



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

ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS

**ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR INDUZIDOS PELO VENENO DA SERPENTE
*Bothrops leucurus.***

Fortaleza
2011

ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS

**ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR INDUZIDOS PELO VENENO DA SERPENTE
Bothrops leucurus.**

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

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

M825e Morais, Isabel Cristina Oliveira de.
 Estudo dos efeitos renais e mecanismos de morte celular
 induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* /
 Isabel Cristina Oliveira de Morais. – 2011.
 108 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará;
 Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
 Área de Concentração: Farmacologia
 Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

 1. *Bothrops*. 2. Morte Celular. 3. Rim I. Título.

CDD 615.942

ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS

**ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR INDUZIDOS PELO VENENO DA SERPENTE
*Bothrops leucurus.***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia

Aprovada em: 12/07/2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Janaína Serra Azul Monteiro
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof^a. Dr^a. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza– UNIFOR

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico essa dissertação a todos que me apoiaram, familiares e amigos.

À Deus que me guiou até alcançar os objetivos finais.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me escutado e atendido em diversas vezes, auxiliando-me nos momentos difíceis, e compartilhando comigo os sucessos e insucessos da minha caminhada.

Aos meus pais (Socorro e Vicente), minha Irmã (Vilmara) e a toda minha família por todo o amor, apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo durante minha vida.

À Professora Dra. Alice Maria Costa Martins, pela orientação, dedicação, ensinamentos e incentivo à pesquisa.

Às minhas amigas Roberta e Aline, obrigada pelo carinho de vocês, pelas conversas, pelas risadas, pelas confidencias, cumplicidade e amizade, por todos os momentos que dividimos. Espero tê-las para sempre em minha vida.

À irmã que Deus me presenteou (Mary Sandra), muito obrigada pela amizade, pelo carinho e pelas orientações quando me senti sem rumo, pela paciência com que sempre me ouviu e aconselhou.

Ao meu grande amigo Gustavo José da Silva Pereira, obrigada por fazer parte da minha vida em momentos tão importantes, e, principalmente obrigada por ter me acolhido em São Paulo e me ajudado nos experimentos. Ao lado ou distante, mesmo que em outro estado, eu sei que posso sempre contar com você.

Aos amigos do Laboratório de Cultivo Celular (LCC): Kamila Soares, Ticiania Praciano, Alba Fabíola, Rodrigo Tavares, Ramon Róseo, Patrícia Magalhães, Dânya Bandeira, Clarissa Perdigão, Thiala Josino, Gdaylon Cavalcante e Marcus Felipe, pela ajuda nos experimentos, a amizade e o excelente convívio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia Venenos e Toxinas (LAFAVET). Em especial ao Rafael Jorge e Antônio Neto.

À professora Dra. Soraya Soubhi Smaili por me receber no laboratório de Sinalização e Morte Celular da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP e possibilitar a execução de parte dos experimentos deste trabalho.

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite.

À todos os professores que tive nessa longa jornada, que construíram passo a passo o conhecimento que hoje detenho. Obrigada pela dedicação, amor e competência.

À todos meus sinceros agradecimentos.

“Nosso maior medo não é sermos inadequados. Nosso maior medo é que nós somos poderosos além do que podemos imaginar. É nossa luz, não nossa escuridão, que mais nos assusta. Nós nos perguntamos: “Quem sou eu para ser brilhante, lindo, talentoso, fabuloso?”

Na verdade, quem é você para não ser? Você é um filho de Deus. Você pensando pequeno não ajuda o mundo. Não há nenhuma bondade em você se diminuir, recuar para que outros não se sintam inseguros ao seu redor.

Todos nós somos feitos para brilhar, como crianças brilham. Nós nascemos para manifestar a glória de Deus dentro de nós. Não é somente em alguns de nós; é em todos.

E enquanto permitirmos que nossa própria luz brilhe, nós, inconscientemente, damos permissão a outros para fazerem o mesmo.

Quando nós nos libertamos do nosso próprio medo, nossa presença, automaticamente, libertará outros.”

(Nelson Mandela, no discurso de posse como presidente da África do Sul)

ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE CELULAR INDUZIDOS PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops leucurus*.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2011.

Venenos de *Bothrops* consistem em uma mistura complexa de substâncias ativas, principalmente peptídeos e proteínas, capazes de interferir com muitos processos fisiológicos. Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 20 mil acidentes por ano no Brasil, que totalizam 90% de todos os acidentes ofídicos registrados. A *Bothrops leucurus* é uma serpente peçonhenta importante que habita a região nordeste do Brasil. Os efeitos biológicos devido ao envenenamento têm perfil semelhante ao observado em outras *Bothrops*, ou seja, a atividade coagulante, hemorrágica, fibrinolítica e insuficiência renal *in vivo*. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do veneno de *Bothrops leucurus* no sistema de perfusão renal e em culturas de células tubulares renais do tipo MDCK (Madin-Darby Canine kidney). Rins isolados de ratos Wistar pesando 250 a 300g (n = 5) foram perfundidos com Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina sérica bovina previamente dialisadas por 120 minutos. Os efeitos do veneno de *Bothrops leucurus* (VBI) (10µg/mL) foram estudados sobre o Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), Fluxo Urinário (FU), Pressão de Perfusão (PP), Resistência Vascular Renal (RVR), Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺), de Potássio (%TK⁺) e de Cloreto (%TCI⁻). O veneno de *B. leucurus* (10 µg / mL) reduziu a PP aos 90 e 120 min e o FU aos 60 e 90 min. O ritmo de filtração glomerular diminuiu aos 60 e 90 min. A resistência vascular renal diminuiu aos 120 min. Observou-se também uma diminuição no percentual de transporte tubular de sódio (% TNA⁺) aos 120 min e de cloreto (% TCL⁻) aos 60 e 90 min. Células MDCK foram cultivadas em garrafas plásticas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, com meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%. O tratamento com VBI causou diminuição da viabilidade celular até na menor concentração testada com um IC₅₀ de 1,25 µg /mL. Citometria de fluxo com anexina V e iodeto de propídio mostrou que a morte celular ocorreu predominantemente por necrose de forma concentração dependente. Quando a apoptose foi analisada através da coloração nuclear, foi observado aumento significativo na porcentagem de morte celular, VBI nas concentrações de 2,5 e 1,5 µg/mL induziu 6,8% e 5,8% de apoptose após 24 horas de tratamento, respectivamente. O tratamento com VBI (1,25 µg/mL) levou a despolarização significativa do potencial de membrana mitocondrial. Nas menores concentrações avaliadas, verificamos aumento de expressão de genes envolvidos na morte celular por apoptose. O íon Ca²⁺ participa da sinalização da morte celular induzida pelo veneno de *B. leucurus*. Esses resultados demonstram que o veneno de *B. leucurus* alterou todos os parâmetros renais avaliados na perfusão de rim isolado e foi citotóxico para cultura de células MDCK.

Palavras- chave : *Bothrops leucurus*; MDCK; morte celular; RIM.

STUDY OF EFFECTS RENAL AND MECHANISMS OF CELL DEATH INDUCED BY SNAKE VENOM OF *Bothrops leucurus*. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil, 2011.

Bothrops venoms consist of complex mixture of active substances, mainly peptides and proteins, which interfere with many physiologic processes. *Bothrops* species are responsible for more than 20,000 accidents per year in Brazil—90% of all recorded snakebites. The *Bothrops leucurus* is an important venomous snake that inhabits the northeast of Brazil. The biological effects due envenomation have similar profile to that observed in other *Bothrops*, ie coagulant activity, hemorrhagic, fibrinolytic, and renal failure *in vivo*. The aim of this study was to investigate the effects of the *Bothrops leucurus* venom in the renal perfusion system and in cultured renal tubular cells of the type MDCK (Madin–Darby Canine kidney). Isolated kidneys from Wistar rats weighing 250 to 300g (n=5) were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6% of bovine serum albumin previously dialyzed for 120 minutes. The effects of *Bothrops leucurus* venom (VBI) (10µg/mL) were studied on the Perfusion Pressure (PP), Renal Vascular Resistance (RVR), Urinary Flow (UF), Glomerular Filtration Rate (GFR) Percentage of Sodium (%TNa⁺), Potassium (%TK⁺) and Chloride (%TCl⁻) Tubular Transport. *B. leucurus* venom (10 µg/mL) reduction the PP at 90 and 120 min and UF at 60 and 90 min. The glomerular filtration rate decreased at 60 and 90 min. The renal vascular resistance decreased at 120 min. It was also observed a decrease on percentual tubular transport of sodium (%TNa⁺) at 120 min and of chloride (%TCl⁻) at 60 and 90 min. MDCK cells were grown in plastic flasks at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ – air, with RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The treatment with VBI caused decrease in cell viability to the lowest concentration tested with an CI₅₀ of 1.25 µg/mL. Flow cytometry with annexin V and propidium iodide showed that cell death occurred predominantly by necrosis. When apoptosis was analyzed by nuclear staining, it was observed significant increase in the percentage of cell death, VBI 2,5 µg/mL induced 6,8% apoptosis and VBI 1,25 µg/mL caused 5,8% of apoptosis after 24 h of treatment. VBI treatment (1,25 µg/mL) led to significant depolarization of the mitochondrial membrane potential. We found increased expression of genes involved in cell death by apoptosis in the lower concentrations tested. The ion Ca²⁺ signaling participates in cell death induced by the venom of *B. leucurus*. These results demonstrate that the venom of *B. leucurus* altered all the renal parameters assessed in isolated kidney perfusion and was cytotoxic to MDCK cell culture.

Keywords: *Bothrops leucurus*; MDCK; cell death; kidney.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais	13
1.2 Aspectos epidemiológicos	14
1.3 Gênero <i>Bothrops</i>	16
1.3.1 <i>Bothrops leucurus</i>	17
1.3.1.1 Descrição	17
1.3.1.2 Distribuição geográfico epidemiológica	18
1.4 Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos.....	19
1.4.1 Efeitos biológicos do veneno de <i>Bothrops leucurus</i>	23
1.5 Manifestações clínicas após o envenenamento	25
1.5.1 Insuficiência renal aguda (IRA)	28
1.5.1.1 Alterações celulares envolvidas na IRA	32
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVO	40
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Obtenção do veneno	43
4.2 Perfusão de rim isolado.....	43
4.2.1 Animais	43
4.2.2 Sistema utilizado	43
4.2.3 Calibração do sistema.....	44
4.2.4 Solução perfusora.....	46
4.2.5 Análises bioquímicas.....	49
4.2.6 Cálculo dos parâmetros funcionais renais	49
4.2.7 Análise histopatológica	50
4.2.8 Grupos experimentais	50
4.3 Ensaio com cultura de células	51
4.3.1 Linhagem celular	51

4.3.2 Cultivo das células MDCK.....	51
4.3.3 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	51
4.3.3.1 Ensaio com MTT.....	51
4.3.3.2 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.....	53
4.4 Experimentos com microscopia de fluorescência.....	55
4.4.1 Núcleos picnóticos.....	55
4.4.2 Medidas da variação do Ca^{2+} intracelular.....	56
4.4.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	57
4.5 Ensaio para avaliação de expressão gênica.....	58
4.5.1 Reação de transcriptase reversa.....	58
4.5.2 Reação de polimerase de cadeia em tempo real (qPCR).....	59
4.6 Aspectos éticos.....	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Perfusão de rim isolado.....	63
5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente <i>Bothrops leucurus</i>	68
5.3 Avaliação do efeito do veneno da serpente <i>Bothrops leucurus</i> sobre células MDCK.....	70
5.3.1 Ensaio de viabilidade celular.....	70
5.3.2 Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo.....	71
5.3.3 Ensaio para verificar a presença de núcleos picnóticos.....	73
5.3.4 Ensaio para verificar o aumento do Ca^{2+} citosólico.....	75
5.3.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	77
5.3.6 Avaliação da expressão de genes envolvidos no processo de morte celular por apoptose.....	79
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	96

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Venenos de serpentes são compostos por uma mistura complexa de substâncias ativas, principalmente, peptídeos e proteínas, capazes de interferir em vários processos biológicos. Durante o processo evolutivo as serpentes desenvolveram uma ampla quantidade de toxinas peptídicas para captura de presas e defesa. Estes peptídeos são direcionados contra uma grande variedade de alvos farmacológicos, tornando-os uma inestimável fonte de ligantes para estudar as propriedades desses alvos em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, além de ajudar no entendimento da patogênese dos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento e trazer a possibilidade de identificação de novos fármacos (GARCIA & LEWIS, 2003).

As serpentes são classificadas no reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Reptilia*, subclasse *Lepdosauria*, ordem *Squamata*, subordem *Serpentes*. Existem serpentes em quase todos os ambientes do globo terrestre, estes animais são muito bem adaptados e abundantes, somando aproximadamente 3 mil espécies no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (HICKMAM; ROBERTS; LARSON, 2004)

O Brasil possui uma vasta fauna ofídica totalizando 371 espécies, distribuídas em 10 famílias e 75 gêneros. Apenas 2 famílias (*Elapidae* e *Viperidae*) reúnem as espécies que chamamos de peçonhentas, ou seja, aquelas que produzem toxinas em suas glândulas especializadas e possuem aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações em seres humanos e animais domésticos (CARDOSO, 2003; BÉRNILS, 2010).

A família *Elapidae*, compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus* muito diversificado, com mais de 50 espécies descritas, distribuídas principalmente na Ásia, África e Austrália. No Brasil, este gênero possui 18 espécies distribuídas em todo território nacional. São popularmente conhecidas por coral verdadeira. A família *Viperidae*, composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis*, *Crotalus* e *Lachesis*, são distribuídas por todo mundo e representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria e pelos

mais graves casos de acidentes ofídicos registrados no Brasil, e também em outros países das Américas (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

1.2 Aspectos epidemiológicos

A real incidência mundial de acidentes por animais peçonhentos e sua gravidade permanecem desconhecidos. Estimativas recentes sugerem que em todo o mundo ocorram cerca de 3 à 5,4 milhões de acidentes por serpentes anualmente, resultando em cerca de 2,5 milhões de envenenamentos e 125 à 150 mil mortes em humanos (BARONE *et al.*, 2011). Os acidentes ofídicos são um grave problema de saúde, especialmente na América Latina, África e Ásia (ANTUNES *et al.*, 2010). Na Europa, Estados Unidos e Canadá, esses acidentes são relativamente raros. Na África, a frequência dos acidentes ofídicos é precariamente documentada. Na Ásia, principalmente no Paquistão, na Índia e na Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 óbitos por ano. No Japão, a incidência geral é de aproximadamente 1/100.000 habitantes e a letalidade é inferior a 1%. Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes com cerca de 20.000 casos por ano, seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (CHIPPAUX, 1998; WARREL, 2004).

A maior parte da morbidade e mortalidade ocorre comumente nos países pobres de regiões tropicais e subtropicais. As consequências dos envenenamentos ofídicos nestes países não têm recebido a devida atenção, deixando de ser registradas como casos de saúde e sendo, na maioria das vezes, tratadas com metodologias ultrapassadas e com procedimentos não efetivos (ALBUQUERQUE; COSTA; CAVALCANTE, 2002).

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

fatores, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde de muitos municípios brasileiros (LEMOS *et al.*, 2009).

Em 2009, foram notificados pelo Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN), 29.485 casos de acidentes ofídicos. As serpentes do gênero *bothrops* e *bothropoides* responderam por 73,2% dos casos notificados neste período, enquanto as do gênero *crotalus* foram responsáveis por 10% dos acidentes.

O perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no Brasil foi avaliado por Bochner e Struchiner (2003), que realizaram um levantamento na literatura, dos casos registrados entre 1901 e 2000, mostrando que o perfil dos casos se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos. Os acidentes ocorrem com maior freqüência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos; atingem sobretudo os membros inferiores; e a maioria desses acidentes é atribuído ao gênero *Bothrops*.

Com relação a sazonalidade dos acidentes é possível identificar uma clara diferença em várias regiões do Brasil. No entanto, dentro da mesma região, os meses com maior ocorrência de acidentes são geralmente os mesmos em vários estudos, ocorrendo com maior freqüência nos meses com tempo chuvoso e quente, mas com algumas variações de acordo com a região. Tem sido sustentada a hipótese da influência da precipitação pluviométrica, a qual elevaria os níveis das águas dos rios, fazendo com que as serpentes que habitam as regiões próximas dessas margens se desloquem a procura de terra firme, e com a diminuição do espaço territorial, aumente o contato com o homem, facilitando a ocorrência dos acidentes (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A região Nordeste do Brasil apresenta distribuição desigual dos acidentes ofídicos, possivelmente relacionada à subnotificação. No período de 1999 a 2003, foram notificados 15.345 acidentes ofídicos, o que corresponde a uma média de 3.069 casos por ano. A incidência média para a região foi de 4,57/100.000. A Bahia foi o estado que apresentou maior número de casos (8.599, média de 1.719,8 casos por ano) e maior incidência média (13,16 casos/100.000hab.), seguida do Maranhão (2.871 casos, média de 574,2 casos/ano e 10,16 casos/100.000 hab.). Alagoas ocupou o terceiro lugar em incidência (5,74 casos/100.000), seguido do Ceará (3,24 casos/100.000), Piauí

(2,86 casos/100.000), Pernambuco (2,81casos/100.000), Paraíba (2,03 casos/100.000), Sergipe (0,72 casos/100.000) e Rio Grande do Norte (0,42 casos/100.000). Apesar do Nordeste apresentar o menor coeficiente de incidência do País (6,84 acidentes/100.000 habitantes), nesta região registrou-se a maior letalidade (0,81%), cerca do dobro da média nacional (0,45%), conseqüência de subnotificações e das dificuldades de acesso aos serviços de saúde (LIRA-DA- SILVA *et al.*, 2009).

No estado do Ceará o registro de casos é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia dos acidentes ofídicos. O levantamento mais recente foi realizado no período de 2001 a 2007, onde foram notificados 3877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas. Corroborando com o perfil nacional, o gênero *Bothrops* foi o responsável pelo maior número de casos, o sexo masculino foi o mais acometido (74,2%), e a faixa etária com maior número de acidentes foi de 21 a 50 anos (ROCHA, 2008).

1.3 Gênero *Bothrops*

Na América do Sul, serpentes do gênero *Bothrops* foram bem estudadas, devido à sua predominância e importância médica em países como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru (HIGUCHI *et al.*, 2007; ACOSTA, 2010). Esse gênero compreende cerca de 23 espécies, pertencem à família *Viperidae* e são popularmente conhecidas como jararacas. Essas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (ALBUQUERQUE; COSTA; CAVALCANTE, 2004; MELGAVAREJO, 2003).

Recentemente, considerando o parafiletismo de *Bothrops*, dados morfológicos e moleculares sugeriram a criação de uma nova espécie e a reclassificação de algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Bothrops*; este gênero foi nomeado por *Bothropoides* e contém 11 espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*,

Bothropoides insularis, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides marmoratus*, *Bothropoides Mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*. Essa nova classificação é aceita e fornecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (FENWICK *et al.*, 2009).

Algumas espécies apresentam maior importância devido sua ampla distribuição geográfica como: *B. atrox*, encontradas no norte do Brasil; *B. jararaca*, distribuídas na região sul e sudeste do país; *B. jararacussu*, encontradas no cerrado da região central e em florestas tropicais da região sudeste; *B. alternatus*, distribuídas ao sul do país; *B. moojeni* na região centro oeste e sudeste; *B. erythromelas* e *B. leucurus* (principalmente na região nordeste) (PINHO; PEREIRA, 2001; MELGAVAREJO, 2003).

1.3.1 *Bothrops leucurus*

1.3.1.1 Descrição

A espécie *Bothrops leucurus* foi descrita pela primeira vez por Wagler em 1824. A serpente *Bothrops leucurus* pertencia a um complexo da *Bothrops atrox*, o qual compreendia as serpentes *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops asper*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops colombienses*, *Bothrops isabelae*, *Bothrops lanceolatus aidae*, *Bothrops lanceolatus nacaridae*. Na década de 60, as serpentes incluídas neste complexo, foram divididas em espécies distintas de acordo com sua localização geográfica e a composição dos venenos (WÜRTER *et al.*, 1997).

É popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco e/ou caiçara, quando filhote, e malha-de-sapo, cabeça de capanga, jaracuçu, jararacuçu, jaracuçu-de-quatro-ventas, caiçaca, patrona e jararaca, quando adulta (LIRA-DA-SILVA, 2009).

A *B. leucurus* apresenta um par de fossetas loreais (órgão termorreceptor), um olho e uma narina de cada lado de sua cabeça, daí sua denominação popular de cobra de “quatro-ventas”. A dentição é do tipo solenóglifa (1 par de dentes anteriores modificados em presas inoculadoras de veneno, grandes, móveis, totalmente canaliculadas e recobertas por uma bainha

protetora). É uma espécie de médio porte (28 a 187 cm) que possui vários padrões de coloração. Diferenças mais marcantes podem ser encontradas entre indivíduos adultos e jovens. Geralmente apresentam um padrão dorsal cinza ou amarronzado, com manchas negras em formato de “V” invertido. Apresentam também uma faixa pós-ocular bem definida e um ventre enxadrezado de coloração cinza e amarelada (Figura 1) (PORTO; TEIXEIRA, 1995).



Figura 1: *Bothrops leucurus* (Fonte: LIRA-DA-SILVA, 2009).

1.3.1.2 Distribuição geográfico- epidemiológica.

A serpente *Bothrops leucurus* ocorre no Nordeste e Sudeste do Brasil, do estado do Ceará até o Espírito Santo. No Nordeste a distribuição da espécie é mais ampla, estendendo-se do norte do Estado do Maranhão, sul do Ceará e na Bahia, ocorre na Chapada Diamantina e Chapadão Ocidental de São Francisco (Figura 2). É uma espécie terrícola, noturna e habita as Florestas Tropicais Caducifólias e Subcaducifólias, áreas de tensão ecológica (entre cerrado e Florestas Tropicais Caducifólias e Subcaducifólias, entre a restinga e a Floresta Tropical Atlântica nos seus diferentes níveis de degradação), campos rupestres remanescentes da Floresta Tropical Atlântica, incluindo áreas de forte ação antrópica, urbanizadas e campos cultivados (PORTO, TEIXEIRA, 1995; LIRA-DA-SILVA, 2009).

Do ponto de vista médico, a *Bothrops leucurus* constitui uma importante serpente causadora de acidentes no Nordeste do Brasil. Juntamente com a *Bothropoides erytromelas*, são as responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos notificados nesta região. Dos acidentes por picadas de serpentes venenosas registrados na Bahia no período de 1982 a 1992, 94% foram causados por *Bothrops leucurus* e ocorreram na região metropolitana de Salvador (SANCHEZ *et al.*, 2007).



Figura 2 : Distribuição geográfica da *Bothrops leucurus*.

Fonte: (www.selvables.com.br)

1.4 Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos.

