, COPIC A, LE PORRIER S, GUBENSEK F, BON C, and KRIZAJ I. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric* organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon* Mar; 41(4): 509-17, 2003.

FELDKAMP, T., KRIBBEN, A., ROESER, N.F., SENTER, R.A., KEMNER, S., VENKATACHALAM M.A., NISSIM, I. and WEINBERG, J.M. Preservation of complex I function during hypoxia-reoxygenation- induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Renal* 286:749-759, 2004.

FELDKAMP, T., KRIBBEN A., and WEINBERG J.M. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase activity and ATP dependence of mitochondrial energization in proximal tubules after hypoxia/reoxygenation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:1742-1751, 2005a.

FELDKAMP T., KRIBBEN, A., and WEINBERG J.M. Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia/reoxygenation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288:F1092-F1102, 2005b.

FELDKAMP, T., KRIBBEN, A., ROESER, N.F., SENTER, R.A. and WEINBERG, J.M. Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am J Renal Physiol* 290: F465-F77, 2006.

FELDKAMP T, KRIBBEN A, ROESER NF, OSTROWSKI T, and WEINBERG JM. Alleviation of fatty acid and hypoxia-reoxygenation-induced proximal tubule deenergization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292: F1606-F1616, 2007.

FERNANDEZ-GOMEZ, F.J., GALINDO, M.F., GOMEZ-LAZARO, M., YUSTE, V.J., COMELLA, J.X., AGUIRRE, N and JORDAN, J. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS dependent pathway. *Br J Pharmacol* 144: 528–537, 2005.

FERREIRA S.H., BARTELT D.C., and GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry.* Jun 23; 9 (13): 2583-93, 1970.

FISSELL, W.H., KIMBALL, MACKAY, S.M., FUNKE A. and HUMES, H.D. The Role of a Bioengineered Artificial Kidney in Renal Failure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 944: 284-295, 2001.

FOEGH, M.L. & RAMWELL, P.W. Os Eicosanóides: Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos & Compostos Relacionados. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.273-285, 2001.

FONTANA, F. 1781. Traite sur le Veninde la Vipere, Les Viperes de France, Stock, Paris, 1940. *apud* SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. *Toxicon* 42: 115-133, 2003.

FONTELES, M.C. and LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated rat kidney. *Arch Int Physiol Biochim* 90: 159-161,1982.

FONTELES, M.C.,COHEN, I.J., BLACK, A.J. and WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am J Physiol* 244: 235-246, 1983.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R N; MONTEIRO, H S A; CURRIE, M G; and FORTE, L. R . Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*. Aug; 275 (2 Pt 2): F191-7, 1998.

FORTE-DIAS, C.L., JANNOTTI, M.L.D., FRANCO, F.J.L., MAGALHÃES, A. and DINIZ, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor isolated from the blood of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA<sub>2</sub> from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 37:1747-1759,1999.

GHAFOURIFAR, P., KLEIN, S.D., SCHUCHT, O., SCHENK, U., PRUSCHY, M., ROCHA, S., and RICHTER, C. Ceramide Induces Cytochrome *c* Release from Isolated Mitochondria. *J Biol Chem* Mar 274 (10):6080-6084,1999.

GEOFFROY, E.F. & HUNAULT, I. 1737. Memoire dans lequel on examine se l'huile d'olive est un specifique contre la morsure de vipers. Les animaux Venimeux et Les Venins, Masson, Paris, 1922. *apud* SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. *Toxicon* 42: 115-133, 2003.

GIEBISCH, G. Renal potassium channels: Function, regulation, and structure. *Kidney Int.* 60: 436–445, 2001.

GRALÉN N, & SVEDBERG T. The molecular weight of crotoxin. *Biochem J.* Aug; 32 (8):1375-7, 1938.

GRAZIOLA, F., SOLIS, V.S. e CURI, R. Estrutura Química e Classificação dos Ácidos Graxos. In: *Entendendo a Gordura- Os Ácidos Graxos*. Curi, R., Pompéia, C., Miyakasa, C.K. e Procopio, J. (Eds.). 1ª, ed., Editora Manole, São Paulo, pp. 07-23, 2002.

GU, R.-M. and WANG, W.-H. Arachidonic acid inhibits K channels in basolateral membrane of the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F407-F414, 2002.

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

HALESTRAP, A. A pore way to die. *Nature*. 434:578-579, 2005.

HALESTRAP, A.P., DORAN, E., GILLESPIE, J.P., and O'TOOLE, A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans.* Feb; 28 (2):170-7, 2000.

HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul; 68 (7):1560-3, 1971.

HUMES, H.D., NGUYEN, V. D., CIESLINSKI, D.A., and MESSANA, J.M. The role of free fatty acids in hypoxia-induced injury to renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 256: F688-F696, 1989.

