



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

**MIKAEL ALMEIDA LIMA**

**POTENCIAL NEFROPROTETOR DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO**  
**NA INJÚRIA RENAL AGUDA INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE**  
*Bothrops jararacussu*

**FORTALEZA-CE**

**2020**

**MIKAEL ALMEIDA LIMA**

**POTENCIAL NEFROPROTETOR DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO  
NA INJÚRIA RENAL AGUDA INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE**

*Bothrops jararacussu*

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

FORTALEZA-CE

2020

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

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

---

- L699p Lima, Mikael Almeida.  
Potencial nefroprotetor dos ácidos ursólico e oleanólico na injúria renal aguda induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* / Mikael Almeida Lima. – 2020.  
147 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
1. Injúria renal aguda. 2. *Bothrops jararacussu*. 3. Ácidos ursólico e oleanólico. 4. Expressão gênica. 5. Triterpenos. I. Título.

CDD 615.1

---

**MIKAEL ALMEIDA LIMA**

**POTENCIAL NEFROPROTETOR DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO  
NA INJÚRIA RENAL AGUDA INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE**

*Bothrops jararacussu*

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Aprovada em: 20/02/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Maria Costa Martins (Titular)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi (Titular)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio (Suplente)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## RESUMO

O acidente ofídico é considerado um importante problema de saúde pública, principalmente em países tropicais e subtropicais. As consequências desses acidentes resultam em sequelas como falência renal. A Injúria Renal Aguda (IRA) é uma complicação grave dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, ocasionando danos na estrutura renal, consequente da rhabdomiólise oriunda do acidente ofídico, alterações hemodinâmicas, reações imunológicas e nefrotoxicidade direta. Nesse contexto, diversas estratégias são estudadas no sentido de prevenir a ocorrência de IRA, como por exemplo o uso substâncias naturais como parte do tratamento. Dentre essas substâncias se destacam os triterpenos, metabólitos secundários bioativos de plantas com grandes variedades químicas estruturais e funcionais. O ácido oleanólico e o ácido ursólico fazem parte desse grupo, e possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e nefroprotetoras. O presente estudo buscou investigar os efeitos dos triterpenos na IRA induzida por veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos. Primeiramente, fez-se a determinação da DL<sub>50</sub> intramuscular do veneno, no qual avaliou-se 4 doses do veneno (10, 15, 20 e 40mg/Kg) por meio do método probito, regressão que examina a relação entre duas variáveis (dose do veneno X número de óbitos). O resultado foi a dose de 14,72 mg/Kg. Para o segundo experimento, que consistiu no experimento de atividade *in vivo* do veneno, optou-se por utilizar 80% da DL<sub>50</sub> (11,77mg/Kg). Dividiu-se os camundongos em 10 grupos (n=6-8): um grupo controle e um grupo veneno em cada tempo analisado, sendo os tempos 6, 12, 24, 72 e 96h de envenenamento. Após o término dos tempos analisados os animais foram eutanasiados. O grupo 6h e 12h apresentaram resultados bioquímicos sugestivos de IRA caracterizada por azotemia renal, redução da taxa de filtração glomerular e proteinúria. Selecionou-se o tempo 12h para realização da terceira etapa, que consistiu no experimento tratamento com os ácidos ursólico e oleanólico. No experimento tratamento dividimos os camundongos em 6 grupos (n=6-8): controle, triterpenos, veneno, e veneno + triterpenos nas doses 25, 50 e 75 mg/Kg. Os animais receberam aplicações de veneno ou salina no tempo 0, seguido do tratamento com salina ou triterpenos nas 3ª e 9ª hora, sendo eutanasiados após 12h de envenenamento. Nos resultados encontrados o grupo veneno + triterpenos na dose 75mg/Kg apresentou valores sugestivos de atividade nefroprotetora, ocorrendo significância, em relação ao grupo veneno, nos parâmetros creatinina plasmática (VT75: 0,24 ± 0,03 mg/dL; V: 0,32 ± 0,04 mg/dL), ureia plasmática (VT75: 106,5 ± 36,73 mg/dL; V: 201,3 ± 25,22 mg/dL), creatina quinase plasmática (VT75: 11434,0 ± 3639,0 U/L; V: 17737,0 ± 4245,0 U/L), gama-GT urinária (VT75: 2,07 ± 0,58 U/mg de creat.; V: 4,09 ± 1,11 U/mg de creat.) e MDA renal (VT75: 1698,0 ± 196,0 nmol/mg de tecido; V: 2259,0 ± 636,6 nmol/mg de tecido). Houve também diferença significativa do grupo veneno em relação ao grupo controle na expressão gênica de SOD1s (V: 0,62 ± 0,16; CTRL: 1,01 ± 0,17). O presente estudo conseguiu reproduzir o modelo de IRA induzido por acidente botrópico. A dose de 80% da DL<sub>50</sub> via intramuscular foi capaz de causar lesão renal e sistêmica caracterizada por diminuição da função renal e indução de processo oxidativo tempo dependente. O tratamento feito com triterpenos conseguiu reduzir os efeitos da IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*, sendo necessário a análise de outros biomarcadores além da SOD1s para comprovar a proteção viabilizada por ação antioxidante dos ácidos ursólico e oleanólicos.

**Palavras-chaves:** injúria renal aguda, *Bothrops jararacussu*, triterpenos, expressão gênica

## ABSTRACT

### THE POTENTIAL NEPHROPROTECTIVE OF URSOLIC AND OLEANOLIC ACIDS IN THE ACUTE KIDNEY INJURY INDUCED BY THE VENOM OF *Bothrops jararacussu*

The snakebite accident is considered a major public health problem, especially in tropical and subtropical countries. The consequences of these accidents result in sequelae like renal failure. Acute Kidney Injury (AKI) is a serious complication of *Bothrops* snakebite accidents, causing damage to the renal structure resulting from rhabdomyolysis, hemodynamic changes, immunological reactions and direct nephrotoxicity. Several strategies are studied in order to prevent AKI, such as the use of natural substances as part of the treatment. Among these substances, triterpenes are characterized by being bioactive secondary metabolites of plants with structural and functional varieties. Oleanolic acid and ursolic acid are characterized by their antioxidant and anti-inflammatory properties with nephroprotective effect. The present study aimed to investigate the effects of triterpenes on *Bothrops jararacussu* venom-induced AKI. First, we made the determination of intramuscular venom LD<sub>50</sub> (10, 15, 20 and 40mg/Kg) by means of the probitus method, a regression that examines the relationship between two variables (venom dose X number of deaths). The result was a dose of 14.72 mg/kg. For the second experiment, the venom activity *in vivo* experiment, we chose to use 80% of the LD<sub>50</sub> (11.77mg/Kg), to determine the best AKI timing. We divided mice in 10 groups (n = 6-8): a control group and a venom group at each time analyzed, 6, 12, 24, 72 and 96h of envenoming. Finished the analyzed times the animals were euthanized. The 6h and 12h group showed results compatible with AKI characterized by renal azotemia, reduced glomerular filtration rate and proteinuria. The 12h time was selected for the third stage, the treatment experiment with ursolic and oleanolic acids. In the treatment experiment, we divided mice into 6 groups (n = 6-8): control, triterpenes, venom, and venom + triterpenes at doses 25, 50 and 75 mg / kg. The animals received venom or saline at time 0, followed by treatment with saline or triterpenes in the 3rd and 9th hours, and were euthanized after 12 hours of envenoming. In the results found, the venom + triterpenes group at a dose of 75mg/Kg showed values suggestive of nephroprotective activity, with significance, in relation to the venom group, in the plasma creatinine (VT75: 0,24 ± 0,03 mg/dL; V: 0,32 ± 0,04 mg/dL), plasma urea (VT75: 106,5 ± 36,73 mg/dL; V: 201,3 ± 25,22 mg/dL), plasma creatine kinase (VT75: 11434,0 ± 3639,0 U/L; V: 17737,0 ± 4245,0 U/L), urinary gamma-GT (VT75: 2,07 ± 0,58 U/mg de creat.; V: 4,09 ± 1,11 U/mg de creat.), renal TBARS (VT75: 1698,0 ± 196,0 nmol/mg of tissue; V: 2259,0 ± 636,6 nmol/mg of tissue). There was also a significant difference between the venom group and the control group in the gene expression of SOD1s (V: 0.62 ± 0.16; CTRL: 1.01 ± 0.17). The present study managed to reproduce the AKI model induced by a botropic envenoming. The 80% LD<sub>50</sub> dose intramuscularly was able to cause renal and systemic damage characterized by loss of renal function and induction of oxidative process time dependent. The treatment with triterpenes managed to reduce the effects of AKI induced by *B. jararacussu* venom, being necessary other biomarkers analysis, besides SOD1s to prove the possible protection made by the antioxidant action of ursolic and oleanolic acids.

**Keywords:** acute renal injury, *Bothrops jararacussu*, triterpenes, gene expression

## AGRADECIMENTOS

Como o autor Joseph Delaney relata em sua obra “*The Spook's Curse*”:

“Não acredito no Deus de que nos falam na igreja. Não acredito em um velho de barbas brancas. Contudo, há alguém observando o que fazemos e, se levarmos uma vida correta, ele estará do nosso lado e nos dará força nas horas de necessidade.”

Dessa forma, agradeço a essa força maior que nos rege e protege nos momentos mais difíceis de nossas vidas, dando coragem para seguirmos nosso destino da melhor forma.

Aos **camundongos** cedidos para a realização deste trabalho (*in memoriam*). Trabalhos como este requerem o uso de animais de laboratório, que muitas vezes são confundidos com animais descartáveis. Nenhum animal deve ser tratado com inferioridade ou desprezo.

Aos meus pais, **Maria Izaudira Almeida Lima** e **José Reinaldo de Lima**, por terem construído a pessoa que sou hoje, não estaria aqui se não tivesse vocês. Muito obrigado pelo carinho sempre.

Ao meu noivo **Yago Dantas da Mata**, meu parceiro de vida nessa jornada terrena. Obrigado pelo carinho sempre e por entender que a distância entre nós faz parte do nosso crescimento profissional, logo estaremos juntos de novo. Amo muito você.

Aos meus irmãos, **Gabriel Almeida Lima** e **Claúdio Henrique Silva Lima**. Obrigado por todos os momentos que tivemos. Sempre devemos nos entender e nos respeitarmos. Amo vocês.

A todos os familiares que me apoiaram, sempre com palavras de carinho e suporte. Meu muito obrigado.

Ao meu orientador Prof. **Alexandre Havt Bindá**, por todos os ensinamentos compartilhados, por ter aceitado me orientar e por acreditar em meu potencial. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os membros do laboratório LTM que participaram e ajudaram nessa jornada: **João Victor, Rafaela, Advane, Klingem, Helena Késia**. Agradecimento em especial a **Cleber, Dayara e Thiago**, este trabalho não teria sido concluído sem a grande ajuda de vocês três. Contem comigo sempre.

Aos meus queridos amigos colombianos **Karen Angel e Leonel Ives**. Muchas gracias por todo.

A **Roberta Izzo, Darliane Cristina e Mariana Portugal** por serem minhas irmãs de coração. Sou muito grato pela presença de vocês em minha vida. Muito obrigado por tudo. Amo vocês.

Aos amigos que me acompanham e sempre me dão muito carinho: **Camila Batista, Daniana Félix, Guilherme Moniz, Raphael Magno, Talles Cunha, Israel Batista, Youri Miranda, Brenna Barbosa, Camilo Aragão, Bruna Swell e Maria Queiroz**. Muito obrigado.

A **Eudmar Marcolino Junior** por tudo que me ensinou nessa vida, obrigado pelo carinho de irmão e por ser a ponte para a realização desse sonho. Amo você.

A **Fernanda Santos e Muriel Pimentel** por todos os ensinamentos compartilhados. Se hoje cheguei aqui foi porque tive a ajuda de vocês. Muito obrigado.

A **Julia Palumbo** e todos da Clínica Veterinária Monsenhor Bruno obrigado pelo carinho comigo sempre. Obrigado Dra. Julia pela amizade e mentoria na clínica de pequenos animais. Amo você.

A **Higina Maria** por ser uma madrinha presente, dando auxílio sempre que precisei, muito obrigado. Amo você.

A **Greda Izzo** por ter aparecido de surpresa em minha vida e ter me ajudado quando mais precisei. Obrigado pelo carinho sempre.

A Prof.<sup>a</sup> **Karuza Alves** obrigado pelo auxílio na análise histopatológica.

A equipe do Laboratório LACT **Alisson, Ederson e Duaran** obrigado pelo auxílio nas análises bioquímicas.



A equipe do Laboratório NEMPI **Júnior, Flávia e Josy** obrigado pelo auxílio na elaboração das lâminas histológicas.

A equipe do Laboratório LABIOTEC **Luciana e Charliene**. Muito obrigado.

As mulheres do Laboratório LDI **Herlice, Samily, Carol, Ivna e Natália**, obrigado pelo carinho sempre.

A Prof.<sup>a</sup> **Lucilene Santos** por ter nos fornecido o veneno de *Bothrops jararacussu*, essencial para esta pesquisa. Muito obrigado.

Ao Prof. **James Almada** por nos enviar os triterpenos, essencial para esta pesquisa. Muito obrigado.

Aos Professores que participaram da minha banca de Qualificação **Daniel, Arlandia e Lucília**. Muito obrigado pelas sugestões.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, em especial as servidoras públicas **Laura Alves e Milena Jales** por todo o suporte dado em relação às exigências do programa. Muito Obrigado

Ao incentivo financeiro da **FUNCAP**.

A todos que em algum momento da minha vida me deram carinho, suporte e palavras de amor. Meus sinceros agradecimentos.

*“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos,  
muito mais do que as nossas qualidades.”*

Alvo Dumbledore (J.K. Rowling)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l	Microlitro
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
ANOVA	Análise de variância
AO	Ácido oleanólico
Asp49	Fosfolipase A <sub>2</sub> tipo Asp49
AU	Ácido ursólico
BjussuMP-I	Metaloproteinase isolada de <i>B. jararacussu</i>
BOJU-I	Fosfolipase A <sub>2</sub> tipo Lys49 básica
BOJU-II	Fosfolipase A <sub>2</sub> tipo Asp49 básica
BOJU-III	Fosfolipase A <sub>2</sub> tipo Asp49 ácida
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BthTX-II	Bothropstoxina-II
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CE	Ceará
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CID	Coagulação intravascular disseminada
CK	Creatina quinase
CICr	<i>Clearance</i> de creatinina
cm	Centímetro
Co <sup>++</sup>	Cobalto
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRE	Creatinina
CrP	Concentração plasmática de creatinina
CrU	Concentração urinária de creatinina
RDW	Distribuição de células vermelhas
dL	Decilitro
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dr.(a)	Doutor(a)
DRC	Doença renal crônica
DSS	Dahl sensíveis ao sal
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
ECA	Enzima de conversão da angiotensina
ECD	Glu-Cis-Asp
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EST	Marcador de sequência expressa
et al.	e colaboradores

FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
fL	Fentolitro
g	Gramma
Gama GT	Gama glutamil-transferase
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GsR	Glutationa redutase
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>3</sub> C	Grupo metil
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
He	Hemácia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ht	Hematócrito
HTAB	Brometo de hexadecitrimetilamônio
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
IL1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL6	Interleucina 6
IM	Via intramuscular
IP	Via intraperitoneal
IRA	Injúria Renal Aguda
K <sup>+</sup>	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
KIM-1	Molécula de injúria renal-1
L	Litro
LAAO	L-aminoacido oxidase
Log	Logaritmo
LTM	Laboratório de Toxinologia Molecular
Lys49	Fosfolipase A <sub>2</sub> tipo Lys49
M	Metro
M	Mega
MCP-1	Proteína 1 quimioatrativa de monócitos
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligrama
Mg <sup>++</sup>	Magnésio
Min	Minuto
ml	Mililitro

MMP-2	Metaloproteinase-2 da matriz
MP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
N	Número de amostras
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase neutrofilica
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NQO-1	NADPH Quinona Oxidoreductase 1
NTA	Necrose tubular aguda
°C	Grau Celsius
P	Probabilidade de significância
PBS	Tampão fosfato salino
Pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RGD	Arg-Gly-Asp
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Rpm	Rotação por minuto
SE	Sergipe
SIM/SUS	Sistema de Informações Hospitalares da Sistema Único de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINITOX/FI	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas da Fundação
OCRUZ/MS	Oswaldo Cruz
SOD1s	Superóxido Dismutase 1
sn-2	Substituição nucleofílica bimolecular
Sp	Serino-proteinase
SP	São Paulo
T	Teste t de Student
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloro acético
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFS	Universidade Federal de Sergipe

UMPO	Unidade de MPO
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UR	Ureia
EUA	Estados Unidos da América
VCM	Volume corpuscular médio
VU	Volume de urina
vs	<i>Versus</i>
YWHAZ	Proteína de ativação Tirosina 3-monooxigenase/5- Triptofano
Zn <sup>++</sup>	Zinco

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Distribuição geográfica do acidente ofídico no Brasil, no período 2007-2012.	24
<b>FIGURA 2</b>	Sazonalidade do acidente ofídico no Brasil, no período 2001-2012.	24
<b>FIGURA 3</b>	<i>Bothrops jararacussu</i> LACERDA, 1884.	27
<b>FIGURA 4</b>	(A) Distribuição de ESTs do veneno de <i>B. jararacussu</i> de acordo com seus produtos de cDNA. (B) Distribuição dos transcritos básicos/ácidos de Asp49 e Lys49 PLA <sub>2</sub> s.	32
<b>FIGURA 5</b>	Fontes naturais de ácidos triterpenóicos.	37
<b>FIGURA 6</b>	Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico.	38
<b>FIGURA 7</b>	Desenho experimental, atividade <i>in vivo</i>	46
<b>FIGURA 8</b>	Desenho experimental, tratamento com triterpenos	49
<b>FIGURA 9</b>	Determinação da letalidade mediana em probito de veneno de <i>B. jararacussu</i> por via intramuscular em camundongos	56
<b>FIGURA 10</b>	Determinação da DL <sub>50</sub> em porcentagem da peçonha de <i>B. jararacussu</i> por via intramuscular em camundongos.	57
<b>FIGURA 11</b>	Avaliação do peso renal no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h	58
<b>FIGURA 12</b>	Fluxo urinário no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	59
<b>FIGURA 13</b>	Avaliação do consumo de água no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	60
<b>FIGURA 14</b>	Comparação da perda de massa corpórea no envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	61
<b>FIGURA 15</b>	Análise dos níveis plasmáticos de creatinina no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	62
<b>FIGURA 16</b>	Identificação dos níveis plasmáticos de ureia no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	63
<b>FIGURA 17</b>	Determinação dos níveis plasmáticos de creatina quinase no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	64

<b>FIGURA 18</b>	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular na taxa de filtração glomerular em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.	65
<b>FIGURA 19</b>	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular nas concentrações urinárias de Gama glutamil transferase (Gama-GT) em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.	66
<b>FIGURA 20</b>	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular nas concentrações de albumina urinária em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.	67
<b>FIGURA 21</b>	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular nas concentrações de proteína urinária em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.	68
<b>FIGURA 22</b>	Avaliação da contagem de hemácias no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	69
<b>FIGURA 23</b>	Avaliação dos níveis de hemoglobina no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	70
<b>FIGURA 24</b>	Avaliação do hematócrito no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	71
<b>FIGURA 25</b>	Avaliação do VCM e HCM no envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	72
<b>FIGURA 26</b>	Avaliação do CHCM e RDW no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	73
<b>FIGURA 27</b>	Avaliação dos níveis de MDA no envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	74
<b>FIGURA 28</b>	Avaliação dos níveis de GSH no envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	75
<b>FIGURA 29</b>	Avaliação dos níveis de MPO no envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	76
<b>FIGURA 30</b>	Alterações histopatológicas do tecido renal em camundongos após envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	77
<b>FIGURA 31</b>	Alterações histopatológicas do tecido muscular em camundongos após envenenamento por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.	79



<b>FIGURA 32</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico no peso renal após indução de IRA por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	81
<b>FIGURA 33</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico no fluxo urinário após indução de IRA por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	82
<b>FIGURA 34</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico no consumo de água após indução de IRA por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	83
<b>FIGURA 35</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na perda de peso após indução de IRA por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	84
<b>FIGURA 36</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de creatinina na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	85
<b>FIGURA 37</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de ureia na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	86
<b>FIGURA 38</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de creatina quinase na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	87
<b>FIGURA 39</b>	Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na Taxa de Filtração Glomerular na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	88
<b>FIGURA 40</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico nas concentrações urinárias de Gama glutamil transferase (Gama-GT) na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	89
<b>FIGURA 41</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico nas concentrações de proteína urinária na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	90
<b>FIGURA 42</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de malondialdeído (MDA) na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	91
<b>FIGURA 43</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de glutathiona reduzida (GSH) na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	92
<b>FIGURA 44</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de mieloperoxidase (MPO) na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	93
<b>FIGURA 45</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de KIM-1 na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	94
<b>FIGURA 46</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de NQO-1 na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	95

<b>FIGURA 47</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de TIMP-2 na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	96
<b>FIGURA 48</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de SOD1s na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	97
<b>FIGURA 49</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de IL-18 na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	98
<b>FIGURA 50</b>	Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de Clusterina na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	99

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados (S: senso e AS: antisenso; gene de referência: GAPDH; YWHAZ).	55
<b>TABELA 2</b>	Parâmetros fisiológicos e bioquímicos no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 06h, 12h, 24h, 72h e 96h.	144
<b>TABELA 3</b>	Valores eritrocitários, atividade de MDA, GSH e MPO no envenenamento induzido por peçonha de <i>B. jararacussu</i> via intramuscular em camundongos, nos tempos de 06h, 12h, 24h, 72h e 96h.	145
<b>TABELA 4</b>	Parâmetros fisiológicos e bioquímicos em camundongos após tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	146
<b>TABELA 5</b>	Valores da atividade de MDA, GSH, MPO e expressão gênica em camundongos após tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na IRA induzida por veneno de <i>B. jararacussu</i> .	147

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>1.1.</b>	<b>Ofidismo: Definição e Aspectos Epidemiológicos Globais</b>	<b>22</b>
<b>1.2.</b>	<b>Acidente ofídico no Brasil</b>	<b>23</b>
<b>1.3.</b>	<b>O Gênero <i>Bothrops</i></b>	<b>25</b>
1.3.1.	<i>Bothrops jararacussu</i>	26
1.3.2.	<i>Acidente botrópico</i>	27
<b>1.4.</b>	<b>Composição do veneno das serpentes</b>	<b>28</b>
<b>1.5.</b>	<b>Rabdomiólise por acidente ofídico</b>	<b>32</b>
<b>1.6.</b>	<b>Injúria renal aguda por acidente ofídico</b>	<b>33</b>
<b>1.7.</b>	<b>Tratamento do acidente ofídico</b>	<b>35</b>
<b>1.8.</b>	<b>Triterpenos: Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico</b>	<b>36</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>42</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E METÓDOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1.</b>	<b>Aquisição dos Animais e Comitê de Ética</b>	<b>43</b>
<b>4.2.</b>	<b>Obtenção dos compostos e substâncias utilizadas</b>	<b>43</b>
4.2.1.	<i>Preparação dos Compostos</i>	43
<b>4.3.</b>	<b>Grupos experimentais</b>	<b>44</b>
4.3.1.	<i>Experimento para determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) do veneno</i>	44
4.3.2.	<i>Experimento Atividade in vivo do Veneno</i>	45
4.3.2.1.	<b>Desenho experimental – Atividade <i>in vivo</i> do veneno</b>	<b>45</b>
4.3.3.	<i>Experimento Tratamento / Lesão in vivo</i>	47
4.3.3.1.	<b>Desenho Experimental Tratamento / Lesão <i>in-vivo</i></b>	<b>48</b>
<b>4.4.</b>	<b>Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos</b>	<b>49</b>
<b>4.5.</b>	<b>Avaliação da Função Renal: Clearance de Creatinina</b>	<b>50</b>
<b>4.6.</b>	<b>Avaliação do Dano Tubular: Gama-GT urinária</b>	<b>50</b>
<b>4.7.</b>	<b>Avaliação Eritrocitária</b>	<b>51</b>
<b>4.8.</b>	<b>Avaliação do Dano Oxidativo: MDA renal</b>	<b>51</b>
<b>4.9.</b>	<b>Avaliação da Atividade Antioxidante: GSH renal</b>	<b>51</b>

<b>4.10. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase</b>	<b>52</b>
<b>4.11. Análise Histopatológica</b>	<b>52</b>
<b>4.12. Avaliação de Marcadores por PCR Quantitativo em Tempo Real</b>	<b>53</b>
4.12.1. <i>Extração do RNA total</i>	53
4.12.2. <i>Síntese de cDNA</i>	54
4.12.3. <i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	54
<b>4.12. Análise Estatística</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>5.1. DL<sub>50</sub> intramuscular de <i>B. jararacussu</i></b>	<b>56</b>
<b>5.2. Atividade do veneno <i>in vivo</i></b>	<b>57</b>
5.2.1. <i>Determinação dos parâmetros fisiológicos</i>	58
5.2.2. <i>Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos</i>	62
5.2.3. <i>Análise da função renal</i>	65
5.2.4. <i>Análise do dano tubular</i>	66
5.2.5. <i>Análise da microalbuminúria e proteinúria</i>	67
5.2.6. <i>Determinação dos parâmetros eritrocitários</i>	69
5.2.7. <i>Determinação dos níveis de MDA no tecido renal</i>	74
5.2.8. <i>Determinação dos níveis de GSH no tecido renal</i>	75
5.2.9. <i>Determinação da atividade de MPO no tecido renal</i>	76
5.2.10. <i>Avaliação histopatológica dos tecidos renal e muscular</i>	76
<b>5.3. Tratamento com Ácido Ursólico e Oleanólico</b>	<b>80</b>
5.3.1. <i>Determinação dos parâmetros fisiológicos</i>	81
5.3.2. <i>Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos</i>	85
5.3.3. <i>Análise da função renal</i>	88
5.3.4. <i>Análise do dano tubular</i>	89
5.3.5. <i>Análise da proteinúria</i>	90
5.3.6. <i>Avaliação dos níveis de MDA no tecido renal</i>	91
5.3.7. <i>Avaliação dos níveis de GSH no tecido renal</i>	92
5.3.8. <i>Avaliação da atividade de MPO no tecido renal</i>	93
5.3.9. <i>Avaliação da expressão gênica de KIM-1, NQO-1, TIMP-2, SOD1s, IL-18 e Clusterina</i>	93
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>100</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>123</b>

**REFERÊNCIAS**

**124**

**ANEXOS**

**143**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ofidismo: Definição e Aspectos Epidemiológicos Globais

A serpente é um animal pertencente ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Reptilia*, subclasse *Lepdossauria*, ordem *Squamata*, subordem *Ophidia* (HICKMAM et al., 2004). Estão presentes no mundo todo e representam o maior número de répteis existentes (BÉRNILS; COSTA 2012). O Brasil possui uma diversidade de espécies divididas nos seis biomas existentes, apresentando um total de 75 gêneros em território brasileiro, sendo dessas apenas duas famílias, Viperidae e Elapidae, consideradas peçonhentas (GREENE, 1992; WÜSTER et al., 2008).

A família Viperidae é composta por duas subfamílias: Viperinae e Crotalinae. Nessa família encontram-se as víboras verdadeiras, ou seja, serpentes consideradas muito agressivas e com veneno altamente tóxico. Representam o mais importante grupo de serpentes, pois é responsável pela maioria e mais graves acidentes ofídicos ocorridos na América, incluindo Brasil (QUEIROZ et al., 2008). Dentre as características que às serpentes desta família apresentam comumente estão a cabeça triangular, fossetas loreais e aparelho inoculador considerado o mais eficiente de todos os répteis, capaz de produzir veneno com potencial hemotóxico que, em algumas espécies, pode ser neurotóxico. Adicionalmente, possuem dentes curvos que podem injetar veneno de forma profunda no corpo da vítima (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Desta forma, essa família acaba por receber uma atenção maior na saúde pública, pois grande parte dos acidentes ofídicos detectados na América ocorre por espécimes desta família (BRASIL, 2017; CHIPPAUX, 2017).

O acidente ofídico em humanos ocorre quando as serpentes se sentem em perigo e executam o comportamento de defesa. Nesses eventos, podem ocorrer desde uma arranhadura e perfuração, com ou sem envenenamento, até dilaceração dos tecidos, dependendo da espécie da serpente e as condições em que o acidente ocorre (OTERO-PATINO, 2009).

O ofidismo é considerado um importante problema de saúde pública, principalmente em países tropicais e subtropicais, representando cerca de 5,4 milhões de acidentes por ano (WHO, 2017). As consequências desses acidentes resultam em uma média de 137.880 óbitos, e um valor três vezes maior de casos com sequelas pós-envenenamento como falência renal, amputações e outras deformidades (KASTURIRATNE et al., 2008; SGRIGNOLLI et al., 2011; MORAIS et al., 2013;

BURDMANN; JHA, 2017; GUTIÉRREZ et al., 2017). Uma melhor compreensão dessa epidemiologia seria de grande valia para um manejo adequado, assim como serviria de incentivo à Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluir definitivamente mordedura por serpentes na lista de doenças tropicais negligenciadas (NTD), sendo também uma forma de encorajar agências internacionais de financiamento. Complementando, também seria de grande estímulo aos fabricantes de soro antiofídico para iniciarem uma produção em quantidade suficiente, assim como às autoridades de Saúde fornecerem centros médicos de acordo com a incidência declarada e a distribuição geográfica dos envenenamentos (CHIPPAUX, 2017).

Na América temos atualmente uma média anual de 57.500 mordeduras (6.2 por 100.000 habitantes), e uma taxa de mortalidade próxima de 370 mortes (0,04 por 100.000 habitantes). A incidência de acidentes ofídicos é influenciada por alguns fatores, como espécimes existentes na região, abundância, clima, altitude, habitat natural da serpente para o seu desenvolvimento e a densidade populacional humana (CHIPPAUX, 2006; KASTURIRATNE et al., 2008). Pesquisadores afirmaram em um estudo que a gravidade dependeria principalmente da serpente responsável (espécie e tamanho) pelo acidente e da acessibilidade dos cuidados de saúde, incluindo disponibilidade de antivenenos (CHIPPAUX, 2017). Infelizmente, estes dados são tidos como fragmentados e negligenciados, devido à grande quantidade de acidentes que não são registrados nos órgãos públicos. Em consequência disso, introduziu-se nos países latino-americanos um termo de notificação obrigatória de acidentes ofídicos, que teve sua utilização iniciada na década de 2000 (GUTIÉRREZ, 2011).

Dados relacionados à América do Sul demonstram que, no Brasil, ocorrem em média 20.000 casos notificados por ano e uma taxa de mortalidade de 0,45% (LEITE et al., 2013).

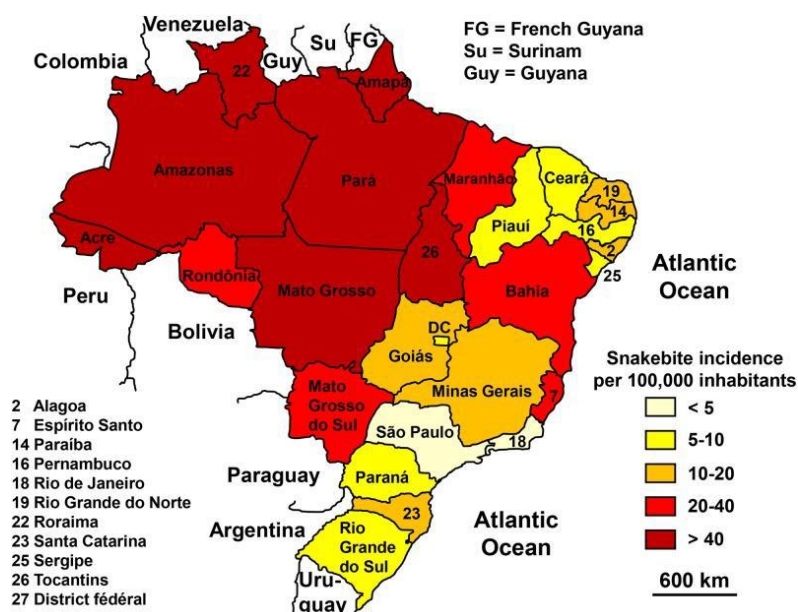
## **1.2. Acidente ofídico no Brasil**

A distribuição geográfica brasileira em relação aos acidentes ofídicos apresenta uma clara predominância na região norte do país, especialmente na região amazônica (**Figura 1**). A distribuição sazonal dos acidentes é mais manifestada no verão, particularmente na região sul (**Figura 2**; BRASIL, 2001). Em relação a incidência por faixa etária houve muita variação de região para região, sendo maior na Amazônia, entre os jovens, e nos adultos com mais de 40 anos (CHIPPAUX, 2017). São mais frequentes nos meses de novembro a abril, ocorrem durante o dia, atingem mais o sexo masculino,



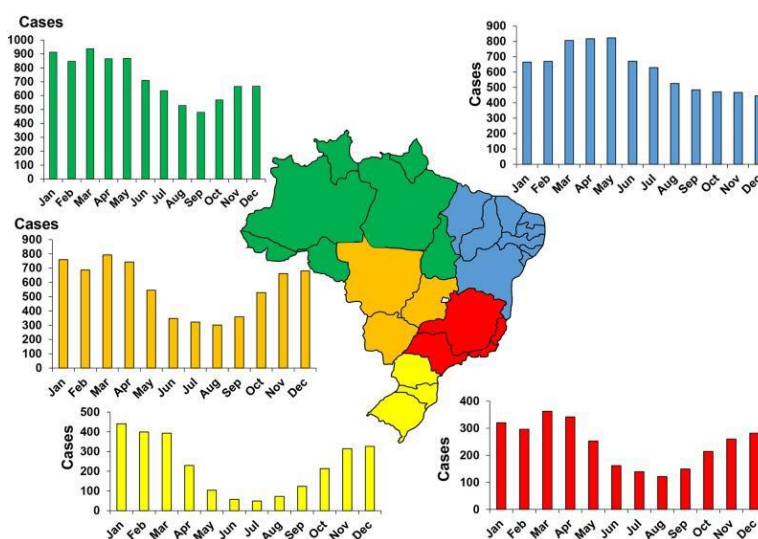
trabalhadores rurais, faixa etária de 15 a 49 anos e os membros inferiores são mais acometidos (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Acredita-se que nas regiões Norte e Nordeste, devido a sazonalidade muito variada nessas regiões, o aumento de casos esteja relacionado ao período chuvoso e de alta temperatura, e que as espécies resistentes próximas as margens de rios se desloquem a procura de terra firme, facilitando o contato com o ser humano (OLIVEIRA et al., 2010).

**Figura 1** — Distribuição geográfica do acidente ofídico no Brasil, no período 2007-2012



Fonte: (Raphael Lorenzeto de Abreu, Map of Brazil's region) CHIPPAUX, 2017.

**Figura 2** — Sazonalidade do acidente ofídico no Brasil, no período 2001-2012.



Fonte: CHIPPAUX JP, 2017.

No Brasil, os dados sobre os casos de envenenamento são coletados através de alguns sistemas, como o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas da Fundação Oswaldo Cruz (SINITOX/FIOCRUZ/MS) e o Sistema de Informações Hospitalares da Sistema Único de Saúde (SIM/SUS), sendo os primeiros casos notificados a partir de 2001. Mesmo com a existência desses sistemas, sabe-se que a quantidade de casos ocorridos no país é maior que a quantidade de casos notificados. Estima-se que haja subnotificação, principalmente em locais distantes de centros médicos, onde não existem recursos adequados de atendimento às vítimas e acesso online a esses sistemas (LEMOS et al., 2009).

Para o período de 2000 a 2013, ocorreram cerca de 360 mil casos de acidentes por serpentes com 1.487 óbitos (BRASIL, 2014; CHIPPAUX, 2015). Na Região Nordeste do Brasil, no mesmo recorte temporal, a incidência destes acidentes foi de 11,2/100.000 habitantes. Dados epidemiológicos reportam que os casos mais relevantes são aqueles causados pelas serpentes da família Viperidae (WEINSTEIN et al., 2011). De acordo com o SINAN somente no ano de 2017 ocorreram cerca de 221 mil casos de acidentes com 267 óbitos registrados (BRASIL, 2018). Dentro da família Viperidae o gênero *Bothrops* é responsável pela maioria destes acidentes em todo o Brasil (85% no período de 2000 a 2013), com exemplos de espécimes como jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca sendo responsáveis por esses acidentes (SANTORO et al., 2008). Os acidentes ocasionados por este gênero produzem vários transtornos clínicos que incluem: dano aos tecidos, coagulopatia, hipovolemia, instabilidade hemodinâmica, e insuficiência renal aguda (OTERO et al., 2002; MISE et al., 2007; EVANGELISTA et al., 2010; HATAKEYAMA et al., 2018).

No estado do Ceará a situação não é diferente. Entre os anos 2007 a 2016, ocorreram 28.402 acidentes por animais peçonhentos notificados, 23,4% (6.169) foram ocasionados por serpentes. No mesmo período, os homens representaram 79,1% das vítimas e as mulheres representaram 20,9%. Observando em relação a faixa etária dos acidentes nos últimos 10 anos ocorreram com pessoas entre 20 e 49 anos (SINAN, 2016).

### **1.3. O Gênero *Bothrops***

As serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizadas por possuírem cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador tipo solenóglifo que atingem até 2,5 cm de comprimento, 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 (MELGAVAREJO, 2003; ALBUQUERQUE, 2004). Este gênero é muito bem estudado por países sul-americanos como Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia devido a sua grande importância epidemiológica para esta região (HIGUCHI et al., 2007; COSTA et al., 2010).

Na pesquisa realizada por Fenwick e colaboradores (2009) foram classificados as serpentes da família Viperidae, mais precisamente a subfamília Crotalinae, em cinco gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*. Esta classificação está fundamentada em um conjunto de dados morfológicos e moleculares (análise comparativa multigênica mitocondrial), no qual é possível reconhecer as linhagens de formas evolutivas, ecológicas e morfológicas distintas como gêneros. Além dos dados morfológicos e moleculares, considerou-se também a diversidade nutricional a que cada espécie é submetida na região em que se encontra, pois esse fator influencia na composição da peçonha, levando assim à diversificação destes animais. Desta forma, o arranjo taxonômico é de grande valia para, por exemplo, a área médica, pois com a correta identificação da espécie responsável pelo acidente pode-se estabelecer a produção e uso eficiente da soroterapia específica (RODRIGUES et al., 2012).

No gênero *Bothrops* estão incluídas as espécies: *Bothrops atrox*, *Bothrops brasili*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops muriciensis*, entre outras (GRANTSAU, 2013). Este gênero é responsável por mais de 70% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil (BRASIL, 2010). Os venenos das espécies que representam este gênero possuem efeitos hemotóxicos e sua letalidade é devida principalmente a seus efeitos sinérgicos sobre fatores hemorrágicos e atividades hipotensoras (GRAHAM et al., 2008).