De modo geral, os venenos ofídicos, são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, íons metálicos e compostos orgânicos. Esses componentes são essenciais para a sobrevivência das serpentes, pois têm funções primárias de imobilizar, paralisar, matar e digerir presas. Por tratar-se de uma mistura complexa possuem farmacologia diversa e seletiva, capazes de afetar elementos chaves de vários processos fisiológicos animais (CALVETE *et al.*, 2009).

Há uma considerável variação na composição dos venenos entre as famílias, gêneros e espécies de serpentes. Vários fatores, como a variação sazonal, habitat, dieta, idade, dimorfismo sexual são conhecidos por produzir

variação na composição do veneno de serpentes de espécies diferentes e também dentro da mesma espécie (ANTUNES *et al.*, 2010).

Venenos das serpentes da família *Viperidae* são os tipos mais estudados de toxinas animais e são mais complexos que os pertencentes a outras famílias (CALVETE *et al.*, 2009). O veneno botrópico é composto por componentes protéicos e não protéicos. Cerca de 90% de sua composição consiste de proteínas, algumas com atividade enzimática, como fosfolipases, L- aminoácido oxidases, metaloproteínases, fosfodiesterases, dentre outras, e essas proteínas são as responsáveis pela a maioria dos efeitos biológicos encontrados (BON, 1997). Os constituintes protéicos que não apresentam atividade enzimática são as lectinas, os precursores de peptídeos bioativos, cardiotoxinas, dentre outros. Enquanto os componentes não protéicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.* 2004; RAJENDRA *et al.* 2004). Os constituintes não orgânicos conhecidos são cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH, TU, 1971). Alguns estudos sugerem que o cálcio, manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON; FOX, 1994).

Dentre as toxinas que compõem os venenos botrópicos estão as fosfolipases; essas enzimas são encontradas em uma variedade de fluidos biológicos e células, como bactérias, plantas, tecidos de mamíferos, eritrócitos, plaquetas, também são encontradas em venenos de escorpiões e abelhas. A atividade fosfolipásica foi estudada pela primeira vez no século XIX utilizando-se venenos de serpentes, desde então, essas enzimas tem sido alvo de vários estudos devido à variedade de seus efeitos farmacológicos (KINI, 2003).

As fosfolipases A_2 (PLA₂) catalisam a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. Os ácidos graxos liberados podem atuar como segundos mensageiros ou podem está envolvidos em outras reações, como exemplo, o ácido araquidônico, que é responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (VARGAS *et al.*, 2010). Um grande interesse em PLA₂s advém desse papel que

ela desempenha no controle da biossíntese de eicosanóides, que são importantes em numerosas condições fisiológicas e fisiopatológicas (MOREIRA *et al.*, 2011).

As (PLA₂) são classificadas de acordo com sua origem (extracelular ou intracelular), formação de pontes dissulfeto e estrutura primária (MODESTO *et al.*, 2006). As de origem extracelular ou fosfolipases A₂ secretórias são encontradas em fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios, em venenos de répteis (serpentes e lagartos) e insetos. São enzimas de baixo peso molecular (13 a 15 kDa), estáveis, requerem cálcio para desempenhar sua atividade catalítica e atuam sobre substratos lipídicos (principalmente fosfolipídios) (De CASTRO *et al.*, 2000). As PLA₂s intracelulares apresentam alta massa molecular (85 kDa), geralmente estão associadas a membranas, são cálcio-independentes.

Atualmente, a superfamília das PLA₂s é composta por um conjunto de quinze grupos que apresentam um alto grau de homologia seqüencial e estrutural, diferenciando-se somente pela localização e quantidade de pontes dissulfeto e pelos comprimentos de seus *loops*. Com base na estrutura molecular, as PLA₂s são classificados em vários grupos numerados de I a XIV subgrupos, as secretórias podem ser divididas em 12 grupos e subgrupos (SCHALOSKE *et al.*, 2006; NEVALAINEN *et al.*, 1993).

PLA₂s de venenos de serpentes (svPLA₂s) são enzimas secretórias pertencentes aos grupos I e II. As PLA₂ do grupo I são obtidas dos venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hidrofidea* e as do grupo II são obtidas dos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*. As PLA₂s da classe II, são subdivididas em dois subgrupos principais: as (i) PLA₂s Asp49, assim denominadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49, exibem alta atividade catalítica; (ii) PLA₂s Lys49, mostrando um resíduo de Lys na posição 49, com pouca ou nenhuma atividade catalítica. A substituição do resíduo Asp 49 por Lys 49 afeta drasticamente a ligação do cálcio às PLA₂, justificando assim sua baixa atividade catalítica (OWNBY *et al.*, 1999).

As svPLA₂s são muito tóxicas e destacam-se por seu grande espectro de atividades biológicas que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, dentre eles, neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, mionecrose, anticoagulante (inibição de

agregação plaquetária), efeitos convulsivos, indução de edema, atividades hipotensora, hemolítica e hemorrágica, entre outros efeitos (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

Outro importante componente protéico encontrado nos venenos botrópicos, são as enzimas L-aminoácido oxidases (LAAOs). São flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Essas enzimas são amplamente distribuídas em venenos de serpentes da família *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae*. Também são encontradas em bactérias, fungos e algas verdes (PAIVA, 2011).

L - aminoácido oxidases isoladas dos venenos de serpentes (svLAAOS) apresentam grande similaridade, como, massa molecular e sequência N-terminal. Estruturalmente são glicoproteínas (3-4%), homodiméricas ácidas ou básicas, se ligam a FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) como co-fatores, têm massa molecular de 120-150 kDa na forma nativa e 55-56 kDa na forma monomérica (TICLI, 2006).

O mecanismo de ação pelo qual a LAAO exerce seus efeitos ainda é muito incerto. Muitos trabalhos foram publicados descrevendo amplos efeitos farmacológicos e biológicos, tais como, indução de apoptose (TORII *et al.*, 1997; DU & CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006, NAUMANN *et al.*, 2011), agregação plaquetária (LI *et al.*, 1994), hemorragia (SOUZA *et al.*, 1999), hemólise (ABE *et al.*, 1998), indução de edema (TICLI, 2006), atividade bactericida (CISCOTTO *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2010), leishmanicida (TOYAMA *et al.*, 2006; NAUMANN *et al.*, 2011). A maioria desses efeitos parece decorrer da produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Nos últimos anos, SV-LAAOs foram estudadas quanto aos seus efeitos celulares, onde, em muitos casos, foram capazes de induzir citotoxicidade e apoptose em células tumorais, deixando as células normais intactas (ALVES *et al.*, 2008). A citotoxicidade se apresenta como indução de apoptose e parece envolver a produção de peróxido de hidrogênio, sendo inibida pela catalase. O peróxido de hidrogênio pertence a espécies reativas de oxigênio (ROS). O H_2O_2 aumenta a atividade da caspase 3, uma protease, reconhecida na indução de morte celular, fato que embora não esteja diretamente relacionado com a

atividade das LAAOs, reforça o envolvimento do peróxido no mecanismo de apoptose (SKULACHEV, 2002; ZHANG; WU, 2008).

As metaloproteinases são um grupo de endopeptidases, dependentes de cálcio ou zinco ligados no sítio ativo para possuírem atividade, são classificadas em cinco superfamílias sendo uma delas a família metzincin, da qual fazem parte as metaloproteinases encontradas nos venenos de serpentes (SVMPs). As SVMPs são secretadas como proteínas precursoras inativas, transformando-se na forma ativa na glândula de veneno. Baseado em seus domínios estruturais e massa molecular são classificados em quatro grupos principais: PI (proteína de classe I) a P-IV; ressalta-se que diferentes membros do grupo são freqüentemente encontradas no veneno da mesma serpente (SANCHEZ *et al.*, 2007).

Metaloproteinases de venenos de serpentes têm sido objeto de muito estudo devido a importância que estas desempenham no envenenamento. Em geral, a ação das SVMPs relaciona-se com a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, fator Von Willenbrand e pró-trombina) e das proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Estes efeitos promovem diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e resposta inflamatória (BALDO *et al.*, 2008).

1.4.1 Efeitos Biológicos do Veneno de *Bothrops leucurus*.

O veneno de *Bothrops leucurus* ainda é pouco estudado. Alguns trabalhos mostram que os efeitos biológicos devidos ao envenenamento têm perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, dentre elas *B. jararaca* (SANCHEZ *et al.*, 1992), ou seja, importantes efeitos locais como edema, necrose tecidual, atividade coagulante, hemorrágica, e falência renal *in vivo* (SANCHEZ *et al.*, 2007).

PRIANTI *et al.* (2003) compararam a concentração protéica e as atividades de fosfolipase A₂ e proteolítica sobre caseína dos venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus*. Foi verificado que, quanto à concentração protéica, o veneno de *B. leucurus* apresentou 92.7% do seu peso seco em proteínas, enquanto o veneno

de *B. jararaca* apresentou 79.9%; quanto à atividade fosfolipase A₂ foi de 2.84 (A_{425nm}/mg) para o veneno de *B. leucurus* e de 0.30(A_{425nm}/mg) para o veneno de *B.jararaca*. Quanto à atividade proteolítica sobre caseína verificaram 94.4 (U/mg) para o veneno de *B. leucurus* e 60.5 (U/mg) para o veneno de *B. jararaca*. Podemos observar que o veneno de *B. leucurus* é 1.16 vezes mais concentrado em proteínas se comparado ao veneno de *B. jararaca*. Quanto à atividade de fosfolipase A₂ é 9.5 vezes mais ativo e quanto à atividade proteolítica sobre caseína é 1.6 vezes mais ativo.

Lira-da-Silva (2001) estudou as atividades biológicas do veneno de *B. leucurus*. As seguintes atividades foram analisadas: coagulante no plasma humano, formação de edema, hemorrágica, necrotizante *in vivo* e fibrinogenolítica pela análise do tempo de coagulação do sangue. De todas essas atividades, a atividade fibrinogenolítica foi a mais significativa, seguida pela formação de edema, hemorrágica, necrotizante e sendo a coagulante a menos significativa.

Com relação à atividade edematogênica, o veneno de *B. leucurus* causou edema em patas de ratos mediado por óxido nítrico, histamina e metabólitos formados a partir do ácido araquidônico pela ação das cicloxigenases (PRIANTI, 2003). Mise *et al.* (2003) mostraram haver danos em tecidos musculares, através da medida de creatinoquinase sérica, após injeção intramuscular do veneno.

O estudo do veneno da *B. leucurus* mostrou a existência de diferentes proteinases, algumas destas frações proteolíticas foram capazes de tornar o fibrinogênio incoagulável, a fração que contém uma enzima thrombina-like, denominada de leucorobin, converteu o fibrinogênio em fibrina, ou um derivado da fibrina, resultando na formação de coágulos, podendo levar a um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (MAGALHAES *et al.*, 2007).

Bello *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram uma metaloproteinase do tipo I denominada leucurolysin-a a partir de veneno de *B. leucurus* que é capaz de promover anticoagulação pela hidrólise do fibrinogênio e da fibrina. Leucurolysin-a não apresentou qualquer efeito hemorrágico quando injetada (até 100 µg) por via subcutânea em ratos e possui um efeito inibitório na agregação plaquetária induzida pelo ADP. Gremski *et al.* (2007) demonstraram que a

leucurolysin-a causou efeitos citotóxicos sobre células endoteliais, apresentando atividade edematogênica e ação trombolítica.

Sanchez *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram parcialmente uma metaloproteínase do tipo III denominada de Leucurolysin-B (Leuc-B) do veneno de *Bothrops leucurus*. A proteínase representa aproximadamente 1,2% do total de proteínas presente no veneno. Leucurolysin-B apresenta atividade anticoagulante, inibe a agregação plaquetária, e os autores acreditam que sua atividade enzimática sobre os componentes da matriz extracelular e proteínas plasmáticas é o principal fator responsável pelas alterações hemorrágicas e no sistema hemostático.

Duas enzimas com atividade fosfolipases A₂ foram isoladas e caracterizadas parcialmente do veneno de *B. leucurus* (bIPLA₂). As seqüências N-terminal (48 resíduos) mostram que uma enzima apresenta lisina na posição 48, e a outra ácido aspártico nessa posição e, portanto, foram designados BLK-PLA₂ e BLD-PLA₂, respectivamente. BLK-PLA₂ apresentaram níveis insignificantes de atividade de PLA₂ em comparação com a de BLD-PLA₂. A atividade das enzimas PLA₂ é Ca₂₊-dependente, BLD-PLA₂ não tem nenhum efeito sobre a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, ADP ou colágeno, mas inibe fortemente a coagulação e é capaz de estimular o crescimento do tumor de Ehrlich, mas não a angiogênese (HIGUCHI *et al.*, 2007).

Recentemente, Naumann *et al.* (2011) estudaram as propriedades biológicas e farmacológicas da enzima L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops leucurus* (BI-LAAO). BI-LAAO é o componente em maior quantidade no veneno e apresentou atividade citotóxica contra leishmania sp, células de câncer de estômago, adenocarcinoma, colorretal e de fibroblastos humanos. A atividade citotóxica foi primariamente pela geração de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que também postulou-se ser o responsável pela inibição da agregação plaquetária.

Uma lectina foi recentemente isolada do veneno de *Bothrops leucurus*. A lectina mostrou atividade antibacteriana eficaz contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (NUNES *et al.*, 2011).

1.5 Manifestações clínicas após o envenenamento

A peçonha botrópica possui importantes atividades fisiopatológicas, com ação proteolítica, coagulante e hemorrágica.

A ação proteolítica caracteriza-se por lesão do tecido local proeminente, ou seja, uma complexa série de alterações patológicas no membro acometido, que se desenvolvem rapidamente após o acidente e muitas vezes resultam em seqüelas permanentes (GUTIERREZ & RUCAVO, 2000). A patogênese é complexa, decorrente da ação de várias enzimas presentes no veneno, dentre elas, as metaloproteinases, hialuronidases, fosfolipases A_2 . Estas enzimas podem atuar por ação direta sobre diferentes substratos, causando lesão tecidual através da ativação/liberação de mediadores celulares e moleculares do processo inflamatório como leucócitos, derivados do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina), ativação do sistema complemento e de cininas, liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α , INF- γ , IL-1 e IL-6. De acordo com Pinho e Pereira (2001) o quadro clínico caracteriza-se por manifestações locais importantes como dor e edema de caráter precoce e progressivo. Frequentemente surgem equimoses, lesões bolhosas e sangramentos no local da picada. Nos casos mais graves, pode ocorrer necrose de tecidos moles com formação de abscessos e desenvolvimento de síndrome compartimental, podendo deixar como sequelas a perda funcional ou mesmo anatômica do membro acometido.

Venenos de serpentes contêm uma grande variedade de proteínas que afetam a hemostasia. Muitas são enzimas como nucleotidases, fosfolipases A_2 , L-aminoácido oxidases (LAAO), metaloproteinases e serinoproteinases, enquanto outras, como desintegrinas e lectinas tipo C, não têm atividade enzimática. Proteinases, quer os membros das famílias serina ou metaloproteinases, podem afetar o sistema hemostático em muitos pontos diferentes. Fosfolipases A_2 , L-ácido aminoácidos oxidases e nucleotidases são mais restritas em seu mecanismo de ação (SAJEVIC, LEONARDI, KRIZAJ, 2011).

Essas proteínas podem ser classificadas como pró-coagulantes, anticoagulantes ou ativadoras de fibrinólise. No grupo dos pró-coagulantes estão incluídos os ativadores do fator V, do fator X e de protrombina, além de

várias enzimas semelhantes à trombina. Inibidores de fatores IX/X, ativadores de proteína C, inibidores de trombina e fosfolipases A₂ exibem propriedades anticoagulantes. Atuantes sobre o sistema fibrinolítico estão às proteínas com atividade proteolítica sobre a fibrina e os ativadores de plasminogênio. As proteínas que agem como pró-coagulantes, causam a ativação *in vivo* do sistema de coagulação, mas, na maioria dos casos, isto não resulta em trombose maciça e embólica, mas provoca o consumo de fatores da coagulação, resultando em um quadro clínico de incoagulabilidade sanguínea (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005).

As serinoproteinases apresentam atividade semelhante à trombina, devido a isso são geralmente denominados enzimas "trombina-like". No entanto, os monômeros de fibrina gerados pelas enzimas trombina-like sofrem polimerização limitada, porque somente um fibrinopeptídeo geralmente é clivado, a clivagem do fibrinogênio em apenas uma cadeia leva à formação de monômeros de fibrina anormais, que se polimerizam, porém numa frágil rede que não é reconhecida pelo fator XIII (responsável pelo fortalecimento da rede de fibrina) e, conseqüentemente, é facilmente disperso pela corrente sanguínea e são facilmente susceptíveis à plasmina. Esse processo, inicialmente, leva a formação de microcoágulos, podendo desencadear a coagulação vascular disseminada ou até desencadear o consumo dos fatores de coagulação seguido de hemorragia local ou sistêmica (CASTRO *et al.*, 2004).

A ação hemorrágica é decorrente de toxinas presentes no veneno que agem como anticoagulantes diretos ou indiretos, aumentando assim o risco de hemorragia. Essas toxinas atuam aumentando a permeabilidade vascular ou danificando o endotélio vascular (hemorraginas e metaloproteinases). Os mecanismos de ação das hemorraginas variam e incluem danos às células endoteliais, mionecrose, ruptura das fibras de colágeno e da membrana basal. Estes efeitos podem ser exacerbados, por outros componentes do veneno ou por outras ações devidas a uma única hemorragina, que inclui (1) fibrinólise, por fibrinogenases, (2) inibição da função plaquetária (desintegrinas) ou (3) trombocitopenia, por ativação de agregação plaquetária. O resultado final é um aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquido intersticial, acarretando a formação de edema, ou extravasamento de células sanguíneas,

levando a equimoses, púrpuras ou sangramentos, o que depende do grau de envenenamento (HUTTON, WARREL, 1993).

Os efeitos clínicos são vistos localmente no membro picado e por todo o corpo. Pode haver sangramento espontâneo a partir de tecidos, observáveis muitas vezes como sangramento das gengivas (gengivorragia), mas também como sangramento no trato gastrointestinal (TGI), com hematêmese e melena, hemorragia nos pulmões, com hemoptise, sangramento no trato genito-urinário, com hematúria ou menorragia. Cada um destes pode variar de leve a grave, capaz de provocar um choque com risco de vida (WHITE, 2005).

As manifestações sistêmicas incluem, além das supracitadas, náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, mais raramente, choque. As complicações sistêmicas mais comuns são: o choque, a insuficiência renal aguda, a septicemia e a coagulação intravascular disseminada, tendo patogênese multifatorial e sendo causas freqüentes de óbitos (FRANÇA; MALÁQUE, 2003; PINHO; PEREIRA, 2001).

1.5.1 Insuficiência renal aguda (IRA)

Diversas alterações renais foram descritas após o envenenamento ofídico, dentre elas glomerulonefrite, glomerulite, nefrite intersticial, arterite, necrose tubular, necrose cortical e insuficiência renal (SITPRIJA, 2006). A insuficiência renal aguda (IRA) é a alteração mais grave seguida na incidência de necrose tubular aguda e, ocasionalmente, glomerulonefrite (COLARES-BUZATO *et al.*, 2002).

No envenenamento botrópico a insuficiência renal aguda é dos mais importantes efeitos sistêmicos, com prevalência de 0,5-14% (BARONE *et al.*, 2011). Apesar da baixa frequência de ocorrência da IRA nos acidentes de modo geral, quando consideradas as causas de morte, torna-se mais relevante, correspondendo a aproximadamente 79,1% dos casos (BUCARETCHI *et al.*, 2001).

Muitos fatores têm sido implicados na patogênese da IRA induzida pelo envenenamento botrópico, como vasoconstrição renal e consequente isquemia renal, hemólise, deposição de fibrina glomerular, lesão vascular, liberação de

substâncias vasoativas, deposição de complexos imunes e ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica do veneno (Figura 3) (SITPRIJA, 2006).

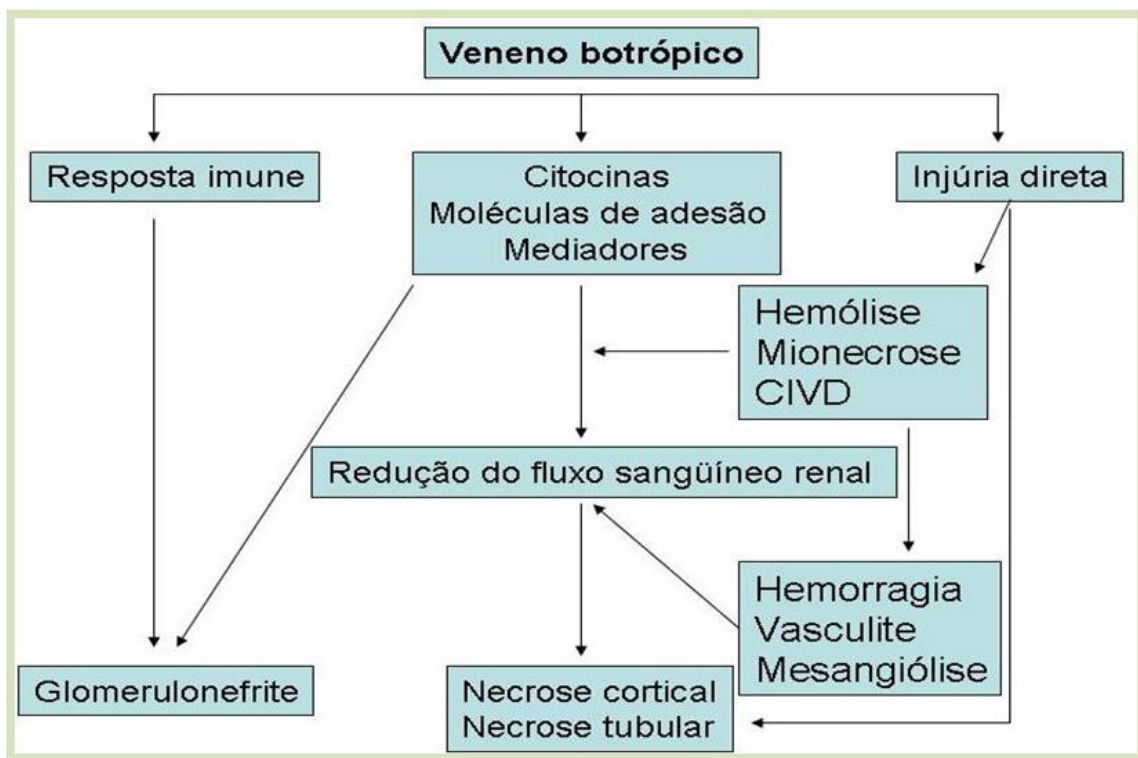


Figura 3: Patogênese da nefropatia induzida pelo veneno botrópico. Fonte: adaptado de SITPRIJA, 2006.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para compreender os mecanismos pelos quais o veneno leva à insuficiência renal aguda. Estes estudos procuram enfocar através de abordagens diferentes, aspectos que contribuam para caracterizar as lesões renais e tentar elucidar qual(is) o(s) agente(s) desencadeante(s) das mesmas.