IMIG J.D. and NAVAR LG. Afferent arteriolar response to arachidonic acid: involvement of metabolic pathways. *Am J Physiol.* Jul; 271(1 Pt 2):F87-93, 1996.

KATTAH, L.S., SANTORO, M.M., DINIZ, C.R. and DE LIMA, M.E. Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits 3H-choline uptake in guinea pig ileum. *Braz J Med Biol Res* 33: 1093-1097, 2000.

KOSHKIN, V., BIKOPOULOS, G., CHAN, C.B. and WHEELER, M.B. The characterization of mitochondrial permeability transition (MPT) in clonal pancreatic  $\beta$ - cells: Multiple modes

and regulation. *J Biol Chem* Oct 279 (40):41368-41376, 2004.

KOWALTOWSKI, A.J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res* 33: 241-250, 2000.

KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E. and FISKUN, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ* 7: 903-910, 2000.

KRAMER, H.J., STINNESBECK, B.A., KLAUTKE, H.J., KIPNOWSKI, J., GLAENZER, K. and DUESING, R. Interaction of renal prostaglandin with the renin-angiotensin and renal adrenergic nervous system in healthy subjects during dietary changes in sodium intake. *Clin Sci* 68: 387-393, 1985.

KRIŽAJ, J.I., FAURE, G., GUBENŠEK, F. and BON, C. Reexamination of crotoxin-membrane interactions. *Toxicon* 34 (9):1003-1009, 1996.

KUAN, C.J., HERZER, W.A. and JACKSON, E.K. Cardiovascular and renal effects of blocking  $A_1$  adenosine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 822-828, 1993.

LANDUCCI, E. C. T., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., ANTUNES, E. and NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipase  $A_2$ . *Toxicon* 38: 199-208, 2000.

LENNON, B.W. & KAISER, I.I. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol B*. 97 (4): 695-9, 1990.

LI, S., BHATT, R., MEGYESI, J., GOKDEN, N., SHAH, S.V. and PORTILLA, D. PPAR- $\alpha$

ligand ameliorates acute renal failure by reducing cisplatin-induced increased expression of renal endonuclease G. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F990–F998, 2004.

LIEBERTHAL, W. & NIGAM, S.K. Acute Renal Failure. I. Relative Importance of Proximal vs. Distal Tubular Injury. *Am J Physiol* 275 (5 Pt 2): F623-F631, 1998.

LOWRY, O.H., ROSBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265. 1951.

MAIA, R.C., CULVER, C.A. and LASTER, S.M. Evidence against Calcium as a Mediator of Mitochondrial Dysfunction during Apoptosis Induced by Arachidonic Acid and Other Free Fatty Acids. *The Journal of Immunology* 177: 6398-6404, 2006.

MAIER, K.G. & ROMAN, R.J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Jan; 10 (1):81-7. 2001.

MAJID, D.S.A., INSCHO, E.W. and NAVAR, L.G. P<sub>2</sub> Purinoceptor Saturation by Adenosine Triphosphate Impairs Renal Autoregulation in Dogs. *J Am Soc Nephrol* 10: 492-498, 1999.

MANCIN, A., SOARES, A., ANDRILAO-ESCARSO, S., FACA, V., GREENE, L., ZUCCOLOTTO, S., PELA, I. and GIGLIO, J. The Analgesic Activity of Crostamine, A Neurotoxin From *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom: A Biochemical and Pharmacological Study. *Toxicon.* 36(12):1927-1937, 1998.

MARTINS, A. M.C., MONTEIRO, H.S.A., JÚNIOR, E.O.G., MENEZES, D.B. and FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36: 1441-1450, 1998.

MARTINS, A.M.C., TOYAMA, M.H., HAVT, A. NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced toxicity in isolated rat kidney. *Toxicon* 40: 1165-1171, 2002.

MARTINS, A. M.C., LIMA, A.A.M., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., FONTELES, M.C. and MONTEIRO, H.S.A. Renal effects of supernatant from macrophages activated by

*Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase. **Pharmacol Toxicol** 92:14-20, 2003.

MARTINS, A. M. C., NOBRE, A. C. L., ALMEIDA, A. C., BEZERRA, G., LIMA, A. A. M., FONTELES, M. C. and MONTEIRO, H. S. A. Thalidomide and pentoxifylline block the renal effects of supernatants of macrophages activated with *Crotalus durissus cascavella* venom. **Braz J Med Biol Res** 37(10): 1525-1530, 2004.

MEBS, D. & OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther** 48: 223-236, 1990.

McGARRY, J.D. Lipid Metabolism I: Utilization and Storage of Energy in Lipid Form. *In: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Devlin, T.M. (Ed.). 4<sup>th</sup> edition. Wiley-Liss Publication, New York, pp. 361-393, 1997.