### 1.3.1. *Bothrops jararacussu*

As serpentes da espécie *Bothrops jararacussu* (**Figura 3**) se caracterizam por alcançar comprimento de até 1,8 m e por produzirem grande quantidade de veneno, sendo mais facilmente encontradas no sudeste e sul do país (ZENI et al., 2007; BRASIL, 2017). Conhecida popularmente de “jararacuçu”, nome originado da língua Tupi que significa “bote da cobra grande”, essa espécie é facilmente encontrada em regiões baixas, alagadiços, margens de rios e lagoas. Possui capacidade de inocular até quatro mililitros de veneno em uma única mordedura, valor esse que corresponde a um grama de seu veneno seco. Suas vítimas consistem geralmente de trabalhadores da área da pesca, caça

e animais rurais como, por exemplo, bovinos e equinos. No Brasil pode ser facilmente encontrada nos litorais do Espírito Santo e Santa Catarina (BELLUOMINI, 1984).

**Figura 3** — *Bothrops jararacussu* LACERDA, 1884.



Fonte: Clero Ferreira de Moraes Junior, 2019 (Olhares Fotografia Online).

As serpentes da espécie *Bothrops jararacussu*, por estarem distribuídas em áreas geográficas distintas, podem apresentar venenos com diferentes composições e níveis de toxicidade (JORGE et al., 2017). Desta forma, os venenos botrópicos podem produzir diversos efeitos químicos e biológicos com suas particularidades. A composição das enzimas que está presente no veneno desta espécie se caracteriza por uma atuação proteolítica, no qual seus componentes podem variar entre coagulantes e fibrinolíticos, como também podem atuar sobre às células de forma que causem um desequilíbrio homeostático (SALAZAR et al., 2007).

### 1.3.2. Acidente botrópico

O acidente botrópico comumente causa uma repercussão clínica devido os sintomas e o prognóstico dos pacientes acometidos. As vítimas deste acidente geralmente apresentam efeitos locais como dor, edema e eritema, que se agravam para equimoses, bolhas, necrose, hemorragia local e inflamação, podendo estes efeitos variar conforme a quantidade de veneno inoculada durante a picada (BOER-LIMA et al., 1999; MISE et al., 2007). Adicionalmente, a necrose local é uma das consequências mais graves, visto que pode ocasionar a amputação de membros (WARREL, 2005; SANTORO et al., 2008). Em relação aos efeitos sistêmicos podem ocorrer a liberação de peptídeos e enzimas para a circulação causando hipotensão arterial, incompatibilidade sanguínea oriunda ao intenso

consumo de fibrinogênio, dano agudo ao miocárdio, angústia respiratória, edema pulmonar, insuficiência renal e óbito (KOUYOUMDJIAN; KOUYOUMDJIAN, 1986).

A atividade hipotensora do veneno consiste em uma das consequências mais graves deste acidente, possuindo como patogênese a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos, originando o composto peroxinitrito, depois de reações com ânions superóxidos gerados localmente (ZAMUNER et al., 2001). A atividade edematogênica por sua vez é mediada pelas metaloproteinases (MPs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e produtos eicosanoides (PANUNTO et al., 2006). A atividade hemorrágica também é mediada pelas metaloproteinases, que em sua composição apresentam cálcio e zinco em suas moléculas e, uma vez na corrente sanguínea, atingem diretamente a estrutura dos vasos sanguíneos provocando extravasamento de sangue (RUIZ DE TORRENT et al., 1999).

Dentre as alterações renais que o veneno botrópico causa temos o comprometimento de toda a estrutura do rim, levando a glomerulonefrite, nefrite intersticial, necrose tubular aguda, necrose cortical e insuficiência renal (GUTIÉRREZ et al., 2009; MELLO, 2011).

#### **1.4. Composição química e atividade biológica do veneno botrópico**

As peçonhas das serpentes constituem um fluido especializado que varia em sua composição e proporção de acordo com cada espécie, compostas principalmente por proteínas enzimáticas que constituem entre 90 a 95% do peso seco e, em baixa percentagem compostos não proteicos como nucleotídeos, carboidratos, lipídios, íons como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Zn<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, dendritos celulares e bactérias (PATIÑO-C, 2002).

Esta secreção viscosa tem uma cor que varia do branco ao amarelo, e se caracteriza como um complexo químico que possui mais de 30 frações diferentes entre proteínas ou peptídicos com atividade enzimática ou farmacológica; aminoácidos livres; ácidos orgânicos; açúcares como glicose, manose e galactose; aminas como acetilcolina, histamina e serotonina; ácidos graxos; água; hialuronidase, a qual é uma enzima que facilita a disseminação do veneno para os tecidos; riboflavina e L-aminoácido oxidases (LAAOs), responsável pela cor amarela (PALACIOS; ZARTA, 2009).

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* possui como principais componentes proteicos de maior importância três classes: as serino-proteinases (SPs), as metaloproteinases e as fosfolipases A<sub>2</sub> (LOMONTE et al., 2014).

As SPs apresentam diferentes funções e podem estar implicadas na digestão, na ativação do sistema de complemento, na diferenciação celular e na hemostasia. Podem

ser encontradas em diversas espécies das subfamílias Crotalinae e Viperinae (COSTA et al., 2010). Suas ações hemostáticas se constituem em transformar o fibrinogênio em fibrina, ativando o fator de coagulação V e proteína C, atuando no fibrinogênio do tipo A ou no fibrinogênio do tipo B, enquanto a trombina sérica atua em ambos (SANT'ANA et al., 2008). Isso se sucede na formação de um complexo de fibrina facilmente degradada pela plasmina, ocasionando um quadro de diminuição da coagulação sanguínea (RUSSEL, 1980; HAVT, 1999; MENALDO et al., 2012). Complementando, atuam na liberação da cinina, oriunda do cininogênio, resultando na quebra do complemento C3 na cascata do complemento (PETRETSKI et al., 2000).

Algumas pesquisas utilizando SPs apresentaram resultados promissores em estudos pré-clínico e clínico como tratamento para enfermidades, como por exemplo para o infarto do miocárdio, choque isquêmico e doenças trombóticas (HERZIG et al., 1970; WILLIES et al., 1989; CHEN; TSAI, 1995). Castro e colaboradores (2004) utilizaram as SPs como forma de prevenção e de redução da formação de trombo, nas superfícies de prótese evitando agregação plaquetária, na circulação extracorpórea, e na melhora da circulação sanguínea nas várias alterações vasculares, secundária à redução da viscosidade sanguínea.

As MPs são as principais enzimas responsáveis pelos efeitos hemorrágicos. Constituem-se por serem enzimas zinco-dependentes ocasionando a clivagem seletiva das pontes de peptídeos chave dos componentes da membrana basal, afetando conseqüentemente as interações com as células endoteliais (ESCALANTE et al., 2004; GOMES et al., 2011). Além disso, são secretadas como pró-enzimas e possuem módulos reguladores responsáveis por interações com a matriz extracelular e integrinas, receptores heterodiméricos capazes de hidrolisar proteínas da membrana basal incluindo fibronectina, laminina, e colágeno do tipo IV e também degradam fibrinogênio e fibrina (SANT'ANA et al., 2008; SILVA JUNIOR et al., 2007).

A classificação das MPs consiste em quatro grupos estruturais, P-I a P-IV (ANGULO; LOMONTE, 2009). A composição das MPs se caracteriza por uma sequência de aminoácidos denominados RGD (Arg-Gly-Asp) e ECD (Glu-Cis-Asp), que reconhecem o receptor de integrina envolvido na interação da matriz-celular, agindo dessa forma diretamente sobre as hemorraginas (HUMPHRIES et al., 1986), sendo que provavelmente participem também enzimas proteolíticas que em conjunto atuam na lâmina basal destruindo a matriz extracelular, circundando as células endoteliais dos capilares e degradando "*in vitro*": fibronectina, laminina, colágeno e gelatina com

consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF, IL1 $\beta$  e IL6 (MOREIRA et al., 1994, YAMASHITA et al. 2014, DELAFONTAINE et al., 2017; CEDRO et al., 2018).

Estudos utilizando MPs como tratamento foram realizados em pesquisas utilizando modelos experimentais de neoplasias com alto grau de malignidade como melanoma, tumores pulmonares e mamários em ratos, apresentando resultados interessantes como redução de processos metastáticos, e inibindo a liberação de fatores de crescimento destes tumores (COTTE et al., 1972; DE CARVALHO et al., 2001; DE CASTRO DAMASIO et al., 2014; DA SILVA et al., 2015; AZEVEDO et al., 2019; PIRES et al., 2019). Mazzi e colaboradores (2004) isolaram a MP denominada BjussuMP-I do veneno de *B. jararacussu* e a caracterizaram por apresentar um peso molecular de 60 kDa, alta atividade hemorrágica, miotóxica e proteolítica, atuando principalmente na degradação da caseína, fibrinogênio A e B com predileção para o B, além de apresentar atividade bactericida em experimentos com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Outra MP isolada dessa vez em veneno de *B. moojeni* foi a protease A, enzima que apresenta atividade proteolítica na caseína, sendo essa atividade aumentada com a presença de Ca<sup>2+</sup> (ASSAKURA et al., 1985). Esse estudo foi de grande importância para as pesquisas envolvendo lesões vasculares, sendo descoberto posteriormente que a protease A ocasiona a hidrólise da gelatina, colágeno do tipo I, fibrinogênio, fibrina e cadeia- $\beta$  da insulina oxidada (ROODT et al., 1997). No entanto, apresenta uma atividade hemorrágica considerada baixa (REICHL; MANDELBAUM, 1993). A protease A associada a outros componentes do veneno, como peptídeos de baixo peso molecular (sistema calicreína-bradicinina), lesam o endotélio e a camada muscular das artérias e arteríolas, causando consequentemente a hipotensão e choque hipovolêmico, sintomas considerados comuns no acidente botrópico (VIDAL, 1988). A trombocitina, outra MP presente no veneno de *Bothrops atrox*, foi também encontrada no veneno de *B. jararacussu*, agindo na ativação do fator VIII, induzindo a agregação plaquetária e demonstrando atividade discreta de trombina-like (MAZZI et al., 2004). Milani Júnior e colaboradores (1997) isolaram de *B. jararaca* e *B. jararacussu* a desintegrina denominada Jararacina, composta por 73 aminoácidos, que demonstrou atividade antiagregante *in vitro*, pois inibiu agregação de plaquetas humanas e a ligação de fibrinogênio e do fator de Von Willebrand à complexa glicoproteína de membrana plaquetária IIb/IIIa.

As PLA<sub>2</sub> são enzimas com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, estáveis e dependentes de cálcio, sendo classificadas em grupos I e II, de acordo com sua estrutura

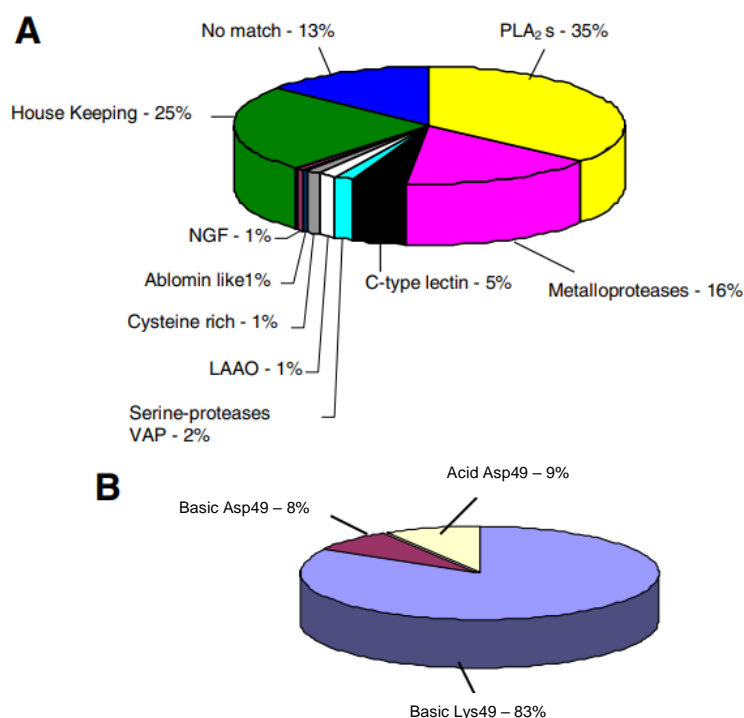
primária e o padrão de pontes dissulfeto (COGO et al, 2006). São responsáveis pela ativação de mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios como os leucotrienos, as prostaglandinas, lisofosfolípídeos e fator de agregação plaquetária. Se caracterizam por catalisar a hidrólise da ligação sn-2 de ésteres de fosfoglicerídeos, produzindo lisofosfolípídeos e ácidos graxos insaturados em uma reação dependente de cálcio (ROBERTO et al., 2004; OSHIMA-FRANCO et al., 2004). Um dos ácidos graxos resultantes da hidrólise é o ácido araquidônico que, por sua vez, pode conduzir à biossíntese de eicosanoides e à hidrólise de fosfolipídios de células inflamatórias ativadas. O aumento de eicosanoides é encontrado principalmente em respostas inflamatórias (VINUCHAKKARAVARTHY et al., 2011; GIMENES et al., 2014). Do veneno de *B. jararacussu* foram isoladas e caracterizadas duas PLA<sub>2</sub>s básicas denominadas bothropstoxina-I (BthTX-I, Lys49), cataliticamente inativa e II (BthTX-II, Asp-49), com baixa atividade catalítica (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002, TAKEDA et al., 2004).

As L-aminoácido oxidases são um grupo de enzimas presente em venenos botrópicos e se caracterizam por agirem catalisando a desaminação oxidativa de aminoácidos específicos na produção de alfa-cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia (CARONE et al., 2017). São definidas como glicoproteínas ácidas homodiméricas com uma flavina como cofator (CROXATTO, 1946). Campos e colaboradores (2013) em suas pesquisas denotam para o possível envolvimento dessa enzima na apoptose de várias linhagens de células (células endoteliais vasculares), que poderiam contribuir para os casos de hemorragias prolongadas pós acidente ofídico. Adicionalmente, podem inibir a agregação plaquetária, tendo um efeito anticoagulante (SANTORO; MARTINS, 2004).

Kashima e colaboradores (2004) realizaram a análise proteômica do veneno de *B. jararacussu* (**Figura 4**), por meio do sequenciamento de cDNA, gerando um total de 549 marcadores de sequência expressa (ESTs). O produto mais abundante que ocorreu no conjunto de transcritos analisados foram PLA<sub>2</sub> (35% do total), das quais 83% eram homólogas à Lys49-PLA<sub>2</sub> básicas (BOJU-I), 8% eram às Asp49-PLA<sub>2</sub> básicas (BOJU-II) e 9% eram às Asp49-PLA<sub>2</sub>s ácidas (BOJU-III). Essas sequências representam o conjunto principal de proteínas, as quais estão principalmente associadas aos efeitos mionecróticos e edematogênicos causados por este veneno.



**Figura 4** — (A) Distribuição de ESTs do veneno de *B. jararacussu* de acordo com seus produtos de cDNA. (B) Distribuição dos transcritos básicos/ácidos de Asp49 e Lys49 PLA<sub>2</sub>S.



Adaptado de: KASHIMA et al., 2004.

A participação de todas estas moléculas faz com que o veneno botrópico tenha grande potencial deletério e, dado a proporção e atividade destes nos venenos, pode-se distinguir seus efeitos nas famílias das serpentes.

### 1.5. Rabdomiólise por acidente ofídico

A rabdomiólise é uma síndrome clínico-laboratorial de múltiplas etiologias resultantes de lesão da musculatura estriada esquelética associada à trauma direto (CABRAL et al., 2012). Como consequência do dano à membrana da célula muscular ocorre a liberação de constituintes intracelulares: mioglobina, hemoglobina, endotoxinas, substâncias tóxicas vasoativas, precursores das purinas, creatinina, potássio, ácido úrico, cálcio, fosfato e creatina quinase (DAHER, 1998). Além de liberar constituintes intracelulares, a lesão muscular é responsável por retenção de fluidos, que em humanos podem atingir 12 litros nas primeiras 48 horas, e, desta forma, ocorre uma hipoperfusão para os rins. A redução da perfusão renal se agrava ainda mais devido a inibição do óxido nítrico causada pela hemoglobina. (GALVÃO, 2003).

Nos envenenamentos ofídicos a rabdomiólise foi inicialmente reconhecida nos acidentes produzidos por serpentes marinhas e, posteriormente em algumas elapídeas terrestres da Austrália e algumas espécies viperídeas (WARREL, 2010). Este efeito caracteriza-se pela ação de PLA<sub>2</sub>s de origem miotóxica ao nível sistêmico, resultante da ligação dessas toxinas aos receptores fibromusculares. As miotoxinas provocam ruptura da integridade da membrana plasmática das células musculares, gerando influxo de cálcio, degeneração celular, resultando em contração dos sarcômeros e intoxicação mitocondrial, o que pode causar a morte celular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). A vista disso, ocorre liberação de elevada quantidade de proteínas citosólicas musculares, como creatina quinase e mioglobina, o que pode contribuir para a IRA (PINHO; BURDMANN, 2008; SANTOS et al., 2009; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

O veneno de *B. jararacussu* possui efeito coagulopático por conta de sua ação pró-coagulante no fibrinogênio e fator X, além de uma atividade miotóxica maior do que as outras espécies do gênero, causando necrose nas fibras musculares estriadas e lançando proteínas de alto peso molecular na circulação (MILANI JÚNIOR et al., 1997). Esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado, contudo, estudos mostraram que a toxina BthTX-II lesiona fibras musculares esqueléticas, principalmente por alteração na composição da membrana plasmática celular (VERONESE et al., 2005).

Nos acidentes botrópicos as atividades fosfolipásica e mionecrótica são mediadas pelas miotoxinas, que ocasionam uma variedade de efeitos farmacológicos como miotoxicidade (LIZANO et al., 1997), neurotoxicidade (MEBS; OWNBY, 1990), interferem na agregação plaquetária (MARKLAND, 1998), citotoxicidade (BULTRON et al., 1993) e inflamação (CHAVES et al., 1998; ZHANG; GOPALAKRISHNAKONE, 1999). O conjunto destes efeitos progridem para transtornos vasculares e hemostáticos, causando conseqüentemente um processo tissular isquêmico levando a amputação de membro ou lesão músculo-tendinosa permanente (ROODT et al., 1997).

### **1.6. Injúria renal aguda por acidente ofídico**

A Injúria Renal Aguda (IRA) é uma complicação grave dos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* (ALBUQUERQUE et al., 2019). Estes desencadeiam danos na estrutura renal, comprometendo todo o órgão, podendo ser severa, oligúrica e requerer diálise. A IRA conseqüente da rabdomiólise, oriunda do acidente ofídico, se justifica pela teoria de que a necrose tubular aguda (NTA) seja a causa mais comum da manifestação da IRA durante os acidentes (PINHO; BURDMANN, 2008). A patogênese

da NTA no acidente ofídico pode estar associada às alterações hemodinâmicas, reações imunológicas e nefrotoxicidade direta (ALBUQUERQUE et al., 2019). Pesquisadores relatam que, ao nível do túbulo proximal, mioglobina e hemoglobina se convertem em hematina (ferrihemato) na presença de pH urinário menor que 5.6, sendo a hematina tóxica para os rins (DAHER, 1998; GALVÃO, 2003). Em casos de depleção de volemia ou hipoperfusão renal, a mioglobina se tornará tóxica para os rins, bem como a hemoglobina, se já existir alguma lesão nesses (SANTOS et al., 2009).

Um outro importante tópico que favorece a hipótese de injúria renal aguda por rabdomiólise são os cristais formados pela mioglobina. Uma pesquisa clínica apresentou resultados de quando um pH urinário era mantido em 8.0, 78% da mioglobina exógena era excretada pelos rins. No entanto, quando o pH se tornava ácido (< 6,0), somente 32% da mioglobina era eliminada. As proteínas do grupo heme da mioglobina ligam-se à proteína de *Tamm-Horsfall* no túbulo distal, formando cilindros intratubulares e reduzindo o fluxo renal (DAHER, 1998). É importante destacar que a hiperuricemia, produto do catabolismo das células musculares, também ocasiona a formação de cristais intratubulares em situações de hipovolemia, com diminuição de diurese, colaborando para a lesão renal e conseqüentemente a diminuição da filtração glomerular (GALVÃO, 2003).

Grande parte dos pacientes acometidos com acidente ofídico recuperam a função renal após tratamento com fluidoterapia. Porém, a IRA após envenenamento por serpente tem sido estudada como um possível fator de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC), ocorrendo tanto em adultos quanto crianças, assim como estar associada à disfunção renal na nefropatia por agroquímicos (BURDMANN; JHA, 2017).

A patogênese da IRA por acidente ofídico ainda não está totalmente esclarecida (DE CASTRO et al., 2004). Porém, vale destacar algumas outras hipóteses relatadas na literatura: isquemia secundária à diminuição do fluxo sanguíneo renal conseqüente de alterações hemodinâmicas oriundas de sangramento sistêmico e extravasamento vascular; degradação proteolítica da membrana basal glomerular; ação citotóxica direta de componentes do veneno em células tubulares renais; e como já relatado, no caso de venenos que induzem miotoxicidade, acúmulo de grandes quantidades de mioglobina nos túbulos renais, com conseqüente toxicidade (PINHO et al., 2005; STIPIRIJA; STIPIRIJA, 2012). Se faz necessário citar outros fatores que contribuem para o desenvolvimento de IRA em envenenamento por serpentes, como inflamação sistêmica, ativação da cascata de coagulação resultando no depósito glomerular de microtrombos na microvasculatura renal, estresse oxidativo e hiperuricemia (BURDMANN; JHA, 2017).

Casos de IRA induzida por acidente ofídico na América Latina são causados majoritariamente por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Pesquisas relatadas na literatura associando diretamente picada por serpentes do gênero *Lachesis* a danos renais são escassas (BURDMANN; JHA, 2017).

### 1.7. Tratamento do acidente ofídico

O tratamento mais eficaz conhecido atualmente para os acidentes ofídicos com comprometimento sistêmico têm como base a administração endovenosa em ambiente hospitalar de antissoro específico, que possui preparo por meio de hiperimunização de animais, principalmente, cavalos e ovelhas, visando à neutralização de toxinas (SOARES et al., 2005; ESPINO-SOLIS et al., 2009). Pesquisas relatam a possibilidade da ocorrência de reações adversas, podendo acontecer de 3 a 84% dos casos (CARON et al., 2009; CRUZ et al., 2009). A soroterapia, mesmo administrada em curto período de tempo após picada da serpente, é eficaz na neutralização de efeitos sistêmicos. Contudo, alguns dos efeitos deletérios não são revertidos com a aplicação do soro antiofídico (MELO et al., 2007).

No Brasil a produção dos soros antiofídicos é classificada da seguinte forma: antiofídico pentavalente, produzido a partir dos venenos de *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwedii* (12,5% cada); antiofídico-crotálico, adicionando-se soro anticrotálico (*Crotalus durissus terrificus*) ao soro antiofídico pentavalente; antiofídico-laquéutico (*Lachesis muta*) e antiofídico-laquéutico-crotálico (MILANI JÚNIOR et al., 1997; OSHIMA-FRANCO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2008). Dos Santos e colaboradores (1992) realizaram um estudo demonstrando que o antiveneno botrópico-crotálico possui maior eficácia em envenenamentos por *B. jararacussu*, apresentando uma titulação de anticorpos maior contra este quando comparado aos antivenenos botrópicos e crotálicos utilizados separadamente, tendo desta forma uma maior neutralização dos efeitos letal, coagulante e miotóxico.

Pesquisas vêm sendo realizadas à procura de tratamentos alternativos para casos de pacientes envenenados por acidentes ofídicos, tais como, o uso de substâncias oriundas de produtos naturais, terapias com laser e imunoterapia utilizando anticorpos recombinantes humanos, sendo direcionado ao tratamento de danos locais e promovendo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e regenerativo do tecido danificado (BARBOSA et al., 2008; VALE et al., 2008; BARONE et al., 2011). Derivados de substâncias naturais

têm recebido muita importância nas últimas décadas, principalmente pelo potencial que eles demonstram para o tratamento de diferentes doenças. Achados na medicina tradicional apresentam moléculas naturais bioativas desenvolvidas como fontes de novos medicamentos, alimentos funcionais e aditivos alimentícios (MARTINES et al., 2014). Estes geralmente são metabólitos secundários gerados por plantas e animais através de várias vias biológicas e processos metabólicos secundários. Estes podem ser classificados por sua estrutura química em flavonoides, alcaloides, triterpenos, quinonas e fenilpropanoide (REN et al., 2013).

### **1.8. Triterpenos: Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico**

Os polifenóis são um grupo complexo de produtos químicos amplamente distribuídos em todo o reino vegetal e, portanto, integram parte da dieta humana (LIU, 1995). Pesquisas sugerem que polifenóis quando incluídos regularmente em dietas possuem capacidade de proteger contra uma variedade de doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares. Diante disso, iniciou-se um interesse crescente nesses compostos por consumidores e fabricantes de alimentos (NATARAJU et al., 2007). Dentre os polifenóis estudados, os triterpenos se caracterizam por serem metabólitos secundários bioativos de plantas com grande variedade química estrutural e funcional, encontradas em uma diversidade de plantas, frutos e ervas, como por exemplo alecrim, tomilho e orégano (**Figura 5**), sendo componentes importantes da dieta humana (IKEDA et al., 2008; CALTANA et al., 2014). Esses ácidos triterpenóides pentacíclicos existem em plantas na forma de ácidos livres ou glicosilados para saponinas triterpenoides (POLLIER; GOOSSENS, 2012).

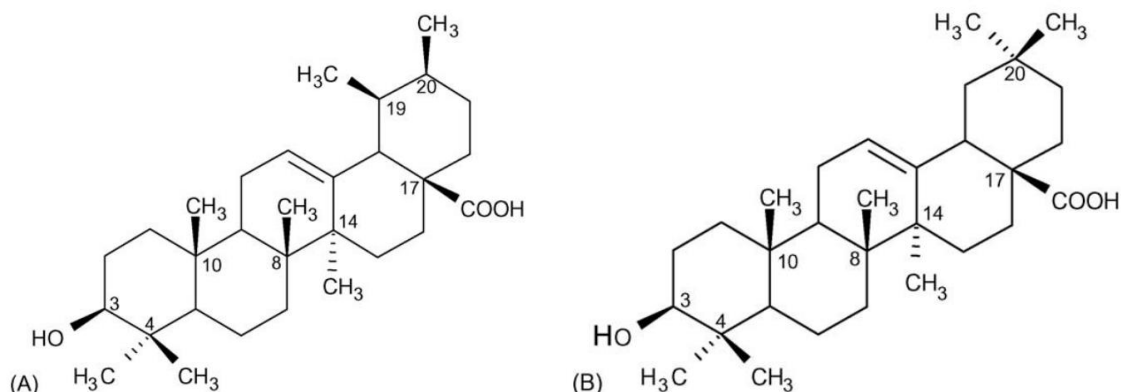
**Figura 5** — Fontes naturais de ácidos triterpenóicos.



Tomilho (à esquerda) e orégano (à direita). Fonte: Barbara W. Beacham, 2013. (Salmonfishingqueen)

Os triterpenos derivados de óleos modulam diferentes mecanismos de sinalização apresentando um alto espectro de atividades (SOMOVA et al., 2003). Dentre esses terpenos estão o ácido oleanólico (AO) e seu isômero, o ácido ursólico (AU), que se caracterizam por apresentar estruturas moleculares semelhantes, com um grupo metila ( $H_3C-$ ) em  $C_{19}$  e  $C_{20}$  no AU e dois grupos metilas em  $C_{20}$  no AO (**Figura 6**; LIU, 1995). Ambos os compostos foram considerados biologicamente inativos por um longo tempo, mas nos últimos anos eles atraíram o interesse de pesquisadores devido seus efeitos farmacológicos, combinado com uma baixa toxicidade. Fazem parte da medicina tradicional e são utilizados em tratamentos de doenças renais induzidas por agentes químicos, fibroses do fígado, efeitos nefroprotetores na cirrose e efeitos protetores anti-células leucêmicas (DU; KO, 2006; . OVÉSNA et al., 2006; JI et al., 2009; MARTÍN et al., 2014).

**Figura 6** — Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico.



(A): Ácido ursólico; (B): ácido oleanólico. Fonte: OVÉSNA et al., 2006.

Estas moléculas de importância terapêutica já foram estudadas em conjunto 1:1 (ácido ursólico: ácido oleanólico) apresentando baixos níveis de toxicidade e quando avaliados no modelo de DSS (Dahl sensíveis ao sal) demonstraram ter efeitos anti-hipertensivo, anti-aterosclerótico, e atividade antioxidante (SOMOVA et al., 2003). A separação e identificação das estruturas destes compostos têm sido realizadas e diferentes estudos individuais têm sido feitos (POLLIER; GOOSSENS, 2012).

O ácido ursólico demonstrou ter potentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes sobre os efeitos deletérios gerados por substâncias químicas, apresentando efeitos protetores sobre a função renal (MA et al., 2014; PAI et al., 2012), atividade anti-inflamatória pela inibição de enzimas de PLA<sub>2</sub>s (NATARAJU et al., 2007), efeito supressor de estresse oxidativo celular em miocardite (SARAVANAN; PUGALENDI, 2006), efeito protetor em modelo de úlcera gástrica (GUPTA et al., 1981), efeito anticâncer (IQBAL et al., 2018; CHEN et al., 2019) e inibição da expressão de mediadores do endotélio vascular, melhorando a aterosclerose quando induzida por hipercolesterolemia (LEE et al., 2012; LI et al., 2018).

O ácido oleanólico por sua vez possui efeitos nefroprotetores nas lesões renais por agentes farmacológicos (ABDEL-ZAHER et al., 2007; PATIL et al., 2010) cardioprotetores no tratamento experimental da miocardite autoimune e na isquemia por reperfusão (DU; KO, 2006; SENTHIL et al., 2007; MARTÍN et al., 2014), efeitos neuroprotetores em modelo de hipóxia por CoCl<sub>2</sub> (CALTANA et al., 2014), efeito gastroprotetor (LI et al., 1999; GUTIERREZ et al., 2018), efeitos anti-HIV (XU et al.,

1996; KASHIWADA et al., 1998; MENGONI et al., 2002) e efeitos hepatoprotetores (LIU et al., 2014).

Tendo em conta todos os efeitos relatados na literatura estas moléculas se evidenciam como novas alternativas no tratamento de diferentes doenças e como moléculas coadjuvantes de outros medicamentos para o tratamento de várias patologias.



## 2. JUSTIFICATIVA

O acidente ofídico é considerado um importante problema de saúde pública, sendo por diversas vezes um acontecimento negligenciado e não notificado aos órgãos responsáveis. Mesmo com a utilização de soroterapia antiofídica específica alguns efeitos deletérios ocasionados pelo veneno não são revertidos, levando conseqüentemente à sequelas graves e, dependendo do prognóstico, ao óbito do paciente. A picada de serpente pode ocorrer em qualquer local no corpo da vítima e, dependendo do local, a peçonha pode atingir altas concentrações no tecido renal em poucas horas da inoculação, e logo em seguida, inicia-se a excreção da mesma na urina (OTERO-PATINO, 2009; MELLO et al., 2010).

O sistema renal possui importância vital para nosso organismo, sendo os rins responsáveis pela filtração e eliminação de diversos compostos não aproveitados em nosso metabolismo, tornando-se suscetíveis a agentes potencialmente nefrotóxicos, como fármacos, proteínas de alto peso molecular e venenos. Além disso, são responsáveis por receberem 25% do débito cardíaco, estando diretamente expostos a toxinas presentes na circulação sanguínea. Sua atividade de filtração glomerular pode potencializar os efeitos dos agentes tóxicos; células denominadas *pars recta*, presentes nos túbulos proximais, apresentam um sistema de transporte de solutos orgânicos que, em caso de envenenamento, permitem uma exposição direta do agente tóxico ao sistema renal (BELLOMO et al., 2012; EDELSTEIN, 2013).

Dessa forma, o uso de medidas nefroprotetoras e tratamentos adjuvantes no acidente ofídico se torna indispensável, sendo necessário que sejam implementadas prontamente, caso contrário, uma injúria renal precoce ocorre conseqüentemente (VALE et al., 2008; BARONE et al., 2011).

Os fármacos em sua maioria não são oriundos de plantas, tendo sua composição em grande parte de forma sintética. No entanto, a riqueza de compostos presente nas plantas constitui uma fonte para a criação de futuros fármacos (OJHA et al., 2016). Alguns estudos mostraram que o ácido ursólico e o ácido oleanólico isolados de produtos naturais são capazes de atenuar a nefrotoxicidade induzida por cirrose e antibioticoterapia por meio da redução da azotemia e do estresse oxidativo (PATIL et al., 2010; MA et al., 2014; JESUS et al., 2015; LEE et al., 2016; AYELESO et al., 2017; MLALA et al., 2019; SIFAOU et al., 2019). No entanto, não há dados sobre o efeito desses ácidos em modelo de injúria renal aguda por ofidismo.

Devido aos efeitos locais e sistêmicos gerados pelo envenenamento botrópico e sabendo que a utilização de soro antiofídico muitas vezes é insuficiente no manejo dos efeitos locais, que podem levar a rabdomiólise e, portanto, a uma injúria renal aguda (LOMONTE, 2003; WARRELL, 2010), se faz necessário investigar novos compostos que possam servir como coadjuvante do tratamento. Assim, o presente trabalho buscou avaliar o possível efeito nefroprotetor dos triterpenos, ácido ursólico e ácido oleanólico, na injúria renal aguda consequente do envenenamento botrópico causado pelo veneno da espécie brasileira *Bothrops jararacussu* por meio de experimentações *in vivo* em camundongos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral.

Avaliar o efeito nefroprotetor dos triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico) na injúria renal aguda induzida por veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em camundongos.

#### 3.2. Objetivos Específicos.

- Determinar a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) via intramuscular do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e estabelecer uma dose capaz de induzir nefrotoxicidade;
- Avaliar a atividade *in vivo* do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* com o intuito de otimizar o protocolo de tratamento e selecionar o melhor tempo de envenenamento capaz de induzir uma injúria renal aguda.
- Analisar por meio de parâmetros bioquímicos clássicos os efeitos dos triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico) na função renal dos animais envenenados com peçonha de *B. jararacussu*.
- Investigar o efeito protetor tubular dos triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico) na IRA induzida por veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.
- Mensurar o perfil oxidativo e inflamatório no tecido renal de animais tratados com os triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico) após envenenamento com peçonha de *B. jararacussu*.
- Quantificar o perfil molecular da expressão de mRNA de genes associados à IRA no tecido renal de animais tratados com os triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico) após envenenamento botrópico da serpente *B. jararacussu*.

## 4. MATERIAL E METÓDOS

### 4.1. Aquisição dos Animais e Comitê de Ética

Foram utilizados camundongos swiss adultos, fêmeas, com um peso entre 25-30g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, aclimatados em temperatura entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), com umidade e circulação de ar controladas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

A pesquisa foi conduzida de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação com Animal (CONCEA) sendo este estudo submetido à aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo recebido número de protocolo 114/17.

### 4.2. Obtenção dos compostos e substâncias utilizadas

A peçonha da serpente *B. jararacussu*, liofilizada e conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi gentilmente cedida pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucilene Delazari dos Santos, membro da Equipe de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu-SP. Os triterpenos (Ácido ursólico/Ácido oleanólico), liofilizados na proporção 1:1 e conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram fornecidos gentilmente pelo Prof. Dr. James Almada da Silva, docente do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Campus Lagarto-SE. A obtenção dos triterpenos ocorreu através do fracionamento do extrato bruto dos galhos de *Himatanthus obovatus* por meio de cromatografia clássica, seguido da identificação das substâncias isoladas por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Os demais produtos químicos e outras drogas aqui mencionadas foram obtidas das seguintes empresas: Sigma-Aldrich® EUA, Vetec® Brasil, Labtest® Brasil, Bioclin® Brasil e Venco® Brasil.

#### 4.2.1. Preparação dos Compostos

O veneno de *B. jararacussu* foi dissolvido em solução tampão fosfato salino (PBS) estabelecendo um volume máximo de 50 $\mu\text{l}$  por aplicação. Os triterpenos foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 2,5%, utilizando Agitador Vortex e Processador Ultrassônico para total dissolução do composto, sendo posteriormente

diluído em solução PBS e estabelecendo um volume máximo de 500 µl por aplicação. O veneno foi administrado por via intramuscular (IM) e os triterpenos foram administrados por via intraperitoneal (IP).

### 4.3. Grupos experimentais

#### 4.3.1. Experimento para determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) do veneno

A toxicidade da peçonha de *B. jararacussu* foi avaliada por meio de determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) por via IM, no qual o veneno foi inoculado na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo de cada animal, sendo no total 04 doses avaliadas. A escolha das doses foi realizada com base em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa. Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em grupos de 10 animais, sendo a classificação desses grupos realizada da seguinte forma:

- Grupo 10mg/kg  
Animais receberam administração única do veneno de *B. jararacussu* na dose de 10mg/kg na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N=10).
- Grupo 15mg/kg  
Animais receberam administração única do veneno de *B. jararacussu* na dose de 15mg/kg na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N=10).
- Grupo 20mg/kg  
Animais receberam administração única do veneno de *B. jararacussu* na dose de 20mg/kg na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N=10).
- Grupo 40mg/kg  
Animais receberam administração única do veneno de *B. jararacussu* na dose de 40mg/kg na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N=10).

Após a aplicação do veneno observou-se por um período de 04 horas as alterações comportamentais e fisiológicas ocorridas nos animais. A taxa de sobrevivência foi

observada nos períodos de 24hs e 48hs após a inoculação do veneno. Os animais sobreviventes foram eutanasiados após indução anestésica dissociativa (xilazina dose: 10mg/kg; cetamina dose: 100mg/kg) via IP seguido de exsanguinação por cardiocentese. Com os números de óbitos de cada grupo descritos em porcentagem determinou-se a  $DL_{50}$  pelo método de probito, utilizando a tabela de Finney (1952). Nesta tabela, cada número de porcentagem (de 1 a 99,9 %) corresponde a um número de probito. Uma curva de dose de veneno (eixo x) vs. número de probito (eixo y) foi feita por regressão linear e a dose correspondente ao número de probito 5 (que corresponde à dose mediana) foi obtida.

#### 4.3.2. *Experimento Atividade in vivo do Veneno*

Para a avaliação da atividade *in vivo* do veneno realizou-se um experimento de determinação do tempo de injúria renal aguda com o intuito de otimizar o protocolo experimental de tratamento. Para tanto, foram realizados envenenamentos seguidos de eutanásia após os períodos de 06, 12, 24, 72 e 96 horas, utilizando a dose de 80% da  $DL_{50}$  via IM obtida no experimento anterior. Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos da seguinte forma:

- Grupo controle

Animais receberam administração de solução salina (NaCl a 0,9%) em um volume de 50 $\mu$ l na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N de cada grupo = 6; N total = 30).