Burdmann *et al.* (1993) demonstraram que a injeção intravenosa do veneno de *B. jararaca* em ratos produziu alterações funcionais e morfológicas semelhantes as observados em humanos com IRA após picada de serpente. Houve uma diminuição aguda e significativa na taxa de filtração glomerular, na diurese e no fluxo plasmático renal. Os autores levantaram a hipótese que a isquemia relacionada com a coagulação glomerular e hemólise intravascular foram os fatores mais importantes que levaram a diminuição na taxa de filtração glomerular, embora a nefrotoxicidade direta do veneno não possa ser excluída.

Pérez *et al.* (1996) verificaram após 6 horas de aplicação intramuscular de 2,5 µg/g do veneno de *B. alternatus*, congestão glomerular, tumefação e degeneração hidrópica dos túbulos proximais e distais, com presença de cilindros hialinos na luz dos túbulos.

Willinger *et al.* (1995) avaliaram a nefrotoxicidade direta do veneno de víbora de Russell usando o modelo de perfusão de rim isolado. Essa serpente pertence a família *Viperidae* e seu veneno apresenta potentes efeitos coagulantes e hemorrágicos, semelhantes ao de *Bothrops*. Foram observadas reduções do fluxo de perfusão renal, da taxa de filtração glomerular e da reabsorção absoluta de sódio, e um aumento da excreção fracionada de sódio e água. O fluxo urinário apresentou ambas as fases oligúrica e poliúrica. Na microscopia de luz e eletrônica revelou uma extensa destruição do filtro glomerular e lise das paredes vasculares. Vários graus de lesão epitelial ocorreram em todos os segmentos tubulares.

Castro *et al.* (2004) demonstraram pela primeira vez que o veneno de *B. jararaca* causou toxicidade direta para tubulos proximais, excluindo qualquer interferência sistêmica ou hemodinâmica que poderia causar dano tubular. Estes efeitos tubulares foram independentes do cálcio extracelular e foram mediados parcialmente pela peroxidação lipídica.

Alterações hemodinâmicas desempenham um papel importante na patogênese da IRA induzida pelo acidente botrópico. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF), catecolaminas e endotelina, são alguns dos mediadores envolvidos. Foi verificado liberação de substâncias vasoativas após acidente por víbora de Russell e aumento de concentrações plasmáticas de norepinefrina, epinefrina, dopamina, tromboxano e endotelina. Envenenamento por *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* induziu elevações significativas de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e NO (SITPRIJA, 2006).

As peçonhas botrópicas contêm uma variedade de PLA₂ miotóxicas básicas que exercem diversos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares (GUTIERREZ e OWNBY, 2003). A atividade fosfolipásica pode produzir diversas prostaglandinas vasodilatadoras renais responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e consequente diurese, natriurese e caliurese ou por outro lado liberação de PGF₂ α que tem ação vasoconstrictora. Através da cicloxigenase a PLA₂ pode ativar o tromboxano A₂ que também tem ação vasoconstrictora,

promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BARBOSA, 2002).

No modelo de perfusão de rim isolado foi demonstrado por Pirotzky *et al.* (1984), que o rim é capaz de produzir serotonina, histamina e PAF. Usando este mesmo modelo, Monteiro e Fonteles (1999) demonstraram que o veneno de *B. Jararaca* promoveu redução da pressão de perfusão, do fluxo urinário e de taxa de reabsorção tubular proximal de sódio. Com o intuito de verificar se o fator de ativação plaquetária (PAF) estaria envolvido nessas alterações, os autores utilizaram triazolobenzodiazepina (WEB 2086) um antagonista do PAF e verificaram o bloqueio nas reduções da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário, mas essa droga não foi capaz de atenuar as alterações na pressão de perfusão e no transporte tubular de sódio.

Havt *et al.* (2001), testaram o veneno de *B. jararacussu*, usando esse mesmo modelo de perfusão de rim isolado, e verificaram diminuição na pressão de perfusão e na resistência vascular renal e aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário. Os autores também utilizam o antagonista do PAF e observaram bloqueio das alterações no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário, mas não houve bloqueio com relação a queda da pressão de perfusão e da resistência vascular renal. Os autores sugeriram que as alterações no ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário foram independentes dos parâmetros vasoativos, pressão de perfusão e resistência vascular renal, sendo promovidos pelo PAF.

Boer-Lima *et al.* (1999) relataram várias alterações histopatológicas renais após a inoculação intravenosa do veneno de *Bothrops moojeni*. Foi verificado picnose com condensação da cromatina nos núcleos das células tubulares proximais. Os resultados também mostraram descontinuação da borda em escova, vacuolização citoplasmática e em alguns túbulos degeneração e descamação de células necróticas. Em conclusão, os autores sugeriram que essas alterações foram possivelmente causados pela atividade proteolítica da PLA₂ presente no veneno.

Barbosa *et al.* (2002) demonstraram que a miotoxina I do veneno de *Bothrops moojeni* tem um efeito deletério na função renal de ratos. CRUZ-HOFLING *et al.* (2001) relataram que a fração contendo PLA₂ da peçonha de *B. insularis* causou lesões renais glomerulares e tubulares em aves, possivelmente

como resultado de isquemia local causada pela formação de prostaglandinas vasoconstritoras.

Pesquisas realizadas abordando a distribuição das peçonhas botrópicas nos órgãos de animais envenenados mostram que os rins são um importante alvo de acumulação de peçonha, possivelmente devido ao seu papel na excreção de proteínas ofídicas. A acumulação da peçonha no tecido renal pode causar danos morfológicos e funcionais que poderia interferir na eliminação do veneno (MELLO *et al.*, 2010).

1.5.1.1 Alterações celulares envolvidas na IRA

Apesar da insuficiência renal aguda (IRA) ser provavelmente o resultado de muitos fatores diferentes, pode ser decorrente de uma série de lesões específicas que ocorrem a nível celular. Após lesão renal inicial, o rim desenvolve uma resposta molecular que determinará o destino da célula. Pelo menos, quatro destinos celulares são identificados na IRA: as células podem apresentar necrose; morrer por apoptose; podem se dividir; ou se comportam indiferente ao estresse (VIEIRA, 2001).

A necrose é definida como uma forma violenta de morte celular, desencadeada principalmente por lesões mecânicas, agentes citotóxicos e hipóxia. Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina, a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos. Devido a depleção de ATP ocorre alteração na permeabilidade da membrana, que tem como consequência comprometimento da bomba de Na^+/K^+ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Ocorre rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local. Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (BOUJRAD *et al.*, 2007; KERR *et al.*, 1995).

Em células renais a morte celular por necrose resulta de efeitos combinados de uma série de vias bioquímicas diferentes que são simultaneamente ativadas por lesões extremamente graves para a célula. Os múltiplos caminhos bioquímicos que são ativados pelo dano celular grave e podem levar à necrose incluem os seguintes eventos: a depleção severa de

reservas de energia celular (ATP); aumento do cálcio citosólico livre; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de várias enzimas, incluindo as fosfolipases, proteases e endonucleases (RANA; SATHYANARAYANA; LIEBERTHAL, 2001).

No início de um insulto isquêmico, rápidas e dramáticas mudanças bioquímicas no ambiente celular ocorrem, principalmente perturbação dos níveis intracelulares de ATP. No caso de isquemia nos túbulos renais, ocorre depleção de ATP celular, alterando muitos processos fisiológicos das células, como síntese protéica, lipogênese e o transporte ativo através da membrana. Foi demonstrado que após 10 minutos de isquemia a atividade da Na^+/K^+ ATPase encontrada na região basolateral das células do túbulo contorcido proximal é translocada para membrana apical levando à alterações na polaridade das células epiteliais desse túbulo. Além disso o volume celular é controlado pela bomba de Na^+ e K^+ e alterações na sua atividade provocam acúmulo de sódio e cloreto, resultando em aumento do volume celular (oncose), contribuindo dessa forma para obstrução tubular e isquemia medular, dois fenômenos principais no desenvolvimento da necrose tubular aguda (BOER-LIMA, 1998; MASON *et al*, 1981).

Acumulação de Ca^{2+} mitocondrial e disfunção respiratória mitocondrial têm sido observadas após isquemia renal. O cálcio ativa enzimas como fosfolipases, proteases e endonucleases, estas enzimas contribuem para a morte celular. A sobrecarga mitocondrial de cálcio leva ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, que tem dois principais efeitos: o primeiro é prejudicar a produção de ATP, o que exacerba ainda mais a depleção primária de ATP e o segundo é o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, que têm sido implicados como efetores importantes de morte celular por necrose (RANA; SATHYANARAYANA; LIEBERTHAL, 2001).

Foi demonstrado em células tubulares renais que a gravidade da depleção de ATP determina o mecanismo de morte celular. Em primeiro lugar, certa quantidade de ATP é necessária para manter a homeostase celular e para impedir o colapso bioquímico; se os níveis de ATP caem abaixo deste valor resulta em necrose. Além disso, apoptose é um processo que exige energia. Se a célula não tem o suficiente para conduzir o ATP através de todas as etapas

bioquímicas necessárias para a apoptose, as células sofrem necrose. Da mesma forma, a resposta das células epiteliais tubulares a agentes citotóxicos está relacionada com a concentração do agente prejudicial. Lieberthal *et al.* (1996) demonstraram que células tubulares renais quando expostas a altas concentrações do agente nefrotóxico cisplatina morrem por necrose, e concentrações menores induzem apoptose.

Na morte por apoptose a célula não perde a integridade da membrana onde tem um papel ativo, com um gasto de energia para levar a sua própria morte. Durante esse processo não ocorre um aumento de tamanho ou inchaço das células, as células mortas encolhem e posteriormente se destacam das células vizinhas. É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003).

A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte. Esta primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes (efetora e de degradação). Na fase efetora há ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam dessa fase. A fase de degradação, é a fase que a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas típicas da apoptose (GREEN; KROEMER, 1998).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática), que ocorre pela ativação de receptores na membrana da célula (por exemplo, Fas/APO-1), ou mediada por organelas intracelulares, como mitocôndrias, que podem liberar fatores apoptóticos (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003)

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), a porção citoplasmática desses receptores contém um domínio de morte intracelular chamados de receptores de morte (*death* receptores, DRs). Entre os DRs incluem-se TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e Fas,

dos quais Fas (CD95) é o membro mais proeminente. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem as pró caspases iniciadoras 8 e 10. Depois de tornarem-se ativas as caspases 8 e 10 difundem-se no citoplasma e ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, entre outras (Figura 4). As caspases efetoras, por sua vez, clivam múltiplos componentes vitais para as células, levando a morte por apoptose (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

A via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, é regulada pelas proteínas da família Bcl-2. Membros da família Bcl-2 podem ser divididas em dois grupos distintos, aquelas com atividade anti apoptótica (Bcl-2 e Bcl-XL) e aquelas que promovam a apoptose (Bax, Bid e Bak). Os sinais mitocondriais anti ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz, respectivamente, a sobrevivida ou morte celular programada (CHAN; YU, 2004).

Vários estímulos podem ativar a via mitocondrial, dentre eles, hipóxia, espécies reativas de oxigênio, deprivação de fatores de crescimento, agentes citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Essas proteínas induzem a permeabilidade da membrana externa mitocondrial com conseqüente liberação de proteínas apoptogênicas, como citocromo c, SMAC/DIABLO e fator indutor de apoptose (AIF). O citocromo c liberado no citosol é necessário como co-fator e rapidamente se associa com a região C-terminal a uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação ao dATP a pro-caspase 9 formando um complexo chamado de apoptossomo, e através da clivagem proteolítica a caspase-9, uma vez ativada cliva e ativa as caspases efetoras 3, 6, 7, levando a morte da célula. Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO que atua inibindo as IAPs de bloquear a atividade das caspases. As IAPs são uma família de proteínas com atividade anti-apoptótica que atuam inibindo as caspases. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAPs de sua ligação inibitória com as caspases (Figura 4) (HAIL *et al.*, 2006; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

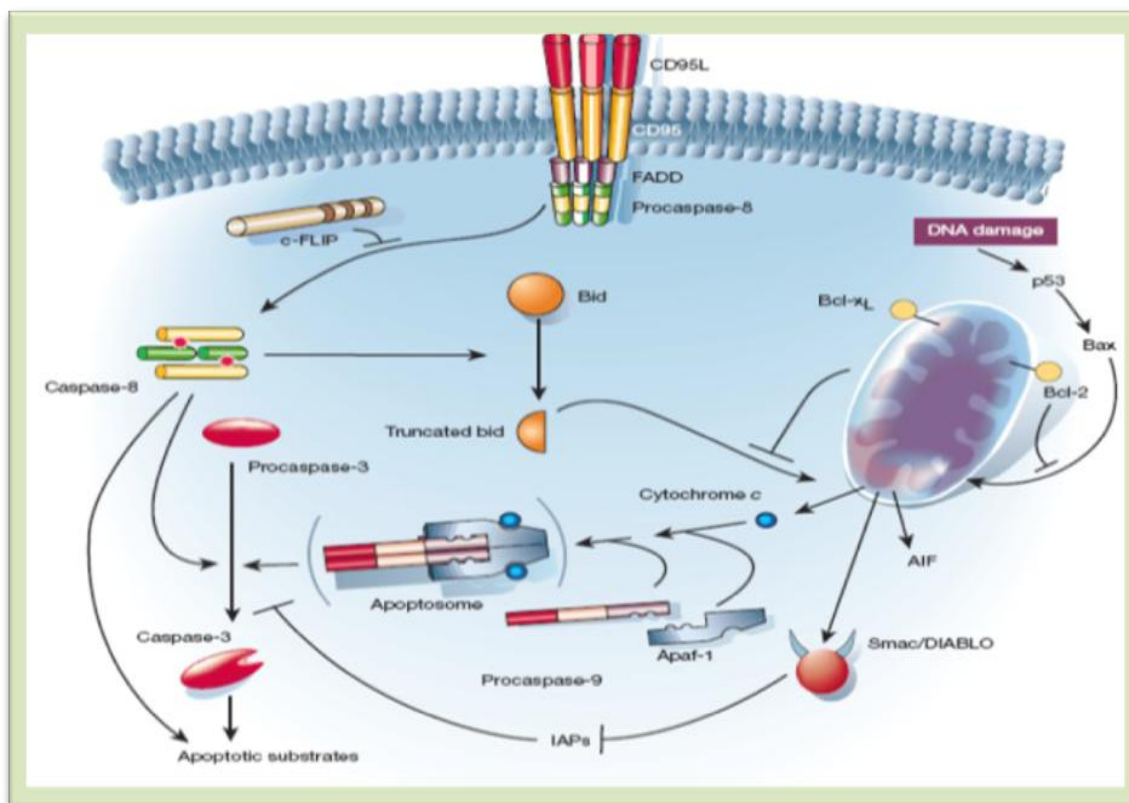


Figura 4: As duas principais vias da apoptose: A via de receptores de morte (via à esquerda da figura) é acionada por membros da superfamília de receptores de morte (como CD95 e de fator necrose tumoral). O Fas-ligante (FasL) associa-se a FAAD na região intracelular. Este complexo ativa a pró caspase 8, que uma vez ativada pode ativar diretamente a pró caspase 3 ou clivar a proteína pró apoptótica Bid, a qual induz a saída do citocromo c. Na via intrínseca, a mitocôndria integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Smac/DIABLO, citocromo c). O citocromo c liberado se oligomeriza com APAF-1 e pró-caspase 9, para formar o complexo ativador da caspase 9 chamado apoptossoma, uma vez ativada a caspase 9 cliva e ativa a pró-caspase 3, induzindo a apoptose. Fonte: HENGARTNER, 2000.

Vários estímulos podem levar a apoptose em células tubulares renais, como injúria celular desencadeada pela isquemia/hipóxia, estresse oxidativo, danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, perda da adesão célula-matriz e da adesão célula-célula, dentre outros (RANA; SATHYANARAYANA; LIEBERTHAL, 2001).

Assim como a gravidade da depleção de ATP, exposição a grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz morte por necrose, enquanto, estresse oxidativo menos grave leva a apoptose. A produção de grandes quantidades de ROS pode causar danos oxidativos diretos para a célula e seus componentes levando a morte por necrose. Com relação a apoptose o aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e

ácidos nucléicos, aumentando o colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que ROS funciona como segundo mensageiro na sinalização da ativação das caspases -9 e -3 (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

Neste trabalho descrevemos a nefrotoxicidade *in vitro* do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, visando obter resultados que possam subsidiar a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos que levam a Insuficiência Renal Aguda. A elucidação destes mecanismos pode permitir a interferência em alguns pontos nas vias de sinalização de respostas, com vistas à interrupção da sequência de eventos que poderiam culminar em lesão.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

As pesquisas atuais envolvendo venenos ofídicos consistem na busca do melhor entendimento dos aspectos clínicos do envenenamento humano e dos mecanismos de ação dos venenos e toxinas. Essas pesquisas vêm atingindo grande progresso, pelo emprego de diversas ferramentas farmacológicas, na prospecção de toxinas com potencial terapêutico e na busca de terapias alternativas ao tratamento convencional.

A *Bothrops leucurus* é uma serpente peçonhenta importante que habita a região nordeste do Brasil, uma vez que é responsável pela maioria dos casos de acidentes ofídicos reportados na região (HIGUCHI *et al.*, 2007). Seu veneno ainda é muito pouco estudado. Alguns trabalhos mostram que os efeitos biológicos devido ao envenenamento têm perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, ou seja, importantes efeitos locais, assim como efeitos sistêmicos graves, como a insuficiência renal aguda (IRA) que é a principal causa de morte nesses acidentes (SANCHEZ *et al.*, 1992).

Diante da importância clínica, este trabalho se propõe a estudar a ação do veneno da *B. leucurus* em rim isolado, bem como sua toxicidade sobre linhagens de células tubulares renais (MDCK – Madin Darby Canine kidney), podendo assim, contribuir para esclarecer os mecanismos de nefrotoxicidade, bem como ajudar na busca de agentes terapêuticos que possam ser úteis para o tratamento da insuficiência renal causada pelo envenenamento botrópico.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar os efeitos renais e os mecanismos de morte celular induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do veneno da serpente *Bothrops leucurus* (VBI) em rim isolado de rato;
- Estudar o efeito do veneno da *Bothrops leucurus* sobre a viabilidade de células tubulares renais (MDCK);
- Estudar o mecanismo de morte induzido pelo veneno da *Bothrops leucurus* nas células MDCK;
- Avaliar a participação do íon Ca^{2+} na morte celular induzida pelo veneno da *Bothrops leucurus*;
- Avaliar o efeito do veneno da *Bothrops leucurus* sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- Avaliar o efeito do veneno da *Bothrops leucurus* sobre a expressão de genes apoptóticos (Bax, caspase 3 e caspase 8).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do veneno

O veneno da serpente *Bothrops leucurus* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente.

4.2 Perfusão de rim isolado

4.2.1 Animais

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

4.2.2 Sistema utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37°C (Figura 5 e 6). Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.



Figura 5: Foto do sistema de perfusão de rim isolado.
Fonte: LFAVET – UFC

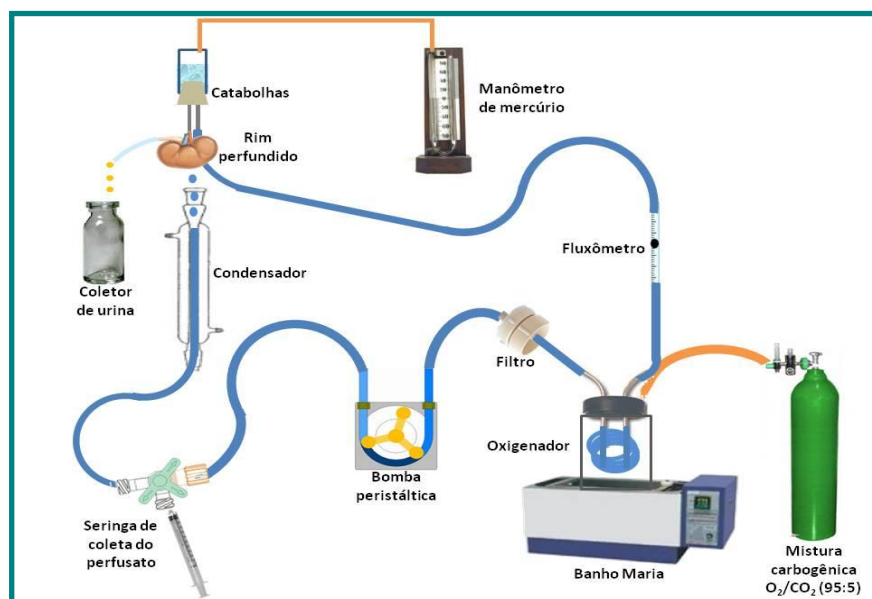


Figura 6: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.
Fonte: LFAVET – UFC.