MORAIS, C., WESTHUYZEN, J., METHAROM, P. and HEALY, H. High molecular weight plasma proteins induce apoptosis and Fas/FasL expression in human proximal tubular cells. **Nephrol Dial Transplant** 20 (1): 50-58, 2005.

MONTECUCCO, C. & ROSSETO, O. How do presynaptic PLA<sub>2</sub> neurotoxins block nerve terminals? **TIBS** 25: 266-270, 2000.

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

MONTEIRO, H.S.A., DA SILVA, I.M.S.C., MARTINS, A.M.C. and FONTELES, M.C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney **Braz J Med Biol Res** 34: 1347-1352, 2001.

MS (Ministério da Saúde) /Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: MS/ FUNASA, 2001.

NATARAJAN, R. and REDDY, M. A. HETEs/EEts in renal glomerular and epithelial cell functions. **Current Opinion in Pharmacology** 3: 198-203, 2003.

NICHOLLS DG & FERGUSON SJ: **Bioenergetics** 3, San Diego CA, Academic Press, 2002.

NISHITSUJI-UWO, G.M., ROSS, B.D. and KREBS, H.A. Metabolic activities of isolated perfused kidney. *Biochem J* 103: 852-862, 1967.

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

NOGUEIRA, T C A., PRIVIERO, F B M.; TOYAMA, M H., MARANGONI, S., CARNEIRO, E M., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. and ZANESCO, A. Effects of crotoxin-like and crude venom from *Crotalus durissus collilineatus* on the cardiac function. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE (17. : 2002 : Salvador, Bahia); *In: Resumos Salvador, Bahia: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002.*

NYGAARD, A.P., DIANZANI, M.U. and BAHR, G.F. *Exptl Cell Res* 6:453, 1954 *apud* AUGUSTYN, J.M., PARSA, B. and ELLIOT, W.B. Structural and respiratory effects of *Agkistrodon piscivorus* phospholipase A<sub>2</sub> on rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 197:185-196, 1970.

OGUNGBADE, G.O., AKINSANMI, L.A., JIANG, H. and OYEKAN, A.O. Role of epoxyeicosatrienoic acids in renal functional response to inhibition of NO production in the rat. *Am J Physiol* 285: F955-F964, 2003.

OLIVEIRA, D.G., TOYAMA, M.H., NOVELLO, J.C., BERIAM, L.O., and MARANGONI, S. Structural and functional characterization of basic PLA<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Protein Chem.* Mar; 21(3):161-8, 2002.

OLSON, M.S. Bioenergetics and Oxidative Metabolism. *In: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.* Devlin, T.M. (Ed.). 4<sup>th</sup> edition, Wiley-Liss Publication, New York, pp.217-266, 1997.

OYEKAN, A.O., YOUSEFF, T., FULTON, D., QUILLEY, J. and McGIFF, J.C. Renal cytochrome P450  $\omega$ -hydroxylase and epoxygenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. *J. Clin. Invest.* 104(8): 1131-1137, 1999.

PASSERO, L.F., TOMOKANE, T.Y., CORBETT, C.E., LAURENTI, M.D. and TOYAMA. M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res.* Oct; 101 (5):1365-71, 2007.

PAUL, M.K., RAJINDER, K. and MUKHOPADHYAY, A.K. Characterization of rat liver mitochondrial permeability transition pore by using mitochondrial swelling assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* April 2 (2): 014-021, 2008.

PENZO D, PETRONILLI V, ANGELIN A, CUSAN C, COLONNA R, SCORRANO L, PAGANO F, PRATO M, DI LISA F, and BERNARDI P. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* Jun 11; 279 (24): 25219-25, 2004.

PETRONILLI V, PENZO D, SCORRANO L, BERNARDI P and DI LISA F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome *c* and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* Apr 13; 276 (15): 12030-4, 2001.

PICOLO, G. and CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. *Life Sci.* Jun 18, 75(5):559-73, 2004.

PINHO, F.M.O., ZANETTA, D.M.T. and BURDMANN, E. A. Acute Renal Failure after *Crotalus durissus terrificus* snakebite: A Prospective Survey on 100 patients. *Kidney Int* 67: 659-667, 2005.

PITTS, R.F. Metabolism of amino acids by the perfused rat kidney. *Am J Physiol* 220: 862-867, 1971.

PONCE-SOTO LA, TOYAMA MH, HYSLOP JC and MARANGONI S. Isolation and Preliminary Enzymatic Characterization of a Novel PLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus collilineatus* Venom. *J Prot Chem* 21 (3): 131-136, 2002.