- Grupo veneno

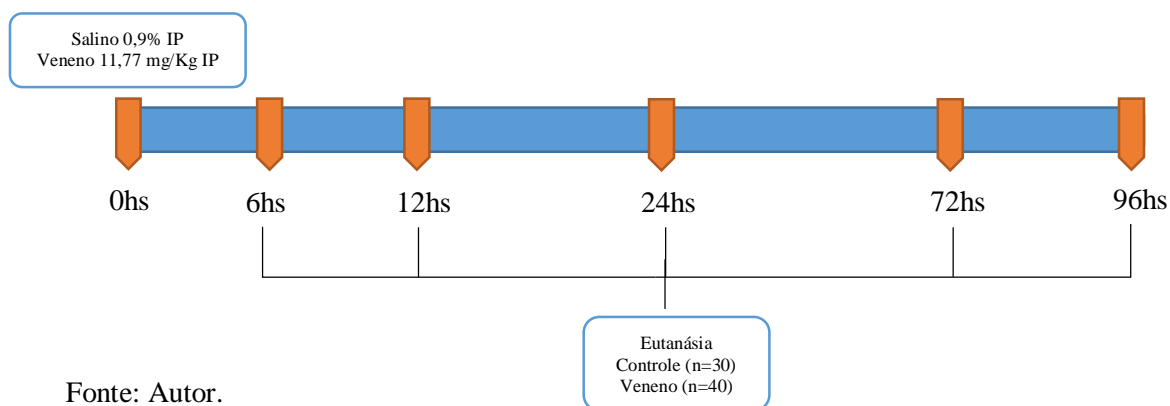
Animais receberam administração única do veneno de *B. jararacussu* na dose de 80% da  $DL_{50}$  dissolvido em solução tampão fosfato salino (PBS) em um volume de 50 $\mu$ l na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM; N de cada grupo = 8; N total = 40).

##### 4.3.2.1. **Desenho experimental – Atividade *in vivo* do veneno**

Para a avaliação da atividade *in vivo* do veneno, os animais foram conduzidos e mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o experimento (**Figura 7**), onde inicialmente passaram por um período de 48h de adaptação. Ao término desse período de adaptação à gaiola metabólica, os animais receberam aplicações de salina (NaCl a

0,9%) ou veneno da serpente *B. jararacussu* (dose de 80% da  $DL_{50}$ ) em dose única na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM). Após o período experimental selecionado (06, 12, 24, 72, 96h) os animais receberam anestesia dissociativa com xilazina (dose: 10 mg/Kg) e cetamina (dose: 100 mg/Kg) via IP seguido de exsanguinação por cardiocentese, onde as amostras de sangue total foram coletadas em seringas estéreis lavadas com solução de heparina a 10% (100 µl de heparina em 900 µl de solução salina 0,9%) e, em seguida, armazenadas em microtubos para posteriores análises hematológicas. Constatado o óbito dos animais realizou-se necropsia por meio de laparotomia abdominal no qual coletou-se rins e músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo. Os tecidos coletados foram pesados, seccionados e direcionados para suas posteriores análises. Os rins direito e os músculos gastrocnêmio foram armazenados em formol tamponado a 10% para posterior análise histopatológica. Os rins esquerdo foram armazenados em microtubos estéreis e congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises de estresse oxidativo. Foram mensurados os volumes de água ingerido durante o período de envenenamento. As amostras de urina das últimas 24 horas pós-envenenamento que estavam acumuladas nos tubos coletores das gaiolas metabólicas foram coletadas e mensuradas (exceto grupos 6h e 12h, onde coletou-se amostras de urina 6h e 12h pós-envenenamento). As amostras de sangue e urina foram centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga refrigerada, sendo seus sobrenadantes transferidos para microtubos estéreis e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas.

**Figura 7** — Desenho experimental, atividade *in vivo* do veneno.



Fonte: Autor.

#### 4.3.3. Experimento Tratamento / Lesão in-vivo

Após selecionado o período experimental de 12h como o melhor modelo experimental a induzir uma injúria renal aguda, resultado esse obtido no experimento anterior, realizou-se então o experimento tratamento para a avaliação do efeito nefroprotetor dos triterpenos. Para tanto, os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos da seguinte forma:

- Grupos controle
  - Salina / DMSO: Animais receberam administração única de solução salina (NaCl a 0,9%) em um volume de 50 µl na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM), após 03h (1ª aplicação) e 09h (2ª aplicação) foi administrado DMSO (2,5%) diluído em solução PBS em um volume de 500 µl via IP (N=6).
  - Salina / Triterpenos: Animais receberam administração única de solução salina (NaCl a 0,9%) em um volume de 50 µl na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM), após 03h (1ª aplicação) e 09h (2ª aplicação) foram administrado os ácidos ursólico e oleanólico (dose: 75mg/kg) em um volume de 500 µl via IP (N=6).
  - *B. jararacussu* / DMSO: Animais receberam administração única de veneno de *B. jararacussu* (dose: 80% da DL<sub>50</sub>) em um volume de 50 µl na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM), após 03h (1ª aplicação) e 09h (2ª aplicação) foi administrado DMSO (2,5%) em um volume de 500 µl via IP (N=8).
- Grupos tratamento
  - *B. jararacussu* / Triterpenos: Animais receberam administração única de veneno de *B. jararacussu* (dose: 80% da DL<sub>50</sub>) em um volume de 50 µl na porção lateral do músculo gastrocnêmio do membro posterior esquerdo (via IM), após 03h (1ª aplicação) e 09h (2ª aplicação) foi administrado os ácidos

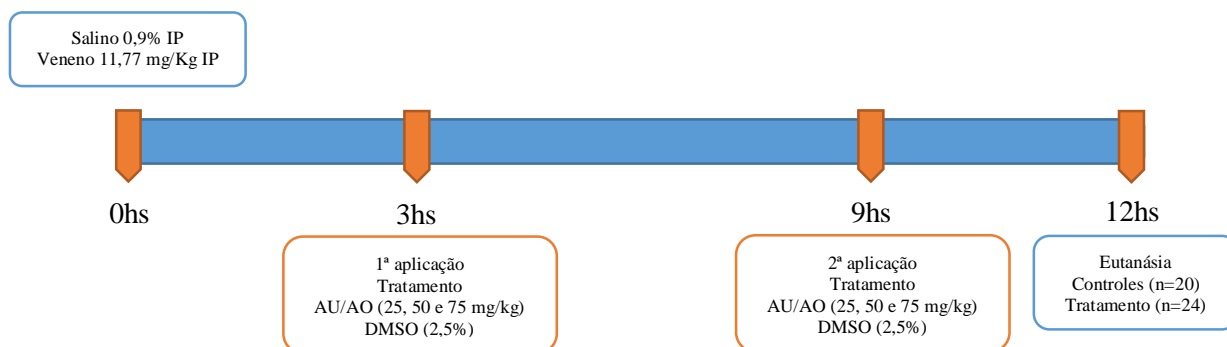


ursólico e oleanólico (doses: 25, 50, 75 mg/kg) em um volume de 500 µl via IP (N de cada grupo por dose = 8; N total = 24).

#### 4.3.3.1. Desenho Experimental Tratamento / Lesão *in-vivo*

Para a avaliação da atividade *in vivo* dos ácidos ursólico e oleanólico no modelo de injúria renal aguda induzida pelo veneno de *B. jararacussu* os animais foram conduzidos e mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o experimento (**Figura 8**), onde inicialmente passaram por um período de 24h de adaptação. Ao término desse período de adaptação à gaiola metabólica, os animais receberam aplicações únicas de salina (0,9% de cloreto de sódio) ou veneno da serpente *B. jararacussu* (11,77 mg/Kg, dose equivalente a 80% da DL<sub>50</sub> estabelecida no experimento anterior) na porção lateral do músculo gastrocnêmio (via IM). Após 3h da inoculação do veneno realizou-se a primeira aplicação do tratamento, DMSO (2,5%) ou AU/AO, sendo a segunda aplicação realizada 9h após inoculação do veneno. Transcorrido o período experimental de 12h os animais receberam anestesia dissociativa com xilazina (dose: 10mg/Kg) e cetamina (dose: 100mg/Kg) via IP seguido de exsanguinação por cardiocentese, onde as amostras de sangue total foram coletadas em seringas estéreis lavadas com solução de heparina a 10% (100µl de heparina em 900µl de solução salina 0,9%) e em seguida armazenadas em microtubos para posteriores análises. Constatado o óbito dos animais realizou-se necropsia por meio de laparotomia abdominal no qual coletou-se os rins. Os tecidos coletados foram pesados, seccionados e direcionados para suas posteriores análises. Os rins direitos foram armazenados em formol tamponado a 10% para posterior análise histopatológica. Os rins esquerdos foram armazenados em microtubos estéreis e congelados em freezer -80°C para posteriores análises de estresse oxidativo e expressão gênica. Foram mensurados os volumes de água ingerido durante o período de envenenamento. As amostras de urina que estavam acumuladas nos tubos coletores das gaiolas metabólicas foram mensuradas e coletadas. As amostras de sangue e urina foram centrifugadas a 4500 rpm por 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada, sendo seus sobrenadantes transferidos para microtubos estéreis e armazenados em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas. Os parâmetros fisiológicos foram normalizados pelo peso corporal do animal.

**Figura 8** — Desenho experimental, tratamento com triterpenos.



Fonte: Autor.

#### 4.4. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

As amostras de plasma de ambos os experimentos (atividade *in vivo* e tratamento) foram submetidas a dosagem de ureia (UR), creatinina (CRE) e creatina quinase (CK) pelos kits Ureia UV Liquiform, Creatinina-k Cinética, e CK NAC, comercialmente fornecido pelas fabricantes Labtest® e Bioclin®. Nas amostras de urina do experimento atividade *in vivo* de veneno foi dosada albumina urinária pelo kit Microalbuminúria da fabricante Bioclin®. Nas amostras de urina de ambos os experimentos foram dosadas proteínas urinárias pelo kit SensiProt da fabricante Labtest®. A creatinina urinária também foi mensurada pelo kit Creatinina-K acima citado. As análises bioquímicas foram realizadas tanto no experimento atividade *in vivo* do veneno quanto no experimento tratamento, sendo o equipamento utilizado o Analisador Bioquímico Automático modelo BS-120 (Mindray®). Os protocolos de diagnóstico seguiram as recomendações do fabricante e os resultados foram expressos em mg/L (albumina urinária), mg/dL (ureia, creatinina e proteína urinária) e U/L (creatina quinase). Os resultados bioquímicos foram normalizados pelo peso corporal do animal.

#### 4.5. Avaliação da Função Renal: Clearance de Creatinina

As creatininas plasmática e urinária foram mensuradas por meio do método de Jaffé modificado, utilizando o kit citado anteriormente. A função renal dos animais foi avaliada através da estimativa da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) pelo *clearance* de creatinina (ml/min/Kg) calculado da seguinte forma (YAMABE et al., 2007):

$$ClCr = \left[ \frac{CrU \times VU}{CrP} \right] \times \left[ \frac{1000}{Peso} \right] \times \left[ \frac{1}{1440} \right]$$

Onde:

**ClCr** = resultado em mL/min/kg

**CrU** = concentração urinária de creatinina (mg/dL)

**VU** = volume de urina (mL)

**CrP** = concentração plasmática de creatinina (mg/dL)

**Peso** = peso do animal em gramas

A avaliação da função renal foi realizada nos experimentos atividade *in vivo* do veneno e no experimento tratamento. A TFG foi normalizada pelo peso corporal do animal.

#### 4.6. Avaliação do Dano Tubular: Gama-GT urinária

O dano tubular foi verificado por meio de avaliação da atividade da enzima Gama Glutamil Transferase na urina dos animais (HENNEMANN et al., 1997; GUIMARÃES, 2000; MELCHERT et al., 2007). Foi utilizado o kit comercial Gama GT Liquiform da fabricante Labtest®. As recomendações do fabricante em relação aos protocolos de diagnóstico foram levadas em consideração e os resultados foram obtidos em U/L e expressos U/mg de creatinina. Segundo estudos anteriores, essa razão nos possibilita retirar a interferência da variação do fluxo urinário o qual pode causar erros na interpretação dos valores da Gama GT (GUIMARÃES, 2000). A avaliação de dano tubular foi realizada nos experimentos atividade *in vivo* do veneno e tratamento. O gama-GT urinário foi normalizado pelo peso corporal do animal.

#### **4.7. Avaliação Eritrocitária**

As amostras de sangue total coletadas em microtubos estéreis foram submetidas à análise eritrocitária em um analisador hematológico veterinário modelo SDH-3 VET (Labtest®) para obtenção dos parâmetros eritrocitários incluindo contagens globais de hemácias (He), determinação do hematócrito (Ht) e concentração de hemoglobina (Hb). A partir dos valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e distribuição de células vermelhas (RDW). A avaliação eritrocitária foi realizada no experimento atividade *in vivo* do veneno.

#### **4.8. Avaliação do Dano Oxidativo: MDA renal**

O malondialdeído é um composto orgânico resultado da peroxidação lipídica, sendo detectável a partir da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para confirmar a presença de dano oxidativo direto nos tecidos o grau de lipoperoxidação foi mensurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, conforme o método de OHKAWA et al (1979). Foi feito um homogenato a 10% (100mg/1ml) de tecido renal em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Em seguida foi coletado 250 µL do homogenato e adicionado 1,5 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. As amostras seguiram para banho fervente (95-100 °C) por 45 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 2 mL de n-butanol. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugadas a 1200 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação retirou-se a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (520-535 nm). Os resultados de MDA foram expressos em nmol/mg de tecido. A dosagem de MDA foi realizada no experimento atividade *in vivo* do veneno e no experimento tratamento. Os resultados do MDA renal foram normalizados pelo peso corporal do animal.

#### **4.9. Avaliação da Atividade Antioxidante: GSH renal**

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

das alterações no conteúdo tecidual de glutathiona reduzida utilizou-se um homogenato a 10% de tecido renal em solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M. Foram adicionados 80 µL de água destilada + 20 µL de ácido tricloro acético (TCA) 50% em 100 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato). O material foi agitado em vórtex e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi retirado e alocado em outro microtubos estéril, no qual foi adicionado 200 µL de tampão tris 0,4M (pH 8,9) + 10 µL de solução de DTNB. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 412 nm e os resultados foram expressos em µg/mg de tecido. A dosagem de GSH foi realizada no experimento atividade *in vivo* do veneno e no experimento. Os resultados do GSH renal foram normalizados pelo peso corporal do animal.

#### **4.10. Avaliação da atividade de MPO**

A mieloperoxidase (MPO) é um enzima presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica e apresenta papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A análise de MPO consistiu em avaliar um marcador de invasão neutrofílica tecidual. As amostras de tecido renal foram homogeneizadas com brometo de hexadecitrimetilamônio a 0,5% (HTAB; pH 6,0) em tampão de fosfato de potássio para preparar um homogenato a 10%. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm por 7 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1% como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é degradado ocorre a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em um composto de cor marrom (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos em unidades de MPO por miligramas (UMPO/mg de tecido). A dosagem de MPO foi realizada no experimento atividade *in vivo* do veneno e no experimento tratamento. Os resultados da atividade de MPO no tecido renal foram normalizados pelo peso corporal do animal.

#### **4.11. Análise histopatológica**

Os tecidos coletados no estudo foram seccionados transversalmente e armazenados em cassetes histológicos imersos em formol 10% tamponado por 48 horas. Logo após esse período os tecidos foram armazenados em álcool 70% até o processo de fixação. Posteriormente o material foi processado para exame histopatológico em

processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), seguido de desidratação em concentrações crescentes de 70 a 100% de álcool etílico. Após o processamento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. Os tecidos já incluídos em blocos de parafina foram seccionados em cortes de 5µm de espessura e colocados em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina e posteriormente registradas por meio de fotomicrografias.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica convencional e a avaliação foi realizada por histopatologista habilitado. A análise histopatológica clássica foi realizada no experimento atividade *in vivo* do veneno (tecido renal e muscular).

#### **4.12. Avaliação de Marcadores por PCR Quantitativo em Tempo Real**

##### *4.12.1. Extração do RNA total*

As amostras foram congeladas a -80 °C até o momento da extração. Realizou-se um homogenato com trizol (Sigma Aldrich ® EUA), onde cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal estéril, e macerado por meio do equipamento Tissuelyzer LT® (Qiagen, EUA) seguido de centrifugação a 4°C na velocidade 12000G por 15 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a este adicionamos 200 uL de 1-Bromo-3-Cloropropano (BCP, Sigma Aldrich ® EUA). Essa solução foi vortexada por 15 segundos e, em seguida, foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a extração centrifugando a última solução em temperatura de 4°C na velocidade de 12000G por um tempo de 15 minutos. Após centrifugação o sobrenadante transparente, que continha o RNA foi cuidadosamente coletado e aplicado em um novo microtubo de 1,5 mL (aproximadamente 500 uL). A este sobrenadante adicionou-se 500 uL de isopropanol, seguido de vortexação e centrifugação a 4°C na velocidade de 12000G por um tempo de 20 minutos. Terminada esta última centrifugação observamos um precipitado de RNA. Este precipitado foi lavado com 1mL de álcool etílico a 75% consistindo de adição do álcool, vortexação por 15 segundos e centrifugação por 5 min na temperatura de 4°C na velocidade de 7500G. Este processo foi repetido 3 vezes. Após a terceira lavagem retirou-se completamente o álcool do microtubo e permitiu-se que o conteúdo líquido fosse completamente evaporado. Após a

finalização do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA) com a finalidade de verificar qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

#### 4.12.2. Síntese de cDNA

O RNA total isolado armazenado a -80 °C seguiu para a síntese de cDNA por meio do GoScript cDNA Synthesis Kit (PROMEGA®, Wisconsin, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 2,0 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do GoScript Reaction Buffer (solução constituída de oligonucleotídeos tampão salino e oligo dT), 500 ng/µL de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até 20µL com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador Veriti Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

#### 4.12.3. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A transcrição relativa dos genes, molécula de injúria renal-1 (KIM-1), inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2), NAD(P)H desidrogenase [quinona-1] (NQO-1), Superóxido Dismutase Citosólica (SOD1s), Interleucina 18 (IL-18) e Clusterina foi realizada através do equipamento QuantStudio 5 Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, EUA). Usamos os genes codificadores para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) e proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano polipeptídeo zeta (YWHAZ) como genes de referência. A **Tabela 1** mostra as sequências dos iniciadores de DNA (primers) dos genes investigados, que foi obtida no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foram utilizados 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA, Wisconsin, EUA), 1,0 µL de cada iniciador (0,8 nM) e 1,0 µL de cDNA das amostras, completando com água livre de nuclease até um volume final de 15µL. Inicialmente a enzima foi ativada por um período de 2 minutos a uma temperatura de 95°C. Em seguida, todos os 45 ciclos transcorridos tiveram uma etapa de desnaturação por 15 segundos a 95°C seguido de um passo de anelamento e extensão por 1 minuto a uma temperatura de 60°C. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à

curva de fusão, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a não formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico. Para tanto a temperatura foi acrescida em 0,05°C a cada 5 segundos iniciando em 60°C até 95 °C. Os dados foram obtidos com o software do sistema QuantiStudio 5.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativo de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$  como descrito por Livak e Schmittgen (2001). A avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real foi realizada apenas para os experimentos envolvendo o estudo dos efeitos dos triterpenos.

**Tabela 1:** Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados (gene de referência: GAPDH; YWHAZ).

Gene	Sequência dos iniciadores		Nº NCBI
	Senso 5'- 3'	Antisenso 5'- 3'	
KIM-1	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA	NM_134248.2
NQO-1	GGAAGCTGCAGACCTGGTGA	CCTTTCAGAATGGCTGGCA	NM_008706.5
TIMP-2	TGGGACACGCTTAGCATCAC	CGGGGAGGAGATGTAGCAAG	NM_011594.3
SOD1s	GGACAATACACAAGGCTGTACC	CAGTCACATTGCCCAGGTCTC	NM_011434.2
IL-18	GACAACCTTGGCCGACTTCA	CTGGGGTTCACTGGCACTTT	NM_008360.2
Clusterina	GCATACCTGCATGAAGTTCTAT	GTAGAAGGGTGAGCTCTGGTTT	NM_013492.2
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	NM_008084.3
YWHAZ	GAAAAGTTCTTGATCCCCAATGC	TGTGACTGGTCCACAATTCCTT	NM_011740.3

Fonte: autor; KIM-1: molécula de injúria renal-1; NQO-1: NAD(P)H desidrogenase [quinona-1]; TIMP-2: inibidor tecidual de metaloproteinase-2; SOD1s: Superóxido dismutase 1; IL-18: Interleucina 18; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, YWHAZ: proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano polipetídeo zeta.

#### 4.13. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism®, versão 6.0. Para o experimento atividade *in vivo* do veneno realizou-se estatística descritiva seguido do teste t de Student. Para o experimento tratamento realizou-se estatística descritiva seguido de teste de comparações múltiplas por meio de análise de variância (ANOVA) e teste Bonferroni's (dados paramétricos) ou aplicação do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn's (dados não paramétricos). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $P < 0,05$ .

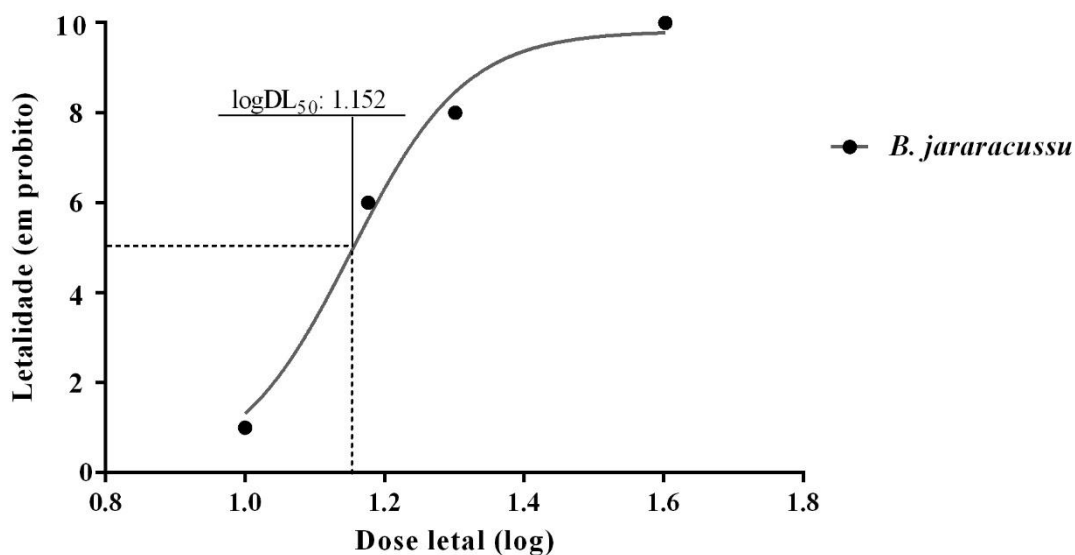


## 5. RESULTADOS

### 5.1. DL<sub>50</sub> intramuscular de *B. jararacussu*

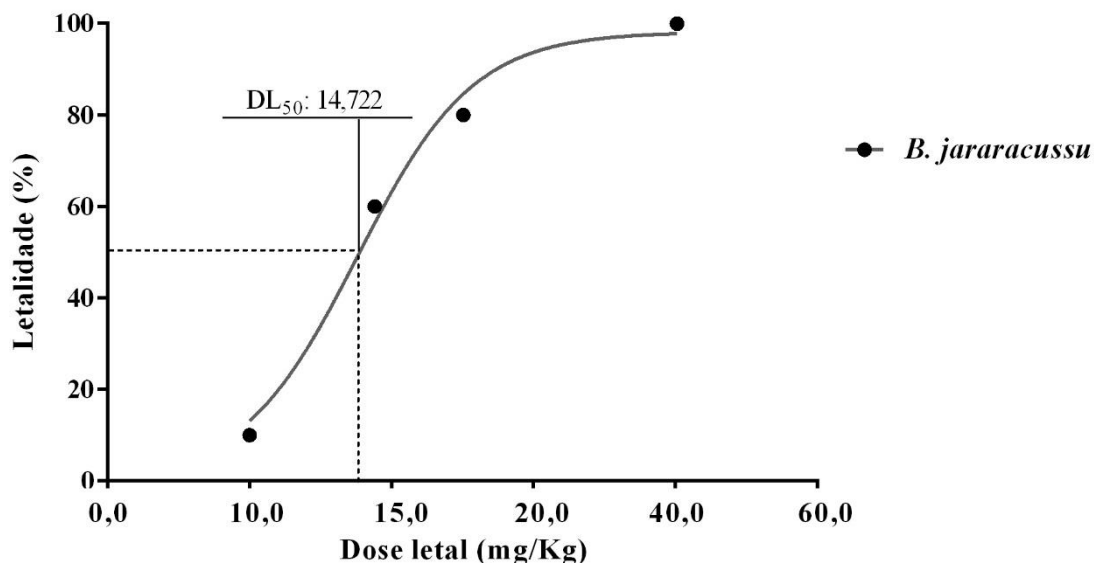
Realizou-se inicialmente a determinação da DL<sub>50</sub> intramuscular para estabelecer a dose de veneno capaz de levar a óbito 50% de uma população em teste. As doses testadas foram 10, 15, 20 e 40 mg/kg administradas por via IM em dose única. Os resultados a seguir apresentam os dados encontrados e justificam a escolha da dose de veneno utilizada nos experimentos posteriores.

**Figura 9** — Determinação da letalidade mediana em probito de veneno de *B. jararacussu* por via intramuscular em camundongos.



Resultado apresentando em curva dose-resposta obtida por meio de método probito. No eixo Y vê-se a letalidade em probito (de 1 a 10), sendo a dose letal mediana localizada no valor 5 de probito, e no eixo X a dose letal em log. R<sup>2</sup> de *B. jararacussu* (0,98).

**Figura 10** — Determinação da  $DL_{50}$  em porcentagem da peçonha de *B. jararacussu* por via intramuscular em camundongos.



Resultado apresentando em curva dose-resposta obtida por meio de método probito. No eixo Y vê-se a letalidade em porcentagem (de 0 a 100%), sendo a dose letal mediana localizada no valor 50%, e no eixo X a dose letal em mg/Kg.  $R^2$  de *B. jararacussu* (0,98).

Como mostra as **Figuras 9 e 10**, nos resultados obtidos houve as seguintes constatações: a dose de 40 mg/Kg resultou no óbito de 100% do grupo, a dose de 20 mg/Kg resultou em óbito de 80% do grupo; a dose de 15 mg/kg resultou em óbito de 60% do grupo e a dose de 10 mg/Kg resultou em óbito de 10% do grupo. Diante desses dados, foi estabelecido por meio do método de probito uma  $DL_{50}$  via intramuscular na dose de 14,72 mg/Kg.

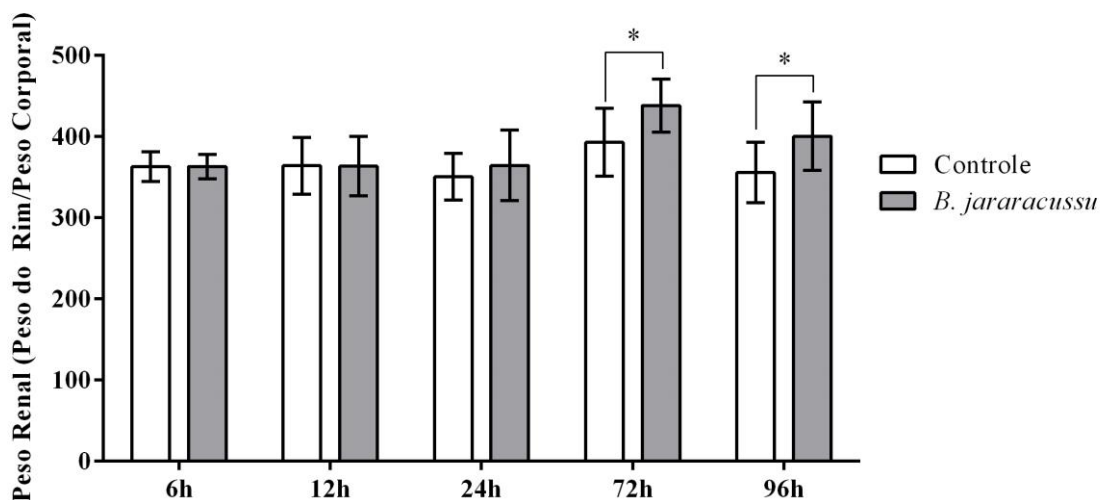
## 5.2. Atividade do veneno *in vivo*

Para a atividade *in vivo* do veneno de *B. jararacussu* optou-se por utilizar uma dose de veneno equivalente a 80% da  $DL_{50}$  via intramuscular estabelecida no experimento anterior, ou seja, a dose de 11,77mg/Kg. Acredita-se que a dose escolhida seja capaz de induzir IRA nos animais sem levá-los à óbito. Os tempos de envenenamento testados foram 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. Os resultados a seguir apresentam os dados encontrados e justificam a escolha do tempo de envenenamento que melhor apresente IRA e, assim, ser utilizado no experimento tratamento com os ácidos ursólico e oleanólico.

### 5.2.1. Determinação dos parâmetros fisiológicos

A **Figura 11** apresenta os valores de peso renal mensurados após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas no peso renal entre os grupos veneno nos tempos 6h ( $363,1 \pm 14,82$  mg), 12h ( $363,6 \pm 36,47$  mg) e 24h ( $364,7 \pm 43,37$  mg) em relação aos seus respectivos controles ( $363,1 \pm 15,57$  mg;  $364,1 \pm 34,92$  mg e  $350,6 \pm 28,99$  mg). Todavia, houve aumento significativo do peso de tecido renal nos animais envenenados nos tempos 72h ( $438,4 \pm 32,82$  mg) e 96h ( $400,5 \pm 42,11$  mg) quando comparados aos seus respectivos controles ( $393,1 \pm 41,99$  mg;  $355,7 \pm 37,39$  mg). Os rins direito e esquerdo foram pesados juntos e os resultados expressos em mg.

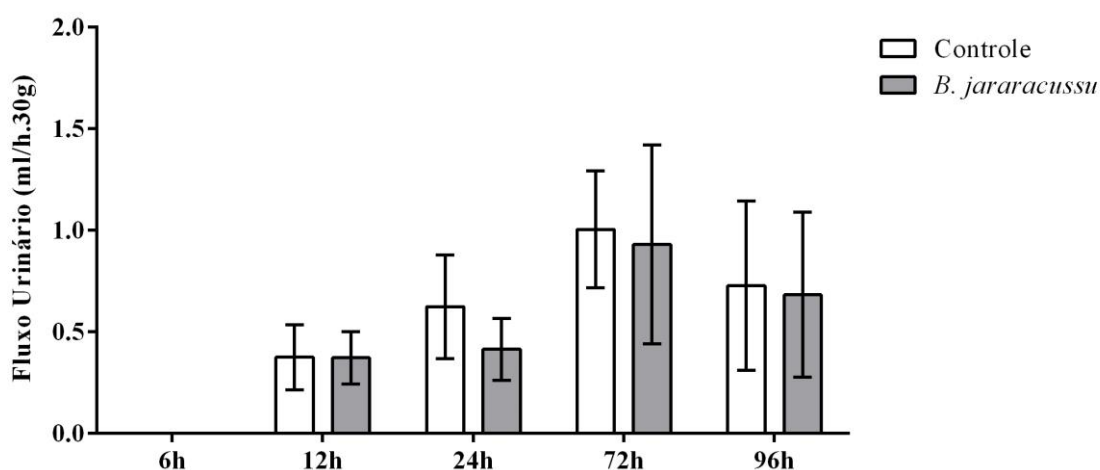
**Figura 11** — Avaliação do peso renal no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos pesos renais de animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* após os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

A **Figura 12** apresenta os volumes de urina excretada, presente nos tubos coletores das gaiolas metabólicas durante o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas no volume de urina excretado entre os grupos veneno nos tempos 12h ( $0,37 \pm 0,12$  ml), 24h ( $0,41 \pm 0,15$  ml), 72h ( $0,93 \pm 0,48$  ml) e 96h ( $0,68 \pm 0,40$  ml) em relação aos seus respectivos controles ( $0,37 \pm 0,16$  ml;  $0,62 \pm 0,25$  ml;  $1,00 \pm 0,28$  ml;  $0,72 \pm 0,41$  ml). Os animais dos grupos veneno e controle no tempo de 6h não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas.

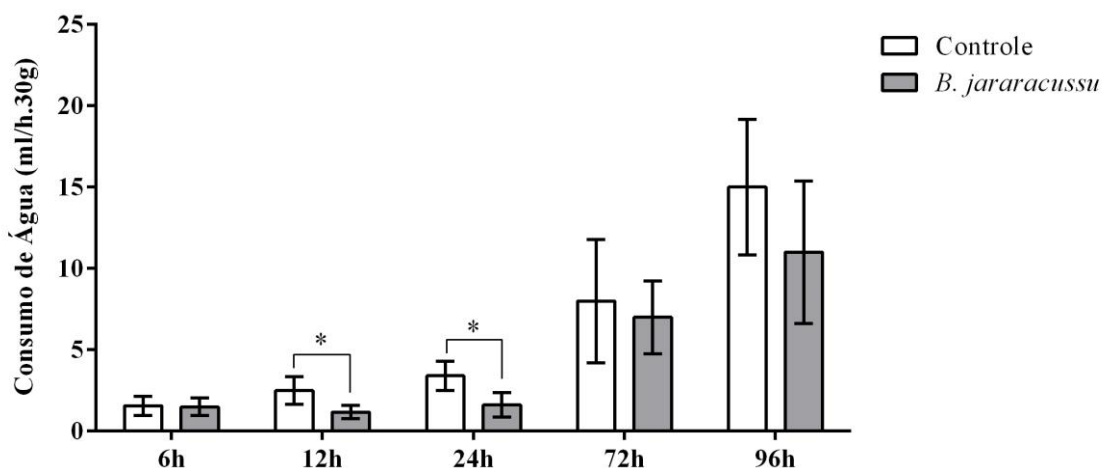
**Figura 12** — Fluxo urinário no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão do volume de urina excretada dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 12h, 24h, 72h e 96h. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

A **Figura 13** apresenta os volumes de água ingerida (presente nos frascos de água das gaiolas metabólicas) pelos animais durante o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas no volume de água ingerida entre os grupos veneno nos tempos 6h ( $1,50 \pm 0,53$  ml), 72h ( $7,00 \pm 2,23$  ml) e 96h ( $11,00 \pm 4,38$  ml) em relação aos seus respectivos controles ( $1,56 \pm 0,58$  ml;  $8,00 \pm 3,79$  ml;  $13,33 \pm 3,05$  ml). No entanto, houve diminuição significativa do volume de água ingerida pelos animais envenenados nos tempos 12h ( $1,16 \pm 0,40$  ml) e 24h ( $1,62 \pm 0,74$  ml) relacionados aos seus respectivos controles ( $2,50 \pm 0,83$  ml;  $3,40 \pm 0,89$  ml).

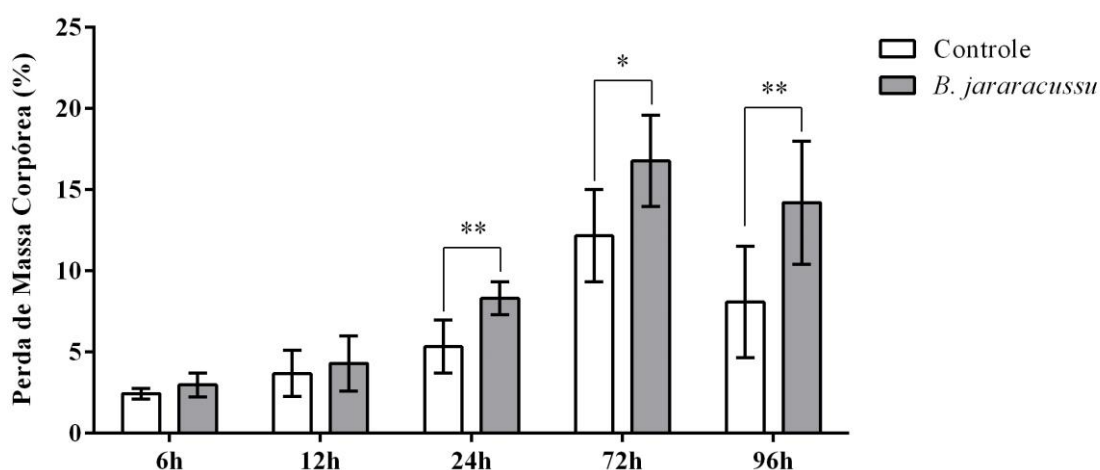
**Figura 13** — Avaliação do consumo de água no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão do volume de água ingerida pelos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

A **Figura 14** apresenta a perda de peso dos animais após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas dos grupos veneno nos tempos 6h ( $2,98 \pm 0,72\%$ ), e 12h ( $4,30 \pm 1,69\%$ ) em relação aos seus respectivos controles ( $2,44 \pm 0,32\%$ ;  $3,68 \pm 1,41\%$ ). Porém, houve aumento significativo nos animais veneno nos tempos 24h ( $8,31 \pm 1,01\%$ ), 72h ( $16,78 \pm 2,82\%$ ) e 96h ( $14,20 \pm 3,79\%$ ) quando comparados aos seus respectivos controles ( $5,33 \pm 1,64\%$ ;  $11,33 \pm 2,48\%$ ;  $8,08 \pm 3,44\%$ ).

**Figura 14** — Comparação da perda de massa corpórea no envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

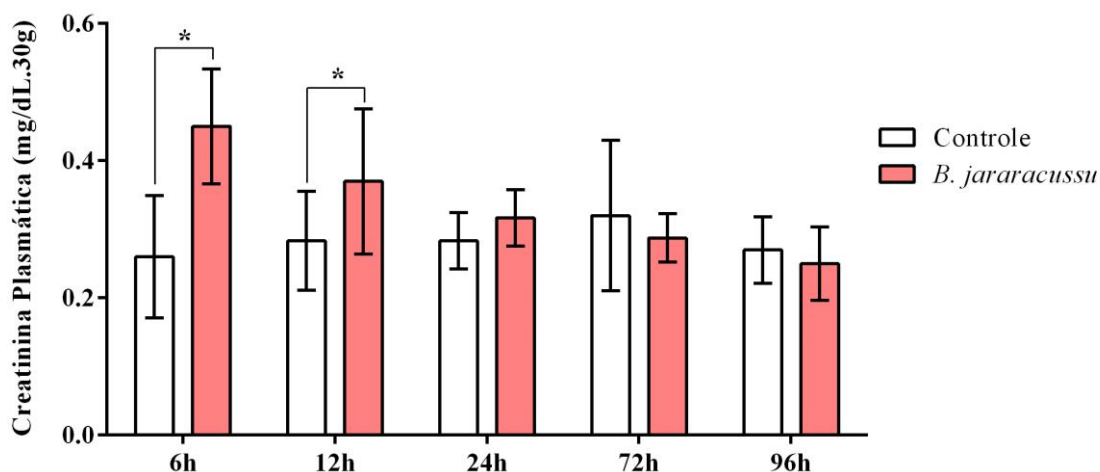


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da perda de peso dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos

A **Figura 15** apresenta as concentrações de creatinina plasmática após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas para a creatinina plasmática entre os grupos veneno nos tempos 24h ( $0,31 \pm 0,04$  mg/dL), 72h ( $0,28 \pm 0,035$  mg/dL) e 96h ( $0,25 \pm 0,05$  mg/dL) em relação aos seus respectivos controles ( $0,28 \pm 0,04$  mg/dL;  $0,32 \pm 0,10$  mg/dL;  $0,27 \pm 0,04$  mg/dL). Entretanto, houve aumento significativo nas concentrações de creatinina plasmática dos grupos veneno nos tempos 6h ( $0,45 \pm 0,08$  mg/dL) e 12h ( $0,37 \pm 0,10$  mg/dL) quando comparados aos seus respectivos controles ( $0,26 \pm 0,08$  mg/dL;  $0,28 \pm 0,07$  mg/dL).