4.2.3 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foi avaliado em cada

uma das bombas (1,2,3,4,5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/min) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As figuras 7, 8 e 9 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

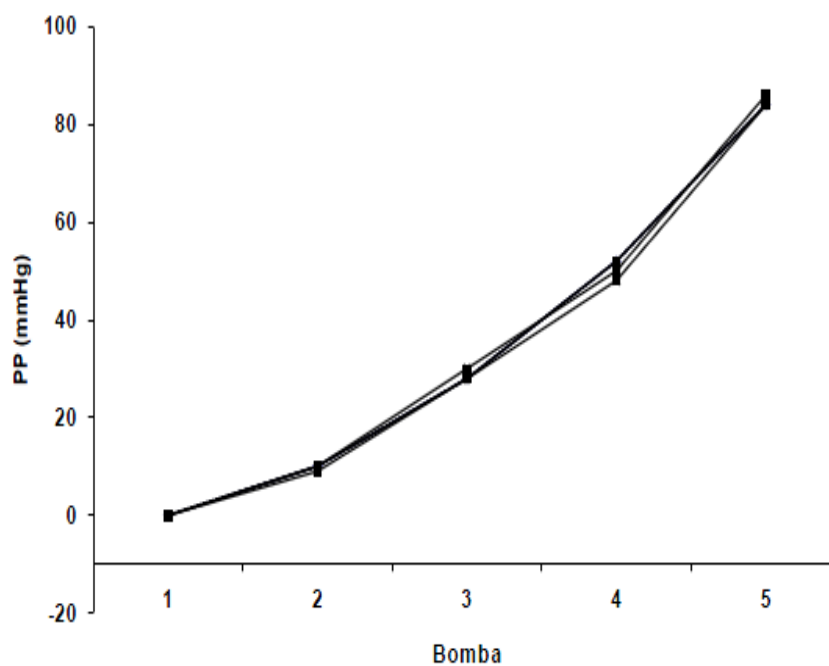


Figura 7: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

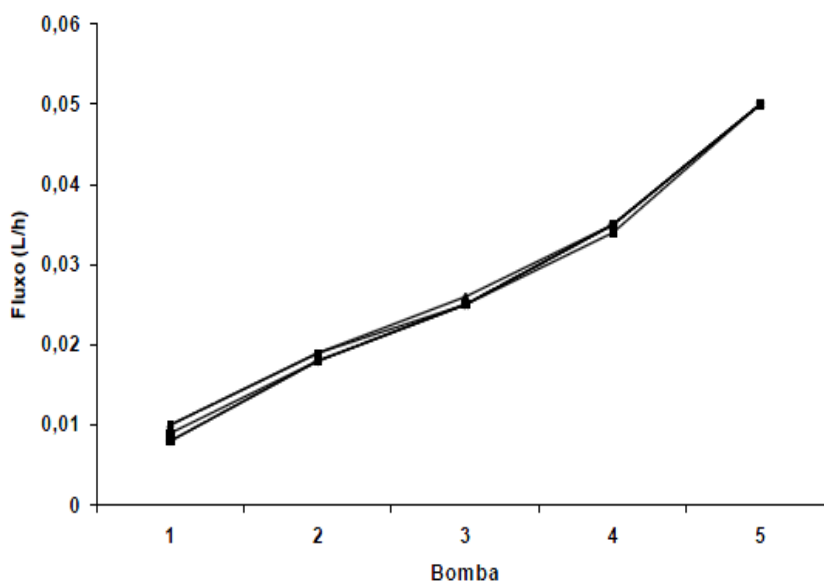


Figura 8: Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

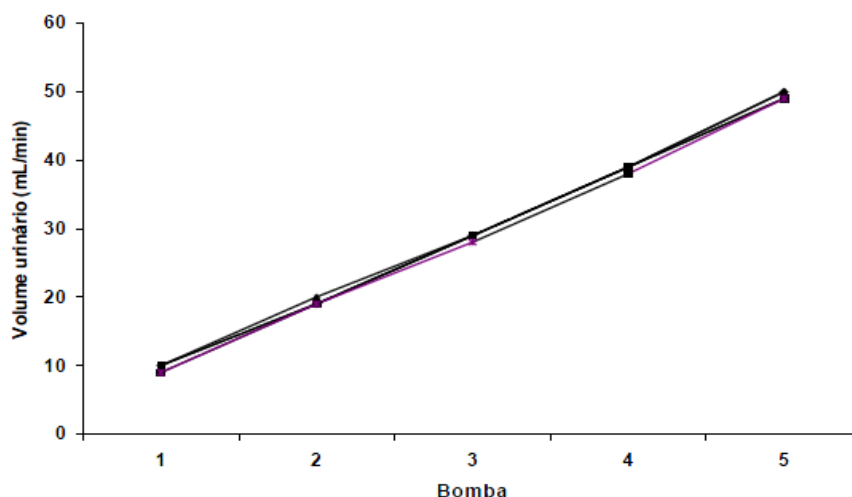


Figura 9: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

4.2.4 Solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 3,2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO_3 = 4,2g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK, LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

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

Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por BALHLAMANN, GIEBISCH e OCHWADT (1967), ROSS (1978). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL–3mL) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30 (figura 10 A e B).

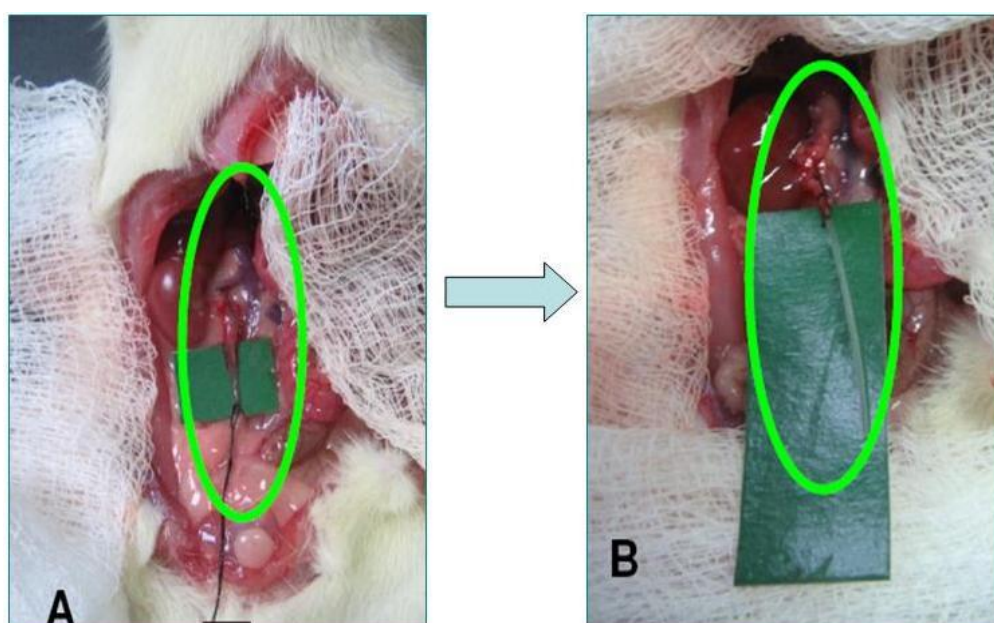


Figura 10: Identificação e dissecação do ureter (A) e ureter canulado (B).

A artéria renal foi isolada (figura 11A) e canulada (figura 11B) através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 12).

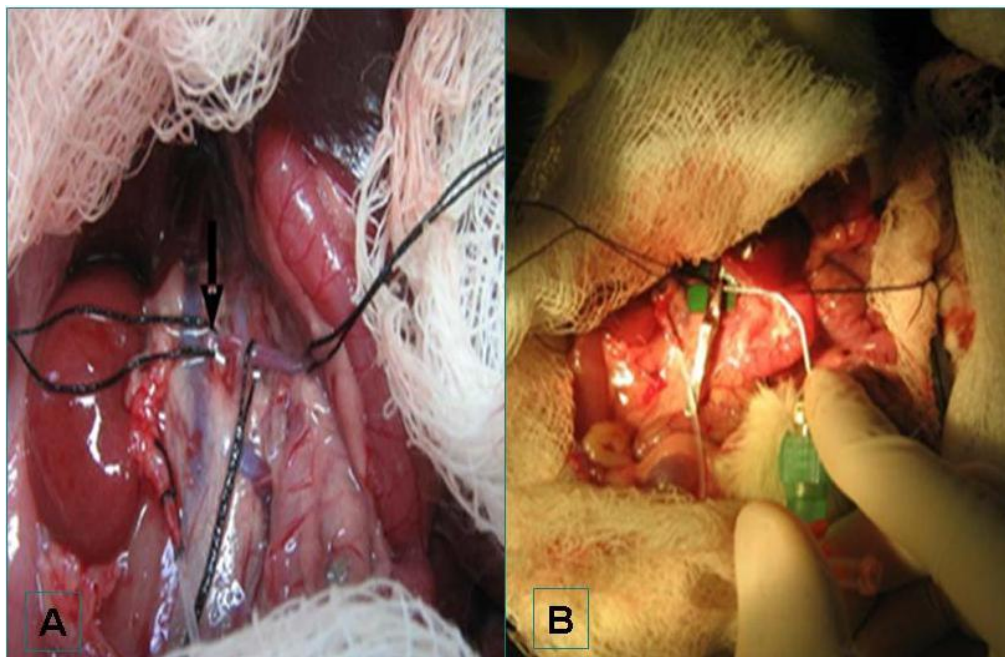


Figura 11: Etapas finais do procedimento cirúrgico para exérese renal. **A:** visualização da artéria renal; **B:** canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.



Figura 12: Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. Amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: pressão de perfusão (PP), resistência

vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCl⁻).

4.2.5 Análises bioquímicas

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

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

4.2.6 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

O quadro 1 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978)

Quadro 1 : Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula
1. PP (mmHg)- Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
2. FU (mL.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo Urinário	FU = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3. RFG (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Ritmo de Filtração Glomerular	RFG = (DOU _{in} / DOP _{in} x FU) sendo DOU _{in} = densidade ótica da inulina na urina e DOP _{in} = densidade ótica da inulina no perfusato.
4. FPR (mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
5. RVR (mmHg/mL .g ⁻¹ . min ⁻¹) – Resistência vascular renal.	RVR = PP (mmHg) / FPR
6. FNa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio filtrado	FNa⁺ = RFG x PNa ⁺
7. ENa⁺ (μEq.g ⁻¹ . min ⁻¹) – Sódio excretado	ENa⁺ = FU x UNa ⁺

8.	\mathbf{TNa}^+ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) - Sódio transportado	$\mathbf{TNa}^+ = \text{FNa}^+ - \text{ENa}^+$
9.	$\%\mathbf{TNa}^+$ - Percentual de sódio transportado	$\%\mathbf{TNa}^+ = \text{TNa}^+ \times 100 / \text{FNa}^+$
10.	\mathbf{FKa}^+ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Potássio filtrado	$\mathbf{FKa}^+ = \text{RFG} \times \text{PKa}^+$
11.	\mathbf{EK}^+ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Potássio excretado	$\mathbf{EK}^+ = \text{FU} \times \text{UKa}^+$
12.	\mathbf{TK}^+ ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Potássio transportado	$\mathbf{TK}^+ = \text{FK}^+ - \text{EK}^+$
13.	$\%\mathbf{TK}^+$ - Percentual de potássio transportado	$\%\mathbf{TK}^+ = \text{TK}^+ \times 100 / \text{FK}^+$
14.	\mathbf{TCI}^- ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Cloreto transportado	$\mathbf{TCI}^- = \text{FCI}^- - \text{ECI}^-$
15.	$\%\mathbf{TCI}^-$ - Percentual de cloreto transportado	$\%\mathbf{TCI}^- = \text{TCI}^- \times 100 / \text{FCI}^-$
16.	\mathbf{FCI}^- ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Cloreto filtrado	$\mathbf{FCI}^- = \text{RFG} \times \text{PCI}^-$
17.	\mathbf{ECI}^- ($\mu\text{Eq}\cdot\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) – Cloreto excretado	$\mathbf{ECI}^- = \text{FU} \times \text{UCI}^-$

4.2.7 Análise histopatológica

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

4.2.8 Grupos experimentais

O estudo do veneno da serpente *Bothrops leucurus* sobre a função renal foi iniciado após um período de controle interno de 30 minutos e as observações foram feitas durante os 90 minutos seguintes.

- Grupo controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (n = 6);
- Grupo tratado com o veneno da serpente *Bothrops leucurus* na

concentração de 10µg/mL (n = 5).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão dos cinco experimentos. Diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni com significância de 5%.

4.3 Ensaio com cultura de células

4.3.1 Linhagem celular

As células utilizadas foram células tubulares epiteliais renais MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) obtidas no departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo- USP.

4.3.2 Cultivo das células MDCK

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

4.3.3 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

4.3.3.1 Ensaio com MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de

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

Protocolo experimental

As células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas para sincronizá-las na fase G₀ do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10 min em estufa de CO₂ a 37°C, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram plaqueadas a 1x10⁵ céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do veneno da serpente *Bothrops leucurus* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg/mL). Após 24 horas do tratamento com a substância-teste, foi removido 100µL do sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C e após 17 horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

O controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição da substância teste (PBS), e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração do veneno. Foi determinada a CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa graphPad Prism, versão 5.01. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.3.3.2 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.

Nesse estudo foi analisada a capacidade do veneno da *Bothrops leucurus* de induzir apoptose e/ou necrose utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V com o kit BD Pharmingen™ Annexin V-FITC. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidios de membrana plasmática, através de suas cargas negativas, na presença de íons cálcio. Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose - enquanto a membrana celular continua intacta - até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V é uma evidência da apoptose (MOCHIZUKI *et al.*, 2004). A anexina V pode ser conjugada com fluórocromos como o FITC que serve como uma sonda sensível para análises por citometria de fluxo das células que estão sofrendo apoptose. A necrose, por outro lado, é acompanhada pela perda da integridade da membrana celular e é avaliada ao se adicionar o corante vital iodeto de propídeo (IP). O corante iodeto de propídeo se liga ao DNA e emite alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, no entanto, as células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. As células viáveis apresentarão baixa fluorescência podendo distinguir as células em apoptose

precoce (FICT positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia se coram com ambos FITC e IP devido ao estágio final de desintegração celular não havendo como diferenciar células em necrose de células em apoptose tardia por este ensaio (BOERSMA *et al.*, 2005).

Protocolo experimental

As células MDCK foram tratadas com o veneno de *B. leucurus* em várias concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 2,5; 1,25; 0,625 µg/mL). Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi coletado, colocado em um tubo (50 ml) e centrifugado a 500 x g por 10 min para coletar células em suspensão. As células aderidas a placa foram lavadas com PBS três vezes e tripsinizadas. O “pellet” obtido após a tripsinização foi ressuscitado no meio que foi retirado do frasco e separado previamente. As células foram centrifugadas novamente e o “pellet” então, ressuscitado em 500µL de tampão do Kit para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100µL desta suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida foi adicionado 5µL de anexina V, iodeto de propídeo, ou ambos, em cada frasco do citômetro, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos com papel alumínio. Por fim, foi adicionado 400µL do tampão e os frascos foram levados para o citômetro de fluxo.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACS, BD, New Jersey, USA). Os dados foram obtidos através do software Cell Quest e os resultados foram analisados através do software WinMDI.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.4 Experimentos de microscopia de fluorescência.

Nestes experimentos foi utilizado um microscópio de fluorescência de alta resolução acoplada a CCD câmera (Quantix 512-Roper Scientific Inc., Princeton Instruments, Princeton, NJ) com sistema de resfriamento para diminuição de ruídos e aumento da resolução em tempo e espaço reais (Nikon TE 300; Nikon, Osaka, Japan). O sistema possui equipamento para controle da temperatura da amostra, diafragma para controle da luz e sistema de filtros para excitação e emissão, que permite o uso de três ou mais fluoróforos diferentes em uma mesma amostra. Imagens foram adquiridas por BioIP software (Anderson Eng). Tais experimentos foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Soraya Soubhi Smaili do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.4.1 Núcleos picnóticos

A presença de núcleos picnóticos foi avaliada com Hoechst 33342 (1µg/mL), um marcador fluorescente específico para núcleos. Hoechst 33342 se liga preferencialmente a pares de base A-T do DNA. Os núcleos picnóticos são caracterizados pela fragmentação nuclear e/ou condensação da cromatina observado pelo aumento da fluorescência.

Protocolo experimental

Células MDCK foram plaqueadas em uma densidade de 3×10^5 células / poço e então tratadas com VBI (0,625, 1,25 e 2,5 µg/mL). Transcorridas 24hs do tratamento, as células foram lavadas com tampão para fluorescência e incubadas com Hoechst 33342 (1µg/µL) por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passado o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas com tampão e montadas em câmaras de *Leiden*, que foram acrescidas de 1,0 mL de tampão. Todos os núcleos foram contados utilizando um microscópio de fluorescência utilizando-se objetiva de 40x e a percentagem de morte celular foi calculada pelo número de núcleos picnóticos em relação ao total de núcleos no campo.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.4.2 Medidas da variação do Ca^{2+} intracelular

Os experimentos para verificar as alterações dos níveis intracelulares de Ca^{2+} foram realizados com o marcador fluorescente de Ca^{2+} , Fura-2-AM. O Fura-2-AM é um indicador de Ca^{2+} permeante à membrana plasmática, devido à sua porção acetoximetil éster (AM). Uma vez dentro das células, este indicador que na forma AM é insensível a íons é hidrolizado por esterases intracelulares liberando o indicador poliânico do grupamento AM, tornando-se assim sensível a íons. A excitação do Fura-2-AM foi realizada continuamente em dois comprimentos de onda, 340 nm e 380 nm, sendo a emissão da fluorescência coletada no comprimento de onda de 505 nm. Quando o Fura-2-AM está ligado ao Ca^{2+} , a fluorescência em 340 nm aumenta, enquanto que a fluorescência em 380 nm diminui. Desta maneira, a razão 340/380 nm corresponde às variações de cálcio citosólico (SMAILI *et al.*, 2008).

Protocolo experimental

As células MDCK foram plaqueadas em placas de Petri contendo lamínulas (*coverslips*) redondas de 25 mm de diâmetro, previamente lavadas com água destilada autoclavadas e deixadas por 30 minutos sob luz Ultra-Violeta. Após 24 horas do plaqueamento as células foram lavadas com tampão para fluorescência e incubadas com Pluronic F-127 e Fura-2AM (3,0 μM), por 30 minutos, a temperatura ambiente e protegidas da luz. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com o mesmo tampão para fluorescência e a lamínula foi encaixada na câmara de *Leiden*, a qual foi adicionado 1,0 mL de tampão. No microscópio a câmara foi inserida no sistema com controle de temperatura, de forma que os experimentos foram realizados com as células mantidas a 37 °C. Durante os primeiros 2 minutos de cada experimento, correspondentes a 20 imagens, não foi dado qualquer estímulo, para que fosse

obtida uma linha de base. Após as 20 primeiras imagens foi adicionado o veneno de *Bothrops leucurus* nas seguintes concentrações 0,625, 1,25 e 2,5 µg/mL. Os experimentos foram desenvolvidos com números de imagens variados, intervalo de 6 segundos entre as imagens e 100 milissegundos de tempo de exposição das células à luz fluorescente. Foi usada a objetiva de 40x e resolução de 2 bins.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.4.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Essa técnica baseia-se na capacidade de um corante fluorescente específico, se ligar diretamente as mitocôndrias de células viáveis. O éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), é um indicador catiônico que se acumula preferencialmente em mitocôndrias energizadas. Ao utilizar TMRE é possível acompanhar a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) indicada pela perda do corante acumulado na mitocôndria para o citosol, bem como é possível verificar aumentos no $\Delta\Psi_m$ indicado pelo aumento na fluorescência a nível da organela. Para obter medidas mais quantitativas do $\Delta\Psi_m$, o sinal do TMRE é calibrado usando Carbonilcianeto-p-tri fluorometoxifenilhidrazona (FCCP) no final do experimento. Antes de iniciar o experimento, a estabilidade de fluorescência deve ser verificada através da aquisição de algumas imagens, até que uma base estável seja alcançada. Quando uma base estável não foi obtida, devido à photobleaching ou efeitos fotodinâmica, as células foram descartadas.

Protocolo experimental

Após 24 horas do plaqueamento as células foram lavadas com tampão para fluorescência e incubadas com o TMRE (20nM) por 30 minutos, a temperatura ambiente e protegidas da luz. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com o mesmo tampão para fluorescência e a lamínula foi encaixada na câmara de *Leiden*, a qual foi adicionado 1,0 mL de tampão. No microscópio a câmara foi inserida no sistema com controle de temperatura, de forma que os experimentos foram realizados com as células mantidas a 37 °C. Os primeiros 2 minutos de experimento, correspondentes as primeiras 20 imagens, transcorreram sem que fosse dado qualquer estímulo, a fim de se obter uma linha de base. Passado este período, foi adicionado *VBI* (1,25 µg/mL). Cada experimento foi calibrado ao final com a adição de FCCP (5 µM), para obtenção da despolarização e queda máximas da fluorescência. Os experimentos foram desenvolvidos com números de imagens variados, intervalo de 6 segundos entre as imagens . Foi usada a objetiva de 40x e resolução de 1 bin.

Análise estatística

Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos com um total de 309 mitocôndrias analisadas. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.5 Ensaio para avaliação de expressão gênica

4.5.1 Reação de transcriptase reversa.

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

4.5.2 Reação de polimerase de cadeia em tempo real (qPCR).

Analisou-se a expressão do gene pró-apotótico (Bax) e das caspases 3 e 8 utilizando o equipamento iQ5 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de PCR. Através dessa tecnologia é possível a quantificação das amostras de cDNA na fase exponencial da cinética de amplificação, período no qual a PCR pode ser quantificado. Isto foi possível com a utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR Green, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores de DNA (*primers*) aqui utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos genes investigados acima descritos obtidas no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Todas as reações de PCR em tempo Real foram realizadas num volume total de 25 μL contendo 12,5 μL de iQ Supermix (solução padrão de amplificação contendo tampão salino, uma mistura de deoxinucleotídeos, enzima amplificadora e corante SYBR Green onde todas estavam em concentrações otimizadas pelo fabricante), 200 nM dos iniciadores e 2 μL de cDNA das amostras. Amostras negativas foram também testadas onde o cDNA era substituído por água mili-Q autoclavada. As condições da PCR foram empregadas da seguinte forma: um período de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 40 ciclos para as reações de amplificação dos genes testes descritos acima. Cada ciclo continha uma fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma fase de anelamento a 60°C por 30 segundos, e uma fase de extensão da cadeia de DNA a 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos submetemos as amostras a uma extensão final na temperatura de 72°C por 3 minutos.

Com o intuito de analisar a especificidade das amplificações, ou seja, saber se os produtos formados eram específicos para os genes testados, foi realizada, após cada reação, uma curva de fusão (*Melting Curve*) onde a temperatura da reação era acrescida em 1°C a cada 20 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento de cada iniciador e terminando a 95°C. Os dados obtidos pelo iQ5 Optical System Software (Version 2.0) foram

baseados no valor do ciclo limiar (C_T – Threshold cycle), ou ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 x maior que a fluorescência basal. A avaliação da expressão gênica foi obtida utilizando o método matemático descrito por PFAFFL (2001).

Protocolo experimental

Para os ensaios de avaliação da expressão gênica, as células MDCK foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL/poço. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$, adicionou-se em cada poço o veneno da serpente *Bothrops leucurus* nas concentrações de 1,5, 1,25 e $1 \mu g/mL$ em hexaplicata e incubou-se as células novamente em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$. Decorridas 24 horas, as células foram deslocadas dos poços por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v), centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Para cada concentração da substância-teste foram obtidos seis precipitados, os quais foram misturados para obter-se apenas uma amostra de cada concentração. O experimento teve sequência com os procedimentos de isolamento de RNA total utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen) e automação pelo equipamento Qiacube.. Isolamento de RNA total: Resumidamente, adicionou-se ao precipitado de células o volume de 350 μL do tampão de lise contendo B-mercaptoetanol. As células foram lisadas quando submetidas ao êmbolo de agulha hipodérmica (13x4,5cm). A solução com as células lisadas foi centrifugada a 14.000 xg por 3 minutos e o sobrenadante foi aplicado a um tubo eppendorf de 2,0 ml que foi aplicado ao equipamento QiaCube (Qiagen). A partir de então todo o isolamento foi realizado automaticamente, seguindo o protocolo descrito pelo kit e já programado ao equipamento.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativamente diferente.