POMPÉIA, C. 2002. Ácido Araquidônico. In: *Entendendo a Gordura- Os Ácidos Graxos*. Curi, R., Pompéia, C., Miyakasa, C.K. e Procopio, J. (Eds.). 1<sup>a</sup>, ed., São Paulo, Editora Manole, pp. 343-366, 2002.



POMPÉIA, C. & Curi, R. 2002. Efeitos citotóxicos dos ácidos graxos – lipoapoptose. *In: Entendendo a Gordura- Os Ácidos Graxos*. Curi, R., Pompéia, C., Miyakasa, C.K. e Procopio, J. (Eds.). 1ª., ed., São Paulo, Editora Manole, pp.321-342, 2002.

POMPERMAYER, K., ASSREUY, J. and VIEIRA, M.A.R. Involvement of nitric oxide and potassium channels in the bradykinin-induced vasodilation in the rat kidney perfused *ex situ*. *Regulatory Peptides* 105: 155-162, 2002.

PORTILLA, D., SHAH, S.V., LEHMAN, P.A., and CREER, M.H. Role of cytosolic calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A2 in hypoxic injury to rabbit proximal tubules. *J. Clin. Invest.* **93**: 1609-1615, 1994.

SACERDOTI D, GATTA A and MCGIFF JC. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* Oct; 72 (1-2):51-71, 2003.

SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G. and DINIZ, R.C. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon* 30 (1): 95-103, 1992.

STANCHI NO, ARIAS D, MARTINO PE, DIEZ RA, and COSTA LA. 30-day intravenous administration of VRCTC-310-ONCO in rabbits. Stanchi NO, Arias D, Martino. *Farmacologia* Feb; 57 (2):167-70, 2002.

ROMAN RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* Jan; 82 (1): 131-85, 2002.

RANGEL-SANTOS, A., DOS-SANTOS, E.C., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C., CARDOSO, D.F. and MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 43(7): 801-810, 2004.

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

RISSO, A., BRAIDOT, E., SORDANO, M.C., VIANELLO, A., MACRÌ, F., SKERLAVAJ, B., ZANETTI, M., GENNARO, R. and BERNARDI, P. BMAP-28, an Antibiotic Peptide of Innate Immunity, Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol* Mar; 22(6): 1926–1935, 2002.

ROSS, H.A. The isolated perfused rat kidney. *Cryobiology* 8: 431- 440,1978.

RUSCHITZKA, F., SHAW, S., NOLL, G., BARTON, M., SCHULZ, E., MÜLLER, G.A., LÜSCHER, T.L. Endothelial vasoconstrictor prostanoids, vascular reactivity, and acute renal failure. *Kidney Int* 54 (67): S199-S201,1998.

SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., CAMPOLINA, D., DIAS, M.B., CASTRO, S.C.B., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., AMARAL, C.F.S., REZENDE, N.A., KAMIGUTI, A.S., WARREL, D.A. and THEAKSTON, R.D.G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *J Q Med* 94:551-559, 2001.

SANTORO, M.L., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., GONÇALVES, L.R.C., ALMEIDA-SANTOS, S.M., CARDOSO, D.F., LAPORTA-FERREIRA, I.L., SAIKI, M., PERES, C.A. and SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem Physiol* 122 C: 61-73, 1999.

SANTOS, P.E.B., SOUZA, S.D., FREIRE-MAIA, L. and ALMEIDA, A.P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. *Toxicon* 28(2):215-224, 1990.

SCHNEIDER, A., ZHANG, Y., ZHANG, M., LU, J.W., RAO, R., FAN, X., REDHA, R., DAVIS, L., BREYER, R.M., HARRIS, R., GUAN, Y. and BREYER, M.D. Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGE-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* 65: 1205-1213, 2004.

SCHRIER, R.W.; WANG, W.; POOLE, B. and MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114 (1): 5-14, 2004.

SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. *Toxicon* 42:115-133, 2003.

SIEMEN, D., PARVEZ, S., WINKLER-STUCK, K., TRIEU, I., WALLECH, C., and SCHÖNFELD, P. Ropinirole: another neuroprotectant blocking the permeability transition pore in the inner mitochondrial membrane. *Akt Neurol* 32, 2005.

SILVA, O.A., LÓPEZ, M., and GODOY, P. Intensive Care Unit Treatment Of Acute Renal Failure Following Snake Bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 401-407, 1979.

SLOTTA, K.H. & FRANKAEL-CONRAT, H.L. (1938) *apud* GRALÉN, N. & SVEDBERG, T. The molecular weight of crotoxin. *Biochem J.* Aug; 32(8): 1375-1377, 1938.  
SOARES, A.M., MANCINI, A.C., CECCHINI, A.L., ARANTES, E.C., FRANÇA, S.C., GUTIÉRREZ, J.M. and GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A<sub>2</sub> subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 877-888, 2001.