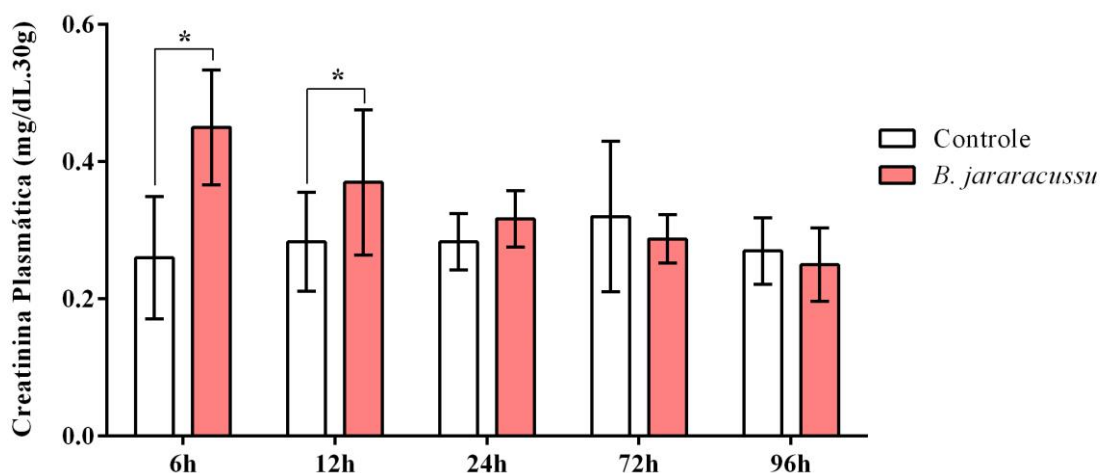
**Figura 15** — Análise dos níveis plasmáticos de creatinina no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis séricos de creatinina dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

A **Figura 16** apresenta as concentrações de ureia plasmática após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas para a ureia plasmática entre os grupos veneno nos tempos 24h ( $53,00 \pm 18,28$  mg/dL), 72h ( $30,71 \pm 4,57$  mg/dL) e 96h ( $28,88 \pm 7,14$  mg/dL) em relação aos seus respectivos controles ( $27,33 \pm 4,03$  mg/dL;  $27,00 \pm 6,48$  mg/dL;  $28,00 \pm 4,61$  mg/dL). Porém, houve aumento significativo nas concentrações de ureia plasmática dos grupos veneno nos tempos 6h ( $125,00 \pm 15,16$  mg/dL) e 12h ( $119,60 \pm 43,06$  mg/dL) quando comparados aos seus respectivos controles ( $32,00 \pm 2,44$  mg/dL;  $31,50 \pm 10,12$  mg/dL).

**Figura 16** — Identificação dos níveis plasmáticos de ureia no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

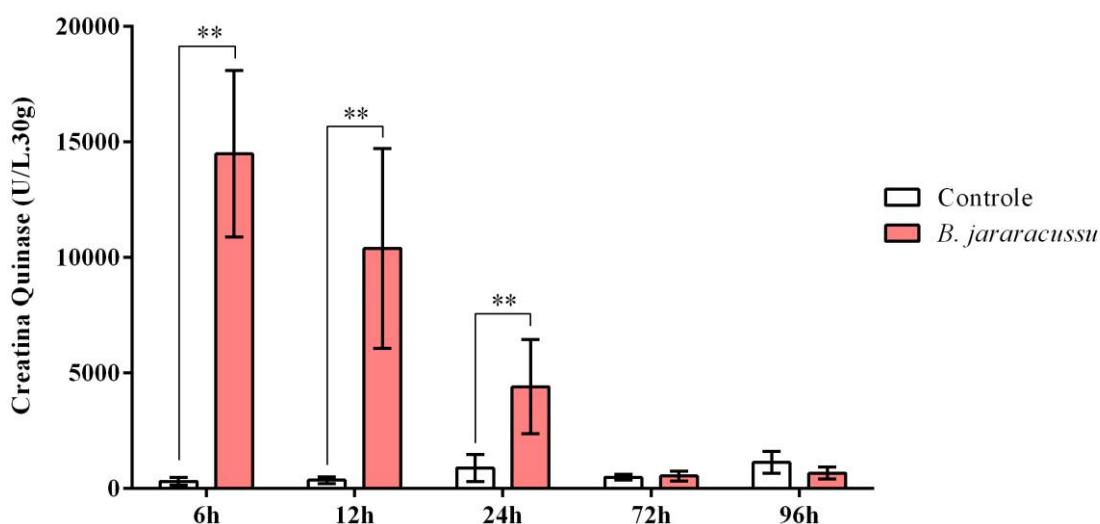


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis séricos de ureia dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*\*P<0,01 em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.



A **Figura 17** apresenta as concentrações de creatina quinase plasmática após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas creatina quinase entre os grupos veneno nos tempos 72h ( $546,20 \pm 211,20$  U/L) e 96h ( $672,40 \pm 264,20$  U/L) em relação aos seus respectivos controles ( $487,40 \pm 126,70$  U/L;  $1133,00 \pm 469,70$  U/L). Contudo, houve aumento significativo nas concentrações de creatina quinase dos grupos veneno nos tempos 6h ( $14487,00 \pm 3605,00$  U/L), 12h ( $10396,00 \pm 4329,00$  U/L) e 24h ( $3607,00 \pm 524,90$  U/L) quando comparados aos seus respectivos controles ( $285,60 \pm 139,90$  U/L;  $364,40 \pm 144,20$  U/L;  $855,40 \pm 516,00$  U/L).

**Figura 17** — Determinação dos níveis plasmáticos de creatina quinase no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

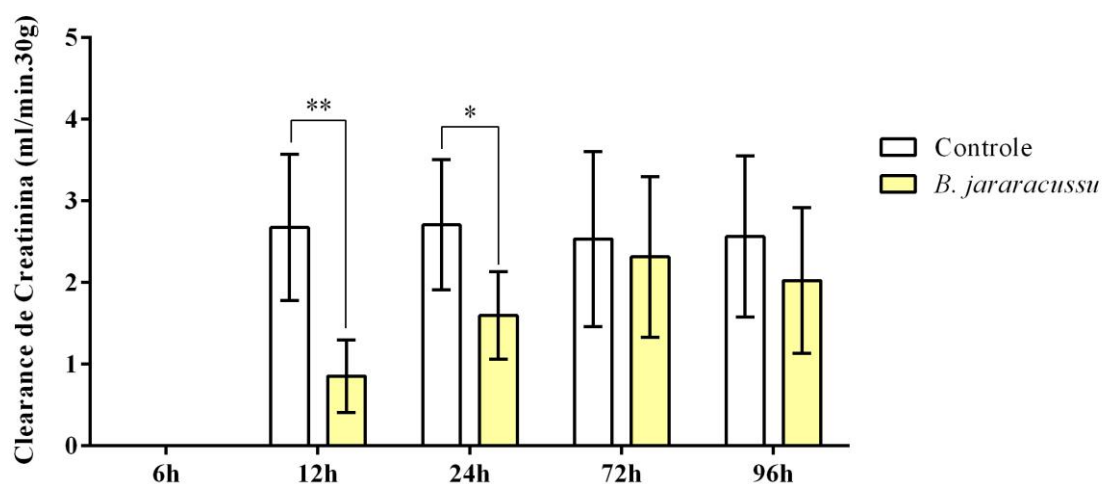


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis séricos de creatina quinase dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.3. Análise da função renal

A função renal foi analisada por meio do *clearance* de creatinina. Como podemos notar na **Figura 18**, houve redução dos valores nos grupos venenos nos tempos 12h ( $0,85 \pm 0,44$  ml/min/Kg) e 24h ( $1,59 \pm 0,53$  ml/min/Kg) quando comparados aos seus respectivos controles ( $2,67 \pm 0,89$  ml/min/Kg;  $2,70 \pm 0,79$  ml/min/Kg). Não houve diferença entre os grupos veneno nos tempos 72h ( $2,31 \pm 0,98$  ml/min/Kg) e 96h ( $2,02 \pm 0,89$  ml/min/Kg) quando comparados aos seus respectivos controles ( $2,53 \pm 1,07$  ml/min/Kg;  $2,56 \pm 0,98$  ml/min/Kg). Os animais dos grupos veneno e controle no tempo de 6h não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, não sendo possível dessa forma realizar o *clearance* de creatinina nesses grupos.

**Figura 18** — Efeito do veneno de *B. jararacussu* via intramuscular na taxa de filtração glomerular em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.

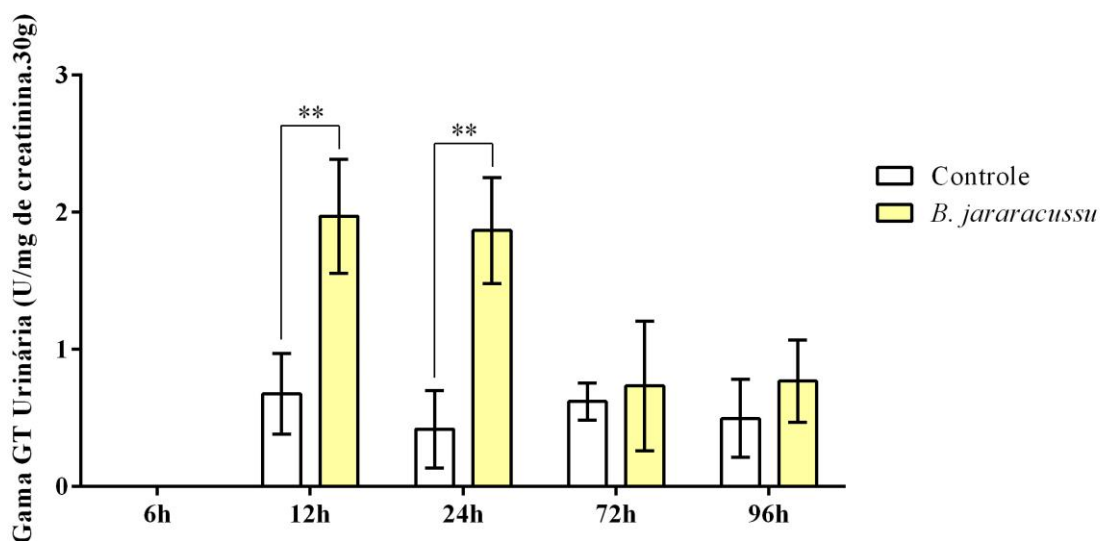


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão do *clearance* de creatinina dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

#### 5.2.4. Análise do dano tubular

O dano tubular foi analisado pela excreção/atividade da enzima gama glutamil transferase (Gama-GT) na urina. Como demonstrado na **Figura 19**, houve aumento para os animais dos grupos veneno nos tempos 12h ( $1,97 \pm 0,41$  U/mg de creatinina) e 24h ( $1,86 \pm 0,38$  U/mg de creat.), ambos em relação aos respectivos grupos controles ( $0,67 \pm 0,29$  U/mg de creat.;  $0,41 \pm 0,28$  U/mg de creat.). Não houve diferença nos valores urinários dos animais envenenados nos tempos 72h ( $0,61 \pm 0,43$  U/mg de creat.) e 96h ( $0,76 \pm 0,29$  U/mg de creat.) quando comparados aos valores dos seus respectivos grupos controles ( $0,74 \pm 0,22$  U/mg de creat.;  $0,49 \pm 0,28$  U/mg de creat.). Os animais dos grupos veneno e controle no tempo de 6h não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, não sendo possível dessa forma realizar análise de Gama-GT urinário nesses grupos.

**Figura 19** — Efeito do veneno de *B. jararacussu* via intramuscular nas concentrações urinárias de Gama glutamil transferase (Gama-GT) em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.

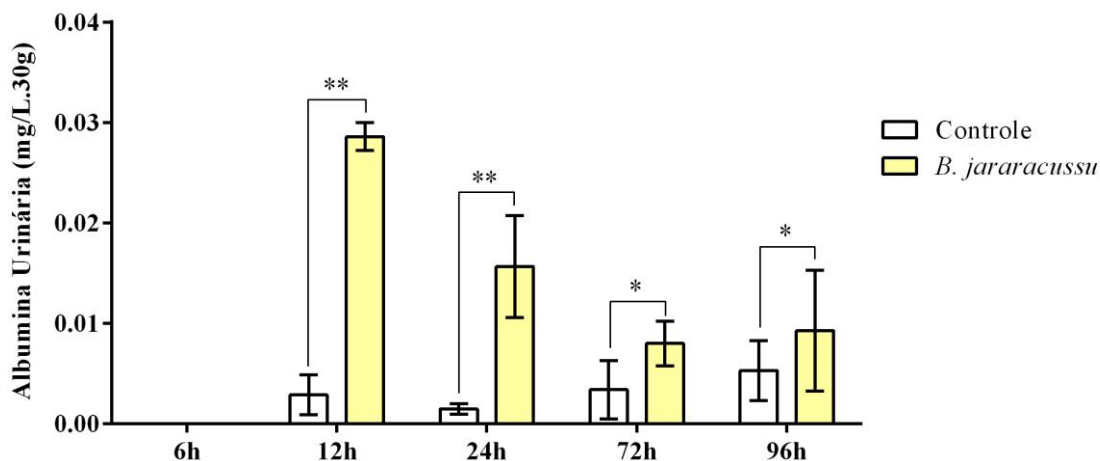


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão atividade de Gama-GT urinária dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 12h, 24h, 72h e 96h \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.5. Análise da microalbuminúria e proteinúria

Avaliamos a perda de albumina urinária. Como apresentado na **Figura 20**, houve aumento da excreção de albumina na urina dos animais dos grupos venenos em todos os tempos analisados, 12h ( $0,028 \pm 0,002$  mg/L), 24h ( $0,017 \pm 0,002$  mg/L), 72h ( $0,008 \pm 0,002$  mg/L) e 96h ( $0,013 \pm 0,007$  mg/L), quando comparados aos seus respectivos grupos controles ( $0,002 \pm 0,001$  mg/L;  $0,001 \pm 0,000$  mg/L;  $0,003 \pm 0,002$  mg/L;  $0,005 \pm 0,002$  mg/L). Os animais dos grupos veneno e controle no tempo de 6h não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, não sendo possível dessa forma realizar análise de albumina urinária nesses grupos.

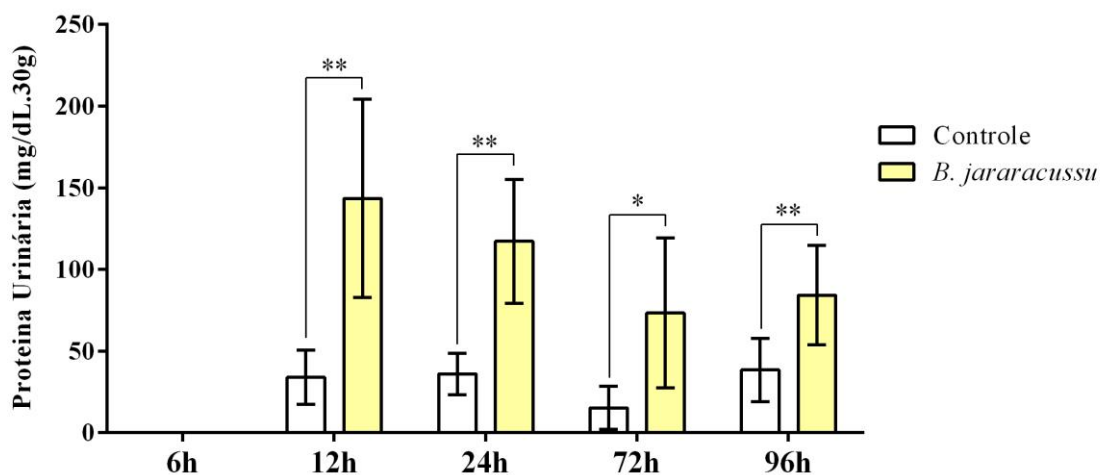
**Figura 20** — Efeito do veneno de *B. jararacussu* via intramuscular nas concentrações de albumina urinária em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão atividade de albumina urinária dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

Avaliamos também as concentrações de proteína urinária. Como podemos observar na **Figura 21**, houve aumento da excreção de proteína na urina dos animais dos grupos venenos em todos os tempos analisados, 12h ( $143,50 \pm 60,59$  mg/dL), 24h ( $117,20 \pm 37,83$  mg/dL), 72h ( $73,40 \pm 46,01$  mg/dL) e 96h ( $84,25 \pm 30,45$  mg/dL), quando comparados aos seus respectivos grupos controles ( $34,02 \pm 16,74$  mg/dL;  $35,97 \pm 12,85$  mg/dL;  $23,27 \pm 23,03$  mg/dL;  $38,41 \pm 19,22$  mg/dL). Os animais dos grupos veneno e controle no tempo de 6h não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, não sendo possível dessa forma realizar análise de proteína urinária nesses grupo.

**Figura 21** — Efeito do veneno de *B. jararacussu* via intramuscular nas concentrações de proteína urinária em camundongos, nos tempos de 12h, 24h, 72h e 96h.

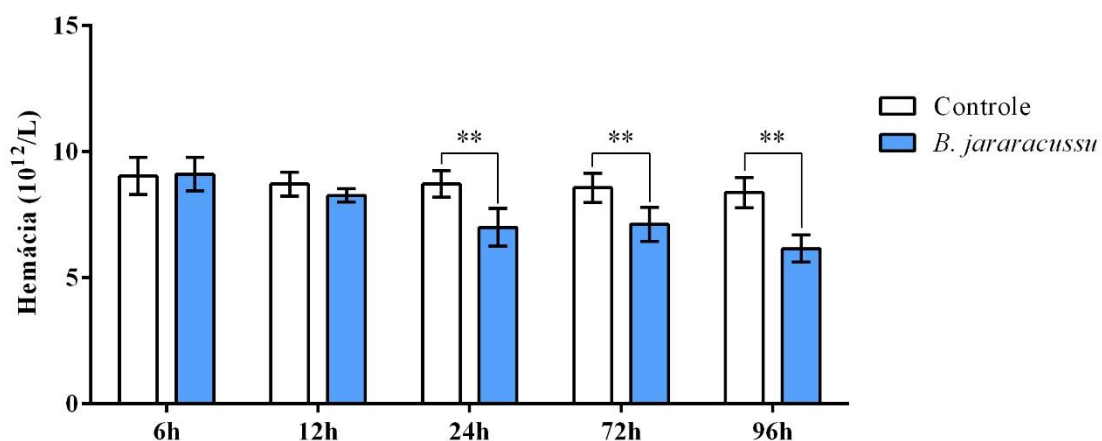


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão atividade de proteína urinária dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.6. Determinação dos parâmetros eritrocitários

Avaliamos o perfil eritrocitário dos animais envenenados por veneno de *B. jararacussu* nos tempos analisados. A **Figura 22** apresenta as concentrações de hemácia após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de He nos grupos veneno nos tempos 6h ( $9,10 \pm 0,66 \cdot 10^{12}/L$ ) e 12h ( $8,26 \pm 0,25 \cdot 10^{12}/L$ ) em relação aos seus respectivos controles ( $9,03 \pm 0,74 \cdot 10^{12}/L$ ;  $8,71 \pm 0,46 \cdot 10^{12}/L$ ). No entanto, houve redução significativa nos grupos veneno nos tempos 24h ( $6,99 \pm 0,75 \cdot 10^{12}/L$ ), 72h ( $7,12 \pm 0,68 \cdot 10^{12}/L$ ) e 96h ( $6,15 \pm 0,54 \cdot 10^{12}/L$ ) quando comparados aos seus respectivos controles ( $8,71 \pm 0,52 \cdot 10^{12}/L$ ;  $8,56 \pm 0,58 \cdot 10^{12}/L$ ;  $8,37 \pm 0,60 \cdot 10^{12}/L$ ).

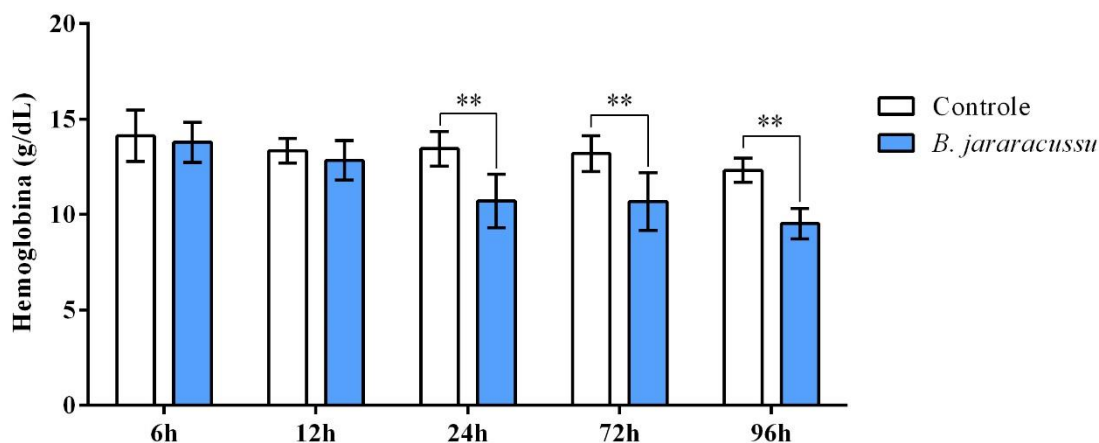
**Figura 22** — Avaliação da contagem de hemácias no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de hemácia dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*\*P<0,01 em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

Podemos observar na **Figura 23** os valores de hemoglobina plasmática após o período de envenenamento nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças significativas nos grupos veneno nos tempos 6h ( $13,79 \pm 1,04$  g/dL) e 12h ( $12,83 \pm 1,03$  g/dL) em relação aos seus respectivos controles ( $14,12 \pm 1,34$  g/dL;  $13,35 \pm 0,64$  g/dL). No entanto, houve redução significativa nos grupos veneno nos tempos 24h ( $10,71 \pm 1,39$  g/dL), 72h ( $10,69 \pm 1,50$  g/dL) e 96h ( $9,52 \pm 0,78$  g/dL) quando comparados aos seus respectivos controles ( $13,45 \pm 0,90$  g/dL;  $13,20 \pm 0,94$  g/dL;  $12,32 \pm 0,63$  g/dL).

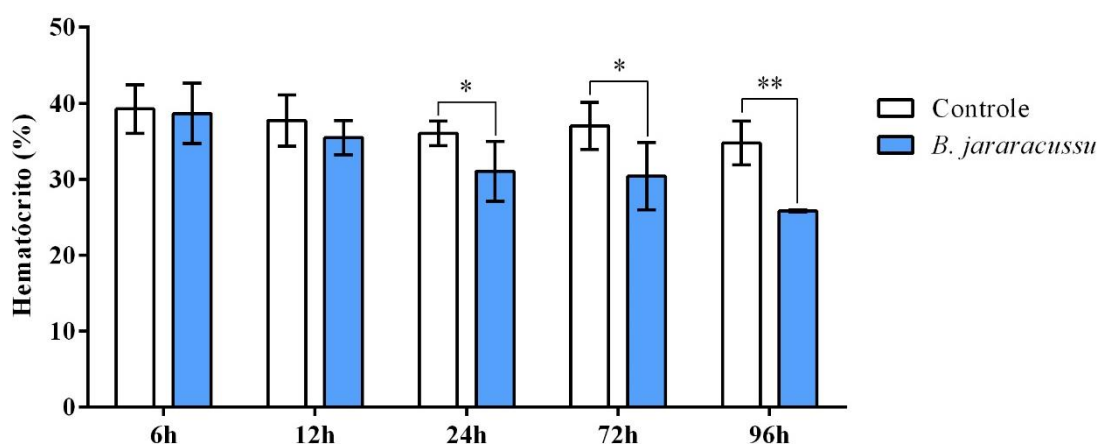
**Figura 23** — Avaliação dos níveis de hemoglobina no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de hemoglobina plasmática dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.  $**P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

Como mostra a **Figura 24** os níveis de hematócrito não apresentaram diferenças significativas nos grupos veneno nos tempos 6h ( $37,65 \pm 2,98$  %) e 12h ( $35,48 \pm 2,22$  %) em relação aos seus respectivos controles ( $39,26 \pm 3,20$  %;  $37,74 \pm 3,35$  %). No entanto, houve redução significativa nos grupos veneno nos tempos 24h ( $31,06 \pm 3,94$  %), 72h ( $30,41 \pm 4,41$  %) e 96h ( $25,84 \pm 0,16$  %) quando comparados aos seus respectivos controles ( $36,05 \pm 1,64$  %;  $37,03 \pm 3,10$  %;  $34,75 \pm 2,89$  %).

**Figura 24** — Avaliação do hematócrito no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

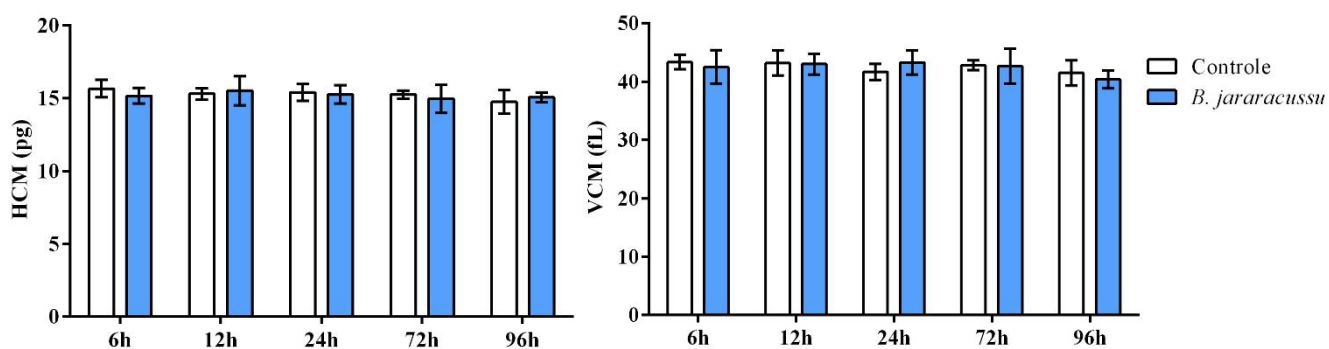


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de hematócrito dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.



Nota-se na **Figura 25** que os níveis de VCM e HCM não apresentaram diferenças significativas nos grupos veneno em todos os tempos analisados: 6h (VCM  $42,50 \pm 2,87$  fL; HCM  $15,18 \pm 0,54$  pg), 12h (VCM  $43,00 \pm 1,78$  fL; HCM  $15,52 \pm 1,00$  pg), 24h (VCM  $43,29 \pm 2,05$  fL; HCM  $15,26 \pm 0,63$  pg), 72h (VCM  $42,63 \pm 2,97$  fL; HCM  $14,96 \pm 0,97$  pg) e 96h (VCM  $40,40 \pm 1,51$  fL; HCM  $15,08 \pm 0,34$  pg) em relação aos seus respectivos controles (VCM  $43,33 \pm 1,21$  fL;  $43,17 \pm 2,13$  fL;  $41,67 \pm 1,36$  fL;  $42,80 \pm 0,83$  fL;  $41,50 \pm 2,17$  fL; HCM  $15,67 \pm 0,59$  pg;  $15,30 \pm 0,38$  pg;  $15,42 \pm 0,58$  pg;  $15,26 \pm 0,27$  pg;  $14,76 \pm 0,78$  pg).

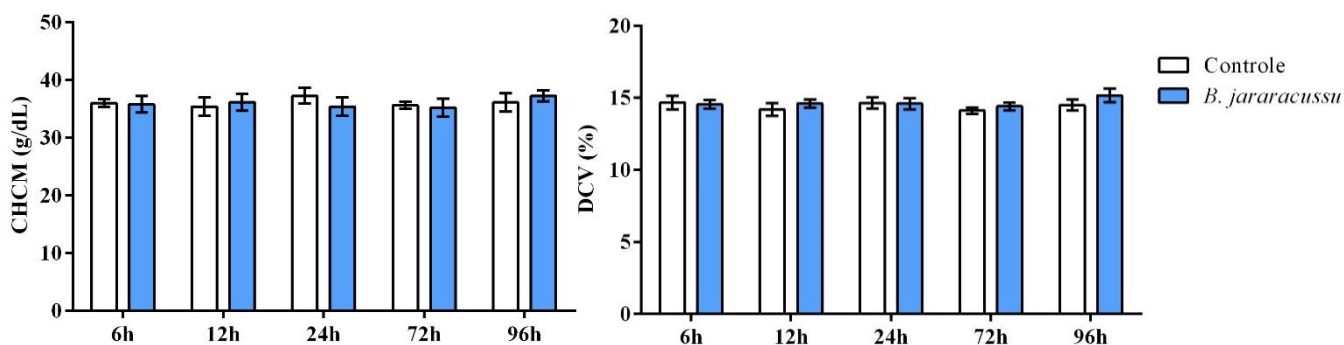
**Figura 25** — Avaliação do VCM e HCM no envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de VCM e HCM dos animais



envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*P<0,05 ou \*\*P<0,01 em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

A **Figura 26** apresenta os níveis de CHCM e RDW. Os valores não apresentaram diferenças significativas nos grupos veneno em todos os tempos analisados: 6h (CHCM  $35,79 \pm 1,42$  g/dL; RDW  $14,54 \pm 0,31$  %), 12h (CHCM  $36,18 \pm 1,46$  g/dL; RDW  $14,62 \pm 0,27$  %), 24h (CHCM  $35,42 \pm 1,62$  g/dL; RDW  $14,60 \pm 0,38$  %), 72h (CHCM  $35,21 \pm 1,56$  g/dL; RDW  $14,41 \pm 0,25$  %) e 96h (CHCM  $37,28 \pm 0,98$  g/dL; RDW  $15,18 \pm 0,47$  %) em relação aos seus respectivos controles (CHCM  $36,03 \pm 0,67$  g/dL;  $35,42 \pm 1,59$  g/dL;  $37,28 \pm 1,36$  g/dL;  $35,64 \pm 0,57$  g/dL;  $36,13 \pm 1,58$  g/dL; RDW  $14,68 \pm 0,47$  %;  $14,20 \pm 0,44$  %;  $14,65 \pm 0,38$  %;  $14,12 \pm 0,21$  %;  $14,73 \pm 0,49$  %).

**Figura 26** — Avaliação do CHCM e RDW no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

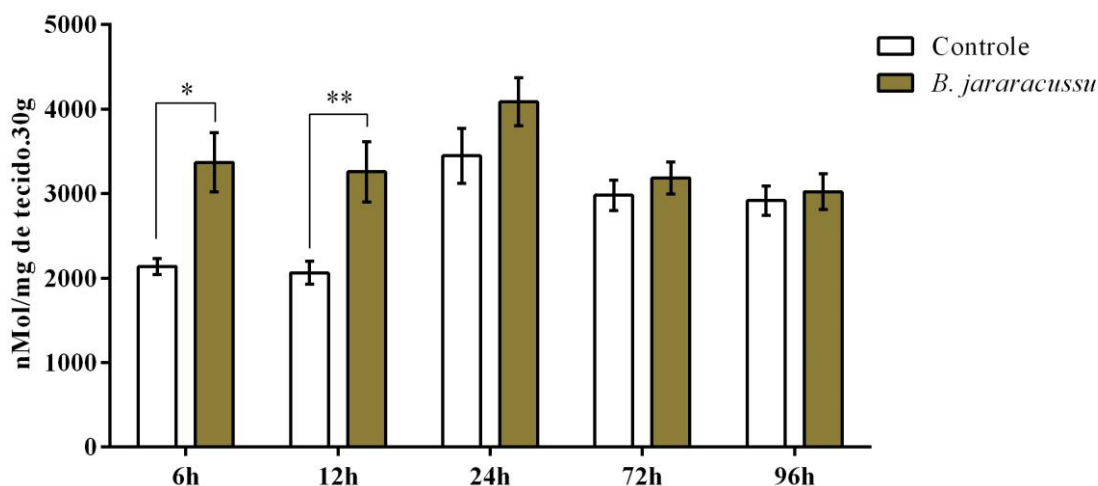


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de CHCM e RDW dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.7. Determinação dos níveis de MDA no tecido renal

Como observado na **Figura 27** não houve diferença nas concentrações de MDA no tecido renal dos animais envenenados nos tempos 24h ( $4085 \pm 695,8$  nmol/mg de tecido), 72h ( $3188 \pm 536,5$  nmol/mg de tecido) e 96h ( $3023 \pm 515,4$  nmol/mg de tecido) em relação aos seus respectivos controles ( $3448 \pm 726,7$  nmol/mg de tecido;  $2980 \pm 437,7$  nmol/mg de tecido;  $2917 \pm 418,6$  nmol/mg de tecido). No entanto, houve aumento significativo nos grupos veneno nos tempos 6h ( $3370 \pm 991,2$  nmol/mg de tecido) e 12h ( $3260 \pm 796,6$  nmol/mg de tecido) em relação aos seus respectivos controles ( $2138 \pm 230,6$  nmol/mg de tecido;  $2063 \pm 330,3$  nmol/mg de tecido).

**Figura 27** — Avaliação dos níveis de MDA no envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

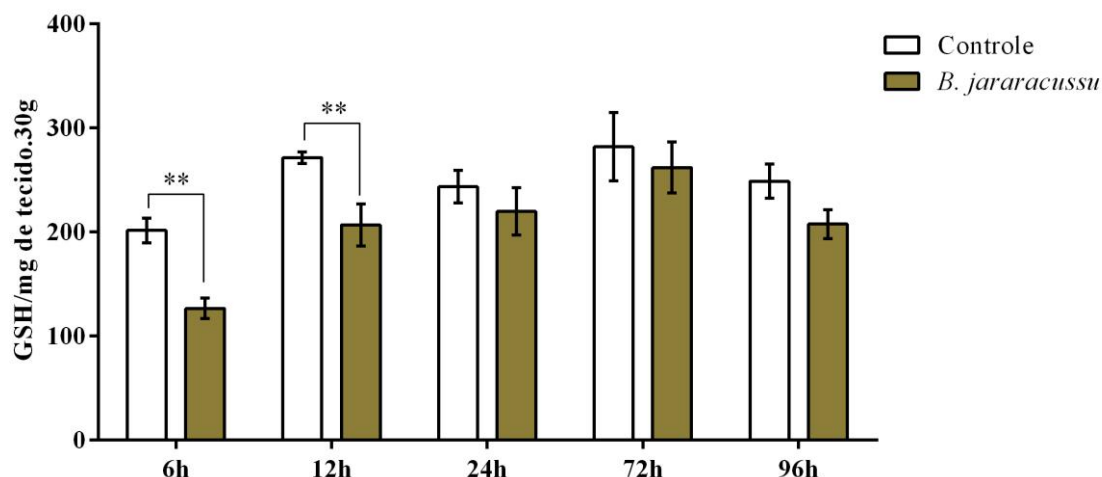


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de MDA dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \* $P < 0,05$  ou \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.8. Determinação dos níveis de GSH no tecido renal

A **Figura 28** demonstra que não houve diferença nas concentrações de GSH no tecido renal dos animais envenenados nos tempos 24h ( $219,9 \pm 55,66$  GSH/mg de tecido), 72h ( $244,4 \pm 46,81$  GSH/mg de tecido) e 96h ( $207,6 \pm 36,18$  GSH/mg de tecido) em relação aos seus respectivos controles ( $243,7 \pm 34,84$  GSH/mg de tecido;  $282,1 \pm 73,37$  GSH/mg de tecido;  $248,9 \pm 43,46$  GSH/mg de tecido). No entanto, houve redução significativa nos grupos veneno nos tempos 6h ( $126,7 \pm 25,91$  GSH/mg de tecido) e 12h ( $206,8 \pm 50,02$  GSH/mg de tecido) em relação aos seus respectivos controles ( $201,5 \pm 26,08$  GSH/mg de tecido;  $267,3 \pm 10,20$  GSH/mg de tecido).

**Figura 28** — Avaliação dos níveis de GSH no envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.

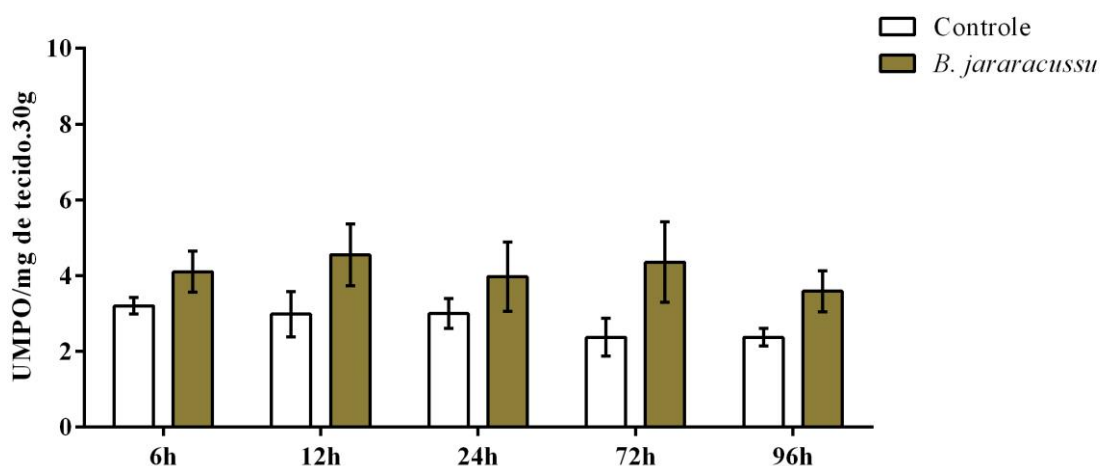


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis de GSH dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.9. Determinação da atividade de MPO no tecido renal

Podemos notar na **Figura 29** que não houve diferença nas concentrações de MPO no tecido renal dos animais envenenados em todos os tempos analisados: 6h ( $4,10 \pm 1,32$  UMPO/mg de tecido), 12h ( $4,55 \pm 1,99$  UMPO/mg de tecido), 24h ( $4,23 \pm 1,85$  UMPO/mg de tecido), 72h ( $4,36 \pm 2,60$  UMPO/mg de tecido) e 96h ( $3,59 \pm 1,32$  UMPO/mg de tecido) em relação aos seus respectivos controles ( $3,20 \pm 0,52$  UMPO/mg de tecido;  $2,54 \pm 1,43$  UMPO/mg de tecido;  $2,99 \pm 0,87$  UMPO/mg de tecido;  $2,00 \pm 0,91$  UMPO/mg de tecido;  $2,37 \pm 0,56$  UMPO/mg de tecido).