4.6 Aspectos éticos

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

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Perfusão de rim isolado

O veneno da serpente *Bothrops leucurus* foi administrado ao sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos após o início dos experimentos. Os 30 minutos iniciais foram considerados como controle interno de cada experimento. Os grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Heinselet.

Após aplicação do veneno da *Bothrops leucurus* na dose de 10 µg/mL foram observadas intensas alterações na fisiologia renal. Com relação aos parâmetros vasculares, verificamos redução na pressão de perfusão (PP) aos 90 e 120 minutos (Tabela 1; Figura 13) e na resistência vascular renal (RVR) aos 120 minutos (Tabela 1, Figura 14). O fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) diminuíram de forma significativa aos 60 e 90 minutos (Tabela 2, Figura 15 e Figura 16). O percentual de transporte total de sódio (%TNA) foi significativamente reduzido aos 90 minutos (Tabela 3, Figura 17), enquanto o percentual de transporte total de cloreto (%TCl⁻) diminuiu significativamente aos 60 e 90 minutos (Tabela 3, Figura 18). Com relação ao percentual de transporte total de potássio (%TK⁺) não observamos alterações significativas quando comparado ao controle (%TK⁺_{CT}=69.13 ±4.14; %TK⁺₆₀= 69.04 ± 6.6; %TK⁺₉₀= 71.84 ± 4.21; %TK⁺₁₂₀ 69.94 ± 6.86).

Tabela 1: Parâmetros vasculares da Perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops leucurus* (10µg/mL).

Tempo	PP (MÉDIA ± EPM)				RVR (MÉDIA ± EPM)			
	Controle		VBI 10µg/mL		Controle		VBI 10µg/mL	
30	110.10	±3.68	110.20	±0.30	5.39	±0.06	5.76	± 0.06
60	108.27	±4.88	112.70	±1.80	5.57	±0.11	5.89	±0.11
90	108.69	±5.08	84.90*	±3.90	5.32	±0.21	4.43	± 0.21
120	110.28	±3.69	78.90*	±2.70	5.48	±0.17	4.13 *	±0.17

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

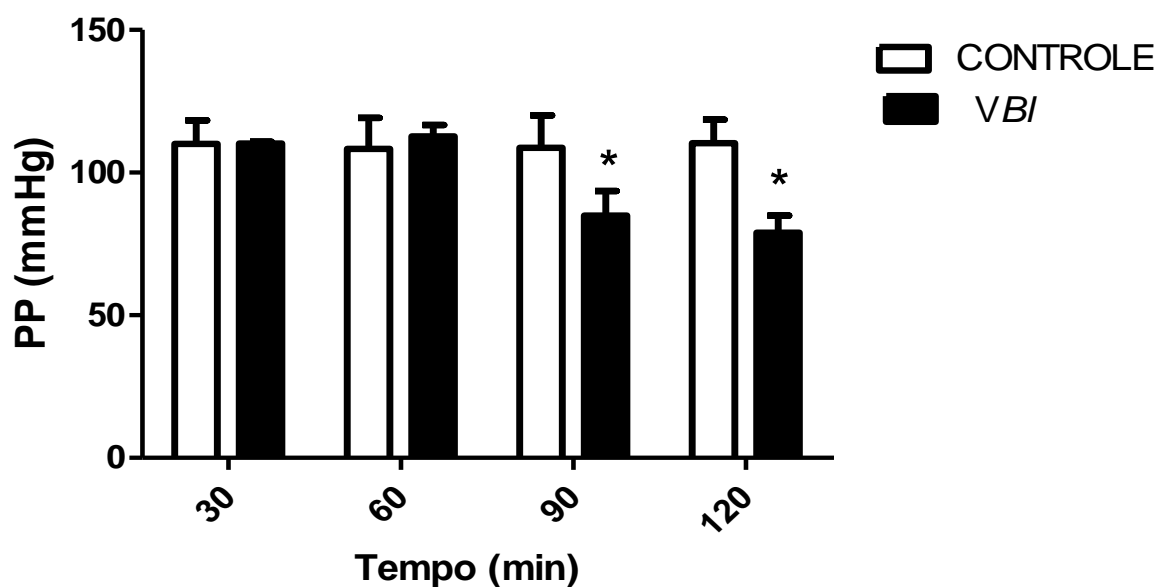


Figura 13: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* na pressão de perfusão em rim isolado de rato, na concentração de 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

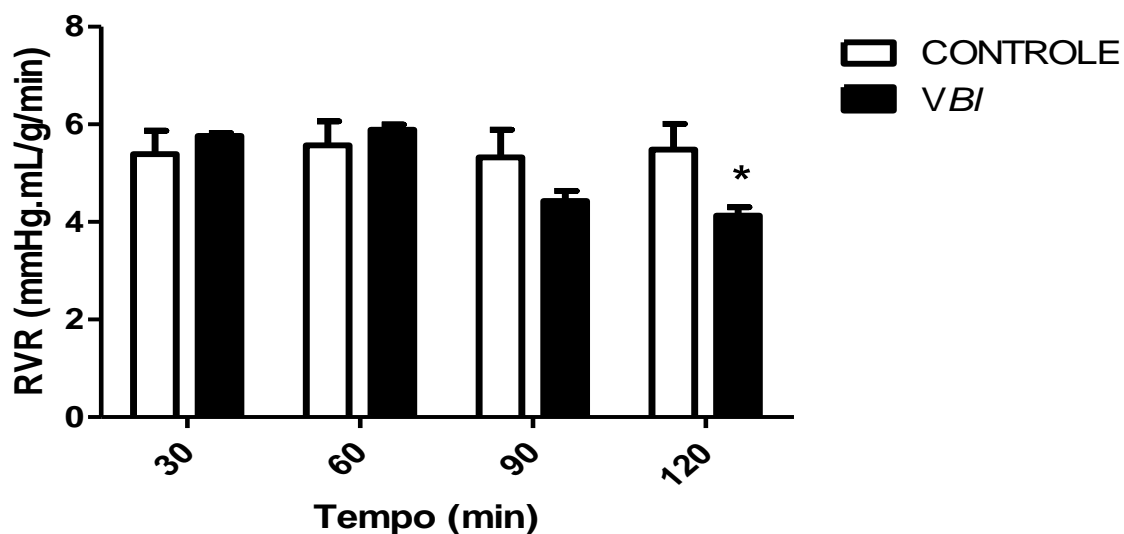


Figura 14: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* (10 μ g/mL) na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 2: Parâmetros funcionais da Perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops leucurus* (10 μ g/mL).

Tempo	FU (MÉDIA \pm EPM)				RFG (MÉDIA \pm EPM)			
	Controle		VBI 10 μ g/mL		Controle		VBI 10 μ g/mL	
30	0.13	± 0.00	0.13	± 0.01	0.70	± 0.07	0.70	± 0.11
60	0.15	± 0.01	0.11*	± 0.01	0.70	± 0.05	0.42*	± 0.04
90	0.16	± 0.02	0.07*	± 0.01	0.63	± 0.05	0.19*	± 0.03
120	0.16	± 0.02	0.13	± 0.02	0.69	± 0.08	0.54	± 0.08

Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

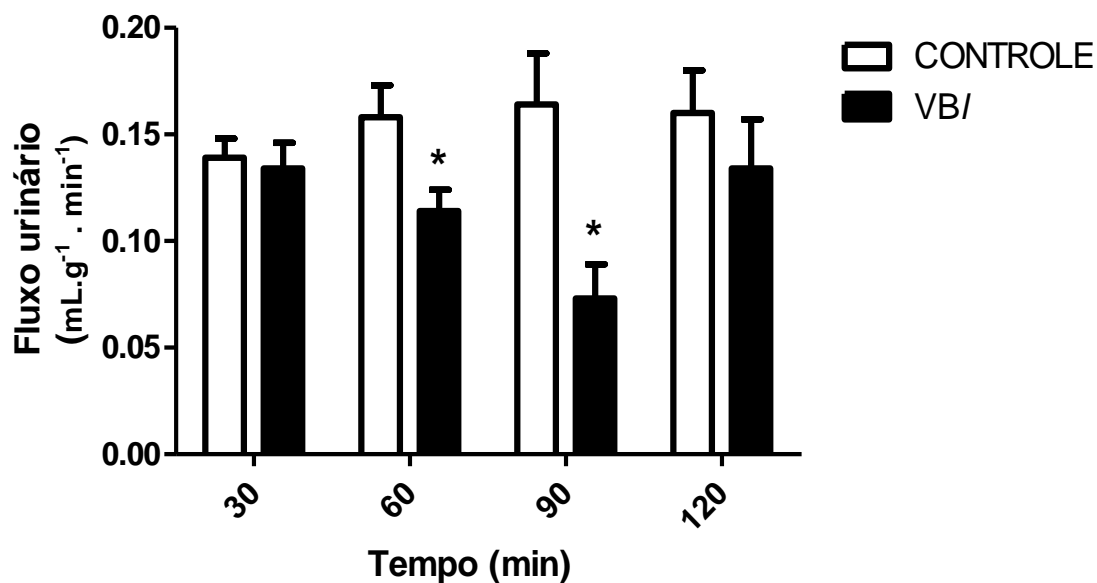


Figura 15: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* (10 μ g/mL) no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

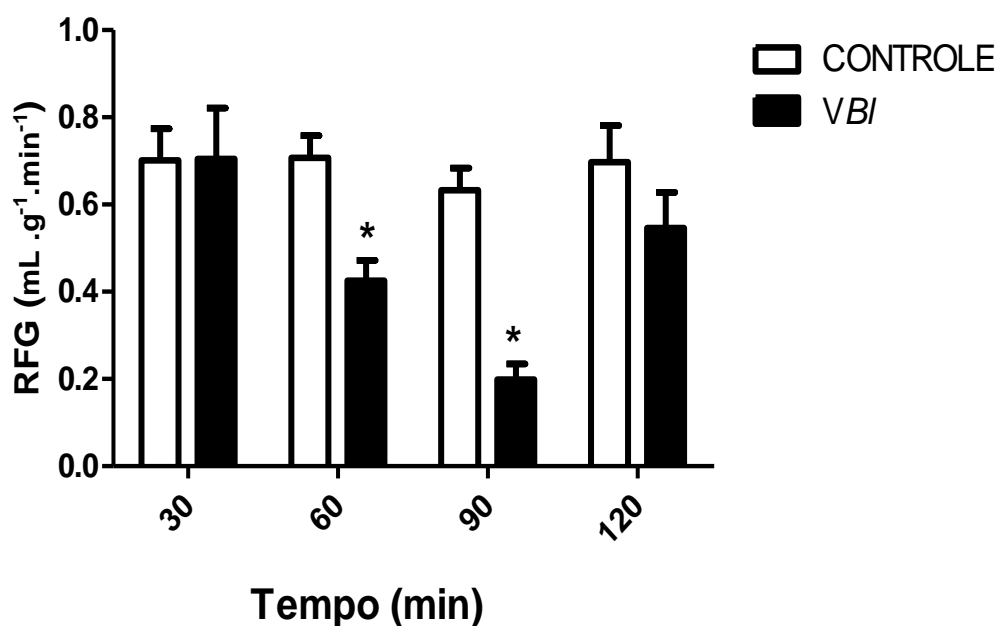


Figura 16: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* (10 μ g/mL) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

Tabela 3: Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio e cloreto da Perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothrops leucurus* (10µg/mL).

Tempo	% TNA ⁺ (MÉDIA ± EPM)				% TCl ⁻ (MÉDIA ± EPM)			
	Controle		VBI 10µg/mL		Controle		VBI 10µg/mL	
30	81.94	±1.24	78.64	±3.10	79.90	±1.03	75.25	±2.15
60	81.11	±1.25	75.62	±2.55	81.25	±2.44	71.34*	±2.58
90	79.26	±0.90	64.54*	±2.44	77.32	±2.22	61.74*	±1.89
120	79.76	±0.56	75.91	±1.22	78.53	±2.33	72.70	±2.84

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$

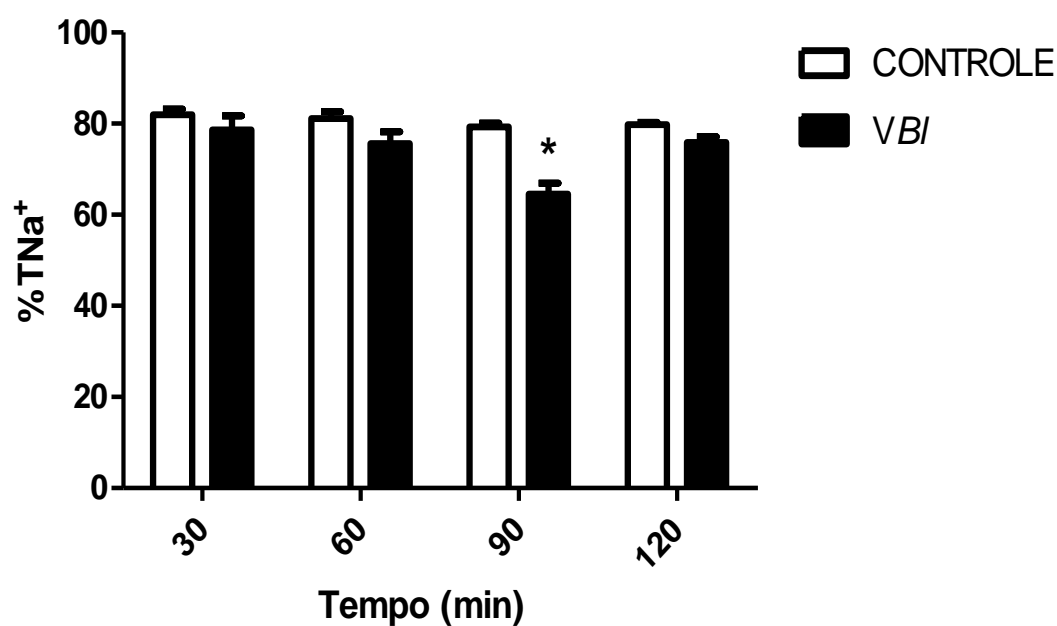


Figura 17: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* (10µg/mL) no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNA⁺). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

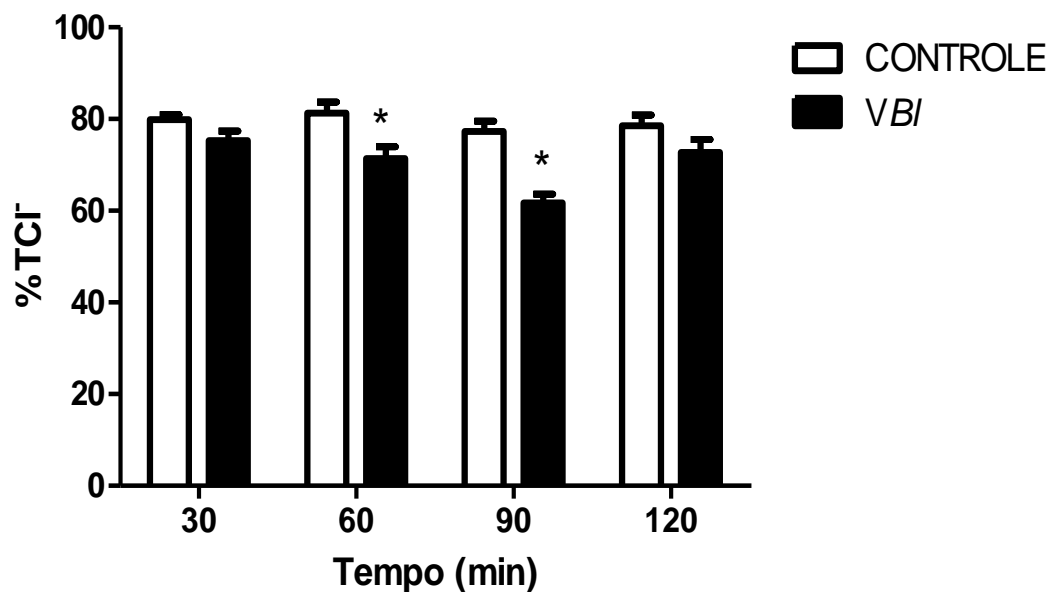


Figura 18: Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* (10 μ g/mL) no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCI). Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

5.2 Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente *Bothrops leucurus*.

A Figura 19 mostra um corte histológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit mostrando que não há alterações provocadas pelo veículo. As lâminas analisadas demonstraram que glomérulos, túbulos, vasos e interstícios estavam normais. Os rins esquerdos serviram como grupo controle não apresentando também qualquer alteração em glomérulos, túbulos, vasos e interstício (Figura 20).

Na análise histológica dos rins direitos perfundidos com o veneno de *B. leucurus* na concentração de 10 μ g/mL, observamos degeneração hidrópica com vacuolização citoplasmática sobre a forma de microvesículas nas células do revestimento tubular proximal, distal e na alça de Henle. Deposição proteinácea nos túbulos e espaços urinários. Alterações glomerulares mínimas. Interstícios e vasos normais (Figura 2).

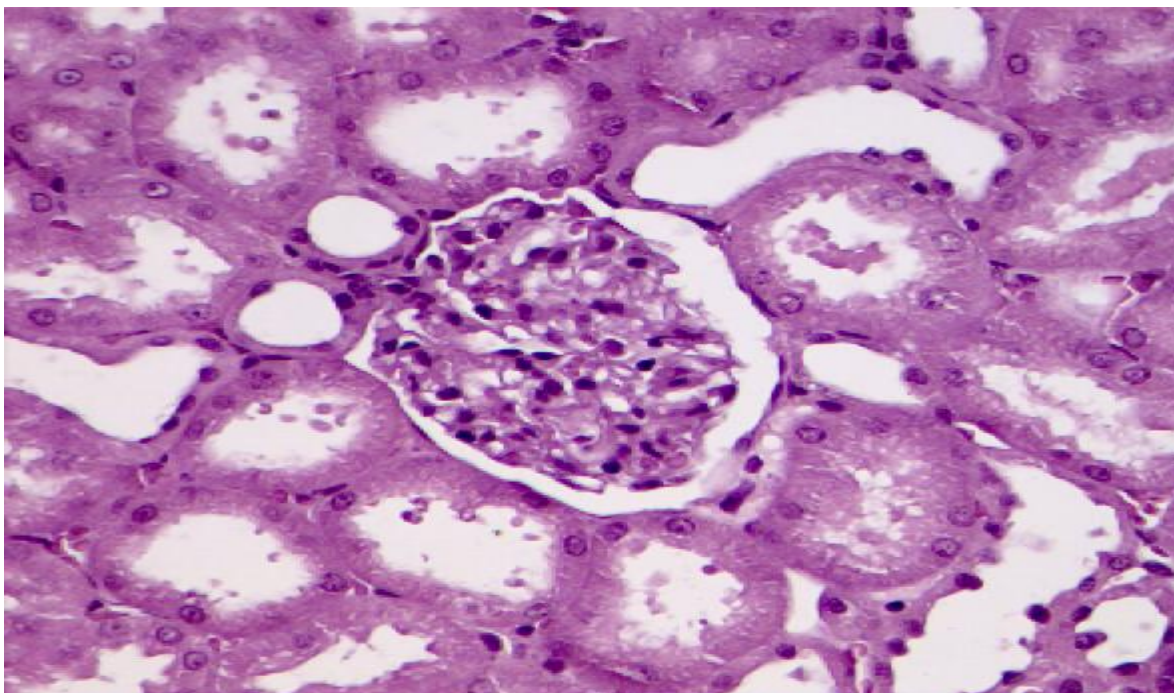


Figura 19: Fotomicrografia de rim esquerdo perfundido apenas com a solução de Krebs-Hanseleit (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=6).

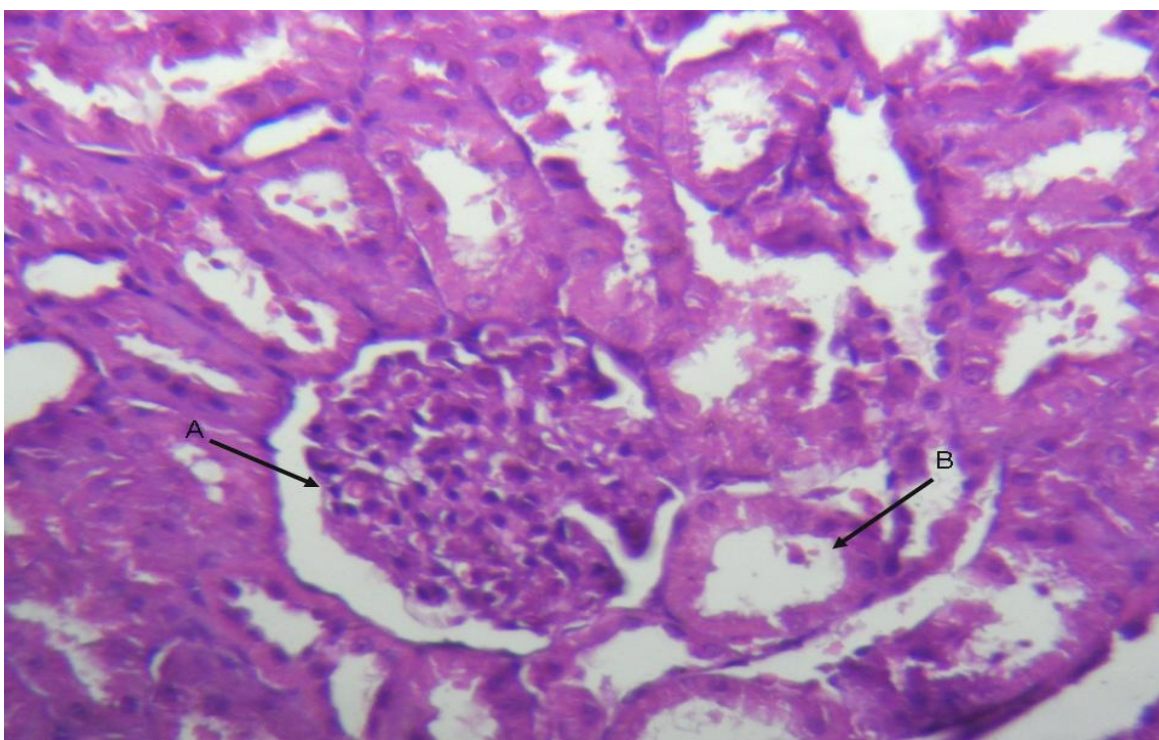


Figura 20: Fotomicrografia de rim esquerdo não perfundido: (A) Glomérulos; (B): Túbulos (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=6).