ST-PIERRE, J. BRAND, M.D. AND BOUTILIER, R.G. Mitochondria as ATP consumers: Cellular treason in anoxia. *PNAS* July 18(97) no. 15: 8670–8674, 2000.

TAFT, D.R. The Isolated Perfused Rat Kidney Model: A Useful Tool for Drug Discovery and Development. *Current Drug Discovery Technologies* (1): 97-111, 2004.

TAMIETI B. P., DAMATTA R. A., COGO J. C., DA SILVA N. S., MITTMANN J., and PACHECO-SOARES, C. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom treatment. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 13(1): 56-68, 2007.

TEIXEIRA, E.H., HAVT, A, BARBOSA, P.S.F., MENESES, D.B., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S.A, SAMPAIO, A.H., and CAVADA, B.S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. *Protein and Peptide Letters* 8:477-484, 2001.

VALENTE, R.H., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., PEREIRA-DA-SILVA, L. and MACEDO, D.V. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A<sub>2</sub> isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon* 36 (6): 901-913, 1998.

VALENTIN, E. and LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1488: 59-70, 2000.

WANG, W., NATION, R. L., EVANS, A. M. and COX, S. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin: A stable model for investigating renal drug handling. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49: 105-113, 2004.

WEINBERG JM, ROESER NF, DAVIS JA, and VENKATACHALAM MA. Glycine-protected, hypoxic, proximal tubules develop severely compromised energetic function. *Kidney Int* 52: 140–151, 1997.

WEINBERG, J. M., DAVIS, J. A., ABARZUA, M. and KIANI. T. Relationship between maintenance of cell ATP and glutathione and protection by glycine against hypoxic tubule injury. *J. Lab. Clin. Med.* 113: 612-623, 1989.

WEINBERG, J.M., VENKATACHALAM, M.A., GOLDBERG, H., ROESER, N.F., and DAVIS, J.A. Modulation by Gly, Ca, and acidosis of injury-associated unesterified fatty acid accumulation in proximal tubules cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 268: F110-F121, 1995.

WEINBERG, J.M., VENKATACHALAM, M.A., ROESER N.F., SENTER R.A. and NISSIM I. Energetic determinants of tyrosine phosphorylation of proximal tubule focal adhesion proteins during hypoxia/reoxygenation. *Am. J. Pathol.* 158:2153-2164, 2001.

WIRTHENSOHN, G. & GUDER, WG. Renal substrate metabolism. *Physiol Rev.* Apr 66 (2): 469-97, 1986.

WOJTCZAK, L. Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 8: 293-311, 1976.

XIMENES, H. M. A., 2002. Efeitos dos Ácidos Graxos sobre Canais Iônicos. In: *Entendendo a Gordura- Os Ácidos Graxos*. Curi, R., Pompéia, C., Miyakasa, C.K. e Procópio, J. (Eds.). 1ª., ed., Editora Manole, São Paulo, pp. 261-269, 2002.

YAN, C.-H., LIANG, Z.-Q., GU, Z.-L., YANG, Y.-P., REID, P. AND QIN, Z.-H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicol* 47: 521-530, 2006.

YANG, T. Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. *Acta Physiol Scand* 177: 417-421, 2003.

ZAGER, R.A., SCHIMPF, B.A., GMUR, D.J., and BURKE, T.J. Phospholipase A<sub>2</sub> activity can protect renal tubules from oxygen deprivation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1; 90 (17): 8297-301, 1993.

ZAGER, R.A., CONRAD, D.S. and BURKHART, K.M. Phospholipase A<sub>2</sub>: a potentially important determinant of adenosine triphosphate levels during hypoxic-reoxygenation tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 7: 2327-2339, 1996.

ZAGER RA, SACKS BM, BURKHART KM and WILLIAMS AC. Plasma membrane phospholipid integrity and orientation during hypoxic and toxic proximal tubular attack. *Kidney Int*. Jul; 56 (1):104-17, 1999.

ZAGER R.A., ANDOH T., and BENNETT W.M. Renal cholesterol accumulation: a durable response following acute and subacute renal insults. *Am J Pathol*. 159:743-752, 2001.