**Figura 29** — Avaliação da atividade de MPO no envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das concentrações de MPO dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student.

### 5.2.10. Avaliação histopatológica dos tecidos renal e muscular

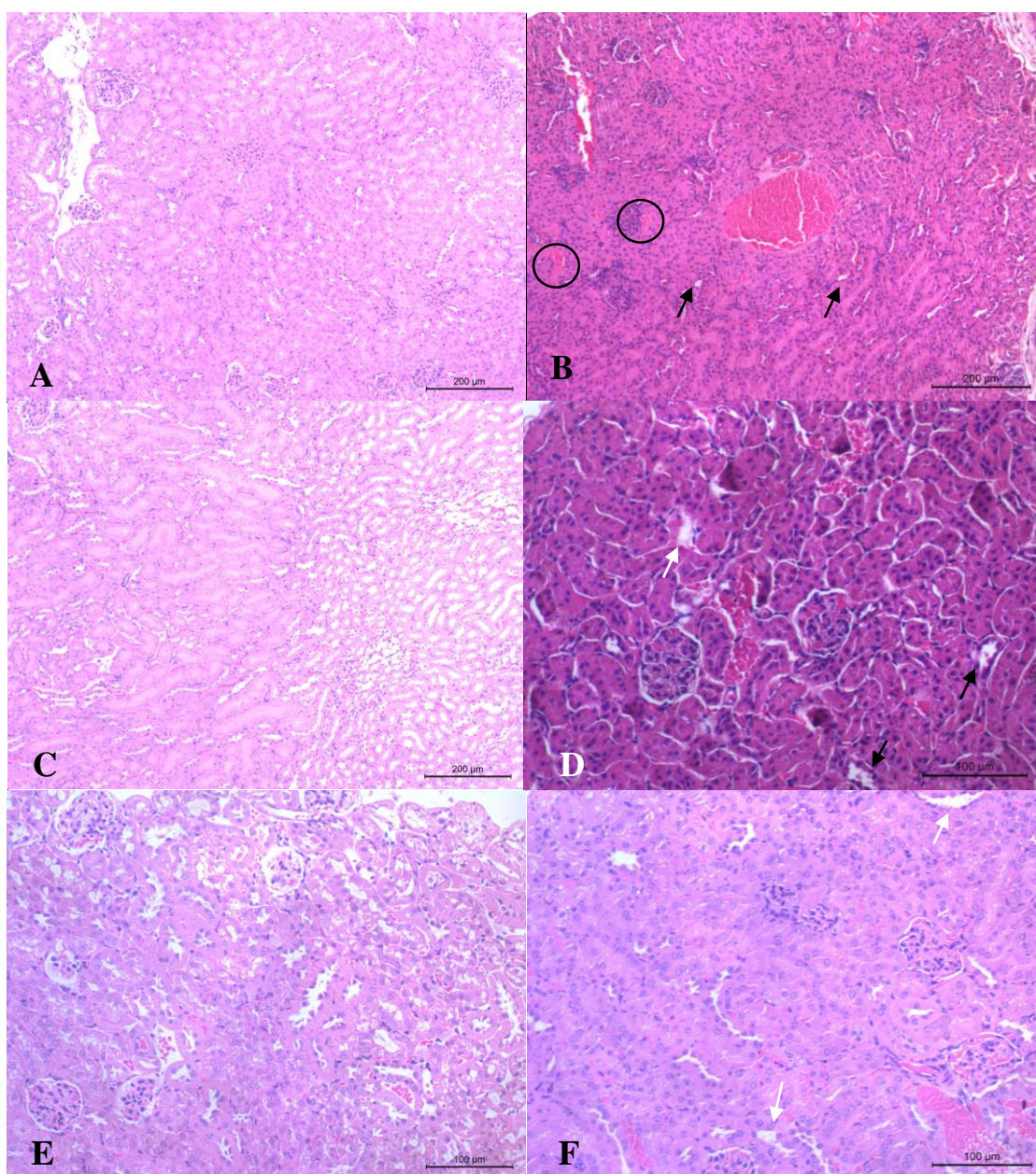
A **Figura 30** apresenta a análise histopatológica do tecido renal dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. A análise histopatológica do tecido renal revelou, nos grupos controles de todos os tempos analisados, estrutura glomerular, arquitetura cortical e medular preservadas e túbulos com morfologia normal contendo células epiteliais preservadas, como pode ser visualizado nas **Figuras 30A, 30C, 30E, 30G e 30I**.

De acordo com a **Figura 30B**, o grupo 6h veneno apresentou estruturas glomerulares com presença de congestão e edema. Observou-se no grupo 12h veneno representado pela **Figura 30D**, marcante tumefação, edema e vacuolização do epitélio

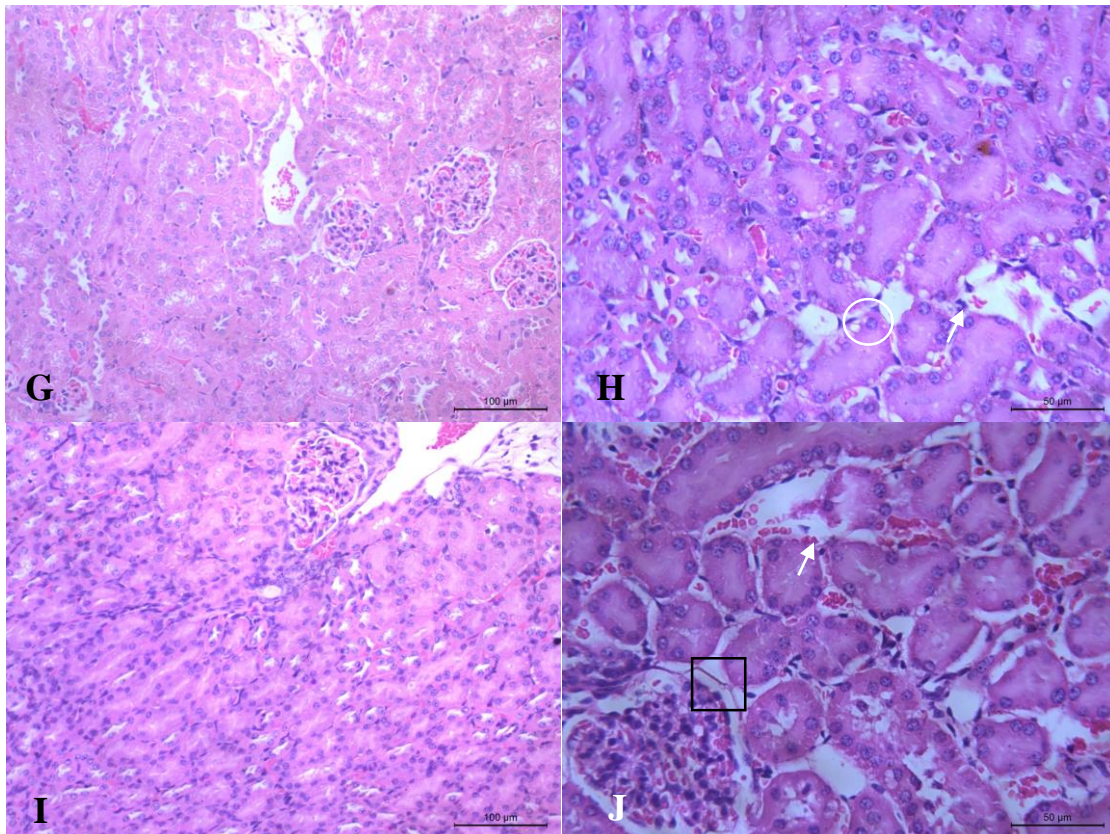


tubular. A **Figura 30F** apresentou no grupo 24h veneno alterações caracterizadas pela presença de ductos dilatados contendo acúmulos de remanescentes celulares eosinofílicos luminiais. A **Figura 30H** representa o grupo 72h veneno, e mostra além de dilatação tubular, degeneração e necrose de células epiteliais tubulares com consequente ectasia. O grupo 96h veneno está apresentado na **Figura 30J** e apresentou além de necrose de células epiteliais tubulares áreas focais de perda de borda em escova.

**Figura 30** — Alterações histopatológicas do tecido renal em camundongos após envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.







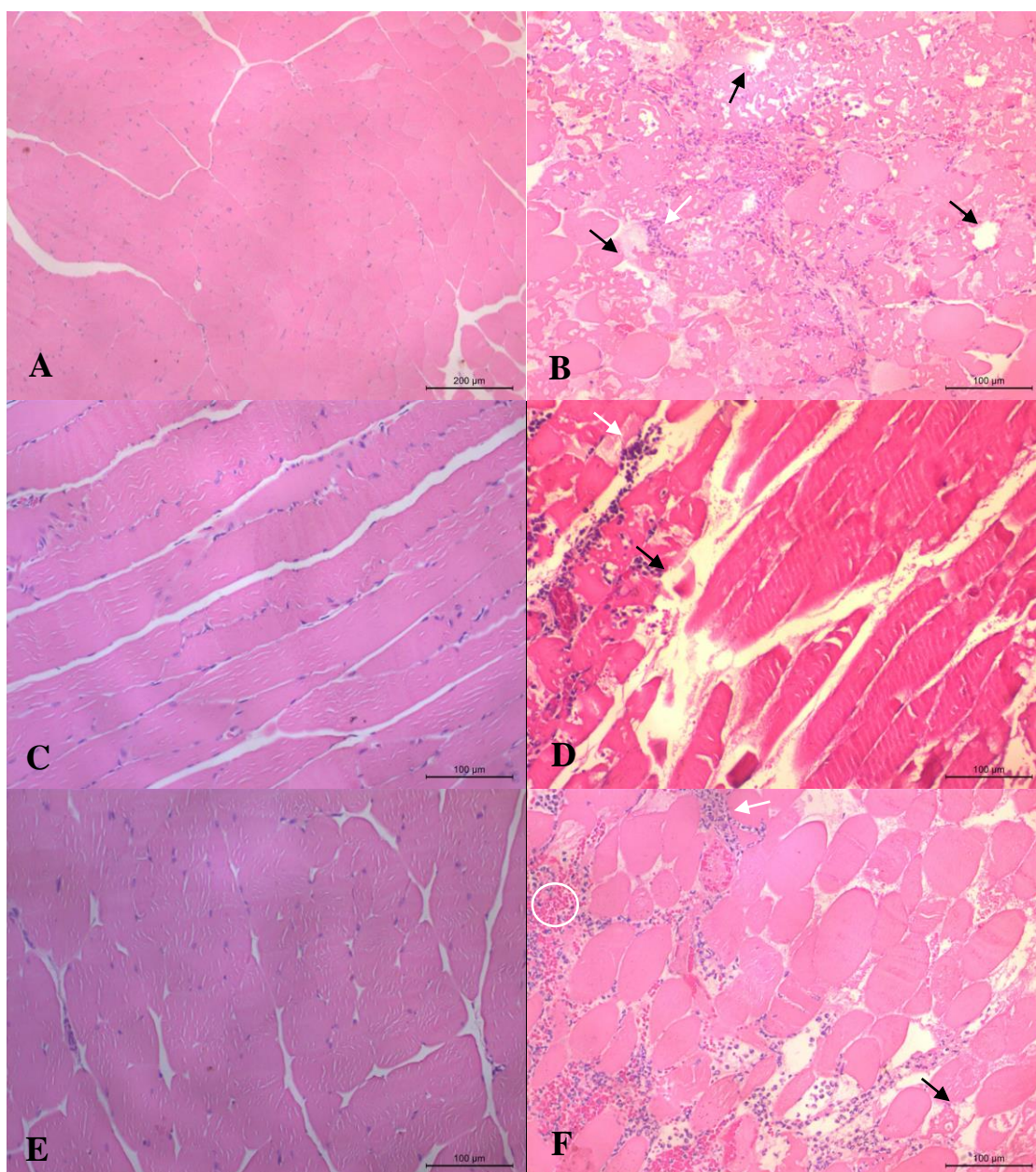
A) grupo 6h controle; B) grupo 6h veneno; C) grupo 12h controle; D) grupo 12h veneno; E) grupo 24h controle; F) grupo 24h veneno; G) grupo 72h controle; H) grupo 72h veneno; I) grupo 96h controle; J) grupo 96h veneno; 50µm: aumento de 400x; 100µm: aumento de 200x; 200µm: aumento de 100x; vacuolização (seta preta); dilatação (seta branca); congestão (círculo preto); necrose (círculo branco); perda de borda em escova (quadrado preto).

A **Figura 31** apresenta a análise histopatológica do tecido do músculo gastrocnêmico do membro posterior esquerdo dos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* durante os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. A análise histopatológica do tecido muscular revelou, nos grupos controles de todos os tempos analisados, estruturas de tecido muscular em corte longitudinal e transversal preservadas, arquitetura das fibras musculares preservadas e vasos sanguíneos preservados, como pode ser visualizado nas **Figuras 31A, 31C, 31E, 31G e 31I**.

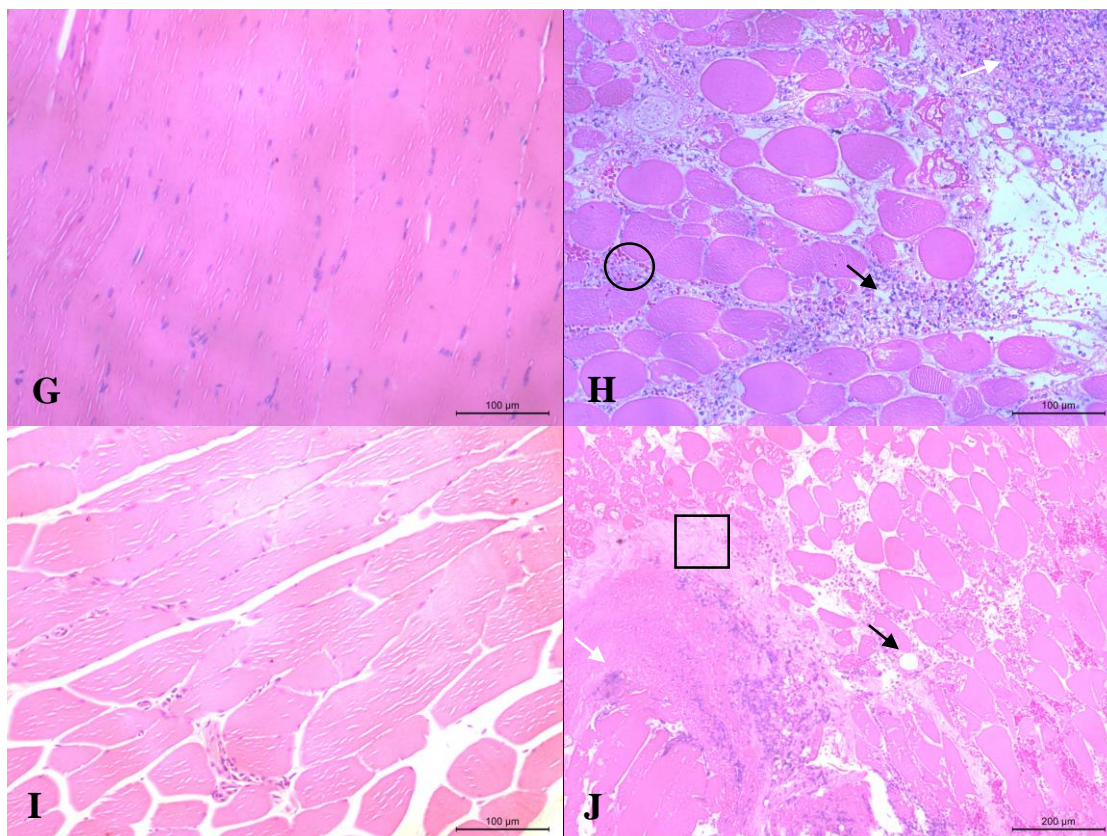
De acordo com a **Figura 31B**, o grupo 6h veneno apresentou estruturas características de infiltrado inflamatório e necrose tecidual. Observou-se no grupo 12h veneno representado pela **Figura 31D**, marcante necrose tecidual, congestão e presença de infiltrados inflamatórios por todo o tecido. A **Figura 31F** apresentou no grupo 24h veneno alterações caracterizadas pela presença infiltrados inflamatórios compostos por leucócitos polimorfonucleares, mionecrose e extensa hemorragia tecidual. A **Figura 31H** representa o grupo 72h veneno, e mostra além de células necróticas, presença de macrófagos, granulócitos e severa hemorragia com espaços entre as fibras musculares

caracterizando degradação tecidual. O grupo 96h veneno está apresentado na **Figura 31J** e apresentou além de mionecrose e infiltrados inflamatórios, a presença de formação inicial de tecido conjuntivo característico de cicatrização.

**Figura 31** — Alterações histopatológicas do tecido muscular em camundongos após envenenamento por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular nos tempos de 6h, 12h, 24h, 72h e 96h.







A) grupo 6h controle; B) grupo 6h veneno; C) grupo 12h controle; D) grupo 12h veneno; E) grupo 24h controle; F) grupo 24h veneno; G) grupo 72h controle; H) grupo 72h veneno; I) grupo 96h controle; J) grupo 96h veneno; 50 $\mu$ m: aumento de 400x; 100 $\mu$ m: aumento de 200x; 200 $\mu$ m: aumento de 100x; mionecrose (seta preta); infiltrado inflamatório (seta branca); macrófagos e granulócitos (círculo preto); congestão/hemorragia (círculo branco); tecido conjuntivo (quadrado preto).

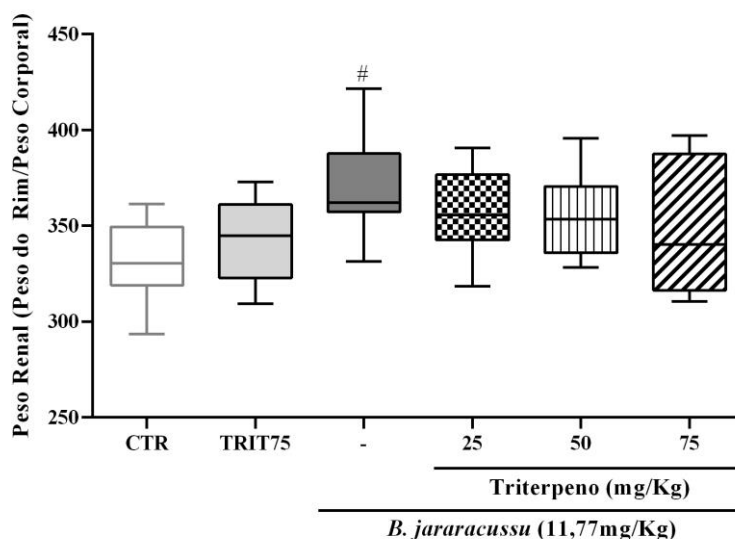
### 5.3. Tratamento com Ácido Ursólico e Oleanólico

Após determinar grupo veneno 12h como melhor modelo experimental de análise para realização do experimento tratamento, assim como caracterizar o modelo de IRA, em outro momento, com um novo grupo de animais iniciamos o tratamento com ácido ursólico/oleanólico nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg. Importante destacar que o grupo triterpenos não apresenta diferença em relação ao controle nas análises subsequentes. Os dados a seguir representam os resultados obtidos.

### 5.3.1. Determinação dos parâmetros fisiológicos

De acordo com a **Figura 32**, o grupo veneno ( $371,1 \pm 27,04$  mg) aumentou significativamente o peso renal quando comparado aos valores do grupo controle ( $332,2 \pm 21,16$  mg). Os grupos veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $356,7 \pm 21,87$  mg), 50 mg/Kg ( $355,2 \pm 21,05$  mg) e 75 mg/Kg ( $349,7 \pm 36,83$  mg) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos grupos controle, triterpenos ( $342,7 \pm 19,60$  mg) e veneno.

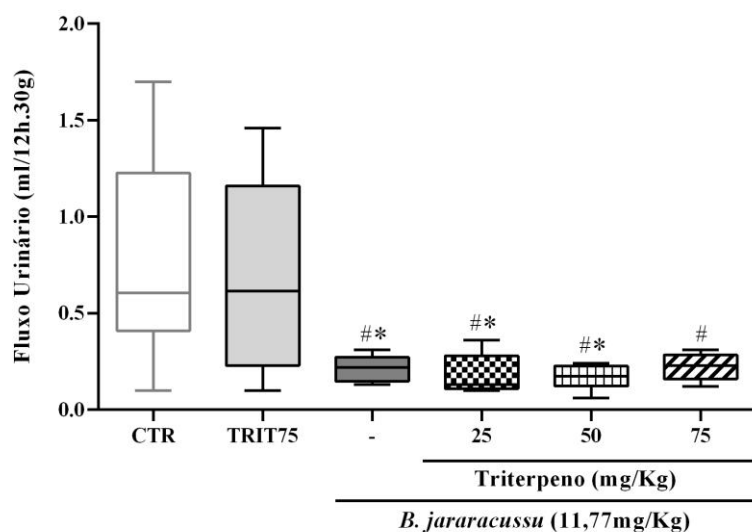
**Figura 32** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico no peso renal após indução de IRA por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão no peso renal após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Como mostra a **Figura 33**, houve diminuição nos valores de urina excretada dos animais que receberam veneno ( $0,21 \pm 0,06$  ml) e veneno + triterpenos nas doses de 25 mg/Kg ( $0,18 \pm 0,09$  ml), 50 mg/Kg ( $0,16 \pm 0,06$  ml) e 75mg/kg ( $0,22 \pm 0,07$  ml) quando comparado aos valores dos grupos controle ( $0,79 \pm 0,53$  ml) e triterpenos ( $0,67 \pm 0,48$  ml).

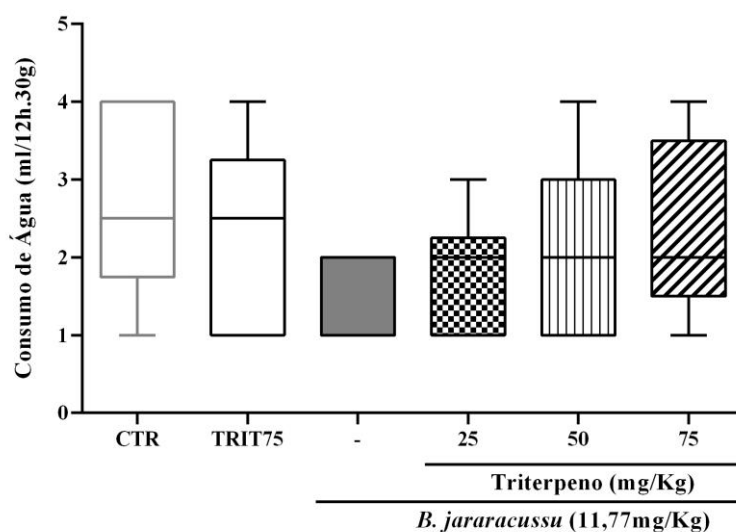
**Figura 33** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico no fluxo urinário após indução de IRA por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da excreção de urina após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Como demonstrado na **Figura 34**, não houve diferença significativa nos valores de ingestão de água dos animais dos grupos veneno ( $1,60 \pm 0,51$  ml) e veneno + triterpenos nas doses de 25 mg/Kg ( $1,90 \pm 0,73$  ml), 50 mg/Kg ( $2,16 \pm 1,19$  ml) e 75mg/kg ( $2,40 \pm 1,14$  ml) quando comparado aos valores dos grupos controle ( $2,66 \pm 1,21$  ml) e triterpenos ( $2,33 \pm 1,21$  ml).

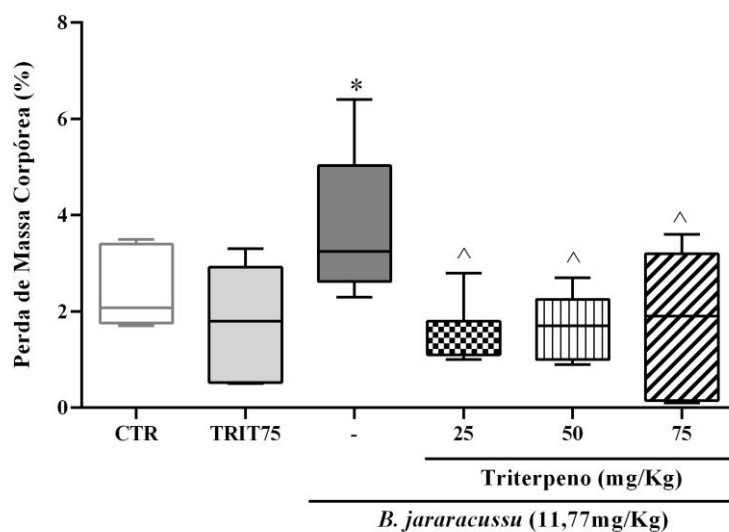
**Figura 34** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico consumo de água após indução de IRA por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da ingestão de água após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Segundo a **Figura 35**, houve aumento significativo nos valores de perda de peso dos animais que receberam veneno ( $3,84 \pm 1,40$  %) quando comparado aos valores do grupo triterpenos ( $1,77 \pm 1,16$  %), e redução significativa dos grupos veneno + triterpenos nas doses de 25 mg/Kg ( $1,47 \pm 0,60$  %), 50 mg/Kg ( $1,67 \pm 0,70$  %) e 75mg/kg ( $1,72 \pm 1,55$  %) quando comparado aos valores do grupo veneno. Não houve diferença significativa quando comparados ao grupo controle ( $2,37 \pm 0,75$  %).

**Figura 35** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na perda de massa corpórea após indução de IRA por veneno de *B. jararacussu*.

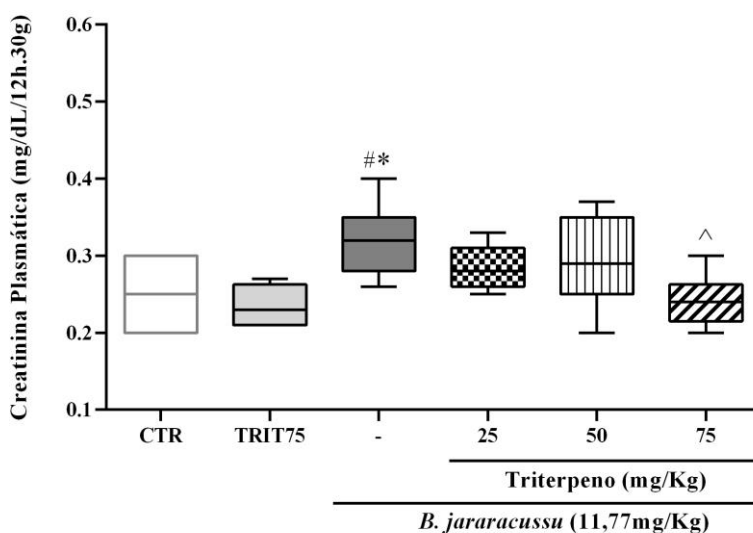


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da perda de peso após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos

De acordo com a **Figura 36**, houve aumento significativo da creatinina plasmática nos animais do grupo veneno ( $0,32 \pm 0,04$  mg/dL) quando comparado aos valores do grupo controle ( $0,25 \pm 0,05$  mg/dL) e triterpenos ( $0,23 \pm 0,02$  mg/dL). O grupo veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $0,24 \pm 0,03$  mg/dL) apresentou redução significativa quando comparado ao grupo veneno. Os animais dos grupos veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $0,28 \pm 0,02$  mg/dL) e 50 mg/Kg ( $0,29 \pm 0,05$  mg/dL) não apresentaram diferenças significativas relacionadas aos grupos controle, triterpenos e veneno.

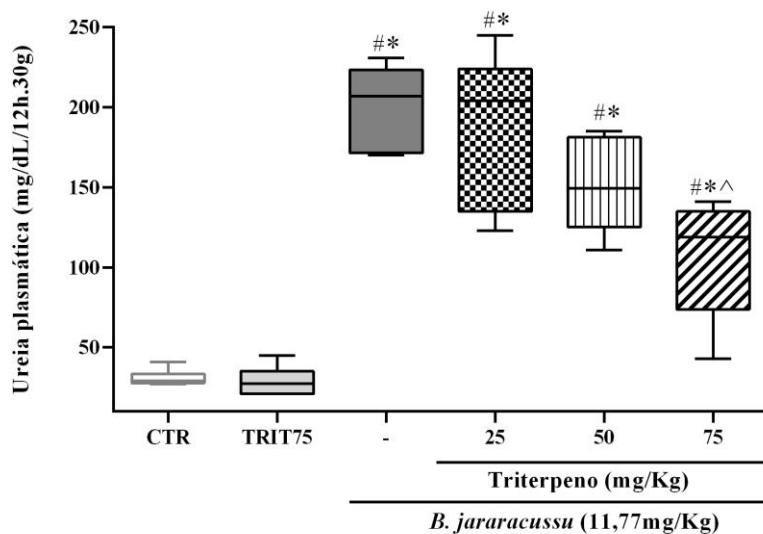
**Figura 36** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de creatinina na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis plasmáticos de creatinina após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Como mostra a **Figura 37**, houve aumento significativo da ureia plasmática nos animais do grupo veneno ( $201,3 \pm 25,22$  mg/dL) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $184,7 \pm 47,71$  mg/dL), 50 mg/Kg ( $150,8 \pm 28,45$  mg/dL) e 75 mg/Kg ( $106,5 \pm 36,73$  mg/dL) quando comparado aos valores dos grupos controle ( $30,83 \pm 5,19$  mg/dL) e triterpenos ( $29,00 \pm 9,35$  mg/dL). Além disso, o grupo veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg apresentou redução significativa quando comparado ao grupo veneno.

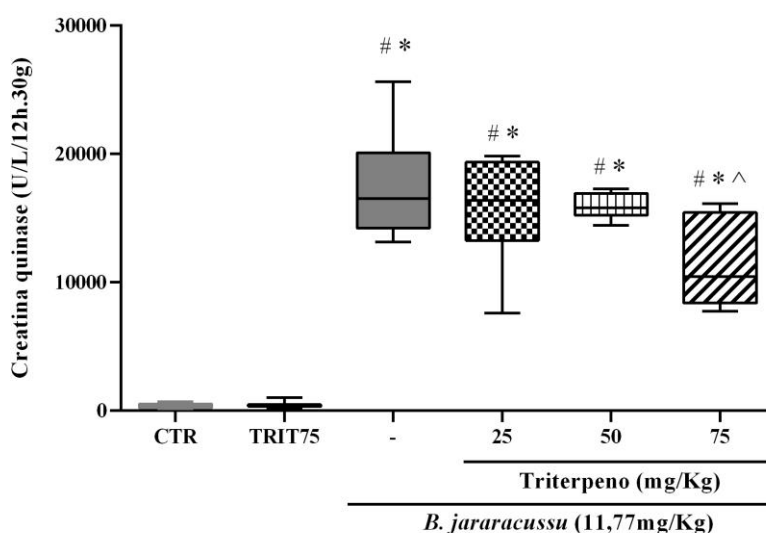
**Figura 37** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de ureia na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão dos níveis plasmáticos de ureia após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Como demonstrado na **Figura 38**, houve aumento significativo da creatina quinase plasmática nos animais dos grupos veneno (17737,0 ± 4245,0 U/L) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg (16021,0 ± 4001,0 U/L), 50 mg/Kg (15949,0 ± 1002,0 U/L) e 75 mg/Kg (11434,0 ± 3639,0 U/L) quando comparado aos valores dos grupos controle (378,9 ± 163,9 U/L) e triterpenos (445,0 ± 231,4 U/L). Adicionalmente, o grupo veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg apresentou redução significativa quando comparado ao grupo veneno.

**Figura 38** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico nos níveis plasmáticos de creatina quinase na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



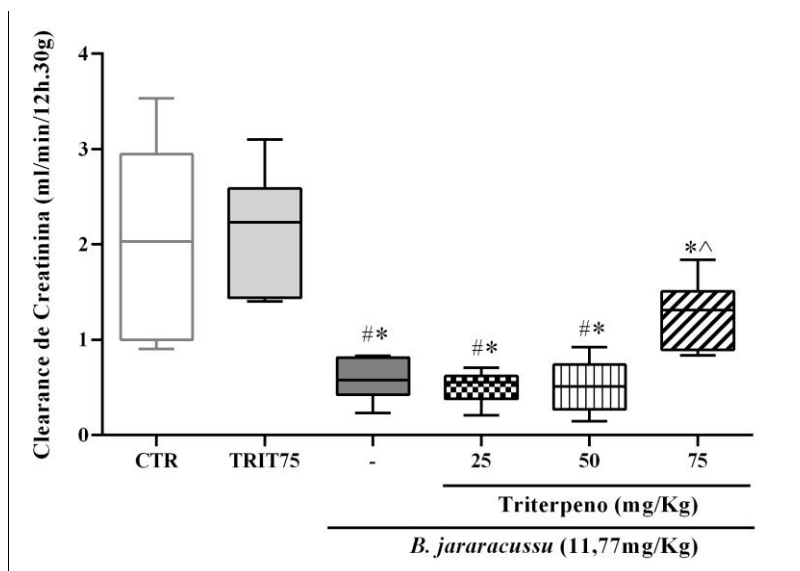
Os valores representam a média ± erro padrão dos níveis plasmáticos de creatina quinase após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). # P<0,05 em relação ao grupo controle. \* P<0,05 em relação ao grupo triterpenos. ^ P<0,05 em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.



### 5.3.3. Análise da função renal

A função renal foi analisada por meio do *clearance* de creatinina. Segundo a **Figura 39**, houve diminuição significativa na taxa de filtração glomerular nos animais do grupo veneno ( $0,59 \pm 0,20$  ml/min/Kg) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $0,50 \pm 0,15$  ml/min/Kg), 50 mg/Kg ( $0,51 \pm 0,26$  ml/min/Kg) e 75 mg/Kg ( $1,26 \pm 0,36$  ml/min/Kg) quando comparado aos valores dos grupos controle ( $2,02 \pm 0,98$  ml/min/Kg) e triterpenos ( $2,15 \pm 0,61$  ml/min/Kg). Adicionalmente, o grupo veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo veneno.

**Figura 39** — Efeito do tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na Taxa de Filtração Glomerular na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

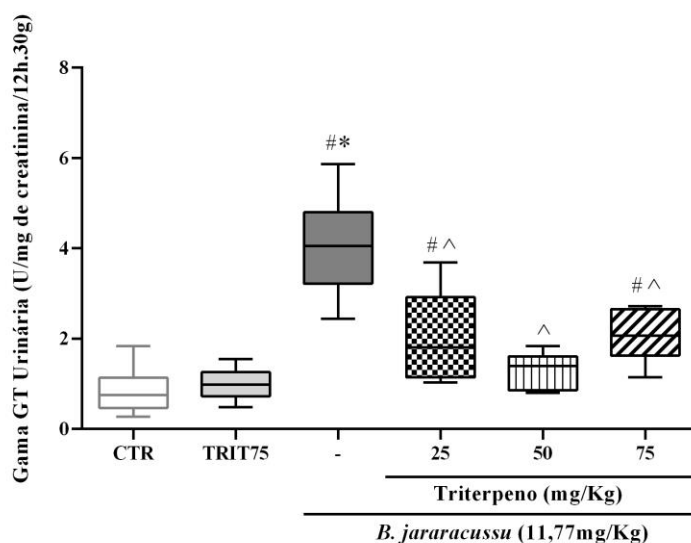


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão do *clearance* de creatinina após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.4. Análise do dano tubular

O dano tubular foi analisado pela excreção/atividade da enzima gama glutamil transferase (gama-GT) na urina. Como demonstrado na **Figura 40**, houve aumento significativo nos níveis de gama-GT urinária nos animais dos grupos veneno ( $4,09 \pm 1,11$  U/mg de creat.) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $2,02 \pm 1,00$  U/mg de creat.) e 75 mg/Kg ( $2,07 \pm 0,58$  U/mg de creat.) quando comparado aos valores do grupo controle ( $0,81 \pm 0,44$  U/mg de creat.). O grupo veneno apresentou também aumento significativo quando comparado ao grupo triterpenos ( $0,99 \pm 0,34$  U/mg de creat.). Adicionalmente, os grupos veneno + triterpenos na dose 25 mg/Kg, 50mg/Kg ( $1,30 \pm 0,40$  U/mg de creat.) e 75 mg/Kg apresentaram redução significativa quando comparado ao grupo veneno.

**Figura 40** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico nas concentrações urinárias de Gama glutamil transferase (Gama-GT) na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

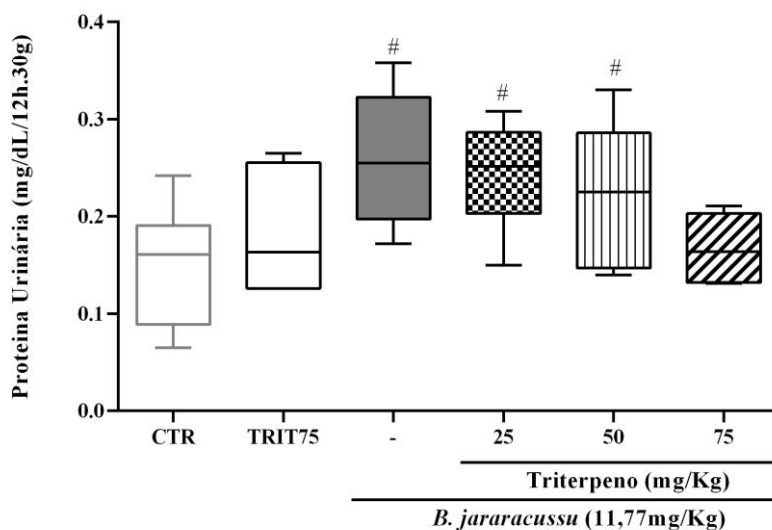


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da atividade de Gama-GT urinária após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.5. Análise da proteinúria

Avaliamos a eliminação da proteína urinária. Como apresentado na **Figura 41**, houve aumento significativo nas concentrações de proteína urinária nos animais do grupo veneno ( $0,255 \pm 0,062$  mg/dL/12h) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $0,245 \pm 0,05$  mg/dL/12h) e 50 mg/Kg ( $0,220 \pm 0,070$  mg/dL/12h) quando comparado aos valores do grupo controle ( $0,148 \pm 0,058$  mg/dL/12h). O grupo veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $0,166 \pm 0,035$  mg/dL/12h) não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos controle, triterpenos ( $0,182 \pm 0,062$  mg/dL/12h) e veneno.