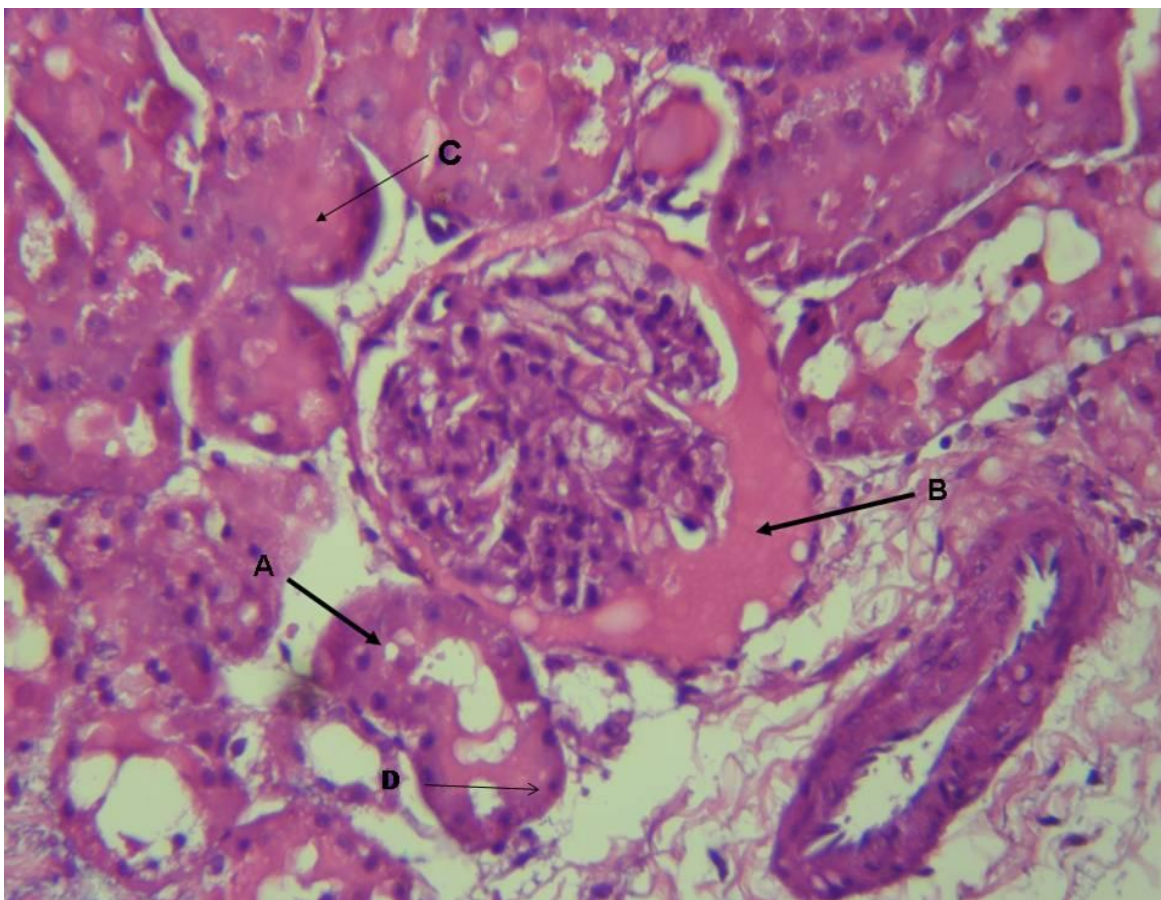


Figura 21: Fotomicrografia do rim direito perfundido com o veneno da serpente *Bothrops leucurus* na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, evidenciando alterações na arquitetura renal: **(A)** Vacuolização das células tubulares; **(B)** Deposição de material protéico nos espaços urinários; **(C)** Deposição de material protéico nos túbulos; **(D)** Núcleo picnótico (Aumento 400x, coloração de hematoxilina-eosina; n=6).

5.3 Avaliação do efeito do veneno da serpente *Bothrops leucurus* sobre células MDCK.

5.3.1 Ensaio de viabilidade celular.

A citotoxicidade do veneno da *Bothrops leucurus* (VBI) foi avaliada em células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que o veneno reduziu significativamente a viabilidade das células MDCK em todas as concentrações testadas quando comparadas ao

controle, com uma CI_{50} de 1,25 $\mu\text{g/mL}$. A figura 22 representa a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

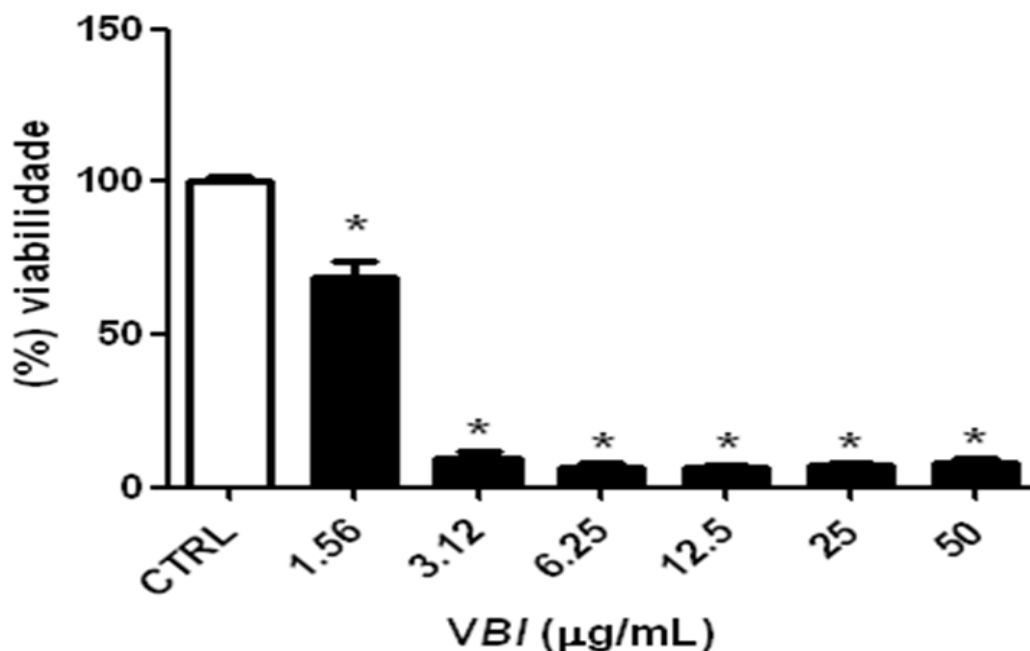


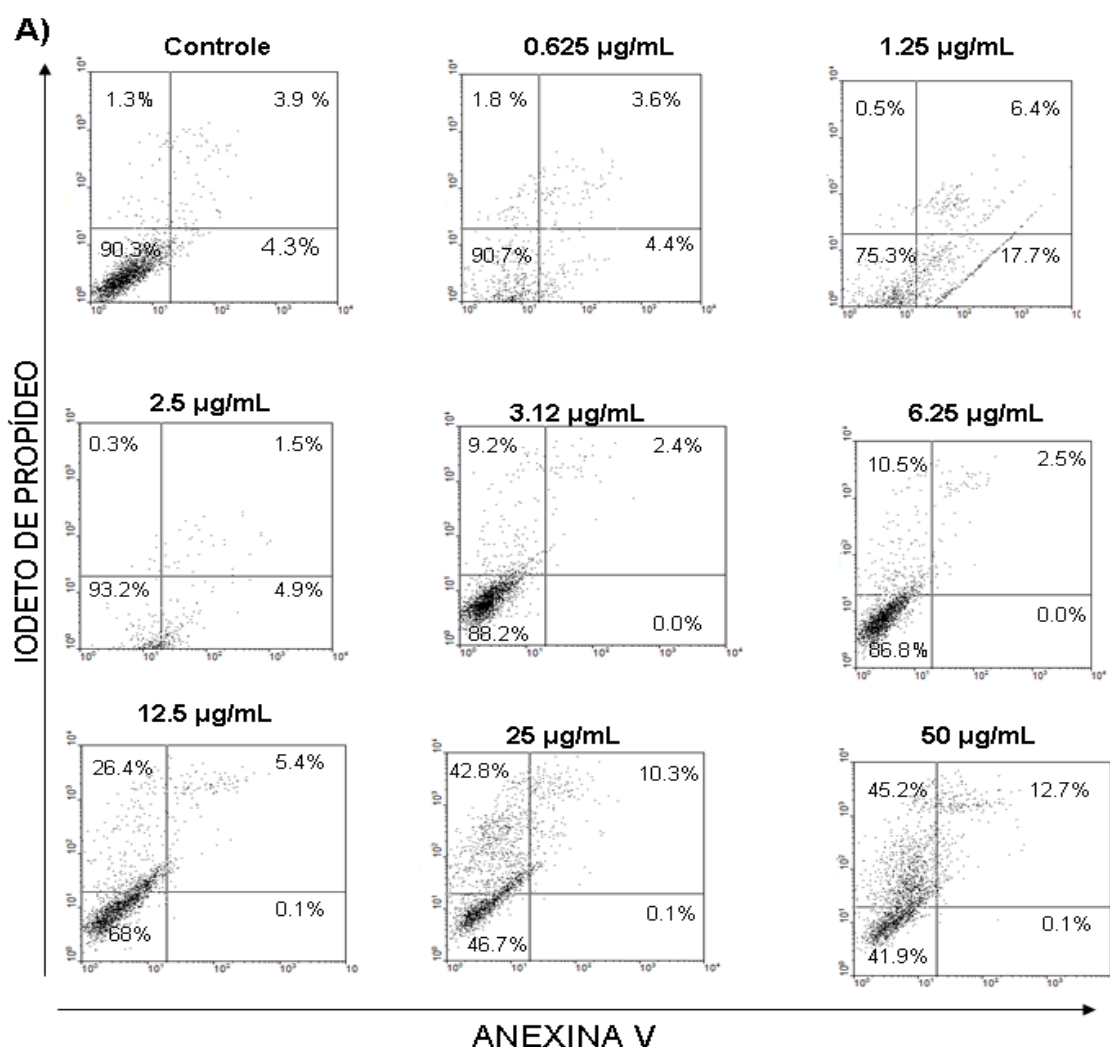
Figura 22: Efeito do veneno da serpente *Bothrops leucurus* sobre a viabilidade de células tubulares renais (MDCK), ensaio com MTT. As células foram cultivadas com VBI por 24 h com diferentes concentrações (50, 25, 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$). A porcentagem de células viáveis foi calculada como uma razão de absorbância a 570 nm de tratado para o grupo controle das células. Valores foram dados como média \pm EPM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste Anova One-way, seguido do pós teste de Dunnett).

5.3.2 Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo.

Após verificar a citotoxicidade, buscamos elucidar qual o tipo de morte induzido pelo veneno de *B. leucurus* nas células MDCK. Para tanto, experimentos para a detecção de apoptose e/ou necrose foram realizados por citometria de fluxo utilizando anexina-V e iodeto de propídeo (PI).

Podemos observar na figura 23 A, que a morte celular ocorreu predominantemente por necrose, com uma frequência muito baixa de apoptose. Na figura 23 B podemos observar células marcadas com anexina V apenas nas menores concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$), e que a porcentagem de células marcadas com anexina V diminui com o aumento da

concentração do veneno, onde verificamos uma tendência ao aumento no número de células mortas por apoptose apenas nas concentrações de 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ mas não foi significativa em relação ao controle. Na figura 23 C, observamos uma alta porcentagem de células marcadas com iodeto de propídeo, caracterizando células em processo de necrose. O processo de morte celular por necrose secundária também foi observado, podendo representar evidências de um processo de morte celular por apoptose incompleto que culminou em necrose. Na figura 23 D, observa-se que a porcentagem de morte celular por necrose secundária foi significativamente maior nas maiores concentrações testadas (25, 50 $\mu\text{g/mL}$).



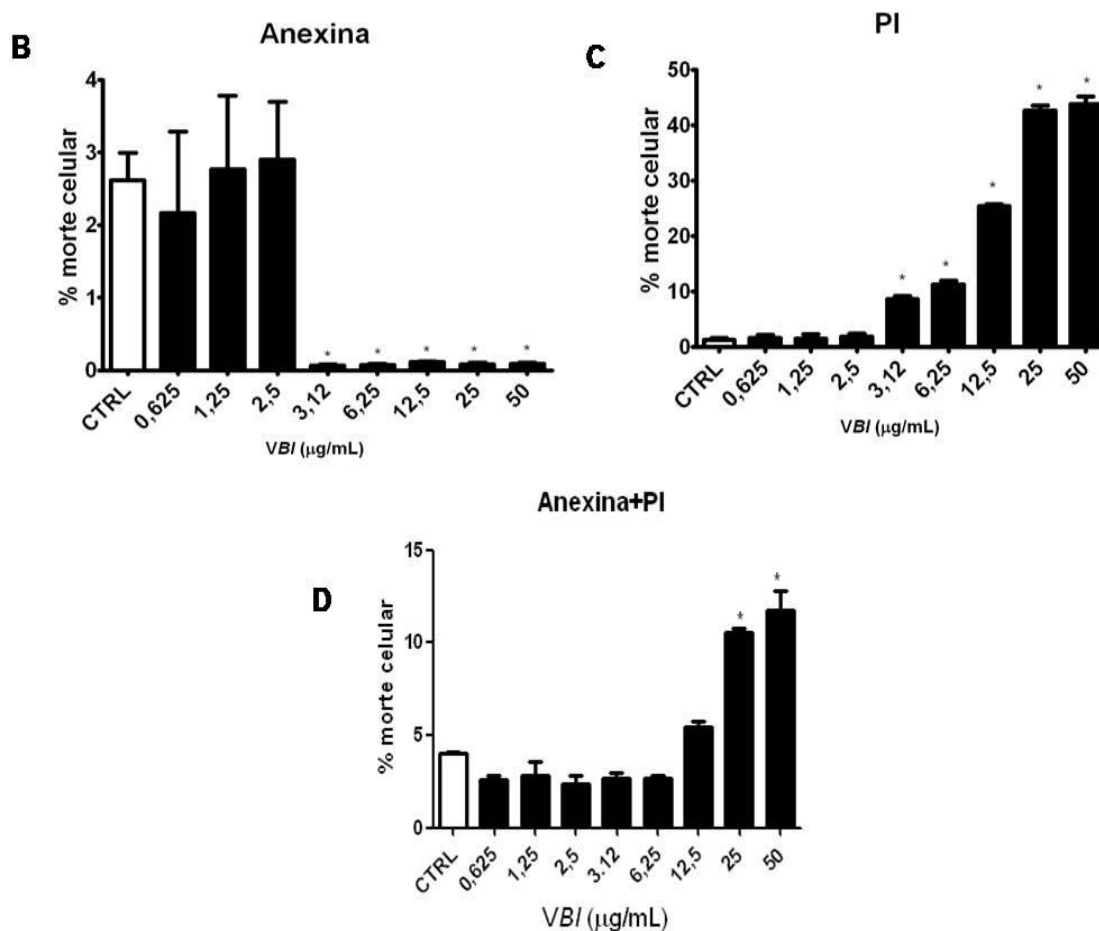


Figura 23: Análise dos efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo **(A)** Gráficos representativos do perfil de marcação simultânea de células MDCK com Anexina-V-FITC (quadrante inferior direito das plotagens – índice de apoptose), PI (quadrante superior esquerdo das plotagens – índice de necrose). No quadrante inferior esquerdo das plotagens, estão representadas as células sem marcação (células que demonstram estar viáveis). No quadrante superior direito das plotagens estão representadas as células com dupla marcação (índice de necrose secundária). **(B), (C) e (D)** Quantificação do tipo de morte celular (Apoptose/Necrose) utilizando marcação de fluorescência com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) nas células MDCK expostas a diferentes concentrações do veneno da *Bothrops leucurus* por um período de 24h.

5.3.3 Ensaio para verificar a presença de núcleos picnóticos

Para avaliar se o veneno da *B. leucurus* foi capaz de induzir morte por apoptose, as células MDCK foram tratadas com 0,625 ($1/2CI_{50}$), 1,25 (CI_{50}) ou 2,5 µg/mL ($2CI_{50}$) de VBI por 24 horas. A CI_{50} foi obtida no ensaio de viabilidade celular (MTT). Os núcleos foram corados com Hoechst 33342 (1µg/mL) e

contados manualmente. Os núcleos picnóticos são caracterizados pela fragmentação nuclear e/ou condensação da cromatina observado pelo aumento da fluorescência. Na Figura 24 A está representando o aspecto do núcleo de células não tratadas marcadas com Hoechst 33342, observar o aspecto homogêneo. Na figura 24 B observar núcleos picnóticos. Os dados mostram que VBI 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu 6,8% de núcleos picnóticos e VBI 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5,8% (Figura 24 C).

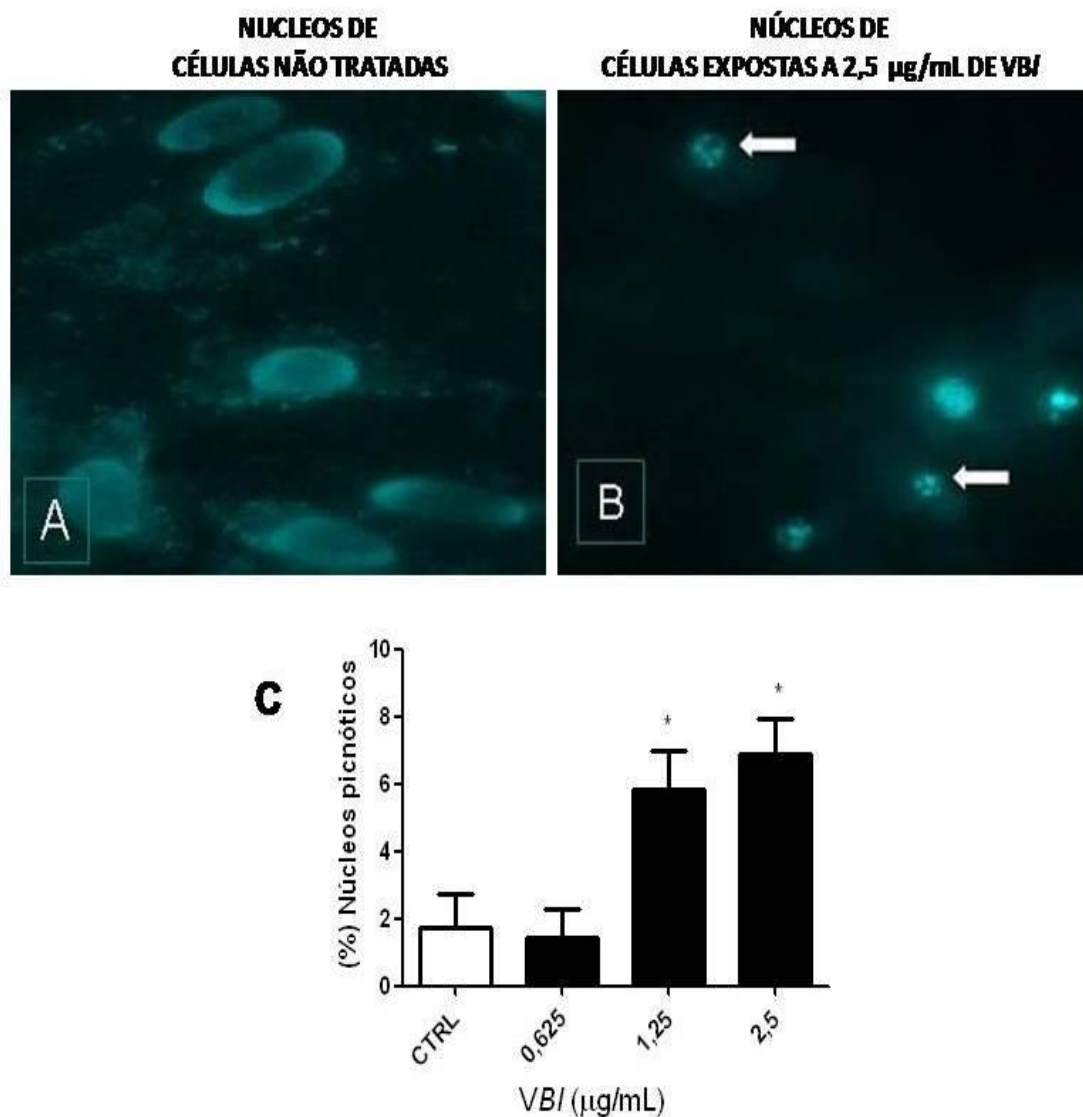


Figura 24: (A) mostra o controle e (B) os núcleos picnóticos (setas). Os núcleos normais não são fragmentados e são menos brilhantes do que os núcleos picnóticos. (C) Percentagem de núcleos picnóticos depois do tratamento com VBI (0,625, 1,25, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5.3.4 Ensaio para verificar o aumento do Ca^{2+} citosólico.

Uma vez que verificamos a ação citotóxica do veneno da *B. leucurus* e dada à participação crucial do íon Ca^{2+} na morte celular, realizamos experimentos com intuito de verificar se haviam alterações dos níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células MDCK após estímulo com *VBI* (0,625; 1,25; 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tais experimentos foram realizados com o marcador fluorescente de Ca^{2+} , Fura-2-AM. Quando o Fura-2-AM está ligado ao Ca^{2+} , a fluorescência em 340 nm aumenta, enquanto que a fluorescência em 380 nm diminui. Desta maneira, a razão 340/380 nm corresponde às variações de cálcio citosólico. A Figura 25 mostra as células MDCK antes e após a estimulação com 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *VBI* (A). A mudança na coloração indica o aumento nos níveis de cálcio citosólico. A Figura 25 B ilustra o registro típico do aumento de Ca^{2+} intracelular induzido pela adição de *VBI* 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os valores médios do aumento de Ca^{2+} citosólico, estão graficamente representados na Figura 25C, onde fica evidente que a concentração que apresentou um maior aumento do Ca^{2+} em relação ao basal (considerado normalizado para zero) foi 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *VBI*.