## ANEXOS

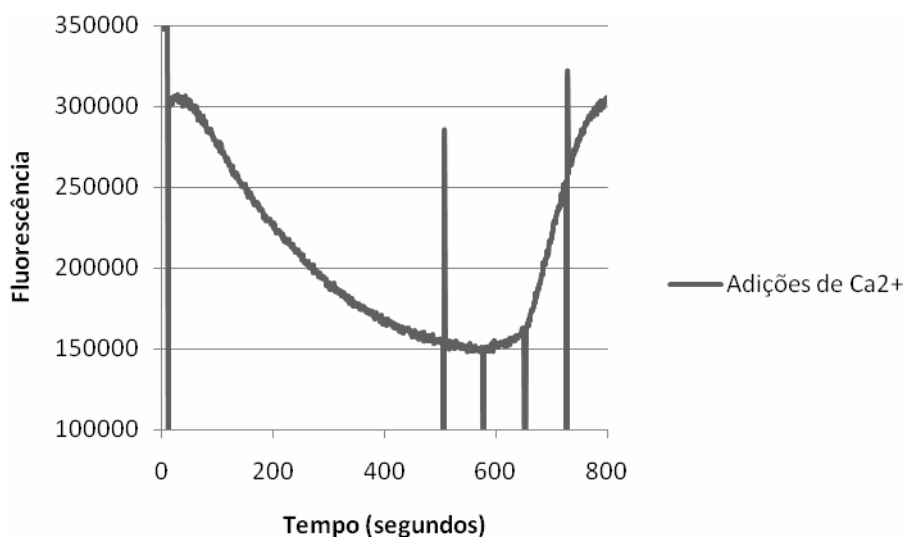
### ANEXO A

**❖ Procedimento experimental para determinação das concentrações das substâncias-teste a serem utilizadas no estudo da permeabilidade mitocondrial de transição (Protocolo SAF 215)**

#### **✓ Cálcio**

Para determinação da concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) capaz de induzir a formação da permeabilidade mitocondrial de transição (PMT), alíquotas de 3mL de suspensões de túbulos proximais (TP) foram realizadas adições de  $10\mu\text{M}$  a cada 75segundos cessadas após a

observação do aumento máximo da fluorescência do marcador safranina O, indicativo de colapso do potencial de membrana, ou desenergização mitocondrial. A adição inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizada aos 500 segundos (Figura A1).



**Figura A1**

### ✓ Fosfolipases $\text{A}_2$ pancreática e crotálica

Para determinação das concentrações de fosfolipases  $\text{A}_2$  pancreática (P-FLA<sub>2</sub>) e crotálica (VS-FLA<sub>2</sub>) capazes de induzir a formação da PMT, alíquotas de 3mL de suspensões

de TP foram realizadas adições de 15U/mL de P-FLA<sub>2</sub> e de 1,5U/mL (5 $\mu\text{g/mL}$ ) de VS-FLA<sub>2</sub>,

cessadas após a observação do aumento máximo da fluorescência do marcador safranina O, indicativo de colapso do potencial de membrana, ou seja, desenergização mitocondrial. A adição inicial de fosfolipases foi realizada aos 500 segundos (Figuras A2 e A3).