**Figura 41** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico nas concentrações de proteína urinária na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

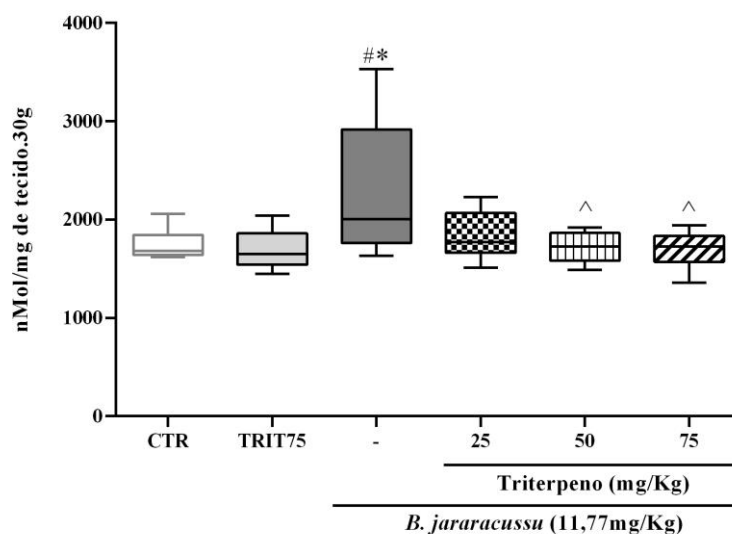


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das concentrações de proteína na urina após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.6. Avaliação dos níveis de MDA no tecido renal

Para avaliar a extensão do dano oxidativo medimos a concentração de malondialdeído (MDA) no tecido renal. Como exposto na **Figura 42**, os animais que receberam somente veneno ( $2259,0 \pm 636,6$  nmol/mg de tecido) apresentaram os níveis de MDA aumentados em relação aos animais dos grupos controle ( $1751,0 \pm 140,9$  nmol/mg de tecido) e triterpenos ( $1698,0 \pm 191,3$  nmol/mg de tecido). Os grupos veneno + triterpenos nas doses 50 mg/Kg ( $1719,0 \pm 150,6$  nmol/mg de tecido) e 75 mg/Kg ( $1698,0 \pm 196,0$  nmol/mg de tecido) apresentaram níveis de MDA reduzidos em relação ao grupo veneno. Adicionalmente, o grupo veneno + triterpenos na dose 25 mg/Kg ( $1841,0 \pm 238,6$  nmol/mg de tecido) não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos controle, triterpenos e veneno.

**Figura 42** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de malondialdeído (MDA) na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

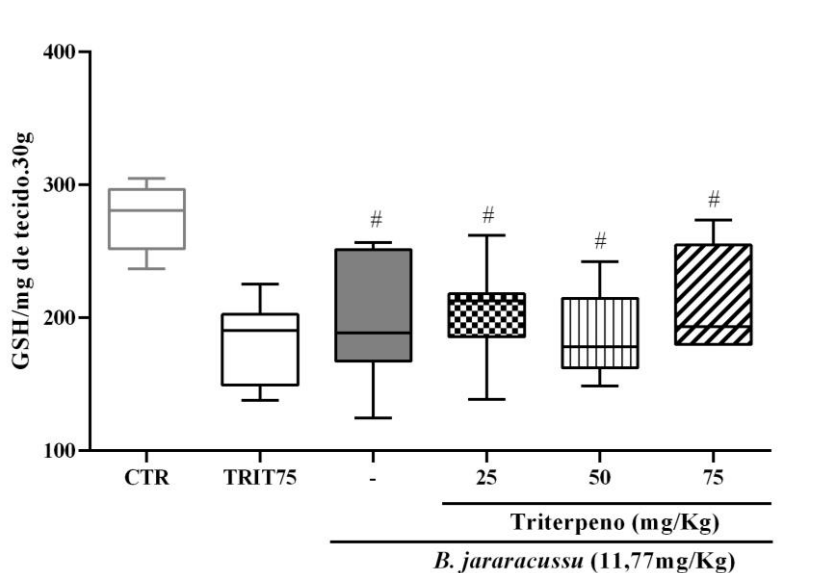


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da atividade de MDA no tecido renal após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo triterpenos. ^  $P < 0,05$  em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.7. Avaliação dos níveis de GSH no tecido renal

Avaliamos a atividade antioxidante por meio da dosagem de glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal. Nota-se na **Figura 43** que os animais dos grupos veneno ( $194,9 \pm 44,44$  GSH/mg de tecido) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $206,4 \pm 35,63$  GSH/mg de tecido), 50 mg/Kg ( $188,9 \pm 31,42$  GSH/mg de tecido) e 75 mg/Kg ( $212,6 \pm 41,21$  GSH/mg de tecido) apresentaram os níveis de GSH reduzidos em relação aos animais do grupo controle ( $276,3 \pm 24,35$  GSH/mg de tecido), e não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo triterpenos ( $182,1 \pm 31,65$  GSH/mg de tecido).

**Figura 43** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de glutathiona reduzida (GSH) na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

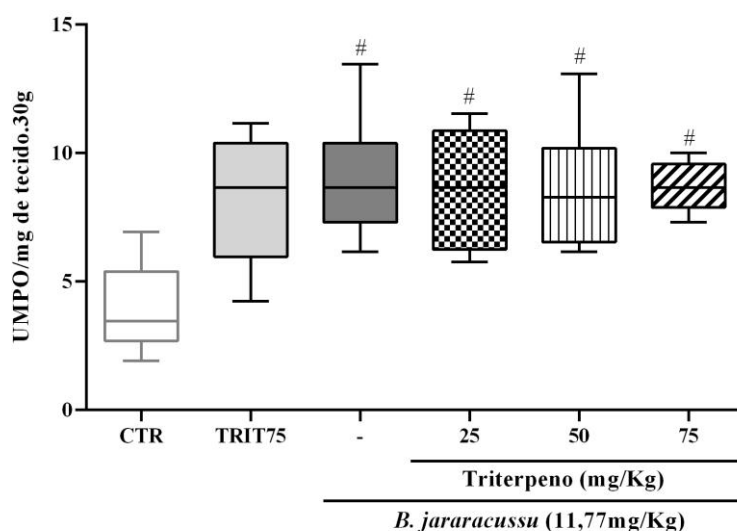


Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da atividade de GSH no tecido renal após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

### 5.3.8. Avaliação da atividade de MPO no tecido renal

A atividade inflamatória foi avaliada por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Como mostra a **Figura 44**, os animais dos grupos veneno ( $8,97 \pm 2,08$  UMPO/mg de tecido) e veneno + triterpenos nas doses 25 mg/Kg ( $8,56 \pm 2,25$  UMPO/mg de tecido), 50 mg/Kg ( $8,62 \pm 2,36$  UMPO/mg de tecido) e 75 mg/Kg ( $8,68 \pm 0,96$  UMPO/mg de tecido) apresentaram os níveis de MPO aumentados em relação aos animais do grupo controle ( $4,06 \pm 1,68$  UMPO/mg de tecido), e não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo triterpenos ( $8,15 \pm 2,37$  UMPO/mg de tecido).

**Figura 44** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na atividade de mieloperoxidase (MPO) na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da atividade de MPO no tecido renal após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

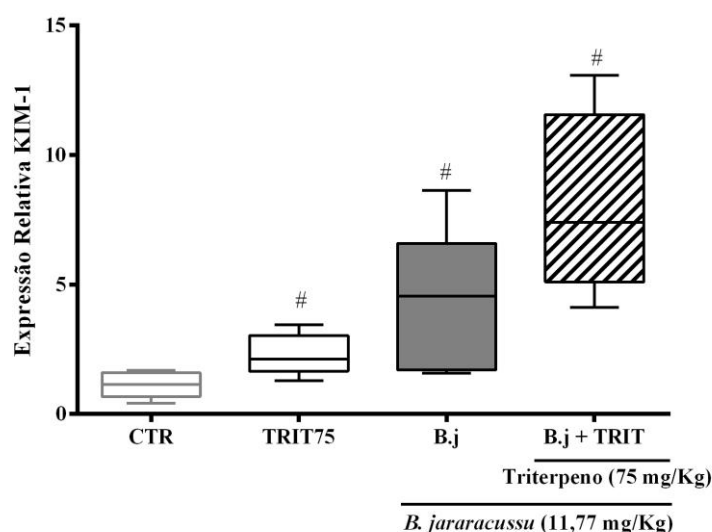
### 5.3.9. Avaliação da expressão gênica de *KIM-1*, *NQO-1*, *TIMP-2*, *SOD1s*, *IL-18* e *Clusterina*

Após obtenção dos parâmetros bioquímicos e resultados de estresse oxidativo, para a análise de expressão gênica optou-se por analisar dentre os grupos veneno + triterpenos somente a dose de 75 mg/Kg, visto que foi a única dose que apresentou resultados sugestivos de nefroproteção. A avaliação da expressão gênica foi realizada nos

genes KIM-1, NQO-1, TIMP-2, SOD1s, IL-18 e Clusterina. Os dados a seguir representam os resultados obtidos.

A **Figura 45** mostra que a expressão gênica de KIM-1 foi aumentada nos grupos triterpenos ( $2,27 \pm 0,78$ ), veneno ( $4,73 \pm 2,59$ ) e veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $8,14 \pm 3,50$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $1,10 \pm 0,48$ ).

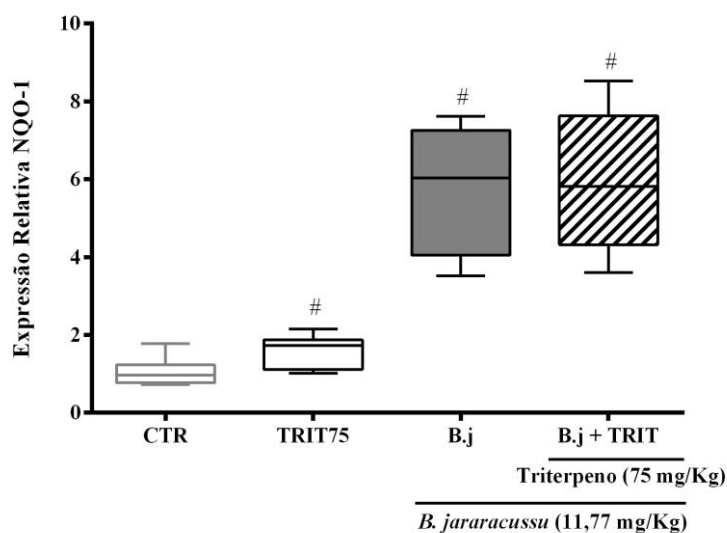
**Figura 45:** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de KIM-1 na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a transcrição gênica de KIM-1 em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Conforme visto na **Figura 46** houve aumento na expressão gênica de NQO-1 nos grupos triterpenos ( $1,59 \pm 0,42$ ), veneno ( $5,78 \pm 1,58$ ) e veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $5,94 \pm 1,93$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $1,04 \pm 0,38$ ).

**Figura 46** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de NQO-1 na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

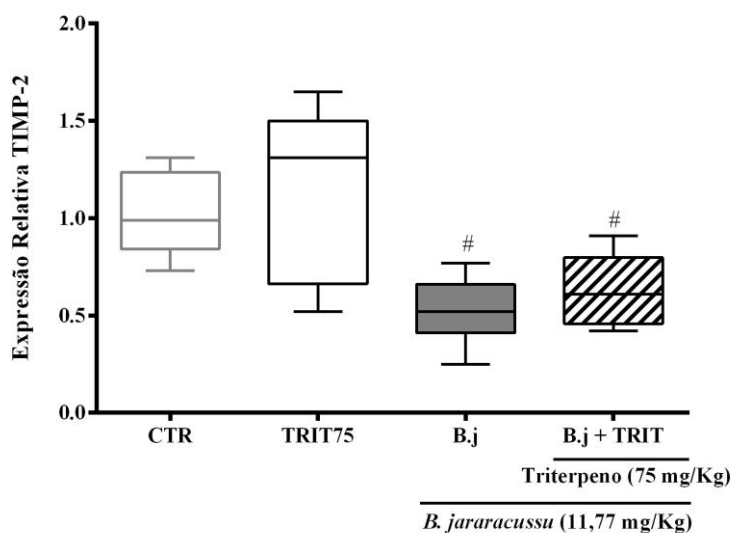


Os valores representam a transcrição gênica de NQO-1 em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.



Em relação a expressão de TIMP-2, como mostra na **Figura 47** houve redução na expressão gênica nos grupos veneno ( $0,52 \pm 0,16$ ) e veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $0,63 \pm 0,18$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $1,01 \pm 0,21$ ).

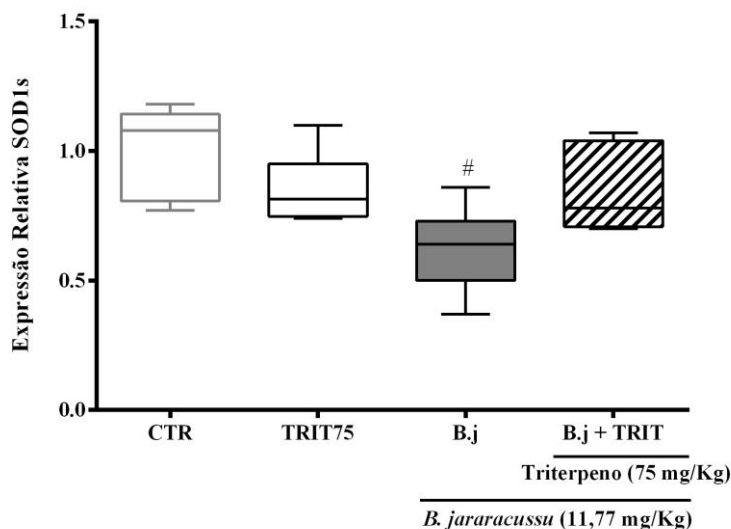
**Figura 47** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de TIMP-2 na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a transcrição gênica de TIMP-2 em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

A **Figura 48** apresenta a expressão gênica de SOD1s, no qual houve redução significativa no grupo veneno ( $0,62 \pm 0,16$ ) em relação aos animais dos grupos controle ( $1,01 \pm 0,17$ ) e triterpenos ( $0,85 \pm 0,13$ ). O grupo 75mg/Kg ( $0,84 \pm 0,16$ ) não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos controle.

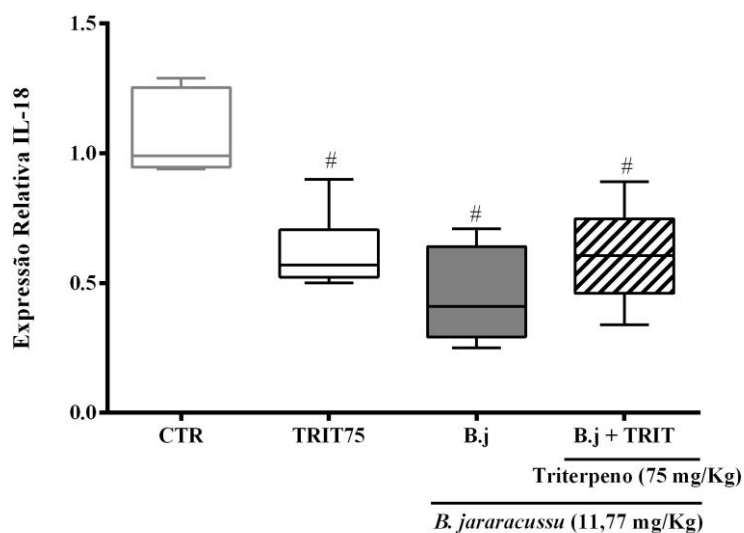
**Figura 48** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de SOD1s na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a transcrição gênica de SOD1s em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Conforme visto na **Figura 49** houve redução na expressão gênica de IL-18 nos grupos triterpenos ( $0,61 \pm 0,14$ ), veneno ( $0,44 \pm 0,17$ ) e veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $0,60 \pm 0,18$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $1,06 \pm 0,15$ ).

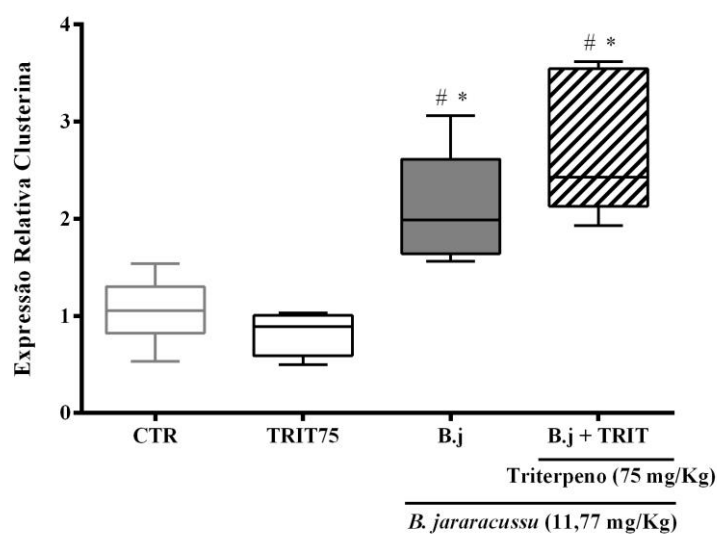
**Figura 49** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de IL-18 na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a transcrição gênica de IL-18 em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Em relação a expressão de clusterina, como mostra na **Figura 50** houve aumento na expressão gênica nos grupos veneno ( $2,11 \pm 0,53$ ) e veneno + triterpenos na dose 75 mg/Kg ( $2,75 \pm 0,74$ ) em relação aos animais dos grupos controle ( $1,05 \pm 0,33$ ). Os animais do grupo triterpenos ( $0,81 \pm 0,22$ ) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais do grupo controle.

**Figura 50** — Efeito do tratamento com ácido ursólico e oleanólico na transcrição gênica de Clusterina na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.



Os valores representam a transcrição gênica de clusterina em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e tratamento com AU/AO. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou explorar as possíveis propriedades nefroprotetoras dos ácidos triterpenóicos, ursólico e oleanólico, no modelo de IRA induzida por veneno de serpente *B. jararacussu*, pois ainda não há relatos do seu efeito neste modelo. Para realização de tal estudo, viu-se a necessidade de realizar dois experimentos que otimizariam as posteriores metodologias, sendo a primeira etapa a determinação da DL<sub>50</sub> por via intramuscular do veneno de *B. jararacussu*, com o intuito de estabelecer um dose de veneno capaz de ocasionar o acidente botrópico nos animais experimentais sem necessariamente causar o óbito, e a segunda etapa sendo a análise da atividade *in vivo* do veneno nos animais experimentais, com a necessidade de determinar um tempo de envenenamento que melhor causasse alterações a níveis fisiológicos, bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo, compatíveis com o quadro de injúria renal aguda.

O acidente botrópico vêm sendo estudado a décadas, sendo descoberto por meio destes estudos desde componentes do veneno e suas atividades específicas, lesivas ou terapêuticas, como novas possibilidades de tratamentos específicos e adjuvantes (CROXATTO, 1946; COTTE et al., 1972). Pesquisas relacionadas aos efeitos renais ocasionados por picada de serpente do gênero *Bothrops* já analisaram diversas hipóteses de patogênese e desenvolvimento das sequelas oriundas da injúria renal aguda (BARONE et al., 2014; GOIS et al., 2017). Porém, ainda existe a necessidade de novos estudos relacionados as vias moleculares responsáveis por tais efeitos (ALBUQUERQUE et al., 2013). A serpente *Bothrops jararacussu* é uma espécie utilizada em boa parte dessas pesquisas, juntamente com a *B. jararaca* e a *B. asper*, isso se deve provavelmente pelas distribuições geográficas dessas espécies serem bem difundidas em território brasileiro, assim como em outros países sul-americanos (CHIPPAUX, 2017; JORGE et al., 2017). Além disso, são espécies consideradas de grande porte e que podem liberar grandes volumes de veneno, facilitando assim a realização de muitas metodologias com apenas a realização de uma coleta de veneno (WARREL, 2005).

Os rins representam papel importante no metabolismo do organismo devido sua atividade indispensável na homeostase, assim como na eliminação de compostos que normalmente não absorvemos e substâncias nocivas ao corpo humano, denominadas xenobióticos (MACEDO et al., 2008). A partir do momento que o sistema renal é acometido por alguma patologia e/ou agente tóxico, o balanço hídrico-eletrolítico se altera ocasionando consequentemente um desequilíbrio fisiológico, alterando diversos

outros sistemas que auxiliam na manutenção das funções vitais metabólicas (BELLOMO et al., 2012). No caso da injúria renal aguda ocorre o acúmulo de compostos prejudiciais ao nosso metabolismo, como ureia e creatinina, além de redução na taxa de filtração glomerular e consequente perda da função excretora renal (EDELSTEIN, 2013). Os acidentes botrópicos estão entres os principais causadores da IRA, tendo como fatores dependentes a espécie, a localização geográfica, a localização da picada da serpente, as variações sazonais, estado de saúde da vítima, idade da vítima e idade da serpente (JORGE et al., 2017).

Diversas pesquisas relatadas na literatura relacionadas aos efeitos renais induzidos por acidente botrópico se comprometeram em explicar os mecanismos de lesão renal por meio de modelos que utilizam animais experimentais (*in vivo*), como ratos e camundongos (BARONE et al., 2014; GOIS et al., 2017), sistemas de rim isolado (*in situ*; EVANGELISTA et al., 2010; DANTAS et al., 2015) e cultivo celular (*in vitro*; MORAIS et al., 2015; DE SOUSA et al., 2016). Neste estudo realizou-se metodologias de atividade *in vivo*, sendo utilizados camundongos experimentais da linhagem Swiss, que se caracterizam por apresentarem comportamento calmo, dócil e de fácil manipulação. A escolha do sexo feminino para este estudo ocorreu após realização de experimentos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM), em que camundongos machos apresentarem comportamento estressado pós-envenenamento, ocorrendo por diversas vezes a automutilação após formação de edema no membro acometido, e em alguns casos ocasionando o óbito desses animais, prejudicando por muitas vezes a realização de posteriores metodologias.

O modelo de injúria renal aguda por acidente botrópico é muito difundido na literatura, sendo encontrado mais comumente pesquisas utilizando frações ou moléculas isoladas, avaliando a atividade nefrotóxica (KAMIGUTI et al., 1991; GAY et al., 2009; REYES et al., 2009). Isso se deve majoritariamente pelo fato de que o mecanismo da IRA por acidente botrópico não está completamente elucidado. Além disso, muito se relata sobre a variabilidade nos resultados devido a variação individual dos animais, assim como fatores relacionados ao estado nutricional, estado de hidratação, peso, sexo, espécie e linhagem (KOSCINCZUK et al., 2004; LINARDI et al., 2011).

A determinação da DL<sub>50</sub> via intramuscular constituiu uma etapa relevante deste estudo para que se fosse possível prosseguir com as etapas posteriores de atividade *in vivo* do veneno e tratamento com os triterpenos. É importante ressaltar que a DL<sub>50</sub> de *B. jararacussu* já foi determinada por diversos estudos, no entanto, as metodologias

utilizadas consistiram em administrações do veneno por vias endovenosa, intraperitoneal e subcutânea (OSHIMA-FRANCO et al., 2002; RONCOLATO et al., 2013). Neste estudo optou-se por determinar a  $DL_{50}$  por via intramuscular com o intuito de mimetizar o acidente botrópico, visto que, em sua grande maioria, os acidentes ofídicos em humanos ocorrem por meio de mordedura da serpente na região dos membros inferiores, sendo a peçonha liberada majoritariamente em regiões de tecido muscular (MILANI JÚNIOR et al., 1997).

O uso de gaiolas metabólicas nas práticas de pesquisas *in vivo* são de grande valia por proporcionar a possibilidade de mensuração de dados como ingestão de água, ingestão de alimento, volume de urina eliminada, volume de fezes excretadas, assim como a coleta de urina e fezes para a realização de posteriores análises (BOER-LIMA et al., 2002; BARONE et al., 2014). Contudo, é importante ressaltar que esse tipo de metodologia vêm sendo debatida devido ao alto nível de estresse ocasionado aos animais submetidos à gaiola metabólica (GIL et al., 1999; ERIKSSON et al., 2004; THANOS et al., 2007).

Dentre os parâmetros fisiológicos apresentados, o peso renal foi analisado e apresentou aumento significativo dos grupos venenos nos tempos 72h e 96h, em relação aos seus respectivos controles. Esse resultado corrobora com estudos descritos na literatura relatando que nas primeiras horas de envenenamento têm se início a injúria renal aguda, ocasionando vacuolização e dilatação de células tubulares, ocorrendo após 24h a proliferação de áreas de regeneração epitelial, deposição de colágeno e fibrina, resultando num aumento do peso renal após 72h de envenenamento (LINARDI et al., 2011). Mello e colaboradores (2010) detectaram o veneno de *Bothrops alternatus* no tecido renal 30 minutos após envenenamento por inoculação intravenosa em ratos. Não podemos excluir a possibilidade de que as alterações observadas não tenham sido influenciadas pela isquemia renal após a hipotensão induzida por veneno em estágio inicial, e que devido a lesão renal ocasionada, os rins após um período de tempo de envenenamento aumentam sua capacidade de trabalho, com consequente aumento do volume renal, condizente com uma possível cronicidade (BOER-LIMA et al., 2002).

O volume de urina excretado não apresentou diferença significativa nos grupos venenos em relação aos grupos controles em todos os tempos analisados. No entanto, é possível observar em termos de quantidade de urina excretada uma diurese em maior volume nos tempos 72h e 96h. Quando observamos esse resultado, associado aos resultados de ingestão de água, se consolida a hipótese de que as primeiras 24h de envenenamento os sintomas do acidente botrópico são mais intensas, com a oligúria e

anúria consequente da dor oriunda do local da picada no paciente acometido, sendo este um achado semelhante aos descritos pela comunidade acadêmica (KOSCINCZUK et al., 2004; SCHRIER et al., 2004; BARONE et al., 2011).

No volume de água ingerida notou-se uma redução significativa nos grupos venenos nos tempos de 12h e 24h quando comparados com seus respectivos. Chorilli e colaboradores (2007) relatam que camundongos adultos devem ingerir em média 3 a 7 ml de água por dia. Tanto no período de 48h de adaptação à gaiola metabólica quanto nos períodos de envenenamento os animais dos tempos 24h, 72h e 96h apresentaram uma ingestão de água considerada satisfatória quando comparada aos valores descritos na literatura. As primeiras 24h do acidente botrópico são consideradas as mais críticas do envenenamento, com sintomas graves que justificam as alterações no comportamento normal do animal, com demonstração de sinais de dor, justificando a consequente baixa ingestão de água nos animais envenenados nos tempos de 12h e 24h quando comparados aos seus respectivos controles (MARTINES et al., 2014; DANTAS et al., 2018). O tempo de 6h de envenenamento foi considerado insuficiente para uma possível mensuração de ingestão de água, visto que ambos os grupos, controle e veneno, apresentaram um baixo volume de água ingerida.

A perda de peso demonstrou diferença significativa nos camundongos envenenadas nos tempos 24h, 72h e 96h, quando comparadas com os grupos controles nos mesmos tempos. Contudo, o uso de gaiolas metabólicas prejudica a análise desses resultados devido estresse que essa metodologia implica nos animais experimentais (TARLAND, 2007; SAHIN et al., 2019). Apesar de não ter ocorrido diferença significativa nos tempos 6h e 12h devemos observar que em todos os tempos analisados ambos os grupos, veneno e controle, apresentaram perda de peso gradual, sendo que todos os animais submetidos à gaiola metabólica tiveram acesso à vontade ao alimento desde o início do período de adaptação até o jejum pré-eutanásia (nos tempos 24h, 72h e 96h o jejum alimentar ocorreu doze horas antes do procedimento de eutanásia; nos tempos 6h e 12h os animais foram submetidos a jejum alimentar durante todo o período de envenenamento). Isso se justifica pelo estresse ocasionado durante o manejo desses animais em momentos como aplicação do veneno/salina, mensuração diária de peso e de volume de água ingerida, limpeza dos tubos coletores de urina 24h pré-eutanásia. Em diversos momentos foram observadas sinais comportamentais de estresse, independente de se tratarem de animais do grupo veneno ou grupo controle (GIL et al., 1999; KALLIOKOSKI et al., 2013; SAHIN et al., 2019).



Neves (2013) relata que camundongos adultos devem ingerir em média 4 a 5 g de alimento diariamente. Infelizmente não foi possível realizar a mensuração de ração ingerida nesse estudo, pois foram utilizadas gaiolas metabólicas que abrangem experimentos em ratos e camundongos, ocorrendo episódios em que as camundongos retiraram os pellets de ração dos suportes alimentares, sendo por muitas vezes encontrados fragmentos de ração nos tubos coletores de fezes, dificultando a quantificação de alimento ingerido diariamente.

Em relação aos parâmetros bioquímicos clássicos, a creatinina apresentou aumento significativo nos grupos veneno nos tempos 6h e 12h quando comparados com seus respectivos controles. A dosagem sanguínea de creatinina constitui uma medida capaz de avaliar a atividade excretora renal (PECOITS-FILHO, 2004). A creatinina é um composto orgânico produto do metabolismo da creatina e fosfocreatina, componentes indispensáveis para a formação de energia no tecido muscular (SILVA; BRACHT, 2001; EMANUELLI et al., 2008). Sua produção é constante e dependente de massa muscular, sendo sua eliminação por meio de filtração glomerular, livremente filtrada, não reabsorvida e pouco secretada (LEAL et al., 2007). O aumento das concentrações séricas de creatinina indica uma perda funcional de no mínimo 75% dos néfrons em atividade (BRITO et al., 2005).

Diversas implicações na eliminação da creatinina podem reduzir sua excreção e comprometer a homeostasia, que por sua vez ocasionam sua acumulação no plasma (PECOITS-FILHO, 2004). No acidente botrópico a injúria renal precoce ocorre de forma rápida, havendo oligúria, diminuição do consumo de água, desidratação e, conseqüentemente, aumento nos valores de creatinina no sangue circulante (SGRIGNOLLI et al., 2011). Os resultados de creatinina plasmática deste trabalho corroboram com os descritos pela literatura, indicando aumento deste composto após poucas horas de acidente botrópico em ratos e camundongos, justificando a importância da análise deste parâmetro, mesmo sendo considerado um marcador tardio de injúria renal aguda (XIMENES, 2009; BARONE et al., 2014; DANTAS et al., 2018).

A ureia apresentou aumento significativo nos grupos venenos nos tempos 6h e 12h quando comparados com seus controles nos mesmos tempos analisados. Assim como a creatinina, a dosagem sanguínea de ureia consiste também em uma medida capaz de avaliar a atividade excretora renal, sendo por muitas vezes considerada mais tardia que a creatinina na detecção de insuficiência renal aguda (PECOITS-FILHO, 2004). Sua síntese ocorre no fígado após ser convertida da amônia, composto tóxico oriundo do catabolismo

dos aminoácidos, sendo sua eliminação renal dependente de filtração glomerular. Aproximadamente 50% da ureia que se direciona ao túbulo proximal é reabsorvida nesse seguimento. Posteriormente, na alça de Henle, a mesma quantidade que foi absorvida é secretada e, após chegar aos ductos coletores, essa quantidade é novamente reabsorvida (EATON; POLLER, 2006).

A redução na TFG leva ao aumento da ureia na circulação sanguínea (BORGES et al., 2008). Portanto, podemos observar o quanto a excreção de ureia é dependente de uma função glomerular e tubular adequada, e que a IRA induzida pelo acidente botrópico compromete a função renal. Os achados desta pesquisa reafirmam os achados de outros autores e modelos de IRA em ratos, no qual ocorreu um aumento nos tempos iniciais 6h e 12h, diminuindo no tempo 24h e retornando a valores iguais ao controle nos tempos 72h e 96h (KOSCINCZUK et al., 2004; XIMENES, 2008). O aumento de ureia plasmática devido acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* em modelos de animais experimentais já foi relatado em diversas pesquisas na literatura, sendo um parâmetro que sofre alteração sempre antes de 24h de envenenamento (ZENI et al., 2007; YOSHIDA et al., 2018)

A creatina quinase demonstrou aumento significativo nos animais envenenados nos tempos 6h, 12h e 24h em relação aos seus controles. A dosagem de creatina quinase plasmática teve a finalidade de avaliar a presença desse composto em sangue circulante, visto que suas concentrações séricas são normalmente baixas. As quantificações plasmáticas de CK vêm sendo utilizadas como um marcador de estresse imposto à musculatura esquelética, decorrente de atividade intensa ou lesões musculares por xenobióticos (PLEBANI, 2010).

No acidente ofídico quanto mais grave for a lesão local oriunda da mordedura da serpente, maior é a quantidade de microtraumas musculares e conseqüente degradação de tecido muscular, permitindo o extravasamento desta enzima e outras substâncias para o meio extracelular (GAY et al., 2005; TOMAZ et al., 2008). Desta forma, o monitoramento das concentrações de CK nas primeiras horas de envenenamento deve ser utilizado para determinar a magnitude do acidente ofídico e dos efeitos deletérios renais que podem vir no futuro, visto que a rbdomiólise é tida como uma das causas da injúria renal aguda no envenenamento por serpente. Estes resultados são similares aos encontrados em outros trabalhos que utilizaram modelos de acidente botrópico por via IM em camundongos, em tempos analisados semelhantes ao deste estudo (MORENO;

GUTIERREZ, 1988; CHAVES et al., 1989; MELO et al., 1993; SATURNINO-OLIVEIRA et al., 2014)

Os resultados de CK desse estudo fortalecem os relatos descritos na literatura relacionados a miotoxicidade do veneno botrópico, uma vez que nas primeiras 24h do envenenamento botrópico ocorre o desenvolvimento de graves lesões locais caracterizadas por dor, rubor, edema, hemorragia, perda da função do local acometido e necrose muscular (KOSCINCZUK et al., 2004). Esses sintomas relatados se associam facilmente com a liberação extracelular da CK e de outras substâncias que, uma vez antes eram encontradas no tecido muscular. Porém, após destruição muscular se direcionam para todo o sistema circulatório e, conseqüentemente são encaminhadas para o sistema renal, enviando proteínas de alto peso molecular como, por exemplo a mioglobina, para filtração glomerular, favorecendo assim o desenvolvimento de uma injúria renal aguda (ZENI et al., 2007; SATURNINO-OLIVEIRA et al., 2014).

Associando todos os resultados bioquímicos deste estudo é possível afirmar que, a reversão dos valores de creatinina, ureia e creatina quinase, nos tempos 72h e 96h sugerem as seguintes afirmações: diminuição dos efeitos das proteases (GUTIERREZ et al., 2009); redução da coagulação intravascular disseminada (CID), com conseqüente melhora na função renal (LOMONTE et al., 2009) e diminuição da atividade mionecrótica com conseqüente redução da liberação de ácidos nucleicos no espaço extracelular, o que corrobora com a redução da CK após 24h de envenenamento (SIFUENTES et al., 2008). É importante relatar que os marcadores bioquímicos séricos estudados não identificaram a evolução da lesão renal aguda observada nos resultados obtidos pelos marcadores bioquímicos urinários e na análise histopatológica.

Na análise da função renal, notou-se que o *clearance* de creatinina obteve uma redução significativa nos camundongos envenenados nos tempos 12h e 24h em relação aos camundongos controle nos mesmos tempos. O *clearance* é tido como uma medida de rotina na avaliação da taxa de filtração glomerular, o qual expressa a função renal. Isto é, o quanto os rins estão tendo êxito em realizar o seu papel na excreção (BRITO et al., 2005). Quando a eliminação da creatinina se altera ou tem redução de sua excreção a mesma passa a se acumular no plasma (EMANUELLI et al., 2008), resultado esse encontrado neste estudo.

A redução da TFG se deve aos seguintes fatores: previamente às mudanças na hemodinâmica renal, o efeito tóxico do veneno botrópico inicia a necrose dos túbulos (ALBUQUERQUE et al., 2019), ocasionando a redução da absorção tubular de

componentes como água, sódio, potássio e fósforo, ativando uma realimentação túbulo-glomerular que por sua vez acarreta no aumento da contração vascular reduzindo a perfusão renal (ALBUQUERQUE et al., 2013). Adicionalmente, a necrose tubular aguda libera substâncias nefrotóxicas e facilita o refluxo do fluido tubular para o sangue, potencializando o acúmulo plasmático de ureia e creatinina (SGRIGNOLLI et al., 2011). Pesquisas anteriores confirmam os dados relatados neste trabalho, ocorrendo diminuição do *Clearance* de creatinina nas primeiras horas de envenenamento, retornando gradualmente a TFG normal após 24h de acidente botrópico (MELLO et al., 2010; LINARDI et al., 2011; DANTAS et al., 2018).

Em relação a análise de dano tubular, a dosagem de Gama GT urinária demonstrou aumento significativo nos grupos veneno nos tempos 12h e 24h quando comparados aos seus respectivos grupos controle. No presente trabalho sua dosagem urinária teve o propósito de quantificar sua eliminação, visto que suas taxas normais urinárias são bem pequenas. A Gama GT constitui uma enzima encontrada em órgãos que possuem alta capacidade de secreção e absorção, como fígado e rins. Concentra grande parte de sua atividade nas microvilosidades das células tubulares proximal e alça de Henle, sendo sua liberação na urina por meio de desintegração fisiológica ou patológica dessas células. Uma vez sendo uma proteína de alto peso molecular, não passa por filtração glomerular e seu aumento na concentração urinária é considerado um marcador de eliminação de células tubulares, indicando assim, uma possível lesão tubular (ARAÚJO, 2014).

No sistema renal em estado basal a Gama GT apresenta atividade direta nos rins, catalisando a hidrólise de peptídeos do filtrado glomerular em aminoácidos e assim facilitando sua reabsorção (GUIMARÃES, 2000). É tida como um marcador precoce de lesão, pois detecta simultaneamente pequenas alterações celulares, antes de qualquer mudança na arquitetura renal, e surge antes de quadros azotêmicos (GUIMARÃES, 2000; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Na IRA por acidente botrópico comumente ocorre a eliminação de proteínas de alto peso na urina. Desta forma, era esperado que a enzimúria de Gama GT fosse encontrada também como um achado laboratorial, assim se afirmando como um importante marcador de dano tubular no modelo apresentado. Não foram encontrados na literatura resultados de análise de Gama GT em acidente botrópico.

Na análise de albuminúria se obteve aumento significativo nos grupos de animais envenenados de todos os tempos analisados em relação aos seus grupos controles. Na presente pesquisa, utilizou-se a análise desse parâmetro com o intuito de avaliar a perda de função renal provocada por acidente botrópico. Em enfermidades renais, as lesões

glomerulares, quando ocorridas, permitem a entrada de albumina no filtrado e lesões tubulares diminuem sua absorção, acarretando em perda urinária. Em um estado fisiológico renal normal, uma pequena quantidade de albumina consegue atravessar os glomérulos, sendo por consequência reabsorvida nos túbulos de forma que não ocorra sua eliminação urinária (ALMEIDA, 2001).

Na nefrotoxicidade por veneno de *B. jararacussu* a eliminação urinária de albumina pode ser um indício de lesão tubular, pois sua reabsorção fica prejudicada (REHAN et al., 1986). Além disso, suspeita-se de redução dos níveis séricos de albumina (SWE et al., 1993; MELLO et al., 2010; YOSHIDA et al., 2018). Desta forma, tal como os marcadores plasmáticos de azotemia, a albumina urinária aumentou significativamente no acidente botrópico, perdurando por até 96h de envenenamento, indicando um possível quadro crônico.

A mensuração de proteína urinária apresentou aumento significativo nos grupos de envenenados de todos os tempos analisados comparados aos seus grupos controles. Dosagens de proteínas de baixo e médio peso possuem grande importância, dado que essas proteínas também são capazes de atravessar a barreira glomerular. Porém, assim como a albumina, essas proteínas podem ser reabsorvidas quase que totalmente (EATON; POLLER, 2006).