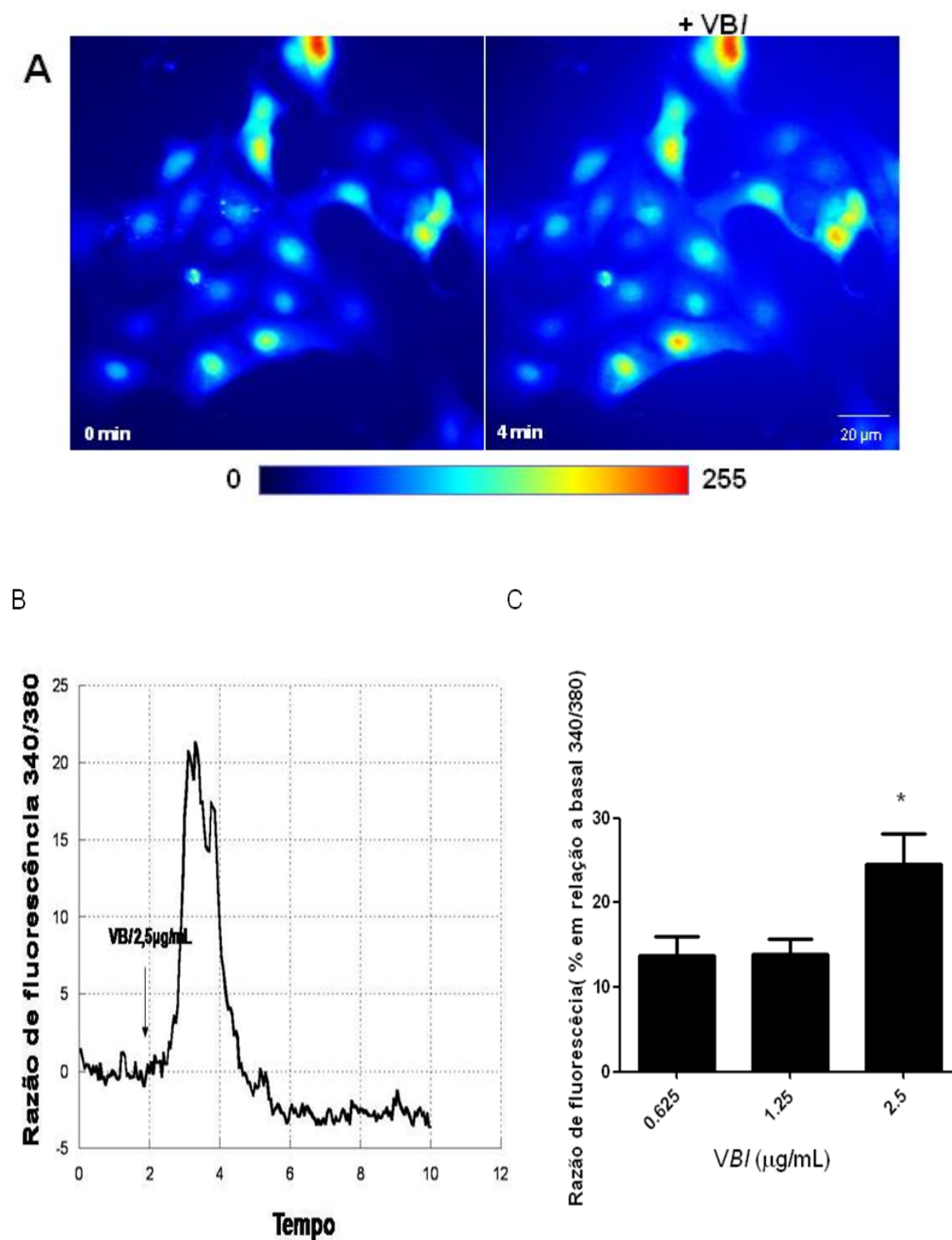


Figura 25: Mobilização de cálcio citosólico pelo veneno de *Bothrops leucurus*. As imagens mostram as células MDCK carregadas com FURA-2 antes e após a estimulação com 2,5 µg/mL do veneno de *Bothrops leucurus* (A). (B) Registro típico representativo do aumento de Ca^{2+}

citossólico induzido por 2,5 µg/mL do veneno de *Bothrops leucurus*. (C) Histograma representativo dos efeitos máximos do aumento de Ca^{2+} citossólico em relação ao basal (considerado normalizado para zero) nas células MDCK tratadas com diferentes concentrações de *VBI*. Todos os dados são expressos como média da razão de fluorescência normalizado \pm SD de pelo menos três experimentos diferentes. * $p < 0,05$ (teste Anova One-way, seguido de Tukey post-hoc). Barras de escala: 20 µM

5.3.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Nesse ensaio as células foram incubadas com tetrametilrodamina (TMRE), corante fluorescente específico que se liga diretamente as mitocôndrias de células viáveis. Em células que estejam em processo de apoptose, especificamente pela via intrínseca ou mitocondrial, a mitocôndria sofre despolarização do seu potencial transmembrânico, ocorrendo perda do TMRE acumulado na mitocôndria para o citosol, havendo uma emissão menor de fluorescência na organela.

A análise do potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com as células MDCK tratadas com o veneno da *B. leucurus* na concentração de 1.25µg/mL (CI_{50}). A figura 26 mostra as mitocôndrias antes e após o tratamento com *VBI*, mostrando a perda da definição e do foco das mitocôndrias indicada pelo o aumento da concentração do TMRE no citosol, após o seu extravasamento, conseqüente à despolarização mitocondrial (A). A figura 26B traz o traçado típico da queda do $\Delta\Psi_m$, mostrando a diminuição da intensidade de fluorescência após a adição do veneno. A figura 26C mostra que a adição de *VBI* (1,25 µg/mL) resultou em 57,6% de mitocôndrias que despolarizaram; 21,5% que hiperpolarizaram e 20,8% que não responderam.

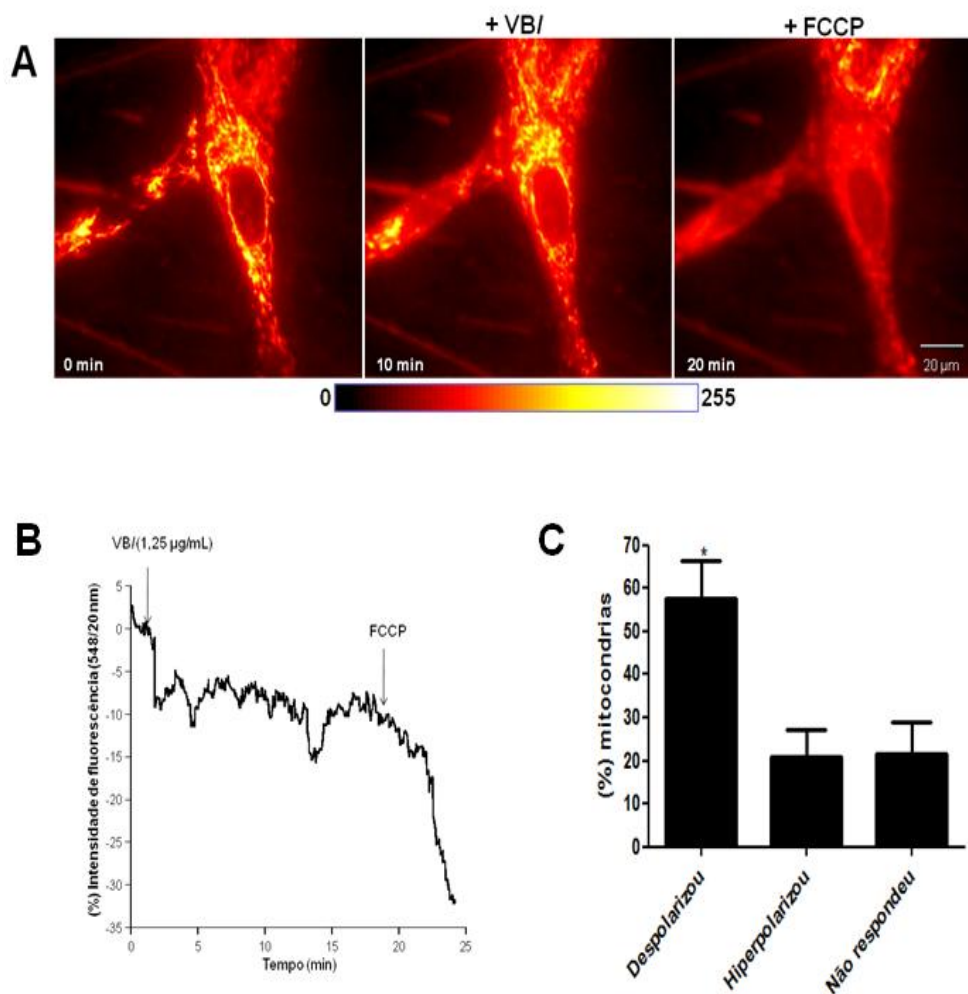


Figura 26: O veneno de *Bothrops leucurus* induz uma diminuição no $\Delta\Psi_m$. Células MDCK carregadas com TMRE 50 nM por 15 min, 37 °C, antes e após a adição do veneno *Bothrops leucurus* (A) As imagens foram obtidas usando uma câmera CCD com um intervalo de 6s entre elas (objetiva de 40X). VBI induziu uma diminuição no $\Delta\Psi_m$ indicado por uma liberação de TMRE da mitocôndria. (B) Mudanças no $\Delta\Psi_m$ resultante da estimulação de células com VBI (1,25 μ g /mL), seguido pelo FCCP (5 μ M), medido através de microscopia de fluorescência. (C) Histograma mostra o percentual de mitocôndrias que despolarizam, hiperpolarizam, ou não responderam após o tratamento com o veneno de *Bothrops leucurus*. Os dados são representativos de três experimentos independentes e expressam a média \pm SD * p <0,05 (teste Anova One-way, seguido de Tukey post-hoc). Barras de escala: 10 μ M.

5.3.6 Avaliação da expressão de genes envolvidos no processo de morte celular por apoptose.

Tendo em vista os resultados apontando para a ocorrência de apoptose nas menores concentrações, avaliamos se havia aumento da expressão de genes envolvidos na morte celular por apoptose. Selecionamos um gene da família da proteína Bcl-2, o gene Bax, o qual tem um papel importante na morte celular mediada pela via intrínseca da apoptose. Também avaliamos se havia ativação da via das caspases (caspase 3 e 8). Para tal finalidade as células MDCK foram tratadas com o veneno de *B. leucurus* (1,0; 1,25; 1,5 µg/mL). Os tratamentos das células foram acompanhados de controle negativo (células não tratadas) e controle positivo (doxorubicina 3,12 µg/mL). Verificamos que houve uma diminuição da expressão de Bax nas concentrações de 1,25 e 1,5 µg/mL (Figura 27A). A figura 27B mostra que houve aumento da expressão caspase 3 na menor concentração utilizada (1 µg/mL). Em seguida, avaliamos a expressão da caspase iniciadora 8, que representa a via dos receptores de morte (via extrínseca). Conforme mostrado na figura 27C a expressão da caspase 8 aumentou após o tratamento de células MDCK com o veneno de *B. leucurus* na dose de 1 µg/mL.

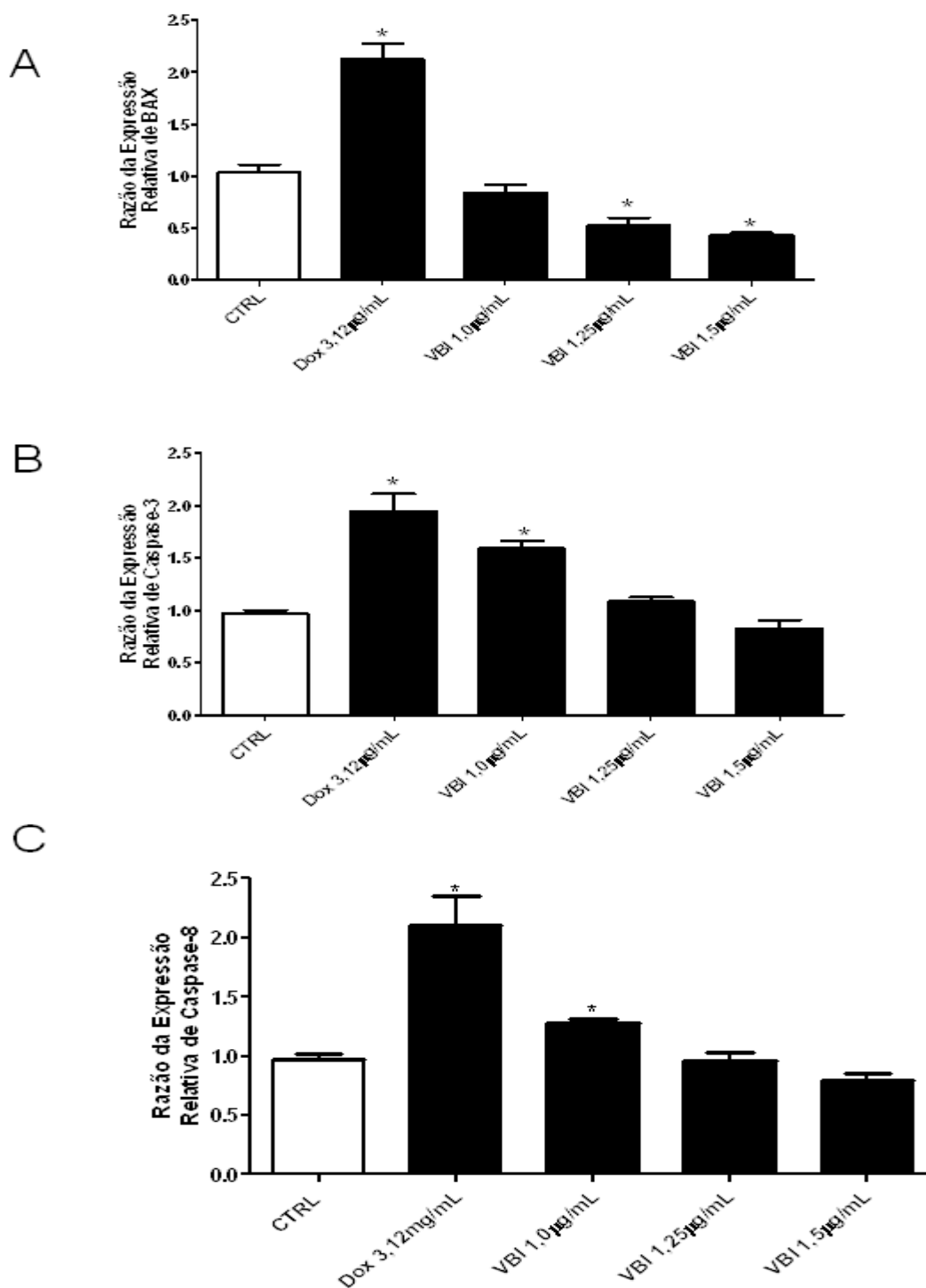


Figura 27: Avaliação da expressão de genes envolvidos na morte celular por apoptose. (A) Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* sobre a expressão relativa do gene pró-apoptótico Bax, (B) a expressão relativa do gene caspase 3, (C) expressão relativa do gene caspase 8 em células MDCK tratadas com VBI em diferentes concentrações (1, 1,25 ou 1,5 µg/mL) por 24 h. Doxorubicina (3,12 µg / mL) foi usada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes e expressam a média ± SD * p <0,05 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA-teste, seguido do teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre a toxicologia de *B. leucurus* quando comparado a outras espécies do gênero *Bothrops*. Em um estudo das atividades biológicas de venenos de serpentes da América do Sul, Sanchez *et al.*, (1992) mostraram que a letalidade, bem como a atividade coagulante, edematogênica, hemorrágica e indução de necrose foram semelhantes às de diversas outras espécies do gênero *Bothrops*.

O quadro clínico do envenenamento por *B. leucurus* tem perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops* (SANCHEZ *et al.*, 1992), ou seja, importantes efeitos locais como edema, necrose tecidual, atividade coagulante, hemorrágica, e insuficiência renal *in vivo*.

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos pelos quais o veneno de *B. leucurus* induz insuficiência renal aguda, utilizamos o sistema de perfusão de rim isolado, o qual permite avaliar os efeitos funcionais e morfológicos de uma substância sobre o rim, sem interferências de fatores sistêmicos.

A administração do veneno de *B. leucurus* (10µg/mL) no sistema de perfusão renal sugere uma ação nefrotóxica, pois verificamos redução na pressão de perfusão (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG). O percentual de transporte total de sódio (%TNA) e cloreto (%TCI) diminuíram. Não observamos alterações significativas no percentual de transporte total de potássio (%TK⁺) quando comparado ao controle.

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

Barbosa *et al.* (2002) testaram o veneno de *B. moojeni* e verificaram alterações semelhantes as observadas nesse estudo e nos outros supracitados, ou seja, redução na pressão de perfusão, na resistência vascular renal e nos transportes de sódio, cloreto e potássio, porém o veneno provocou uma diurese intensa que não foi observado nos outros estudos com venenos de *Bothrops*.

De acordo com Sitprija (2006), alterações hemodinâmicas causadas por citocinas pró-inflamatórias e mediadores vasoativos liberados pela ação de fosfolipases A₂ e metaloproteinases são fundamentais na fisiopatologia da insuficiência renal aguda após acidentes ofídicos. As alterações hemodinâmicas incluem hipotensão, aumento da resistência vascular renal, diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. Outros fatores que contribuem para IRA após acidentes ofídicos incluem hemorragia, hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, ativação de fatores do complemento e geração de radicais livres.

Sabe-se que no veneno botrópico existem várias enzimas com atividade proteolítica, dentre elas, as metaloproteinases, hialuronidases, fosfolipases A₂, estas podem atuar por ação direta sobre diferentes substratos, causando destruição de estruturas teciduais renais através da ativação/liberação de mediadores celulares e moleculares do processo inflamatório como prostaglandinas, citocinas e fatores do complemento (GUTIERREZ; RUCAVO, 2000).

As prostaglandinas (PGE₂, PGI₂) são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. Os níveis basais das prostaglandinas PGE₂, PGI₂ são importantes na manutenção do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular (RANG *et al.*, 2004).

Os venenos botrópicos apresentam vários peptídeos que intensificam à resposta a bradicinina, esses peptídeos já foram isolados do veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwidi* e *Bothrops jararacussu* (FERREIRA *et al.* 1970, 1992, 1998). A bradicinina participa fisiologicamente da regulação da pressão sanguínea e da função renal. Trata-se de uma potente substância vasodilatadora que atua através da ativação de receptores B₂, estimulando a liberação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio

(EDHF) (MOREAU *et al.*, 2005). Guimarães *et al.*, 1986 demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal em rim isolado de rato.

Em virtude do mencionado, podemos inferir que os peptídeos potenciadores da bradicinina, juntamente com a liberação dos mediadores inflamatórios com ação vasodilatadora, podem ter contribuído para a redução da resistência vascular renal e da pressão de perfusão observados nesse estudo.

Boer-Lima *et al.*, (1999) verificaram que após a injeção endovenosa do veneno da *Bothrops moojeni* em ratos, houve uma diminuição na taxa de filtração glomerular e disfunção tubular renal, incluindo insuficiência aguda da movimentação proximal de sódio. Os autores associaram esses efeitos a graves alterações morfológicas nas estruturas glomerulares e em células tubulares renais. O veneno da *B. leucurus* (10µg/ml) levou a uma diminuição significativa do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário, isso pode ser correlacionado com a diminuição da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, o que pode ter acarretado isquemia em algumas áreas dos rins, e dessa forma promover lesão renal de modo indireto e também por ação citotóxica direta do veneno nas células glomerulares e tubulares.

O veneno de *B. leucurus* na dose de 10µg/mL alterou a arquitetura renal, provocando focos de necrose tubular aguda, provavelmente pelo seu efeito nefrotóxico direto. Vários autores já descreveram a necrose tubular aguda como a lesão mais frequentemente encontrada em cortes histológicos renais após acidente ofídico envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* (CRUZ HÖFLING *et al.*, 2001; BURDMANN; VIEIRA JR; VIDAL, 2003).

Os fenômenos degenerativos observados por vacuolização das células de revestimento tubular são lesões reversíveis que refletem as fases iniciais da agressão tóxica do veneno. A retenção de íons é a causa dessa degeneração. A degeneração diminui a reabsorção tubular promovendo um aumento da excreção e redução do transporte de íons sódio, potássio e cloreto, assim como o aumento do *clearance* osmótico (BRAGA 2006).

A deposição de material proteináceo nos túbulos pode ser consequência da lesão epitelial tubular o que pode ter acarretado o acúmulo de proteínas liberadas no citoplasma das células lesadas, juntamente com resíduos citoplasmáticos.

Esses achados histológicos corroboram com os resultados encontrados com outras espécies do gênero *Bothrops* (HAVT 2001; BRAGA 2006, BURDMAN *et al.*, 1993).

Avaliamos o potencial citotóxico do veneno utilizando cultura de células tubulares renais (MDCK), trata-se de uma linhagem de células bem estabelecida, com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO; SUEUR; CRUZ-HÖFLING, 2002).

Inicialmente verificamos se o veneno da *B. leucurus* era capaz de induzir morte celular, para esse propósito, utilizamos o ensaio do MTT, essa técnica tem sido usada para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular (MOSMAN *et al.*, 1993). Os resultados mostram que o veneno apresentou elevada toxicidade para as células, reduzindo de forma significativa a viabilidade celular em todas as concentrações estudadas.

Vários autores concordam que a ação proteolítica dos venenos botrópicos tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ; LOMONTE, 1995), já foi demonstrado que o veneno de *Bothrops leucurus* apresenta uma intensa atividade proteolítica (PRIANTI *et al.*, 2003), podendo desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. Isso poderia também ocasionar a perda da função de transporte das células epiteliais renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos como sódio e cloreto observados nesse estudo.

O veneno também apresenta metaloproteinases que podem causar proteólise da matriz extracelular, interromper a adesão célula-matriz e induzir apoptose em linhagens de células endoteliais (BALDO *et al.*, 2008). A peçonha de *B. leucurus* contém LAAO que tem demonstrado efeito citotóxico em várias linhagens celulares. A citotoxicidade se apresenta como indução de apoptose e parece envolver a produção de peróxido de hidrogênio, o aumento na concentração do H₂O₂ pode induzir a ruptura de membranas, parada do crescimento celular e conseqüentemente morte celular (NAUMANN *et al.*, 2011).

O presente estudo também objetivou identificar qual o mecanismo de morte celular induzido pelo veneno da *B. leucurus*. Para tanto, foram utilizados os seguintes experimentos para avaliar se a morte celular ocorreu por indução de necrose ou apoptose: análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria

de fluxo, ensaio para verificar a presença de núcleos picnóticos, medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e expressão de genes pró apoptóticos.

Os experimentos para o estudo de indução de apoptose e de necrose foram realizados com Kit para detecção de morte celular que permite a marcação das células com anexinaV-FITC, que caracteriza a apoptose e iodeto de propídeo (PI) que caracteriza necrose. Nossos resultados sugerem que o principal tipo de morte induzido pelo veneno de *B. leucurus* foi por indução de necrose, no entanto em concentrações menores também verificamos apoptose. O fato de termos observado uma baixa frequência de apoptose, apesar da peçonha de *B. leucurus* conter proteínas capazes de induzir este processo de morte celular, podemos inferir que a ação potente da peçonha em produzir intensa necrose mascara qualquer efeito apoptótico.

Alguns estudos avaliaram a toxicidade de peçonhas botrópicas em cultura células MDCK e encontraram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Nascimento *et al.*, (2007) avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus* em células MDCK, e também verificaram redução da viabilidade celular, com diminuição da resistência transepitelial das monocamadas. Ao estudarem o mecanismo de morte celular, verificaram que a peçonha induziu morte predominantemente por necrose e possivelmente através da ação das espécies reativas de oxigênio. Collares buzato *et al.*, (2002), ao estudarem a citotoxicidade do veneno de *Bothrops moojeni*, também observaram que a peçonha induziu citotoxicidade nas células MDCK, com aumento da liberação de LDH, indicativo de morte celular por necrose, e comprometimento da interação célula-matriz.