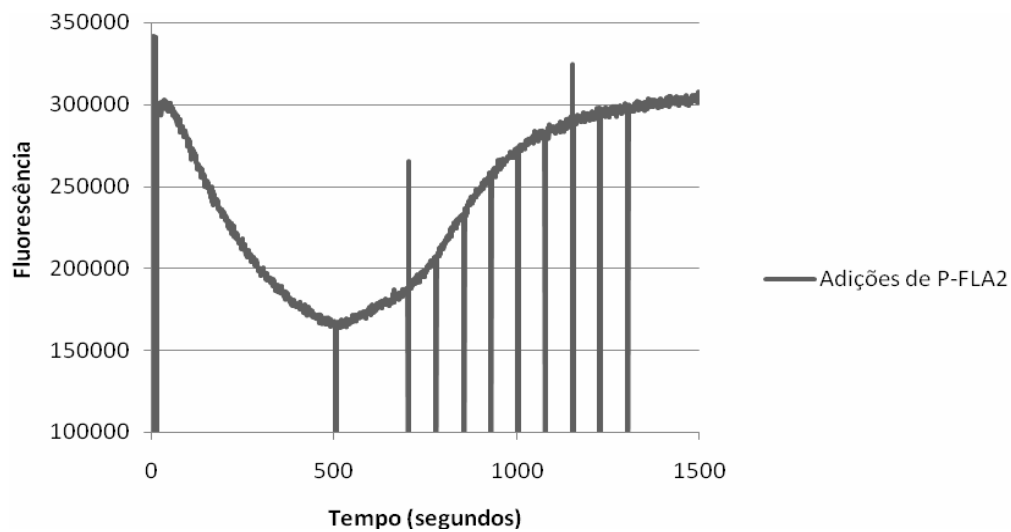


Figura A2

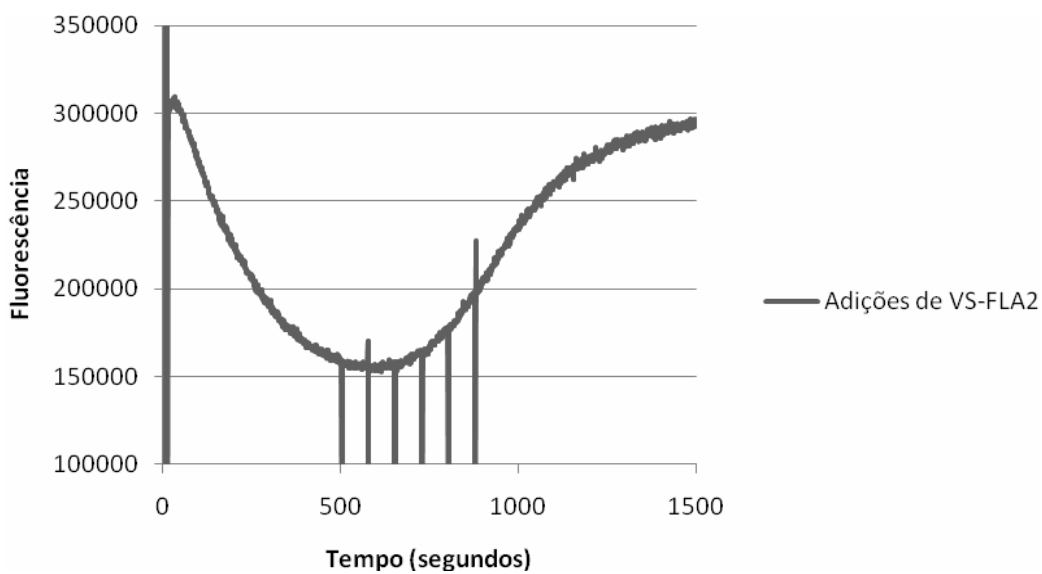


Figura A3

## ANEXO B

### ❖ CRONOGRAMA DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS COM TÚBULOS PROXIMAIS ISOLADOS

<b>Experimento no.</b>	<b>Data</b>	<b>Experimento</b>
01	14/12/2006	SAF215
02	30/01/2007	SAF215
03	08/02/2007	SAF215b
04	16/02/2007	SAF215c
05	23/02/2007	SAF 218
06	28/02/2007	SAF 215c
07	28/03/2007	SAF 218b
08	12/06/2007	SAF 218c
09	19/06/2007	SAF 218c
10	01/08/2007	SAF 218c
11	08/08/2007	SAF 218c
12	15/08/2007	SAF 218c
13	23/08/2007	SAF 218c
14	28/08/2007	SAF 218c

## ANEXO C

**Quadro 05. Efeitos biológicos de venenos brutos e frações crotoxina e fosfolipase A<sub>2</sub> das serpentes *Crotalus durissus* brasileiras em rim isolado de rato**

<b>PP</b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>	<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>
<b>Veneno bruto</b>	↑	↓	-	<b>Veneno bruto</b>	↓	-	↓
<b>CTX</b>	↑	-	-	<b>CTX</b>	↓	-	↓
<b>FLA2</b>	N/A	-	↑	<b>FLA2</b>	N/A	-	↓
<b>RVR</b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>	<b>%TK<sup>+</sup></b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>
<b>Veneno bruto</b>	N/A	↓	N/A	<b>Veneno bruto</b>	N/A	-	N/A
<b>CTX</b>	↑	-	N/A	<b>CTX</b>	↓	↓	N/A
<b>FLA2</b>	N/A	-	-	<b>FLA2</b>	N/A	↓	↓
<b>FU</b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>	<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>
<b>Veneno bruto</b>	↑	↓	↑	<b>Veneno bruto</b>	N/A	-	N/A
<b>CTX</b>	↑	-	↑	<b>CTX</b>	↓	↓	N/A
<b>FLA2</b>	N/A	-	↑	<b>FLA2</b>	N/A	-	↓
<b>RFG</b>	<b>Cdca</b>	<b>Cdco</b>	<b>Cdte</b>				
<b>Veneno bruto</b>	↓	↓	↑				
<b>CTX</b>	↑	↓	↑				
<b>FLA2</b>	N/A	↓	↑				

Nota 1: Cdca- *C.d.cascavella*; Cdco- *C.d.collilineatus*; Cdte- *C.d.terrificus*; PP- pressão de perfusão; RVR - resistência vascular renal; FU - fluxo urinário; RFG - ritmo de filtração glomerular; %TNa<sup>+</sup>- percentual de transporte de sódio, %TK<sup>+</sup>- percentual de transporte de potássio e %TCl<sup>-</sup>- percentual de transporte de cloreto; N/A - não se aplica, não disponível.