A proteinúria no acidente botrópico é uma alteração indicativa de injúria renal aguda, e mesmo que a lesão glomerular seja menos presente, esse parâmetro pode indicar que sua origem está associada à necrose tubular, que por sua vez sugere a incapacidade de absorção causada pelo veneno e liberação de proteínas pelas próprias células tubulares (MELLO et al., 2010; BARONE et al., 2011; LINARD et al., 2011). Outras pesquisas relatadas na literatura descrevem que a proteinúria induzida por acidente botrópico pode estar associada a azotemia, aumento do MDA em tecido renal e alterações histopatológicas (BOER- LIMA et al., 2002; DANTAS et al., 2018; YOSHIDA et al., 2018).

Os parâmetros eritrocitários avaliados apresentaram diferenças em níveis de hemácia, hemoglobina e hematócrito. A dosagem de valores eritrocitários foi utilizada com a finalidade de indicar possíveis perdas sanguíneas devido intenso quadro hemorrágico instalado durante o envenenamento (BERLING; ISBISTER, 2015). A diminuição desses valores geralmente está associada à processos anêmicos. Porém, animais em quadros de anemia severa apresentam redução associada de hemácias,

hemoglobina e hematócrito, sendo normalmente esses resultados inferiores aos valores de referência descritos pela literatura (ARAÚJO, 2012).

A taxa de hemácia apresentou redução significativa nos grupos veneno dos tempos 24h, 72h e 96h relacionado aos grupos controle nos mesmos tempos. Os eritrócitos consistem em células anucleadas que quando se encontram em sua fase madura normalmente circulam na corrente sanguínea por alguns meses apesar de sua limitada capacidade sintética e do fato de se expor repetidas vezes a implicações mecânicas e metabólicas. Sua característica de não possuírem núcleo e outras organelas impossibilita a síntese de ácidos nucléicos ou proteínas (EVERDS, 2004).

Apesar da diferença significativa nos tempos 24h e 72h, apenas os animais envenenados no tempo 96h apresentaram valores de hemácia inferiores aos valores de referência ( $7,0 - 11,2 \cdot 10^{12}/L$ ) relatados em outros trabalhos (ARAÚJO, 2012). Os valores de hemácia em outras pesquisas envolvendo o acidente por *Bothrops* em atividade *in vivo* apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa (SENISE et al., 2015; YOSHIDA et al., 2018).

A hemoglobina apresentou uma redução significativa nos grupos veneno dos tempos 24h, 72h e 96h quando comparados aos seus respectivos grupos controles. A hemoglobina constitui uma proteína composta de grupamentos heme que representa 95% da composição de proteína total desta célula. As vantagens de conter hemoglobina dentro das células, ao contrário de livre no plasma, incluem: uma meia-vida maior (a hemoglobina livre no plasma possui uma meia-vida de apenas algumas horas), a atividade metabólica dos eritrócitos de manter o ferro ligado à hemoglobina em seu estado funcional e a capacidade de controlar a afinidade do oxigênio pela hemoglobina, alterando as concentrações de fosfatos orgânicos (especialmente o 2,3-DPG; EVERDS, 2004).

A presença de hemoglobina livre no plasma na concentração normalmente encontrada no sangue excederia a pressão osmótica, muitas vezes além do que normalmente ocorre pelas proteínas plasmáticas, prejudicando consideravelmente a circulação de fluídos entre o sistema vascular e os tecidos (BOLLIGER et al., 2010). Somente os animais envenenados no tempo 96h apresentaram valores de hemoglobina inferiores aos valores de referência ( $10,3 - 16,6 \text{ g/dL}$ ) publicados na literatura (ARAÚJO, 2012). Senise e colaboradores (2015) apresentaram resultados de hemoglobina no acidente por *Bothrops jararaca* em ratos nos tempos 3h, 6h e 24h após início do envenenamento e, analisando em relação a evolução conforme os tempos analisados, apresentaram similaridade com este trabalho. A redução da hemoglobina no acidente

botrópico foi relatada na literatura por Ximenes (2009) que demonstrou no envenenamento por *B. jararacussu* por via IM em ratos nos tempos 6h, 24h, e 48h.

O percentual de hematócrito demonstrou redução significativa nos envenenados dos tempos 24h, 72h e 96h em relação aos seus respectivos controles. O hematócrito consiste no percentual do volume de hemácias no volume total de sangue. Em procedimentos manuais, o hematócrito é medido após a centrifugação de um tubo microcapilar cheio de sangue total, com auxílio de uma tabela de leitura específica (THRALL, 2004). Após centrifugado, a porcentagem do composto de hemácias separado do plasma no tubo microcapilar é o hematócrito. Em procedimentos automatizados o hematócrito não é medido diretamente, seu valor é obtido por meio do produto da quantidade de hemácias e o VCM (EVERDS, 2004). Seu valor para camundongos em geral está entre 40 e 50%. Porém, esse valor pode variar dependendo de diversos fatores como linhagem estudada, local do experimento, estado de jejum, metodologia utilizada, entre outros (EVERDS, 2004; WEISS; WARDROP, 2010). Somente os animais envenenados nos tempos 72h e 96h apresentaram valores de Ht inferiores aos valores de referência publicados na literatura (ARAÚJO, 2012).

Geralmente a redução do hematócrito é dependente de mecanismos patológicos que provocam queda na produção de substâncias essenciais para síntese de eritrócitos e, conseqüentemente, a diminuição da produção eritrocitária (CHRISTIAN, 2010). A eritropoiese ocorre no interior da medula óssea, sendo controlada, principalmente, pela eritropoietina. A eritropoietina, produzida pelos rins sob hipóxia tecidual, age nas células-tronco mesenquimais induzindo-as a proliferação e diferenciação em células progenitoras eritróides (SILVA; MACEDO, 2006). Acredita-se que, diante de uma IRA induzida por acidente botrópico, a produção de eritropoietina seja prejudicada devido a lesão renal ocorrida, reduzindo suas atividades na células-tronco mesenquimais, interferindo assim na síntese eritrocitária, diminuindo os níveis de hemácia, hemoglobina e hematócrito, corroborando com os resultados apresentados nos tempos analisados após 24h de envenenamento (BERLING; ISBISTER, 2015). Pesquisas com modelo de acidente botrópico em experimentação animal relataram que após 24h de envenamento o hematócrito se apresenta com redução significativa, resultados estes similares aos descrito neste estudo (XIMENES, 2009; BARONE et al., 2011; BARONE et al., 2014; MARTINES et al., 2014).

Os índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM e RDW não apresentaram diferenças significativas entres os grupos veneno e controle em todos os tempos

analisados. A avaliação desses índices consistiu em, caso se tivesse diferença significativa, classificar a anemia morfológicamente com base nesses parâmetros. Dessa forma, se evidenciaria a resposta medular à anemia por meio da determinação do grau de reticulocitose e policromasia no sangue. Esta classificação normalmente está associada ao exame microscópico da população eritrocitária por meio de esfregaço sanguíneo, e não deve ser considerada específica somente para anemia (EVERDS, 2004; BOLLIGER et al., 2010). Todos os parâmetros hematimétricos avaliados se apresentaram dentro dos valores normais relatados pela literatura (ARAUJO, 2012). Diante disso, pode-se afirmar que a redução dos parâmetros eritrocitários nesta pesquisa indica um possível quadro anêmico nos grupos veneno dos tempo 72h e 96h como anemia normocítica normocrômica, justamente por não haver alterações nesses índices hematimétricos, demonstrando assim uma possível resposta medular frente a perda sanguínea relacionada ao acidente botrópico instalado.

O estresse oxidativo se apresenta como um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres (CHIRINO et al., 2008), sendo que a atividade desses radicais está relacionada a diversos componentes celulares, destruindo suas estruturas (YAO et al., 2007). Na avaliação de dano oxidativo, a dosagem de MDA nos mostrou um aumento significativo nos animais envenenados dos tempo 6h e 12h em relação aos animais controle nos mesmos tempos. Sua dosagem teve o intuito de avaliar o nível de peroxidação lipídica no tecido renal. Sua origem vem da lesão causada pelos radicais livres às membranas biológicas (VANNUCCHI et al., 1998), sendo sintetizado durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido araquidônico (TUAN, 2014). Os lipídios constituem uma classe de biomoléculas envolvidas no estresse oxidativo e os produtos formados denominados aldeídos são os principais causadores de outros danos dentro e fora da célula (DEL RIO et al., 2007).

Em um estudo realizado por Dantas e colaboradores (2018) determinou-se os valores de MDA de tecido renal em camundongos na IRA induzida por *B. insularis*, no qual foram apresentados resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Strapazzon et al. (2015) avaliou em pacientes humanos o MDA plasmático no acidente botrópico por *B. jararaca* e *B. jararacussu* em diferentes tempos. Dados como esses apresentados reafirmam que a mensuração de MDA é um marcador fidedigno de dano oxidativo, sendo não somente utilizada em modelo de IRA induzido por acidente ofídico, como em diversos modelos de IRA relatados na literatura (YE et al., 2010; KADKHODAEI et al., 2014; DA COSTA et al., 2015). Trabalhos utilizando modelo de



perfusão de rim isolado sob efeito do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* apresentaram resultados de MDA compatíveis com os apresentados neste trabalho, afirmando que apenas 90 minutos após aplicação do veneno já se obtém resultados que confirmam dano oxidativo por síntese de MDA (MARINHO, 2015; NOGUEIRA JÚNIOR, 2017).

Em relação a análise de atividade antioxidante, a GSH demonstrou redução significativa no tecido renal dentre camundongos envenenados nos tempos 6h e 12h quando comparadas aos camundongos controles nos mesmos tempos analisados. A GSH constitui uma tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, se caracterizando como um antioxidante não enzimático e atuando na redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nos tecidos, detendo assim a função de proteger as células dos danos causados pelos radicais livres e peróxidos oriundos do estresse oxidativo. A enzima glutationa redutase (GsR) é responsável por restaurar a glutationa oxidada em forma de glutationa reduzida, estabilizando novamente o estoque desse antioxidante (OLIVEIRA et al., 2008).

Pesquisas relacionadas a dosagem de GSH no acidente botrópico em humanos e animais experimentais corroboram com os valores encontrados nesta pesquisa, onde pacientes apresentam redução da atividade antioxidante mediada por GSH durante o envenenamento (STRAPAZZON et al., 2015; GOIS et al., 2017, DANTAS et al., 2018). O GSH foi dosado em modelo de perfusão renal sob efeito de veneno de *B. alternatus* após 90 minutos, demonstrando redução na atividade antioxidante mediada por este composto assim que se tem início do acidente, concordando com os resultados encontrados neste estudo (NOGUEIRA JUNIOR, 2017).

Em relação a análise indireta da atividade inflamatória por meio de dosagem de MPO não se observou diferença nos grupos veneno de todos os tempos analisados relacionados aos seus respectivos controles. A mieloperoxidase consiste em uma enzima presente em monócitos, neutrófilos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Quando ocorre lesão tecidual, os neutrófilos, além do papel de endocitose, secretam enzimas intracelulares como elastase, endopeptidases e mieloperoxidase até o local lesionado. O MPO é o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROMAN et al., 2007). Marinho (2015) apresentou resultados de MPO em tecido renal perfundido após 90 minutos de efeito das frações isoladas Asp49 e Lys49 de *B. pauloensis*, no qual em ambas as frações a atividade de MPO se mostrou elevada significativamente quando comparada ao controle.

Strapazzon et al. (2015) avaliou em pacientes humanos o MPO sérico no acidente botrópico por *B. jararaca* e *B. jararacussu* em diferentes tempos (0h, 24h, 7d e 30d), não havendo diferença significativa em relação ao controle. Analisando os resultados da literatura associados aos encontrados no experimento atividade *in vivo*, a atividade de MPO não apresentou resultados compatíveis com os relatados por outros autores, sendo que no experimento tratamento com AU/AO visualizou-se aumento significativo dos animais do grupo veneno em relação ao grupo controle. Acredita-se na hipótese que o tecido renal utilizado para realização dessa metodologia era constituído majoritariamente de tecido medular renal, visto que a dosagem do MPO foi a última metodologia realizada no experimento atividade *in vivo*, utilizando o pouco tecido renal coletado que restou.

No experimento atividade *in vivo* observamos importantes alterações histopatológicas renais condizentes com o quadro de degeneração tubular causado pelo acidente botrópico nas primeiras horas (6h e 12h), sendo observado nas últimas horas analisadas alterações mais severas como necrose epitelial e perda da borda em escova (72h e 96h). A correlação entre essas alterações e o aumento das concentrações de ureia e creatinina foram reportadas por diversos autores em acidentes por *Bothrops* (BOER-LIMA et al., 1999). Gay e colaboradores (2009) descreveram em acidente por *B. alternatus* extensa vacuolização das células epiteliais, congestão, edema, descamação e necrose acompanhadas de degradação proteolítica de colágeno tipo IV. Dantas e colaboradores (2018) reportaram em acidente por *B. insularis* dano tubular severo, azotemia, aumento do MDA, redução do GSH renal e aumento da expressão proteica de KIM-1. Semelhante ao que foi observado no presente estudo, o veneno de *Bothrops* em outros estudos provocou degeneração das estruturas tubulares com vacuolização, perda da arquitetura tubular e acúmulo de material eosinofílico luminal (KAMIGUTI et al., 1991; KOSCINCZUK et al., 2004; REYES et al., 2009; GOIS et al., 2017). Os resultados da análise histopatológica corroboram com os dados obtidos na análise do gama-GT urinário e proteinúria visto que, em ambas as metodologias, o dano tubular encontrado ocorreu nas primeiras 24h de envenenamento botrópico.

As alterações histopatológicas musculares são compatíveis com as descritas pela literatura no acidente botrópico, ocorrendo severa hemorragia e congestão nas primeiras horas, seguido da presença de infiltrados inflamatórios com a presença de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e consequente mionecrose com extensa perda tecidual. A correlação similar entre essas alterações e o aumento da CK foram relatadas na literatura

e condizem com os achados encontrados neste trabalho (MELO et al., 1993; MOREIRA et al., 1994; SATURNINO-OLIVEIRA et al., 2014)

Após análise dos resultados avaliados no experimento atividade *in vivo* do veneno podemos afirmar que o modelo de IRA induzido por acidente de *B. jararacussu* foi desenvolvido com sucesso, promovendo alterações em níveis bioquímicos, urinários, eritrocitários e de dano oxidativo. Os tempos de 6h e 12h de acidente botrópico apresentaram resultados compatíveis com o quadro de injúria renal aguda, sendo selecionado o tempo de 12h de envenenamento para a realização da terceira etapa desta pesquisa, no qual avaliou-se possíveis efeitos de proteção renal induzidos pelos ácidos ursólico e oleanólico. A escolha do tempo de 12h para a realização do experimento tratamento com os triterpenos foi realizada com a expectativa de selecionar um tempo de análise que ocasionasse uma lesão renal aguda e, com a inserção do tratamento, apresentasse um bloqueio à resposta do veneno botrópico. Os resultados encontrados nos tempos 72h e 96h nos indicam uma possível cronicidade do dano causado pelo veneno de *B. jararacussu*, sendo necessária realização de outras metodologias para averiguar uma consequente doença renal crônica oriunda do acidente botrópico.

Os ácidos triterpenóicos são conhecidos na medicina tradicional chinesa, sendo utilizado por séculos como tratamento para diversas patologias, como hepatopatias, nefropatias, enfermidades cardiovasculares e respiratórias (LIU, 1995). Atualmente, os terpenos de uma forma geral são focos de estudos comprovando atividades protetoras em diversos tipos de modelos experimentais (DU; KO, 2006; OVÉSNA et al., 2006; SARAVANAN; PUGALENDI, 2006; JI et al., 2009; MARTÍN et al., 2014). Várias substâncias oriundas de produtos naturais possuem sua eficácia comprovada em modelos de IRA. Dentre os triterpenos estudados, o ácido ursólico e ácido oleanólico se destacam por apresentarem resultados satisfatórios em modelos de nefrotoxicidade pós-antibioticoterapia e IRA consequente de cirrose hepática (PATIL et al., 2010; MA et al., 2014; JESUS et al., 2015; ALI et al 2019). As doses empregadas dos ácidos ursólico e oleanólico no experimento tratamento foram selecionadas com base nos trabalhos relatados na literatura utilizando modelos em camundongos (JI et al., 2009; MA et al., 2014; MARTÍN et al., 2014; LI et al., 2018)

Os parâmetros fisiológicos avaliados no experimento tratamento são condizentes com os valores encontrados no experimento atividade *in vivo* do veneno. A administração dos triterpenos não ocasionou alterações significativas nos parâmetros de peso renal, ingestão de água, excreção de urina e perda de peso nos animais tratados na doses

avaliadas. Esses resultados nos afirmam que os parâmetros fisiológicos avaliados neste trabalho não devem ser considerados como parâmetros excludentes na realização de experimentos com triterpenos, pois apesar dos resultados desses parâmetros fisiológicos não terem apresentado achados sugestivos de nefroproteção no acidente botrópico, parâmetros bioquímicos e moleculares nos mostraram o potencial nefroprotetor dos ácidos ursólico e oleanólico. Não foram encontrados relatos na literatura dos parâmetros fisiológicos avaliados nesta pesquisa relacionados ao tratamento com AU/AO em IRA induzida por acidente ofídico.

Os parâmetros bioquímicos plasmáticos e urinários avaliados no experimento tratamento demonstraram resultados sugestivos de nefroproteção nos animais envenenados que receberam tratamento com os triterpenos, principalmente na dose 75mg/kg. Parâmetros como ureia, creatinina, creatina quinase, *clearance* de creatinina, gama-GT urinária e proteinúria nos revelaram diminuição do quadro azotêmico induzido nos animais do grupo veneno, assim como o retorno de alguns desses parâmetros a valores encontrados nos animais do grupo controle.

Os resultados de ureia e creatinina no experimento tratamento são condizentes com os relatados na literatura utilizando tratamento com AU/AO em outros modelos de nefrotoxicidade. Pai e colaboradores (2012) relataram que o efeito do ácido ursólico em lesão renal induzida por gentamicina em camundongos foi capaz de reduzir valores de ureia e creatinina a valores semelhantes ao do grupo controle, resultados esses também visualizados em outra pesquisa utilizando ácido oleanólico na nefrotoxicidade por gentamicina em ratos (PATIL et al., 2010). Os efeitos renoprotetores do ácido ursólico foram demonstrados na redução dos valores séricos de creatinina, ureia e cistatina C em modelo de injúria renal agudo induzido por isquemia reperfusão em ratos, e também em modelo de IRA por sepse em camundongos (PENG et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Em relação aos valores de creatina quinase encontrados nesta pesquisa a dose 75mg/kg dos AU/AO apresentou uma redução dos efeitos causados pelo veneno botrópico. No entanto, os valores encontrados nesse grupo não se aproximaram dos valores encontrados nos grupos controle e triterpenos. Preciado e colaboradores (2018) relataram redução nos valores de CK utilizando tratamento com AU/AO em modelo de envenenamento por *B. atrox* por via IM em camundongos, resultado esse corroborando com os valores encontrados neste trabalho. A dosagem de CK no tratamento com ácido oleanólico também foi realizada em modelo de lesão cardíaca por miocardite autoimune

em camundongos, apresentando resultado positivo na redução da lesão após 21 dias de tratamento (MARTÍN et al., 2014).

A avaliação da função renal por meio do *clearance* de creatinina nos mostrou resultados sugestivos de atividade nefroprotetora na dose 75mg/kg, sendo esta dose a única a não apresentar diferença significativa em relação ao grupo controle. A análise do *clearance* foi realizada com o intuito de avaliar a depuração de creatinina produzida no organismo dos animais. Não existem trabalhos anteriores com AU/AO e derivados que avaliaram o *clearance* de creatinina no contexto de dano renal induzido por acidente ofídico. Efeitos dos ácidos ursólico e oleanólico no sistema renal de camundongos diabéticos mostraram aumento na eliminação de creatinina urinária após tratamento, sendo mais significativo no tratamento realizado somente com ácido oleanólico (WANG et al., 2010). Patil e colaboradores (2010) relataram aumento no *clearance* de creatinina de ratos tratados com ácido oleanólico na dose 80mg/kg por via oral após nefrotoxicidade induzida por gentamicina, confirmando os resultados desta pesquisa em modelo de acidente botrópico.

O tratamento com AU/AO reduziu a Gama GT urinária com significância estatística. Não existem trabalhos anteriores com triterpenos que avaliaram a excreção dessa enzima no contexto de dano renal, não se dispondo de dados para fins de comparação de resultados. No entanto, podemos afirmar que, o que foi aqui observado em relação a esse parâmetro, é condizente com os resultados globais aqui obtidos, ou seja, de proteção do dano.

A administração dos AU/AO na dose 75mg/kg reduziu a eliminação de proteína urinária dos animais sob efeito de envenenamento botrópico. Não foram encontrados trabalhos anteriores com triterpenos que avaliaram a excreção de proteína urinária de baixo e médio peso molecular na IRA. Portanto, não se dispõe de dados para fins de comparação de resultados. A avaliação da eliminação de albumina urinária em tratamentos com AU/AO foi relatada na literatura em diversos modelos experimentais incluído IRA pós-antibioticoterapia, ocorrendo majoritariamente a redução na eliminação de albumina na urina após tratamento com triterpenos (PATIL et al., 2010; WANG et al., 2010; ULLEVIG et al., 2011; LEE et al., 2014).

O tratamento com triterpenos em todas as doses empregadas atenuou a concentração do MDA renal. O tratamento com AU/AO reduziu a concentração de MDA renal na IRA por tetracloreto de carbono (MA et al., 2014). Yin e colaboradores (2012) relataram a redução do MDA em tecido renal após indução de estresse oxidativo em

modelo de camundongos alimentados com ácidos triterpenoides por até 8 semanas. No presente trabalho o tratamento com AU/AO também reduziu o dano oxidativo renal como pode ser observado pela redução da média do MDA renal dos animais.

Em modelo de IRA induzido por acetaminofeno, o ácido ursólico aumentou os níveis de GSH renal de ratos após tratamento por 07 dias (ABDEL-ZAHER et al., 2007). Esses dados não corroboram com os dados aqui obtidos, visto que os AU/AO não aumentaram a concentração de GSH renal. Acredita-se na hipótese de que o tratamento por apenas 12h não seja tempo suficiente para se obter aumento na atividade antioxidante por GSH. Em outra teoria, suspeita-se da possibilidade dos AU/AO não apresentarem atividade antioxidante mediada pelo sistema envolvendo o ciclo metabólico da glutatona. Não foram encontrados trabalhos anteriores com triterpenos que avaliaram a atividade de GSH renal na IRA por acidente ofídico.

No presente estudo o tratamento com triterpenos não diminuiu a inflamação induzida por veneno de *B. jararacussu* por meio da atividade de mieloperoxidase. A dosagem de MPO no tratamento com ácido ursólico foi descrita na literatura apenas em modelo de IRA induzida por ácido aristolóquico utilizando animais *zebrafish* (DING et al., 2015). O estresse oxidativo desempenha um papel crítico no aumento da resposta inflamatória. Os radicais livres afetam as estruturas celulares e levam a ativação da via do NF- $\kappa$ B com liberação de quimiocinas e citocinas com conseqüente recrutamento de neutrófilos (RADA et al., 2011; SINHA et al. 2015). Acredita-se que a posologia dos AU/AO utilizada no tratamento desse trabalho não conseguiu reduzir a inflamação relacionada à atividade de MPO no tempo de análise selecionado. Não foram encontrados trabalhos anteriores com triterpenos que avaliaram a atividade de MPO renal na IRA por acidente ofídico.

A Molécula de Injúria Renal 1 (KIM-1) é um biomarcador e se expressa no túbulo proximal (TIMMEREN et al., 2007). Avaliar sua expressão é uma forma de verificar a injúria tubular. A KIM-1 se caracteriza por ser uma proteína transmembrana cuja expressão aumenta nas células tubulares proximais quando há injúria local (TIMMEREN et al., 2007). É um marcador de lesão renal precoce pois se altera muito antes dos parâmetros bioquímicos clássicos, como ureia e creatinina sérica. A creatinina precisa de 50% de comprometimento da função renal para que seja alterada (HAN et al., 2002; BONVENTRE, 2008).

No rim lesado, KIM-1 torna as células tubulares em uma espécie de fagócito ao exercer a função de internalizar células apoptóticas e detritos de células necróticas

(ICHIMURA et al., 2012). Já foi bem reportado que a expressão de KIM-1 aumenta no acidente por *Bothrops* e outras espécies de serpentes (MARTINES et al., 2014; CABRAL, 2018; DANTAS et al., 2018), o que vai de acordo com os achados do presente trabalho. Essa molécula se expressa mais rapidamente do que outros marcadores também considerados precoces como o NGAL, MCP-1 e IL-18, sendo, portanto, mais sensível (LIANGOS et al., 2009). Na presença de um agente nefroprotetor a expressão de KIM-1 pode ser reduzida, no entanto, os valores apresentados neste trabalho no grupo 75mg/Kg apresentaram-se superiores aos encontrados no grupo veneno. Como a análise aqui realizada para a expressão relativa de KIM-1 foi feita apenas no tempo de 12 horas, quando a lesão renal provocada pelo envenenamento se apresentava ainda bastante intensa, talvez a proteção observada pelo emprego do AU/AO em outros parâmetros, para este marcador, viesse a ocorrer posteriormente. Os valores de KIM-1 nos animais envenenados deste trabalho corroboram com os valores encontrados em outros trabalhos deste grupo utilizando veneno de *Lachesis acrochorda* e *Crotalus durissus* ssp. em camundongos no mesmo tempo analisado (dados não publicados; CABRAL, 2018). Sugere-se a realização de análises em tempos posteriores ou o emprego de doses mais altas, na tentativa de reverter o efeito lesivo indicado pelo KIM-1.

A NADPH Quinona Oxidoreductase 1 (NQO-1) é uma flavoenzima que contém como cofator o dinucleotídeo de flavina e adenina – FAD. Localizada na membrana mitocondrial, sua função se caracteriza por catalisar a redução de uma ampla gama de substratos, incluindo as quinonas, por meio da captação de dois elétrons. As quinonas possuem tanto a capacidade de oxidar moléculas endógenas como reagir com o oxigênio e nitrogênio formando outros radicais livres (ROSS; SIEGEL, 2017). A remoção de uma quinona por NQO-1 tem sido considerada um mecanismo de proteção contra o dano oxidativo e sua inibição está associada a intoxicação e câncer (NEBERT et al., 2002).

Nesta pesquisa os animais envenenados por *B. jararacussu* apresentaram aumento na expressão de NQO-1 e, mesmo após tratamento com os triterpenos, não houve redução dessa expressão. Em modelos experimentais de dano por isquemia reperusão o bloqueio da NADPH oxidase por NQO-1 promove uma redução da disfunção renal e do estresse oxidativo (LONGO, 2014). Pesquisas relatadas na literatura utilizando cisplatina em modelo de IRA em ratos relataram aumento da expressão de NQO-1, comprovando seu potencial como alvo terapêutico promissor para a proteção da lesão renal aguda. A expressão aumentada de NQO-1 para o grupo tratado apenas com veneno ofídico de *B. jararacussu* indica que o tecido renal busca alternativas anti-oxidativas de proteger-se

contra a lesão, mas os efeitos anti-oxidantes demonstrados pelos triterpenos nesta pesquisa parecem não agir pela via de proteção associada ao fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), ativador transcricional da via que induz a produção da enzima NQO-1 e outros produtos anti-oxidantes endógenos.

O Inibidor Tecidual de Metaloproteinases (TIMP-2) é uma proteína membro da família de genes TIMP. As proteínas codificadas por essa família de genes são inibidores naturais das metaloproteinases da matriz (MMP), um grupo de peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular, sendo o TIMP-2 capaz de inibir o MMP-2 com mais eficácia do que outros TIMPs. Possuem a capacidade de suprimir diretamente a proliferação de células endoteliais, ou seja, diminuir a formação de tecidos inativos em resposta a fatores angiogênicos e inibindo a atividade da protease em tecidos submetidos à remodelação da matriz extracelular (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Neste trabalho a expressão gênica de TIMP-2 mostrou-se diminuída nos animais envenenados mesmo após receberam tratamento com triterpenos. Suspeita-se que as células do tecido renal não conseguem evitar a apoptose e necrose tecidual consequente dos efeitos do veneno, e que os ácidos ursólico e oleanólico não apresentem atividades antioxidantes mediadas pela ativação de TIMP-2. Em um experimento realizado anteriormente por este grupo de pesquisa utilizando veneno de *L. acrochorda* em camundongos verificou-se que o veneno induziu uma diminuição da expressão de TIMP-2 nos tempos de 12 e 24 horas, resultado semelhante ao encontrado neste estudo. Não existem pesquisas anteriores publicadas na literatura com triterpenos que avaliaram a expressão desta molécula no contexto de dano renal por ofidismo, não se dispondo de dados para fins de comparação de resultados.

As Superóxido Dismutase 1, variante citossólica desta família de enzimas antioxidantes (SOD1s), são enzimas codificadas pelo gene SOD1, que se caracterizam por conter um barril  $\beta$  e um sítio binuclear de cobre e zinco em cada subunidade (MASLOV et al., 2015). São proteínas do espaço intermembranar citoplasmático e mitocondrial que atuam convertendo radicais superóxido de origem natural, porém prejudiciais, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. O SOD1 é essencial na proteção contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o estresse oxidativo por lesão de isquemia-reperfusão, a liberação de EROs contribui substancialmente para o dano celular e a morte por um efeito direto na célula, bem como por sinais apoptóticos. Sabe-se que a SOD1s possuem capacidade para limitar os efeitos prejudiciais das EROs,



sendo dessa forma importante por seu efeito antioxidantes (YAMANOBE et al., 2007; FUJITA et al., 2012).

A expressão de SOD1s nos animais do grupo veneno mostrou-se reduzida em relação ao grupo controle, enquanto que os animais do grupo 75mg/kg mantiveram resultados semelhantes aos encontrados nos animais do grupo controle e triterpenos. Esse resultado nos indica que o tratamento com triterpenos conseguiu reverter os efeitos causados pelo veneno, sendo as SOD1s possivelmente mediadoras da atividade antioxidante dos ácidos ursólico e oleanólico. Em experimentos realizados por pesquisadores deste grupo as SOD1s apresentaram diminuídas em camundongos *black* com IRA induzida por *L. acrochorda* após 12h e 24h de envenenamento. Não foram encontrados estudos anteriores na literatura com triterpenos que avaliaram a atividade desta molécula no contexto de injúria renal por acidente ofídico, não se dispondo de dados para fins de comparação de resultados.

A Interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória produzida em diversos tecidos com envolvimento em diferentes patologias (BELCHER et al., 2019). Se caracteriza por agir sinergicamente com a IL-12 para induzir a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos Th1 (MAK; SAUNDERS, 2006), sendo secretada de forma inativa e ativada por caspase 1 no túbulo proximal quando há injúria renal (BELCHER et al., 2019). A análise de IL-18 é utilizada como um marcador para lesão tubular proximal em necrose tubular aguda. O nível de IL-18 aumenta em várias doenças de cunho inflamatório e isso pode limitar a sua aplicação em termos de sensibilidade e especificidade renal (PERES et al., 2013).

A análise de IL-18 neste estudo mostrou diminuição da sua expressão em camundongos dos grupos triterpenos, veneno e tratamento em relação ao grupo controle. Esse achado corrobora com os resultados encontrados por este grupo de pesquisa em experimentos anteriores utilizando veneno de *L. acrochorda* em camundongos no mesmo tempo analisado. Cabral (2018) apresentou resultados em tecido renal de camundongos envenenados por *C. durissus* ssp., no qual a IL-18 dos envenenados apresentou valores semelhantes aos encontrados nos animais controle. Acredita-se que os macrófagos, responsáveis pela liberação da interleucina 18, não estejam relacionados ao processo inflamatório renal instalado no envenenamento, sendo necessária a análise de outros mediadores inflamatórios para se afirmar tal hipótese. Não foram encontradas pesquisas com triterpenos que avaliaram a expressão de IL-18 na IRA por acidente botrópico. Sendo assim, não se dispõe de dados para fins de comparação de resultados.

A Clusterina é uma glicoproteína localizada na maioria dos órgãos, sendo secretada principalmente pelas células tubulares renais (DAIRI et al., 2016). As suas funções estão relacionadas com mecanismos de proteção celular, transporte de lipídios, promoção de agregação celular, maturação espermática, desempenha um papel importante nos mecanismos anti-apoptose, mecanismos de proteção específicos contra lesão renal e regulação da atividade do complemento (REIS, 2016). É expressa em resposta à lesão tubular renal, exercendo um efeito protetor renal a uma variedade de doenças renais como na nefrectomia, obstrução uretral unilateral, cálculo renal, isquemia-reperfusão renal ou nefrotoxicidade (ZHOU et al., 2009; LI et al., 2015).

Os valores de clusterina apresentados neste trabalho indicam o aumento de expressão nos animais envenenados e no grupo tratamento em relação aos animais controle e triterpenos. Suspeita-se que a atividade dos triterpenos não seja capaz de atenuar a lesão tubular renal expressada por meio da clusterina, sendo necessária a análise de outros marcadores de lesão renal, como por exemplo NGAL, para se afirmar tal hipótese. Não existem pesquisas anteriores publicadas na literatura com triterpenos que avaliaram a expressão desta molécula no contexto de dano renal, não havendo dados para comparação dos resultados.

Com base nesses resultados podemos inferir que a atividade dos ácidos ursólico e oleanólico se destaca por seu efeito antioxidante e, amparados por Pai e colaboradores (2012), sabemos que o AU/AO possuem efeito nefroprotetor na injúria renal aguda por antimicrobianos, sendo possível a ocorrência da reversão de IRA consequente de acidente botrópico. Dessa forma, sugerimos que a atividade do AU/AO no presente trabalho, seja analisada em outros biomarcadores de atividade antioxidante para que se possa justificar os dados bioquímicos e de estresse oxidativo encontrados.

Como já mencionado, diversos trabalhos estudaram o efeito antioxidante dos ácidos ursólico e oleanólico em diversos modelos (DU; KO, 2006; . OVÉSNA et al., 2006; ABDEL-ZAHER et al., 2007; SENTHIL et al., 2007; JI et al., 2009; PATIL et al., 2010; PAI et al., 2012; MARTÍN et al., 2014; MA et al., 2014). O efeito nefroprotetor dos AU/AO aqui observado, pode ser justificado por algumas propriedades que eles detém, e que nesta pesquisa foi observado pela reversão da SOD1s gênica.

Como limitações podemos citar a composição dos triterpenos, por apresentarem difícil dissolução e diluição, a ausência da medida de concentração plasmática das drogas em estudo de forma a verificar sua biodisponibilidade, a falta de análise dos eletrólitos urinários e a quantidade limitada de AU/AO, que não nos permitiu reproduzir o

experimento mais de uma vez, tendo assim pouco material disponível para análise de outros marcadores para o dano oxidativo, por exemplo. Na literatura o modelo de IRA induzido por veneno botrópico segue sendo realizado e, segundo os parâmetros analisados no presente trabalho, nós conseguimos reproduzi-lo.

Os resultados obtidos em relação ao tratamento com triterpenos corroboram com os previamente relatados na literatura em outros modelos, demonstrando um efeito redutor da IRA por veneno de *B. jararacussu*. A dose de 75mg/Kg apresentou resultados promissores ao atenuar a maioria dos parâmetros bioquímicos e dados de estresse oxidativo analisados, havendo assim um efeito protetor sobre a lesão.

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que o modelo de injúria renal aguda por veneno de serpente *Bothrops jararacussu* foi reproduzido com sucesso, promovendo modificações em parâmetros bioquímicos, urinários, hematológicos e oxidativo avaliados.

A dose de 11,77 mg/Kg do veneno de *B. jararacussu* correspondente a 80% da DL<sub>50</sub> via intramuscular, obtida na primeira etapa do presente trabalho, foi capaz de causar lesão renal e sistêmica caracterizada por perda da função renal e indução de processo oxidativo tempo dependente, uma vez que essas alterações se estenderam até 24h de envenenamento. No entanto, resultados de albuminúria, proteinúria e alterações histopatológicas como necrose epitelial e perda da borda em escova se estenderem por até 96h do acidente botrópico, indicando que o acidente botrópico pode ocasionar lesão renal crônica.

Os ácidos ursólico e oleanólico administrados na dose 75mg/Kg apresentaram ação protetora renal capaz de atenuar a azotemia, a TFG, a perda de proteína na urina e o dano oxidativo. Será necessário uma investigação de outros biomarcadores moleculares, a análise dos tempos subsequentes, o emprego de testes que ampliem a dose empregada e o número de aplicações, ou seja, metodologias que justifiquem esse potencial nefroprotetor.

Dessa forma, concluímos que os ácidos ursólico e oleanólico aplicados intraperitonealmente na dose de 75 mg/kg possuem efeito protetor na injúria renal aguda induzida por administração intramuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. O. et al. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. **Toxicon**, v. 234, n. 1-2, p. 124–134, 2007.
- ALBUQUERQUE, H. N.; COSTA, T. B. G.; 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.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. et al. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. et al. Acute kidney injury induced by *Bothrops* venom: insights into the pathogenic mechanisms. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 148, 2019.
- ALMEIDA, F. A. Microalbuminúria como marcador precoce de comprometimento da função renal. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, 2001.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 723-732, 2002.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009
- ARAÚJO, Fernanda Trindade Madeira. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório/FIOCRUZ**, 157 p. Dissertação (Mestrado em Ciências das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012
- ARAÚJO, H. P. et al. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502–514, 2008.
- ARAÚJO, Wagner Lima. **Avaliação da atividade e da estabilidade de GGT urinário de cães hípidos**, 39 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- ASSAKURA, M. T. et al. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.
- AYELESO, T. B.; MATUMBA, M. G.; MUKWEVHO, E. Oleanolic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1915, 2017.
- BARBOSA, A. M. et al. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p.1236–1244, 2008.

- BARONE, J. M. et al. 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.
- BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**, v. 79, p. 1-10, 2014.
- BELCHER, J. M. et al. Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 622-632, 2014.
- BELLOMO, R.; KELLUM J. A.; RONCO C. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, p. 756-766, 2012
- BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 12, n. 45, p. 82-96, 1984.
- BERLING, I.; ISBISTER, G. K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 82-89, 2015.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Brazilian reptiles – List of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2012. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 15 dez 2019.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 217-222, 2002.
- 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. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 5, p. 698-706, 1999.
- BOES, K. M.; WEISS, D.; WARDROP, K. J. Hematology of cervids. **Veterinary hematology: Wiley-Blackwell**, p. 918-26, 2010.
- BOLLIGER, A. P. et al. Hematology of laboratory animals. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>a</sup> ed. Ames: Wiley Blackwell, Cap. 110; 2010. p. 852-887.
- BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 68, n. sup241, p. 78-83, 2008.
- BORGES, K. E. et al. Exames de função renal utilizados na medicina veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.
- BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in cancer biology**, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2010.