Mora *et al.*, (2005), ao estudarem a citotoxicidade de PLA₂ miotóxicas sobre células linfoblastóides, verificaram que em concentrações elevadas da toxina, a morte ocorreu predominante por necrose, caracterizada por rompimento da membrana plasmática e inchaço mitocondrial. Em concentrações menores, a toxina induziu apoptose. Os autores concluíram que o tipo de resposta citotóxica predominante observada, ou seja, apoptose ou necrose, depende da concentração da toxina e, conseqüentemente, da extensão da lesão da membrana plasmática.

Estudos recentes têm demonstrado que o início do processo necrótico pode depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer seqüencialmente, onde numa concentração relativamente baixa do composto pode ocorrer colapso do potencial de membrana mitocondrial e posteriormente, usando uma maior concentração, ocorre rompimento de membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY, 2006).

O processo apoptótico inicia-se com o a retração celular que faz com que a célula perca o contato com as células vizinhas, no núcleo o DNA se condensa formando uma camada ao longo da membrana nuclear interna, também se verifica condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos e formação de vesículas sem perda de integridade da membrana. Uma das vias de sinalização que inicia esse processo é a via intrínseca, a qual é ativada a partir de estímulos gerados no interior da célula, que levam a ativação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e tBid). Em seguida, ocorre a ruptura do potencial transmembrânico mitocondrial, também conhecido como permeabilidade de transição, fazendo com que ocorra um influxo de íons e ao mesmo tempo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c para o citosol. Uma vez liberado, o citocromo c se liga a APAF-1 que facilita a ligação de dATP e a procaspase 9, formando o apoptossomo. O apoptossomo ativa as caspases 3 e 7 (caspases efetoras), que por sua vez vão clivar os substratos protéicos das células, resultando no processo apoptótico (HENGARTNER, 2000).

Um importante marcador de morte celular por apoptose é a clivagem da cromatina internucleossomal e fragmentação nuclear por DNases, que uma vez liberadas das mitocôndrias, são translocadas para o núcleo promovendo a fragmentação do DNA (SMAILI *et al.* , 2003). Com o intuito de verificar se o veneno de *B. leucurus* induz condensação e fragmentação nuclear, utilizamos a coloração com o Hoechst 33342. Esse fluoróforo é amplamente utilizado para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. No presente estudo verificamos que o veneno de *Bothrops leucurus* (1,25 e 2,5 µg/mL) induziu

apoptose após 24 h de tratamento, esta constatação é reforçada pela condensação da cromatina, caracterizando morfologicamente a morte celular do tipo apoptose.

Outra importante característica associada à morte celular por apoptose é o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, que pode ser consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio ou aumento de $[Ca^{2+}]_c$, é considerado um indicador de dano mitocondrial e é geralmente definido como um estágio inicial de apoptose (SMAILI *et al.*, 2003). Assim no presente trabalho, decidimos investigar se o veneno da *B. leucurus* na concentração de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50}) seria capaz de sensibilizar as mitocôndrias. Verificamos que nesta concentração o veneno promoveu despolarização mitocondrial, o que é um indício de morte celular por apoptose. A literatura relata que as peçonhas ofídicas causam apoptose em uma variedade de células (SUHR; KIM, 1996), e este efeito é mediado por componentes como LAAO (ANDE *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; NAUMANN *et al.*, 2011), metaloproteínases (GUTIERREZ *et al.*, 2000; BALDO *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 2007) desintegrinas (COMINETTI *et al.*, 2004; SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2005) e fosfolipases A_2 (HIGUCHI *et al.*, 2007; GUTIERREZ; OWNBY, 2003).

Para avaliarmos o papel da apoptose nos efeitos do veneno de *B. leucurus* em relação a sua citotoxicidade sobre as células MDCK, pesquisamos a expressão de genes envolvidos no processo de morte celular programada: os genes *Bax*, *a caspase 8* e *a caspase 3*. *Bax* é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Os membros desta família podem promover tanto a sobrevivência da célula, como é o caso de Bcl-2 e Bcl-XL, ou a morte celular, como é o caso de Bax e Bak. Foi demonstrado que a superexpressão de Bax pode acelerar a morte celular, em resposta a diversos estímulos apoptóticos (SMAILI *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstraram uma diminuição da expressão de Bax nas concentrações de 1,25 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de *VBI* após 24 horas de incubação nas células MDCK. Conforme já relatado, Bax participa da via intrínseca da apoptose, diante deste resultado podemos inferir que o efeito apoptótico nessas concentrações pode ser mediado por genes envolvidos na via extrínseca da apoptose.

Diversos estudos sugerem a ativação de caspases como um dos eventos essenciais na morte celular apoptótica. As caspases são enzimas da família das cisteína proteases que clivam seus substratos especificamente após resíduos de aspartato (HENGARTNER, 2000). A ativação das caspases de iniciação, como as caspases 2, 8, 9 e 10, por sinais pro-apoptóticos conduz a ativação proteolítica das caspases efetoras, como caspases 3, 6 e 7. Estas por sua vez, clivam proteínas vitais, iniciando e executando a fase de degradação celular (LING *et al.*, 2001).

Os resultados do presente trabalho demonstram que o veneno de *B. leucurus* nas menores concentrações é capaz de induzir apoptose e que há também uma ativação da via das caspases. Verificamos aumento de expressão da caspase 8 e da caspase 3 nas menores concentrações testadas. A caspase 8 é uma pró-enzima e sinais externos recebidos através de receptores de morte levam ao recrutamento e agregação de pró-caspases 8, que mutuamente se clivam e ativam-se em caspase 8. Estes estímulos ativam direta ou indiretamente a caspase 3, um homodímero também encontrado sob a forma de pró-caspase, que é clivada por caspases iniciadoras (HENGARTNER, 2000). Estes dados sugerem um possível envolvimento da caspase 8 como iniciadora dos efeitos apoptóticos do veneno de *B. leucurus* nas células MDCK. A ativação de caspase 8 pode dar início a clivagem e ativação de caspase 3 (efetora). Dessa forma o aumento da expressão da caspase 8 e a diminuição de Bax reforça que nesta concentração (1µg/mL) a morte induzida pelo veneno de *B. leucurus* nas células MDCK dá-se pela via extrínseca da apoptose.

Recentemente, Zhang e Cui (2007) demonstraram que a LAAO isolada de *Agkistrodon acutus* ativa a via de receptor de Fas, que ativa caspase 8. A caspase 8 por sua vez, cliva Bid, que, uma vez ativada, modifica Bax, formando poros na membrana mitocondrial, o que leva a liberação de citocromo c e outros sinais de morte; observaram também a ativação de caspase 9 após ativação de caspases 8 e 3.

Uma vez que verificamos a ação citotóxica do veneno de *B. leucurus* sobre as células MDCK, objetivamos investigar a participação do íon Ca^{2+} . O Ca^{2+} é o mais versátil dos mensageiros intracelulares, sabe-se que a homeostase do íon Ca^{2+} é de fundamental importância para a regulação das

diversas atividades fisiológicas da célula, bem como para a sobrevivência celular. Pesquisas recentes, mostram que a sobrecarga celular de Ca^{2+} , ou alteração da compartimentalização do Ca^{2+} intracelular, pode causar citotoxicidade ou acionar a morte celular por apoptose ou necrose (ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY, NICOTERA, 2003).

Existem vários mecanismos pelos quais um aumento na concentração intracelular de cálcio pode contribuir para a lesão celular. Altas concentrações de Ca^{2+} citosólico podem ativar diversas enzimas hidrolíticas, entre elas proteases, lipases e nucleases, que medeiam a toxicidade induzida pelo Ca^{2+} . Entre as proteases estão as *calpaínas*, cisteíno-proteases sintetizadas como pró-enzimas inativas e que são ativadas via proteólise estimulada pelo Ca^{2+} (DONG *et al*, 2006). Os efeitos que envolvem a ativação das calpaínas na morte celular incluem: (1) clivagem e inativação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (NAKAGAWA, YUAN, 2000) e (2) clivagem e ativação da proteína pró-apoptótica Bid, que tanto pode se ligar à membrana mitocondrial externa, induzindo sua permeabilização, (CHEN *et al.*, 2001) quanto pode sob sua forma truncada (tBid) ativar as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, que oligomerizam na membrana externa da mitocôndria formando poros suficientemente grandes para permitir o vazamento de proteínas intermembranas como o citocromo c, levando à ativação de caspases (SMAILI *et al.*, 2003).

Para que a concentração de Ca^{2+} retorne ao seu nível basal e seja mantido o gradiente de concentração através da membrana, existe a necessidade da remoção do excedente de Ca^{2+} após a estimulação celular. Os mecanismos de remoção do Ca^{2+} citosólico incluem efluxo do íon para o meio extracelular e captação pelo retículo endoplasmático e mitocôndria. O sequestro do excesso de Ca^{2+} pelas mitocôndrias pode prejudicar a síntese de ATP, reduzindo assim o ATP celular a níveis incompatíveis com a sobrevivência da célula, levando à morte celular por apoptose ou necrose, um resultado, que depende da extensão da lesão de membrana e do influxo de Ca^{2+} (SMAILI *et al.*, 2008).

Assim, dada a participação crucial do desequilíbrio da concentração intracelular de Ca^{2+} na morte celular, um dos objetivos do presente trabalho foi verificar o envolvimento do Ca^{2+} na citotoxicidade induzida pelo veneno da *B.*

leucurus. Nossos resultados evidenciaram o aumento de Ca^{2+} citosólico nas células MDCK após adição de VBI, esse efeito foi mais proeminente na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Esse aumento do $[Ca^{2+}]_c$ pode ser decorrente do influxo do íon a partir do meio extracelular, e isso ocorre quando há ruptura de membrana, e também ocorre pelo esvaziamento de estoques intracelulares, tais como retículo endoplasmático e mitocôndria.

Mora *et al.*, (2005) demonstraram o aumento de Ca^{2+}_c após estímulo por PLA_2 lys 49 homóloga do veneno da serpente *Bothrops asper* em células linfoblastóides. Os resultados mostraram que diferentes doses de Lys49 PLA_2 estão associadas com mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, e que o aumento cálcio citosólico foi mais proeminente nas maiores doses, onde também foi verificado um maior dano na membrana plasmática, demonstrando dessa forma o envolvimento do cálcio extracelular na morte celular induzida por esta toxina.

Através dos resultados obtidos, verificamos que o veneno de *B. leucurus* apresentou efeitos nefrotóxicos, evidenciados pelas alterações nos parâmetros renais avaliados no sistema de perfusão de rim isolado, como também pela toxicidade nas células tubulares renais MDCK. O veneno na dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ provocou intensas alterações na fisiologia renal, com alterações nos parâmetros vasculares, funcionais e no transporte de eletrólitos. O veneno de *B. leucurus* exerceu efeitos citotóxicos nas células MDCK, como indução de morte celular, despolarização no potencial de membrana mitocondrial, aumento de cálcio citosólico, fragmentação nuclear e aumento de expressão de caspases.

Estes achados podem constituir aspectos importantes do processo de nefrotoxicidade mediado pelo veneno de *B. leucurus*. A caracterização dos efeitos no rim isolado e nas células tubulares renais nos trouxe relevantes informações das alterações renais (morfológicas e funcionais) causadas pelo veneno.

Dessa forma nossos resultados sugerem que uma ação nefrotóxica direta do veneno pode estar relacionada com a patogênese renal do envenenamento por *B. leucurus*. Estudos futuros são necessários, na tentativa de investigar mais detalhadamente qual fração do veneno estaria mais envolvida na patofisiologia das lesões renais.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- ✓ O veneno da *Bothrops leucurus* (10 µg/mL) promoveu intensas alterações na fisiologia renal avaliados no sistema de perfusão de rim isolado de rato. Na análise histopatológica dos rins perfundidos foi observado deposição de material protéico nos túbulos renais e glomérulos e vacuolização das células tubulares.
- ✓ O veneno de *Bothrops leucurus* exerce um efeito citotóxico em cultura de células MDCK. O principal mecanismo de morte observado foi necrose de forma concentração dependente.
- ✓ O íon Ca^{2+} participa da sinalização da morte celular induzida pelo veneno de *B. leucurus*.
- ✓ Nas menores concentrações o veneno de *Bothrops leucurus* induziu morte por apoptose, que envolve aumento da expressão de caspases.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 924–927, 1998.
- ACOSTA, A.R.; SANCHEZ, E.E.; MARQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, A.M.; GIRÓN, M.E.; ESTRELLA, A.; GIL, A.; GUERRERO, B. Hemostatic properties of Venezuelan Bothrops snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. **Toxicon**, v. 56, p. 926-935, 2010.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G, A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J, GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C., FULY, A, L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, p. 542-550, 2008.
- ANDE, R. S. ; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.
- ANTUNES, C.T.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C.; SAIKI, M.; SANTORO, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 56, 1443–1458, 2010.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. de.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BALDO, C.; TANJONI, I.; LEON, I.R.; BATISTA, I.F.C.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54–65. 2008.

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

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

BARONE, J. M.; ALPONTI, R. F.; FREZZATTI, R.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on bothrops jararaca envenomation-induced acute kidney injury in mice. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 148-156, 2011.

BJARNSON, J. B.; FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac Ther**, v62, p325-372, 1994.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.N.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia.

BJARNSON, J. B.; FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac Ther**, v62, p325-372, 1994.

BOCHNER R.; STRUCHINER C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad Saúde Pública**, v. 19, p. 7-16. 2003.

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

BOER-LIMA, P.A. **Alterações histopatológicas e ultraestruturais renais causadas pelo veneno bruto de *Bothrops moojeni* (Caiçara) em ratos wistar**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

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

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

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

BUCARETCHI, F.; HERRERA, S. R. F.; HYSLOP, S.; BARACAT, E. C. E. & VIEIRA, R. J. Snakebites by *Bothrops* spp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 329-333, 2001.

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

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

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

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FESB Letters**, v. 583, p. 1736–1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003.

CASTRO, H.C., ZINGALI, R.B., ALBUQUERQUE, M.G., PUJOL-LUZ, M., RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.843-856, 2004.

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

CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 31, p.119-128, 2004.

CHEN, M.; HE, H.; ZHAN, S.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; GOTTLIEB, R.A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. **JBiol Chem**, v. 276, p. 24–28, 2001.

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

CINTRA, A.C.O.; MARAGONDI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**, v. 12, p. 57-64, 1993.

CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E.A.F., et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. 53, 330–340, 2009.

CLEMETSON, K.J.; LU, Q.; CLEMETSON, J.M., Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors, **Pathophysiol. Haemost. Thromb**, v. 34, p. 150–155, 2005.

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

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

COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; RAMOS, O.H.P.; FOX, J.W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Alternaginc, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 18247-18255, 2004.

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

DAMICO, D. C.S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A., JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONIA, S.; COLLARES-BUZATO, C B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, p. 678- 692, 2007.

DE CASTRO R.C.; LANDUCCI E.C.; TOYAMA M.H.; GIGLIO JR.; MARANGONI S.; DE NUCCI G.; ANTUNES E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-85, 2000. detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Calcium in cell injury and death. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 1, p. 405-434, 2006.

DU, XY e CLEMETSON, KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELONGSPERGER, C.M. Annexin V-affinity assay: A review on an

apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET, J.R.R.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool J Linn Soc**, v. 156, p. 617-640, 2009.

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

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

FERREIRA, S.H.; BARTELD, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n.13, p. 2583- 2595, 1970.

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

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

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

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. In: CARDOSO, L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 6, p. 72-86.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmac**, v20, p1549-1556, 1971.
GARCIA LM; LEWIS RJ. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature**, v. 19, p. 790-802, 2003.

GARCIA, LM.; LEWIS, RJ. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature**, v. 2, p. 790 – 802, 2003

GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F .; ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; ALCANTARA, T. M.; SOARES , A. M.; RODRIGUES , V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new

weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 24-32, 2009.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 267-271, 1998.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 120-135. 2007.

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

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

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

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

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.

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

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

HENGARTNER M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, p. 540-541, 846p.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of

two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319 - 328, 2007.

HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

HUTTON, R.A., WARRELL, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, v.7, p.176-189, 1993.

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 1–27, 1995.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v42, p827-840, 2003.

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

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

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

LING, Y.; ZHONG, Y.; PEREZ-SOLER, R. Disruption of cell adhesion and caspase-mediated proteolysis of beta- and gamma-catenins and APC protein in paclitaxel-induced apoptosis. **Mol. Pharmacol**, v. 59, p. 593-603, 2001.

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

LIRA-DA-SILVA, R.M. *Bothrops leucurus* wagler, 1824 (serpentes; viperidae): natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 56-65, 2009.

LIRA-DA-SILVA, R.M. **Estudo farmacológico do veneno de Bothrops leucurus (Serpentes; Viperidae)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 203p. 2001.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S., FERREIRA, R.N.; ALMEIDA, A.P.; SANCHEZ, E.F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 565-575. 2007.

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

MASON, J.; BECK, F.; DORGE, A.; RICK, K.; THURAU, K. Intracellular electrolyte composition of renal tubule following renal ischemia. **Kidney Int**, v. 20, p. 61-70, 1981.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v1477, p146-156, 2000. mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 31, p.119-128, 2004.

MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.

MELLO, S.M.; LINARDI, A.; RENNÓ, A.L.; TARSITANO, C.A.B.; PEREIRA, E.M.; HYSLOP, S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, v. 55, p. 470-480, 2010.

MISE, Y.F.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; BARBOSA, A.; LIRA-DA-SILVA, R.M. Skeletal muscle damage caused by *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae) venom. Poster. In: **J Venom Anim Toxins incl. Trop Dis**, v.9, n.2, p.448, 2003.

MOCHIZUKI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA., R. C.; OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. B.; TAVASSI, A. M. C.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochemical pharmacology**, v. 72, p. 377– 384, 2006.

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

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

MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 47, p. 75–86, 2005.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; LOMONTE, B.; PRUGATO, E.; TEIXEIRA, C. A phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: Expression of cyclooxygenase-2 and PGE2 biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, p. 288–296, 2011.

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

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

MOUREAU, M.E.; GARBACHI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kalikrein- Kinin system: Current and future pharmacological targets. **Journarl of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol**, v. 150, p. 887–94, 2000.

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

NAUMANN, G.B.; SILVA, L.F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C.M.F.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F.F.; EBLE, J.A.; SANCHEZ, E.F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011.

NEVALAINEN, T. J. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. **Clin. Chem**, v. 39, p. 2453- 2459,1993.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; LIRA-DA-SILVA, R.M., SILVA-LUCCA, R.M.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 57–63, 2011.

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

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 552-565 2003.

OWNBY, C.L.; SELIESTRE-DE-ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P., FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411–445, 1999.

PAIVA, R.M.A.; FIGUEIREDO, R. F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; BIANCHI, M. L.; P; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; PIETRO, R. C. L. R.; MARTINS, C. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 7, p. 1-7, 2011.

PÉREZ, D.A.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, M. S.; TEIBLER, P.; RUÍZ, R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos organos de ratones. **APPTLA**, v. 46, p. 97-102, 1996.

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

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-9, 2001.

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

PONCE-SOTO L.A.; BONFIN, V.L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARAGONDI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparations. **Protein J**, v. 25, p. 147-55, 2006.

PORTO, M., TEIXEIRA, D.M. *Bothrops leucurus* (White-tailed lancehead). **Herpetological Review**, v.26, p.156, 1995.

PRIANTI-JR, A.C.G.; RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; LIRA-DA SILVA,R.M.; PRADO-FRANCESCHI,J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; LEITE, G.B.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v.41, p.595-603, 2003.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v44, p1-17, 2004.

RANA, A.; SATHIANARA, P.; LIEBERTHAL, W. Role of apoptosis on renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. **Apoptosis**, v. 6, p. 83-102, 2001.

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

REUTELONGSPERGER, C.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.843-856, 2004.

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

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

ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U 937 (a human monocytic cell line). **Pharmacological Reserch**, v. 53, p. 293 – 302 2006.

SANCHEZ, E. F.; GABRIEL, L. M.; GONTIJO , S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; EVANGELISTA, K. S.; EBLE, J. A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 468. p. 193-204, 2007.

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

SANCHEZ, E.F.; GABRIEL, L.M.; GONTIJO, S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 468, p. 193-204. 2007.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D.L.; FULLY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor pospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 58, p. 908-17, 2008.

SAVEJIC, T .; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. x, p. 1-19, 2011.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrinlike protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 38: 1505-1511, 2005.

SINAN, Sistema de informações de agravos de notificação. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383>.

Acesso em 20 março de 2011.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Brasil, 2009. Rio de Janeiro: SINITOX, Centro de Informação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em 05 de maio de 2011.

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

SKULACHEV, V.P. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 959, p. 214–237, 2002.

SMAILI, S.S.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 183-190, 2003.

SMAILI, S.S.; HIRATA, H.; URESHINO, R.; MONTEFORTE, P.T.; MORALES, A.P.; MULDER, M.I.; TERASHIMA, J.Y.; OSEKI, K.; ROSENSTOCK, T.R.; LOPES, G.S.; BINCOLETTO, C. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. **Ann Acad Brás Cienc**, v. 81, 2008.

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

STRAUSS, H.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Detection of Apoptotic Tumor Response In Vivo After a Single Dose of Chemotherapy with ^{99m}Tc-Annexin V. **J Nucl Med**, v.45, n.3, p.526, 2004.

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

TEIXEIRA, S.S. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai***. Dissertação de mestrado em toxicologia. Universidade de São Paulo, 2009.

TICLI, F.K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L- aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação de sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida**. Tese de doutorado em toxicologia. Universidade de São Paulo, 2006.

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

TORRES, A. F. C.; COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO

NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795–804, 2010.

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

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Plenum Press**, p37-62, 1996.

VARGAS, F. F. R.; SOTO, L. A. P.; SOUZA, D. M.; MARAGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 66–74, 2010.

VIEIRA, J. M. Jr. Atualização em insuficiência renal: expressão gênica na insuficiência renal aguda (IRA). **Jornal Bras Nefrol**, v23, n4, p230-233, 2001.
WALSER, M.; DAVIDSON, D.G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkalistable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1955.

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

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

WILLINGER, C.C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W. In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. **Kidney Int.** v. 47, p. 518- 528, 1995.

WÜSTER, W.; SALOMAO, M.G.; THORPE, R.S.; PUORTO, G.; FURTADO, M.F.D, HOGE, S.A, Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: Thorpe, R.S., W. Wüster & A. Malhotra (eds.), **Venomous Snakes. Ecology, Evolution and Snakebite, Symp. zool. Soc. Lond**, p 99-113. 1997.

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

ZHANG, L.; WU, W.T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Nat. Prod. Res.** v. 22, p. 554 –563, 2008.