Nota 2: Os dados referentes à fosfolipase A<sub>2</sub> da serpente *Crotalus durissus terrificus* foram retirados da presente tese. Os demais resultados foram compilados de artigos publicados pelos seguintes autores: Martins *et al.*, (1998, 2002), Monteiro *et al.*, (2001) e Amora *et al.*, (2006). Vide Referências Bibliográficas.

## ANEXO D

❖ Resumos e artigos publicados no período 2006-2008.

✓ **Resumos**

1. SANTOS, J. V. A., SOUZA, F. D. A., **AMORA, D.N.**, MONTEIRO, H. S. A. Curva dose-resposta dos efeitos induzidos pelo veneno bruto da *Crotalus durissus collilineatus* na função renal e avaliação dos efeitos do veneno na vasculatura mesentérica. *In: XXV Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, 2006, Fortaleza. XXV Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, 2006.*
2. SOUSA, F. C. M., **AMORA, D.N.**, ARAGAO, F. O. F., GOES, J. G. S., BRAGA, M.D.M., MARTINS, A. M. C., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. The role of indomethacin on renal effects induced by crotoxin fraction isolated of *Crotalus durissus collilineatus* venom. *In: IX Congresso Brasileiro de Toxinologia, 2006, Fortaleza. IX Congresso Brasileiro de Toxinologia, 2006.*
3. MONTEIRO, H. S. A., MARTINS, R.D., ALVES, R. S., **AMORA, D.N.**, SILVA NETO, A.G., MAIA, D.G., TOYAMA, H. M., MARTINS, A.M.C., BARBOSA, P.S.F., FONTELES, M. C., Monteiro, F.D.C. Effects of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* venom on renal perfusion and mesenteric bed vessels. *In: 15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, 2006, Glasgow. 15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Glasgow: International society on Toxinology/ *Toxicon*, 2006. v. 00. p. 360-360.*
4. MONTEIRO, H. S. A., ALVES, R. S., MARTINS, R. D., **AMORA, D.N.**, BARBOSA, P. S. F., SOUSA, D. F., ALVES, C. D., TOYAMA, M. H., MENEZES, D. B., MARTINS, A.M.C., FONTELES, M. C., Monteiro, F.D.C. Renal and Blood vessel alterations induced by gamma toxin of *Tityus serrulatus* venom. *In: 15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, 2006, Glasgow. 15<sup>th</sup> World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, 2006. v. 00. p. 350-350.*
5. ALVES, R. S., MARTINS, R.D., BARBOSA, P. S. F., **AMORA, D.N.**, ABREU, J.P.S., Oliveira, I.M.S., MESQUITA, J. L. M., TOYAMA, H. M., MENEZES, D. B., FONTELES, M. C., MARTINS, A. M. C., BRAGA, M.D.M., MONTEIRO, H. S. A. Alterações Renais Induzidas pela Fosfolipase A<sub>2</sub> do Veneno da *Bothrops insularis*. *In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia-SP. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006. p. 67.*

✓ **Artigos completos**

1. **DANIELA N. AMORA**, JOEL M. WEINBERG, NANCY F. ROESER, RUTH SENTER, TIFFANY OSTROWSKY and HELENA S.A. MONTEIRO. Mitochondrial dysfunction induced by pancreatic and crotalic phospholipases A<sub>2</sub>s (*Crotalus durissus terrificus*) on rabbit proximal tubules suspensions. **Toxicon** (aceito para publicação).
2. BRAGA, M. D. M., MARTINS, A.M.C., **AMORA, D.N.**, MENESES, D.B., TOYAMA, H. M., TOYAMA, D. O., MARANGONI, S., ALVES, C. D., BARBOSA, P. S. F., ALVES, R. S., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H. S. A. . Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 199-207, 2008.
3. **AMORA, D.N.**, SOUSA, T. M., MARTINS, A.M.C., BARBOSA, P. S. F., MAGALHÃES, M. R., TOYAMA, M. H., FONTELES, M. C., MENEZES, D. B., MONTEIRO, H. S. A. Effects of *Crotallus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. v. 47, n. 3, p. 260-264, 2006.
4. BARBOSA, P. S. F., MARTINS, A. M. C., ALVES, R.S., **AMORA, D.N.**, MARTINS, R. D., TOYAMA, M. H., HAVT, A., NASCIMENTO, N. R. F., ROCHA, V.L.C., MENEZES, D. B., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. The Role of Indomethacin and Tezosentan on Renal Effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. **Toxicon**. v. 47, n. 8, p. 831-837, 2006.
5. BRAGA, M. D. M., MARTINS, A. M. C., **AMORA, D.N.**, MENEZES, D. B., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., MARANGONI, S., BARBOSA, P. S. F., ALVES, R. S., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H. S. A. Purication and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**. v. 47, n. 8, p. 859-867, 2006.