- BRADLEY, P. P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.
- BRASIL, 2001. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –**SINAN** Net. Acesso em 22/11/2019.
- BRASIL, 2010. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –**SINAN** Net. Acesso em 22/11/2019.
- BRASIL, 2014. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –**SINAN** Net. Acesso em 22/11/2019.
- BRASIL, 2017. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –**SINAN** Net. Acesso em 22/11/2019.
- BRASIL, 2018. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –**SINAN** Net. Acesso em 22/11/2019.
- BRITO, M. V. H. et al. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 243-246, 2005
- BULTRÓN, E.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1179, n. 3, p. 253-259, 1993.
- BURDMANN, E. A.; JHA, V. Acute kidney injury due to tropical infectious diseases and animal venoms: a tale of 2 continents. **Kidney international**, v. 91, n. 5, p. 1033-1046, 2017.
- CABRAL, G. G. et al. Insuficiência renal aguda devido à rabiomiólise. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, p. 42-47, 2012.
- CABRAL, Ívila Santos. **Estudo dos efeitos fisiopatológicos locais e renais induzidos pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp. do estado da Bahia**, 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2018.
- CALTANA, L. et al. Further evidence for the neuroprotective role of oleanolic acid in a model of focal brain hypoxia in rats. **Neurochemistry International**, v. 79, p. 79–87, 2014.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. A. **The Venomous Reptiles of the Western hemisphere**. Comstock (Cornell University Press), Ithaca, NY, 962 p., 2004.
- CAMPOS, L. B. et al. *In vitro* comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 1-10, 2013.
- CARON, E. J. et al. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? **Toxicon**, v. 54, p.779–783, 2009.

- CARONE, S. E. et al. A new l-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 25-35, 2017.
- CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 7/8, p.843-856, Apr. 2004.
- CEDRO, R. C. et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 33, 2018.
- CHAVES, F. et al. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon**, v. 27, n. 10, p. 1085-1093, 1989.
- CHAVES, F. et al. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp 49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861-1869, 1998.
- CHEN, H. et al. Ursolic acid isolated from *Isodon excisoides* induces apoptosis and inhibits invasion of GBC-SD gallbladder carcinoma cells. **Oncology letters**, v. 18, n. 2, p. 1467-1474, 2019.
- CHEN, Y. L.; TSAI, I. H. Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein-Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, p. 472-477, 1995.
- CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 13, 2015.
- CHIPPAUX, J. P. et al. **Snake venoms and envenomations**. Krieger Publishing Company, 300 p., 2006.
- CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, 2017.
- CHIRINO, Y. I. et al. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. **Toxicology Letters**, v. 4, n. 176, p. 48-57, 2008.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2009.
- CHRISTIAN, J. A. Erythrokinetics and Erythrocyte Destruction. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>a</sup> ed. Ames: Wiley Blackwell, Cap. 22; p. 136-143. 2010
- COGO, J. C. et al. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1947-1959, 2006.



- COSTA, J. de O. et al. Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1365-1377, 2010.
- COTTE, C. A.; ESSENFELD-YAHR, E.; LAIRET, A. C. Effects of *Crotalus* and *Bothrops* venom on normal and malignant cells cultivated *in vitro*. **Toxicon**, v. 10, n. 2, p. 157-158, 1972.
- CROXATTO, H. Hypertensinase Activity of an L-aminoacid oxidase preparation and of the venom of *Bothrops neuwiddii*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 62, n. 2, p. 146-148, 1946.
- CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in developing world. **Ethnicity and Disease**, v. 19, n. 1, Suppl, 1, p. 42- 46, 2009.
- DA COSTA, M. F. B. et al. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, n. 9, p. 787-795, 2015.
- DA SILVA, C. P. et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 44, 2015.
- DAHER, E. F. et al. Rhabdomyolysis and acute renal failure after strenuous exercise and alcohol abuse: case report and literature review. **São Paulo medical journal**, v. 123, n. 1, p. 33-37, 2005.
- DAIRI G. et al. Transcriptome-based analysis of molecular pathways for clusterin functions in kidney cells. **Journal of cellular physiology**, v. 9999, p. 1–11, 2016.
- DANTAS, R. T. et al. Evaluation of KIM-1 as an early biomarker of snakebite-induced AKI in mice. **Toxicon**, v. 151, p. 24-28, 2018.
- DANTAS, R. T. et al. L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. **Toxicon**, v. 104, p. 52-56, 2015.
- DE CARVALHO, D. D. et al. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1471-1476, 2001.
- DE CASTRO DAMASIO, D. et al. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299-307, 2014.
- DE CASTRO, I. et al. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 833-839, 2004.
- DE SOUSA, F. C. M. et al. *Bothrops erythromelas* venom induces apoptosis on renal tubular epithelial cells. **Toxicon**, v. 118, p. 82-85, 2016.

DE VASCONCELOS AZEVEDO, F. V. P. et al. Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom on human breast cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 261-273, 2019.

DEL RIO, D., STERWART, A. J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 15, p. 316-28, 2005.

DELAFONTAINE, M. et al. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 244, 2017.

DING, Y. et al. Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish. **Toxins**, v. 7, n. 1, p. 97-109, 2015.

DOS SANTOS, M. C. et al. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

DU, Y.; KO, K. M. Effects of pharmacological preconditioning by emodin/oleanolic acid treatment and/or ischemic preconditioning on mitochondrial antioxidant components as well as the susceptibility to ischemia-reperfusion injury in rat hearts. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 288, n. 1-2, p. 135-42, 2006

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia renal de Vander**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

EBAID, H. et al. Antioxidant bioactivity of Samsun ant (*Pachycondyla sennaarensis*) venom protects against CCL4-induced nephrotoxicity in mice. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

EDELSTEIN, C. T. Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Advances in Chronic Kidney Disease**. v. 15, ed. 3, p. 222-234, 2012.

EMANUELLI, M.P. et al. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

ERIKSSON, E. et al. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. **Experimental physiology**, v. 89, n. 4, p. 427-433, 2004.

ESCALANTE, T. et al. *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by  $\alpha$ 2-macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. **Toxicon**, v. 43, n. 2, p. 213-217, 2004.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

EVANGELISTA, I. L. et al. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

EVERDS, N. Hematology of the Mouse. In: HEDRICH, H. J. **The Laboratory Mouse**. 1ª Ed. Londres: Academic Press; Elsevier, Cap. 17; p. 271-286. 2004.

- FENWICK, A. M. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.
- FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve**. Cambridge university press, Cambridge, 1952.
- FUJITA, H. et al. Clustered fine compartmentalization of the mouse embryonic cerebellar cortex and its rearrangement into the postnatal striped configuration. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 45, p. 15688-15703, 2012.
- GALVÃO, J.; GUSMÃO, L.; POSSANTE, M. Insuficiência renal e rabdomiólise induzidas por exercício físico. **Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão**, v. 17, n. 4, p. 189-197, 2003.
- GAY, C. C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 546-554, 2005.
- GAY, C. C. et al. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 53-59, 2009.
- GIL, M. C. et al. Influence of age on stress responses to metabolic cage housing in rats. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 19, n. 5, p. 625-633, 1999.
- GIMENES, S. N. C. et al. Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58-66, 2014.
- GOIS, P. H. F. et al. Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006024, 2017.
- GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290-300, 2011.
- GRAHAM, R. L. J. et al. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 121-129, 2008.
- GRANTSAU, R. **As Serpentes Peçonhentas do Brasil**. 1ª ed. São Carlos, SP: Vento Verde. p. 116-129. 2013.
- GREENE, H. W. The behavioral and ecological context for pitviper evolution. **Jr (eds) Biology of the Pitvipers**. Selva, Tyler, TX, p. 107-117, 1992.

GUIMARÃES Fabiola Voznika. **Avaliação da atividade da gama glutamil transpeptidase urinária em cães que receberam gentamicina em dose terapêutica.** 68 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2000.

GUPTA, M. B. et al. Antiulcer activity of some plant triterpenoids. **The Indian journal of medical research**, v. 73, p. 649, 1981.

GUTIERREZ, B. et al. Oleonic acid protects against gastrointestinal disturbances in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **multiple sclerosis journal**, england: sage publications ltd, p. 824-825, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, CHARLOTTE L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009

GUTIÉRREZ, J.M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes em América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 51, p. 1–16, 2011.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snakebite envenoming. **Nature**, v.3, 2017

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

HATAKEYAMA, D. M. et al. Examination of biochemical and biological activities of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae; Wied-Neuwied 1824) snake venom after up to 54 years of storage. **Toxicon**, v.141, p.34-42, 2018.

HAVT, Alexandre. **Toxicidade aguda e alterações hematológica e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 1999.

HENNEMANN, C. R. A. et al. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeo em cães. **Ciência Rural**. v. 27, n. 2, 1997.

HERZIG, R. H.; RATNOFF, O. D.; SHAINOFF, J. R. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 76, p. 451-465, 1970.

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11ª T. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, pag. 540-541, 846p;

HIGUCHI, D. A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319-328, 2007.

HUMPHRIES, M. J.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of human melanoma cells. **Science**, v. 233, p. 467-470, 1986.

ICHIMURA, T.; BROOKS, C. R.; BONVENTRE, J. V. Kim-1/Tim-1 and immune cells: shifting sands. **Kidney international**, v. 81, n. 9, p. 809-811, 2012.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 1, p. 26–42, 2008.

IQBAL, J. et al. Ursolic acid a promising candidate in the therapeutics of breast cancer: Current status and future implications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 752-756, 2018.

JESUS, J. A. et al. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

Jl, H. Y. et al. Interspecies scaling of oleanolic acid in mice, rats, rabbits and dogs and prediction of human pharmacokinetics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 2, p. 251–257, 2009.

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

KADKHODAEI, M.; NAJAFI, A.; SEIFI, B.. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **International Journal of Surgery**, v. 12, n. 11, p. 1162-1166, 2014.

KALLIOKOSKI, O. et al. Mice do not habituate to metabolism cage housing—a three week study of male BALB/c mice. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58460, 2013.

KAMIGUTI, A. S. et al. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1097-1105, 1991.

KASHIMA, S. et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.

KASHIWADA, Y. et al. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1090-1095, 1998.

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

KOSCINCZUK, P. et al. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 64, n. 4, p. 320-324, 2004.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; KOUYOUMDJIAN, N. C.V. Acidentes Ofídicos "estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto", **A revista do Clínico Geral**, p. 55-93, set. 1986.

- LEAL, T.L. et al. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 905-911, 2007.
- LEE, A. W. et al. Ursolic Acid attenuates HMGB1-induced LOX-1 expression in vascular endothelial cells *in vitro* and inhibits atherogenesis in hypercholesterolemic mice *in vivo*. **Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 317, 2012.
- LEE, J. et al. Effects of ursolic acid on glucose metabolism, the polyol pathway and dyslipidemia in non-obese type 2 diabetic mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 7, p. 683-691, 2014.
- LEE, S. Y. et al. Recent studies on ursolic acid and its biological and pharmacological activity. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 15, p. 221-228, 2016.
- LEITE, C. A. C. et al. Ablation of the ability to control the right-to-left cardiac shunt does not affect oxygen uptake, specific dynamic action or growth in the rattlesnake *Crotalus durissus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 10, p. 1881-1889, 2013.
- LEMOS, J. C. et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos noticiados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 50- 59, 2009.
- LI J. et al. Calcium oxalate calculi-induced clusterin expression in kidney. **Urolithiasis**, v. 43, n. 5, p. 411-418, 2015.
- LI, Q. et al. Ursolic acid attenuates atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice: role of LOX-1 mediated by ROS/NF-κB pathway. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1101, 2018.
- LI, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1201-1205, 1999.
- LIANGOS, O. et al. Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. **Biomarkers**, v. 14, n. 6, p. 423-431, 2009.
- LINARDI, A. et al. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 9, p. 895-906, 2011.
- LIU, J. et al. Oleanolic acid co-administration alleviates ethanol-induced hepatic injury via Nrf-2 and ethanol-metabolizing modulating in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 221, p. 88-98, 2014.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of ethnopharmacology**, v. 49, n. 2, p. 57-68, 1995.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)). **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIZANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochemical Journal**, v. 326, n. 3, p. 853-859, 1997.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, 2009.

LOMONTE, B. et al. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 323–39, jun. 2014.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885–901, 2003

LONGO, Larisse. **Análise de marcadores inflamatórios e antioxidantes após aplicação das técnicas de hipotermia tópica e pré-condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos**. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Em Gastroenterologia e Hepatologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

MA, J. Q. et al. Ursolic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney by inhibiting the STAT3 and NF-κB activities. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 389–395, 2014.

MACEDO, E.; BOUCHARD, J.; MEHTA, R. L. Renal recovery following acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 14, n. 6, p. 660-665, 2008.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. Cap. 15: T cell differentiation and effector function. *In*: MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. The immune response: basic and clinical principles. Elsevier, **Academic Press**, 1194 p. 2006.

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

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARTÍN, R. et al. Oleonic acid modulates the immune-inflammatory response in mice with experimental autoimmune myocarditis and protects from cardiac injury. Therapeutic implications for the human disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 72, p. 250–62, 2014.

MARTINES, M. S. et al. Effects of *Schizolobium parahyba* extract on experimental *Bothrops* venom-induced acute kidney injury. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e86828, 2014.

MASLOV, L. N. et al. Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion. **Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova**, v. 101, n. 1, p. 3-24, 2015.

- MAZZI, M. V. et al. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2004.
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.
- MELCHERT, A. et al. Gama-glutamyl transpeptidase urinária como indicador de insuficiência renal aguda induzida por gentamicina em cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 111-116, 2007.
- MELGAVAREJO, A. R. **Cap. 4: Serpentes Peçonhentas do Brasil**. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 33, 2003.
- MELLO, S. M. et al. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 470-480, 2010.
- MELO, M. M.; LUCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p. 29-34, 2007.
- MELO, P. A. et al. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 285-291, 1993.
- MENALDO, D. L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2545-58, dez. 2012.
- MENGONI, F. et al. *In vitro* anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta medica**, v. 68, n. 02, p. 111-114, 2002.
- MILANI JÚNIOR, R. et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 90, n. 5, p. 323-334, 1997.
- MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 569-573, 2007.
- MLALA, S. et al. Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2751, 2019.
- MORAIS, I. C. O et al. L-Aminoacid oxidase from *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity via apoptosis and necrosis. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0132569, 2015.
- MORAIS, I. C. et al. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**. v. 61, p. 38-46, 2013.
- MOREIRA, L. et al. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 977-987, 1994.



MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 403-409, 1988.

NATARAJU, A et al. Group IIA secretory PLA<sub>2</sub> inhibition by ursolic acid: a potent anti-inflammatory molecule. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 801–9, 2007

NEBERT D. W. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: A HuGE review. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 62–70, 2002.

NEVES, S. M. P. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, Universidade de São Paulo, 216 p. 2013.

NOGUEIRA JÚNIOR, Francisco Assis. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus***. 92 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thyobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OJHA, S. et al. Plant-derived agents for counteracting cisplatin-induced nephrotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, 27 p. 2016.

OLIVEIRA, C. F. et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009

OLIVEIRA, R. B. et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

OSHIMA-FRANCO, Y. et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 175-182, 2004.

OTERO, R. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 998-1011, 2009.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENŇOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 131-137, 2006.

PAI, P. G. et al. Nephroprotective effect of ursolic acid in a murine model of gentamicin-induced renal damage. **ISRN Pharmacology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

- PALACIOS, J.; ZARTA, E. Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia viperidae *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonia. [s.l.] **Universidad de la Amazonia**, 2009.
- PANUNTO, P. C. et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 21-31, 2006.
- PATIL, C. R. et al. Protective effect of oleanolic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 33-37, 2010.
- PATIÑO, B. S. Serpientes Venenosas. In: **Boletín GEAS**. [s.l: s.n.]. v. 212p. 37-42, 2002.
- PECOITS-FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, 2004.
- PENG, J. et al. Renoprotective effects of ursolic acid on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through oxidative stress, inflammation and the inhibition of STAT3 and NF- $\kappa$ B activities. **Molecular medicine reports**, v. 14, n. 4, p. 3397-3402, 2016.
- PERES, L.A.B. et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 3 p. 229-236, 2013.
- PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1293- 1300, 2000.
- PINHO, F. M. O.; YU, L; BURDMANN, E. et al. A Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. In: **Seminars in Nephrology**. WB Saunders, p. 354-362. 2008.
- PINHO, F. M. O.; ZANETTA, D. M. T; BURDMANN, E. A. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. **Kidney international**, v. 67, n. 2, p. 659-667, 2005.
- PIRES, W. L. et al. Lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom induces IL-10 release by TCD4<sup>+</sup> cells and TNF- $\alpha$  release by monocytes and natural killer cells. **Journal of leukocyte biology**, 2019.
- PLEBANI, M. Skeletal muscle biomarkers: not new but still interesting diagnostic tools. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 48, n. 6, p. 745-746, 2010.
- POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, v. 77, p. 10-15, 2012.
- QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of brasilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p.842-851, 2008.
- RADA, P. et al. SCF/ $\beta$ -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf<sub>2</sub> transcription factor in a Keap1-independent manner. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 6, p. 1121-1133, 2011.
- REHAN, A. et al. Glomerular injury and proteinuria in rats after intrarenal injection of cobra venom factor. Evidence for the role of neutrophil-derived oxygen free radicals. **The American Journal of Pathology**, v. 123, n. 1, p. 57, 1986.

REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Proteolytic specificity of *Bothrops moojeni* protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, v. 33, n. 2, p.187-194, 1993.

REIS, Maria Francisca Moura Rodrigues. **Contribuição para o estudo da doença renal crônica em felídeos: valores urinários de tgf- $\beta$ 1 e de clusterina e sua importância no diagnóstico precoce da doença**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

REN, Q. et al. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937–952, 2013.

REYES, A. et al. Histological injuries in rat's kidneys induced to low dose of snake's poison *Bothrops asper*. **Revista electronica de Veterinaria**, v. 10, n. 9, 2009.

ROBERTO, P. G. et al. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* venom. **The protein journal**, v. 23, n. 4, p. 273-285, 2004.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics** . V. 75, n. 9, p. 2707-20, 2012.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 1, p. 12-19, 2007.

RONCOLATO, E. C. et al. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. **Journal of immunotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 160-168, 2013.

ROODT, A. R. de; DOLAB, J. A.; HAJOS, S. E.; FERNANDEZ, T.; SEGRE, L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofidicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caisaca, Lanzadera). **Medicina (Buenos Aires)**, v. 57, n. 6, p. 667-676, 1997.

ROSS, D.; SIEGEL, D. Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 595, 2017.

RUIZ DE TORRENT, R. et al. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **Acta Physiologica Pharmacologica Et Therapeutica Latinoamericana**, v. 49, p. 177-183, 1999.

RUSSEL, F. E. Snake venom poisoning, **Philadelphia**, v. 18, p. 139-234, 1980.

SAHIN, Z. et al. Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 122-127, 2019.

SALAZAR, A. M. et al. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 95-104, 2007.

- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P. D. et al. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. **Critical reviews in toxicology**, v. 41, n. 10, p. 803-821, 2011.
- SANT'ANA, C. D. et al. BjuSSuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.151, p. 443–454, 2008.
- SANTORO, M. L. et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.
- SANTOS, M. F. L.; FARANI, M. C.; ROCHA, P. N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp.: revisão e análise crítica da literatura. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 31, n. 2, p. 132-138, 2009.
- SARAVANAN, R.; PUGALENDI, V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 1, p. 41, 2006.
- SATURNINO-OLIVEIRA, J. et al. *Abarema cochliacarpus* extract decreases the inflammatory process and skeletal muscle injury induced by *Bothrops leucurus* Venom. **BioMed Research International**, v. 2014.
- SCHRIER, R. W. et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 1, p. 5-14, 2004.
- SEDLAK, J.; LIDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SENISE, L. V.; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 11, p. 1528-1536, 2015.
- SENTHIL, S.; CHANDRAMOHAN, G.; PUGALENDI, K. V. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. **International journal of cardiology**, v. 119, n. 1, p. 131-133, 2007.
- SGRIGNOLLI, L. R. et al. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. **Nephron clinical practice**, v. 119, n. 2, p. c131-c137, 2011.
- SIFAOU, I. et al. Ursolic Acid Derivatives as Potential Agents Against *Acanthamoeba* sp. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 130, 2019.
- SIFUENTES, D. N. et al. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 28-36, 2008.
- SILVA, E.G.B.; BRACHT, A.M.K. Creatina, função energética, metabolismo e suplementação no esporte. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 12, n. 1, p. 27-33, 2001.
- SILVA, R. L.; MACEDO, M. C. M. A. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 153-6, 2006.

SILVA-JUNIOR, F. P. et al. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 18-31, 2007.

SINAN, 2016. Boletim epidemiológico: acidentes por animais peçonhentos. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em 5 de novembro de 2019.

SINHA, K. et al. Morin protects gastric mucosa from nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin induced inflammatory damage and apoptosis by modulating NF- $\kappa$ B pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 4, p. 769-783, 2015.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, Siravit. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 943-953, 2012.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2625-2641, 2005

SOMOVA, L. I. et al. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 299-305, 2003.

STRAPAZZON, J. O. et al. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 2015.

SWE, T. N. et al. Renal ischaemia, transient glomerular leak and acute renal tubular damage in patients envenomated by Russell's vipers (*Daboia russellii siamensis*) in Myanmar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 678-81, 1993.

TAKEDA, A. A. S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> complexed with p-bromophenacyl bromide and  $\alpha$ -tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1699, n. 1-2, p. 281-284, 2004.

TARLAND, E. **Effect of metabolism cage housing on rodent welfare**. Examensarbete 10p/15hp, Litteraturstudie, SLU, Uppsala, 2007.

THANOS, P. K. et al. A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm. **Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 58, n. 2, p. 219, 2009.

THRALL, M. A. Morfologia dos eritrócitos. THRALL, M. A. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 5; p. 69-82, 2004.

TIMMEREN, M. M. V. et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. **The Journal of pathology**, v. 212, n. 2, p. 209-217, 2007.

TOMAZ, M. A. et al. Increase of the cytotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom on mouse extensor digitorum longus and soleus by potassium channel blockers and by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 52, n. 4, p. 551-558, 2008.

TUAN, Bruna Taliani. **Relação do estresse oxidativo com a excreção de cisplatina e nefrotoxicidade em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com altas doses de cisplatina e radioterapia**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2014.

ULLEVIG, S. L. et al. Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 2, p. 409-416, 2011.

VALE, L. H. F. et al. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 103, n. 1, p. 104-107, 2008.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto. v. 31, p. 31-44, 1998.

VERONESE, E. L. G. et al. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 123-130, 2005.

VIDAL, J. C. Bioquímica de los venenos ofídicos. **Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina**, v. 4, p. 6, 1988.

VINUCHAKKARAVARTHY, T. et al. Active compound from the leaves of *Vitex negundo* L. shows anti-inflammatory activity with evidence of inhibition for secretory phospholipase A<sub>2</sub> through molecular docking. **Bioinformation**, v. 7, n. 4, p. 199, 2011.

WANG, Z. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European journal of pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 255-260, 2010.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010

WARRELL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal**, v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

WEINSTEIN, S.A. et al. **Venomous Bites from Non-Venomous Snakes: A Critical Analysis of Risk and Management of Colubrid Snake Bites**. Elsevier, 2011.

WILLIES, T. W.; TU, A. T.; MILLER, C. W. Thrombolysis with a snake venom protease in rat model of venous thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 53, p. 19-19, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. **WHO** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/> (2017). Acesso em 5 de novembro de 2019.

WÜSTER, W. et al. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 445-459, 2008.

XIMENES, Rafael Matos. **Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.

XU, H.X. et al. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. **Journal of natural products**, v. 59, n. 7, p. 643-645, 1996.

YAMABE, N. et al. Beneficial effect of *Corni Fructus*, a constituent of hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. Bull. v. 30, p.520-526, 2007.

YAMANOBE, T. et al. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. **Free radical research**, v. 41, n. 2, p. 200-207, 2007.

YAMASHITA, K. M. et al. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2814, 2014.

YAO, X. et al. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 334, n. 2, p. 115-124, 2007.

YE, T. M. et al. Study of the effects of *Auricularia auricular* polysaccharide on local ischemia/reperfusion injury in rat. **Chinese journal of applied physiology**, v. 26, n. 4, p. 423-426, 2010.

YOSHIDA, E. H. et al. Acute kidney injury caused by the intraperitoneal injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Natural product research**, p. 1-6, 2018.

ZAMUNER, S. R. et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1523, 2001.

ZENI, A. L. B. et al. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 664-676, 2007.

ZHANG, C.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Histopathological studies of the acute inflammation in synovial tissue of rat knee joint following intra-articular injection of PLA2 from Chinese Cobra (*Naja atra*) venom. **Toxicon**, v. 37, n. 5, p. 783-799, 1999.

ZHANG, Z. et al. Oral supplementation with ursolic acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury in a mouse model by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 5, p. 7142-7148, 2018.

ZHOU W. et al. Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 298, n. 3, p. 568-578, 2010.

**ANEXOS**



**Tabela 2** — Parâmetros fisiológicos e bioquímicos no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 06h, 12h, 24h, 72h e 96h.

GRUPOS	P. R. (mg)	F. U. (ml)	C. A. (ml)	P.M.C (%)	Cr. P. (mg/dL)	Ureia P. (mg/dL)	CK P. (U/L)	CCr. (ml/min/Kg)	GGT U. (U/mg de creat.)	Album. U. (mg/L)	Protein. U. (mg/dL)
6h CTRL	363,1 ± 15,57	-	1,56 ± 0,58	2,44 ± 0,32	0,26 ± 0,08	32,00 ± 2,44	285,60 ± 139,90	-	-	-	-
6h VEN	363,1 ± 14,82	-	1,50 ± 0,53	2,98 ± 0,72	0,45 ± 0,08*	125,00 ± 15,16**	14487,00 ± 3605,00**	-	-	-	-
12h CTRL	364,1 ± 34,92	0,37 ± 0,16	2,50 ± 0,83	3,68 ± 1,41	0,28 ± 0,07	31,50 ± 10,12	364,40 ± 144,20	2,67 ± 0,89	0,67 ± 0,29	0,002 ± 0,001	34,02 ± 16,74
12h VEN	363,6 ± 36,47	0,37 ± 0,12	1,16 ± 0,40*	4,30 ± 1,69	0,37 ± 0,10*	119,60 ± 43,06**	10396,00 ± 4329,00**	0,85 ± 0,44**	1,97 ± 0,41**	0,028 ± 0,002**	143,50 ± 60,59**
24h CTRL	350,6 ± 28,99	0,62 ± 0,25	3,40 ± 0,89	5,33 ± 1,64	0,28 ± 0,04	27,33 ± 4,03	855,40 ± 516,00	2,70 ± 0,79	0,41 ± 0,28	0,001 ± 0,000	35,97 ± 12,85
24h VEN	364,7 ± 43,37	0,41 ± 0,15	1,62 ± 0,74*	8,31 ± 1,01**	0,31 ± 0,04	53,00 ± 18,28	3607,00 ± 524,90**	1,59 ± 0,53*	1,86 ± 0,38**	0,017 ± 0,002**	117,20 ± 37,83**
72h CTRL	393,1 ± 41,99	1,00 ± 0,28	8,00 ± 3,79	11,33 ± 2,48	0,32 ± 0,10	27,00 ± 6,48	487,40 ± 126,70	2,53 ± 1,07	0,74 ± 0,22	0,003 ± 0,002	23,27 ± 23,03
72h VEN	438,4 ± 32,82*	0,93 ± 0,48	7,00 ± 2,23	16,78 ± 2,82*	0,28 ± 0,035	30,71 ± 4,57	546,20 ± 211,20	2,31 ± 0,98	0,61 ± 0,43	0,008 ± 0,002*	73,40 ± 46,01*
96h CTRL	355,7 ± 37,39	0,72 ± 0,41	13,33 ± 3,05	8,08 ± 3,44	0,27 ± 0,04	28,00 ± 4,61	1133,00 ± 469,70	2,56 ± 0,98	0,49 ± 0,28	0,005 ± 0,002	38,41 ± 19,22
96h VEN	400,5 ± 42,11*	0,68 ± 0,40	11,00 ± 4,38	14,20 ± 3,79**	0,25 ± 0,05	28,88 ± 7,14	672,40 ± 264,20	2,02 ± 0,89	0,76 ± 0,29	0,013 ± 0,007*	84,25 ± 30,45**

Os valores representam a média ± erro padrão dos valores nos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* após os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*P<0,05 ou \*\*P<0,01 em relação ao grupo controle no mesmo tempo. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. CTRL: controle; VEN: veneno; P. R.: peso renal; F. U.: fluxo urinário; C. A.: consumo de água; P.M.C: perda de massa corpórea; Cr. P.: creatinina plasmática; Ureia P.: ureia plasmática; CK P.: creatina quinase plasmática; CCr.: *clearance* de creatinina; GGT U.: gama GT urinária; Albumin. U.: albumina urinária; Protein. U.: proteína urinária.

**Tabela 3** — Valores eritrocitários, atividade de MDA, GSH e MPO no envenenamento induzido por peçonha de *B. jararacussu* via intramuscular em camundongos, nos tempos de 06h, 12h, 24h, 72h e 96h.

GRUPOS	He (10 <sup>12</sup> /L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	MDA (nmol/mg de tec.)	GSH (GSH/mg de tec.)	MPO (UMPO/mg de tec.)
6h CTRL	9,03 ± 0,74	14,12 ± 1,34	39,26 ± 3,20	43,33 ± 1,21	15,67 ± 0,59	36,03 ± 0,67	14,68 ± 0,47	2138 ± 230,6	201,5 ± 26,08	3,20 ± 0,52
6h VEN	9,10 ± 0,66	13,79 ± 1,04	37,65 ± 2,98	42,50 ± 2,87	15,18 ± 0,54	35,79 ± 1,42	14,54 ± 0,31	3370 ± 991,2*	126,7 ± 25,91**	4,10 ± 1,32
12h CTRL	8,71 ± 0,46	13,35 ± 0,64	37,74 ± 3,35	43,17 ± 2,13	15,30 ± 0,38	35,42 ± 1,59	14,20 ± 0,44	2063 ± 330,3	267,3 ± 10,20	2,54 ± 1,43
12h VEN	8,26 ± 0,25	12,83 ± 1,03	35,48 ± 2,22	43,00 ± 1,78	15,52 ± 1,00	36,18 ± 1,46	14,62 ± 0,27	3260 ± 796,6**	206,8 ± 50,02**	4,55 ± 1,99
24h CTRL	8,71 ± 0,52	13,45 ± 0,90	36,05 ± 1,64	41,67 ± 1,36	15,42 ± 0,58	37,28 ± 1,36	14,65 ± 0,38	3448 ± 726,7	243,7 ± 34,84	2,99 ± 0,87
24h VEN	6,99 ± 0,75**	10,71 ± 1,39**	31,06 ± 3,94*	43,29 ± 2,05	15,26 ± 0,63	35,42 ± 1,62	14,60 ± 0,38	4085 ± 695,8	219,9 ± 55,66	4,23 ± 1,85
72h CTRL	8,56 ± 0,58	13,20 ± 0,94	37,03 ± 3,10	42,80 ± 0,83	15,26 ± 0,27	35,64 ± 0,57	14,12 ± 0,21	2980 ± 437,7	282,1 ± 73,37	2,00 ± 0,91
72h VEN	7,12 ± 0,68**	10,69 ± 1,50**	30,41 ± 4,41*	42,63 ± 2,97	14,96 ± 0,97	35,21 ± 1,56	14,41 ± 0,25	3188 ± 536,5	244,4 ± 46,81	4,36 ± 2,60
96h CTRL	8,37 ± 0,60	12,32 ± 0,63	34,75 ± 2,89	41,50 ± 2,17	14,76 ± 0,78	36,13 ± 1,58	14,73 ± 0,49	2917 ± 418,6	248,9 ± 43,46	2,37 ± 0,56
96h VEN	6,15 ± 0,54**	9,52 ± 0,78**	25,84 ± 0,16**	40,40 ± 1,51	15,08 ± 0,34	37,28 ± 0,98	15,18 ± 0,47	3023 ± 515,4	207,6 ± 36,18	3,59 ± 1,32

Os valores representam a média ± erro padrão dos valores nos animais envenenados por peçonha de *B. jararacussu* após os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h, 72h e 96h. \*P<0,05 ou \*\*P<0,01 em relação ao grupo controle tratado com solução salina 0,9% via IM. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. CTRL: controle; VEN: veneno; He: hemácia; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: distribuição de células vermelhas; MDA: malondialdeído; GSH: glutatona reduzida; MPO: mieloperoxidase.

**Tabela 4** — Parâmetros fisiológicos e bioquímicos em camundongos após tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

GRUPOS	P.R (mg)	F. U. (ml)	C. A. (ml)	P.M.C (%)	Cr. P. (mg/dL)	Ureia P. (mg/dL)	CK P. (U/L)	CCr (ml/min/Kg)	GGT U. (U/mg de creat.)	Protein. U. (mg/dL/12h)
CTRL	332,2 ± 21,16	0,79 ± 0,53	2,66 ± 1,21	2,37 ± 0,75	0,25 ± 0,05	30,83 ± 5,19	378,9 ± 163,9	2,02 ± 0,98	0,81 ± 0,44	0,182 ± 0,062
TRIT75	342,7 ± 19,60	0,67 ± 0,48	2,33 ± 1,21	1,77 ± 1,16	0,23 ± 0,02	29,00 ± 9,35	445,0 ± 231,4	2,15 ± 0,61	0,99 ± 0,34	0,166 ± 0,035
VEN (-)	371,1 ± 27,04 <sup>#</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>#*</sup>	1,60 ± 0,51	3,84 ± 1,40 <sup>*</sup>	0,32 ± 0,04 <sup>#*</sup>	201,3 ± 25,22 <sup>#*</sup>	17737,0 ± 4245,0 <sup>#*</sup>	0,59 ± 0,20 <sup>#*</sup>	4,09 ± 1,11 <sup>#*</sup>	0,255 ± 0,062 <sup>#</sup>
VEN+TRIT25	356,7 ± 21,87	0,18 ± 0,09 <sup>#*</sup>	1,90 ± 0,73	1,47 ± 0,60 <sup>^</sup>	0,28 ± 0,02	184,7 ± 47,71 <sup>#*</sup>	16021,0 ± 4001,0 <sup>#*</sup>	0,50 ± 0,15 <sup>#*</sup>	2,02 ± 1,00 <sup>#^</sup>	0,245 ± 0,05 <sup>#</sup>
VEN+TRIT50	355,2 ± 21,05	0,16 ± 0,06 <sup>#*</sup>	2,16 ± 1,19	1,67 ± 0,70 <sup>^</sup>	0,29 ± 0,05	150,8 ± 28,45 <sup>#*</sup>	15949,0 ± 1002,0 <sup>#*</sup>	0,51 ± 0,26 <sup>#*</sup>	1,30 ± 0,40 <sup>#^</sup>	0,220 ± 0,070 <sup>#</sup>
VEN+TRIT75	349,7 ± 36,83	0,22 ± 0,07 <sup>#</sup>	2,40 ± 1,14	1,72 ± 1,55 <sup>^</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>^</sup>	106,5 ± 36,73 <sup>#**^</sup>	11434,0 ± 3639,0 <sup>#**^</sup>	1,26 ± 0,36 <sup>*</sup>	2,07 ± 0,58 <sup>#^</sup>	0,148 ± 0,058

Os valores representam a média ± erro padrão em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). # P<0,05 em relação ao grupo controle. \* P<0,05 em relação ao grupo triterpenos. ^ P<0,05 em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's. CTRL: controle; TRIT75: triterpenos; VEN (-): veneno; VEN+TRIT25: veneno + triterpenos 25 mg/Kg; VEN+TRIT50: veneno + triterpenos 50 mg/Kg; VEN+TRIT75: veneno + triterpenos 75 mg/Kg; P. R.: peso renal; F. U.: fluxo urinário; C. A.: consumo de água; P.M.C: perda de massa corpórea; Cr. P.: creatinina plasmática; Ureia P.: ureia plasmática; CK P.: creatina quinase plasmática; CCr.: *clearance* de creatinina; GGT U.: gama GT urinária; Protein. U.: proteína urinária.

**Tabela 5** — Valores da atividade de MDA, GSH, MPO e expressão gênica em camundongos após tratamento com ácidos ursólico e oleanólico na IRA induzida por veneno de *B. jararacussu*.

GRUPOS	MDA (nmol/mg de tec.)	GSH (GSH/mg de tec.)	MPO (UMPO/mg de tec.)	KIM-1	NQO-1	TIMP-2	SOD1s	IL-18	Clusterina
CTRL	1751,0 ± 140,9	276,3 ± 24,35	4,06 ± 1,68	1,10 ± 0,48	1,04 ± 0,38	1,01 ± 0,21	1,01 ± 0,17	1,06 ± 0,15	1,05 ± 0,33
TRIT75	1698,0 ± 191,3	182,1 ± 31,65	8,15 ± 2,37	2,27 ± 0,78 <sup>#</sup>	1,59 ± 0,42 <sup>#</sup>	1,15 ± 0,44	0,85 ± 0,13	0,61 ± 0,14 <sup>#</sup>	0,81 ± 0,22
VEN (-)	2259,0 ± 636,6 <sup>#*</sup>	194,9 ± 44,44 <sup>#</sup>	8,97 ± 2,08 <sup>#</sup>	4,73 ± 2,59 <sup>#</sup>	5,78 ± 1,58 <sup>#</sup>	0,52 ± 0,16 <sup>#</sup>	0,62 ± 0,16 <sup>#</sup>	0,44 ± 0,17 <sup>#</sup>	2,11 ± 0,53 <sup>#</sup>
VEN+TRIT25	1841,0 ± 238,6	206,4 ± 35,63 <sup>#</sup>	8,56 ± 2,25 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-
VEN+TRIT50	1719,0 ± 150,6 <sup>^</sup>	188,9 ± 31,42 <sup>#</sup>	8,62 ± 2,36 <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-
VEN+TRIT75	1698,0 ± 196,0 <sup>^</sup>	212,6 ± 41,21 <sup>#</sup>	8,68 ± 0,96 <sup>#</sup>	8,14 ± 3,50 <sup>#</sup>	5,94 ± 1,93 <sup>#</sup>	0,63 ± 0,18 <sup>#</sup>	0,84 ± 0,16	0,60 ± 0,18 <sup>#</sup>	2,75 ± 0,74 <sup>#</sup>

Os valores representam a média ± erro padrão em camundongos após a indução de IRA por veneno de *B. jararacussu* e o tratamento com AU/AO (25, 50, 75 mg/kg). # P<0,05 em relação ao grupo controle. \* P<0,05 em relação ao grupo triterpenos. ^ P<0,05 em relação ao grupo veneno. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's, ou pelo teste Mann-Whitney. CTRL: controle; TRIT75: triterpenos; VEN (-): veneno; VEN+TRIT25: veneno + triterpenos 25 mg/Kg; VEN+TRIT50: veneno + triterpenos 50 mg/Kg; VEN+TRIT75: veneno + triterpenos 75 mg/Kg; MDA: malondialdeído; GSH: glutatona reduzida; MPO: mieloperoxidase; KIM-1: molécula de injúria renal 1; NQO-1: NADPH quinona oxidoreductase 1; TIMP-2: inibidor tecidual de metaloproteinases 2; SOD1s: superóxido dismutase 1; IL-18: Interleucina 18.