



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

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS INDUZIDOS PELO
VENENO E PLA₂ LYS 49 E ASP 49 DA SERPENTE *Bothropoides
erythromelas* (AMARAL, 1923): ANÁLISE DOS MEDIADORES
ENVOLVIDOS**

**FORTALEZA
2010**

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS INDUZIDOS PELO
VENENO E PLA₂ LYS 49 E ASP 49 DA SERPENTE *Bothropoides
erythromelas* (AMARAL, 1923): ANÁLISE DOS MEDIADORES
ENVOLVIDOS**

**Tese de Doutorado submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Título de Doutora em Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

**FORTALEZA
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S696a Sousa, Fabíola Carine Monteiro de
 Avaliação dos efeitos renais induzidos pelo veneno e PLA₂ Lys 49 E Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* (Amaral, 1923): Análise dos mediadores envolvidos / Fabíola Carine Monteiro de Sousa. - 2010.
 212 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2010.
 Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
 Co-orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
1. *Bothrops* 2. Venenos 3. Rim 4. Fosfolipases A₂ 5. Técnicas de Cultura de Células 6. Apoptose I. Título.

CDD 615.942

FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS INDUZIDOS PELO
VENENO E PLA₂ LYS 49 E ASP 49 DA SERPENTE *Bothropoides
erythromelas* (AMARAL, 1923): ANÁLISE DOS MEDIADORES
ENVOLVIDOS**

**Tese de Doutorado submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do Título de
Doutora em Farmacologia.**

Data da Aprovação: 03 / 12 / 10

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
(Orientadora)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia / UFC**

**Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
(Co-Orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / UFC**

**Profa. Dra. Diva Maria Borges Nojosa
Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) / UFC**

**Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual Paulista - UNESP
(Campus Experimental do Litoral Paulista)**

**Prof. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (Campus de Vitória de Santo Antão)**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Pelo dom da vida, pela força e coragem durante toda a caminhada.

À MINHA MÃE SOCORRO

Pelo amor, estímulo e carinho os quais foram as armas desta vitória.

AO MEU PAI NICOLAU (In memoriam)

Por acreditar em mim como uma vencedora. Neste momento, o meu coração divide-se em dois sentimentos: saudade e alegria, contudo agradeço à Deus pelo precioso tempo em que ele permitiu estarmos juntos.

AOS MEUS AVÔS LUÍZ E RITA

Por tudo o que sou, por todos os ensinamentos e pela constante presença em minha vida.

ÀS MINHAS TIAS GRAÇA E FALENA

Pelo amor e extrema dedicação em todos os momentos.

À CÍCERO (JAJÁ)

Por toda a força, presença e pelas palavras positivas nos momentos em que cheguei a acreditar que não conseguia superar as dificuldades.

À PROFa. Dra. ALICE MARIA COSTA MARTINS

Pela orientação e carinho com o qual fui recebida no Laboratório LCC.

À PROFa. Dra. HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

Pela oportunidade de crescer cientificamente.

AGRADECIMENTOS

À minha **Família** que nas lutas da vida são meus pilares; nas derrotas, meus ombros consoladores e nas vitórias, meus maiores torcedores.

A todos os meus **parentes** e **amigos** que sempre me motivaram e vibraram com as minhas conquistas.

Ao Dr. **Marcos Hikari Toyama** por acreditar em nosso grupo e pela gentileza de ceder as frações Lys 49 e Asp 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas*.

À professora Dra. **Diva Maria Borges Nojosa** pela cooperação, gentileza de ceder o veneno total da *Bothropoides erythromelas* e pelos conselhos importantes na minha qualificação.

Ao professor Dr. **Dalgimar Beserra de Menezes** pela imensa ajuda nos estudos histopatológicos e pelo exemplo de trabalho e competência.

Ao Dr. **Alexandre Havt Bindá** pela colaboração prestimosa na realização dos experimentos de Biologia Molecular.

Ao Dr. **Paulo Sérgio Ferreira Barbosa** pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e pela inestimável colaboração em todos os momentos em que precisei de ajuda.

Ao Dr. **René Duarte Martins** pela amizade e pelos momentos de diversão que suavizaram os momentos difíceis da longa caminhada.

À Dra. **Inez Liberato Evangelista** pelos conselhos importantes na minha qualificação.

Ao amigo **Antônio Rafael Coelho Jorge** pela amizade, companheirismo e ajuda incondicional durante todo o Doutorado.

Aos estudantes de iniciação científica do LFAVET **João Paulo Cândido Barbosa, João Victor de Almeida Santos** e **Antônio Gomes da Silva Neto** pela contribuição na parte experimental.

À técnica do laboratório LFAVET **Maria Silvia Helena Freire de França** pela amizade e pela realização cuidadosa do preparo da solução de perfusão sem esquecer a colaboração na fase experimental.

Às técnicas em bioquímica **Francisca Alves de Oliveira** e **Charliene Sousa de Melo** pela realização cuidadosa nos ensaios bioquímicos.

À **Beatriz Helena Moreira Serra Azul** pelo companheirismo e ajuda no laboratório.

Aos amigos do LCC **Rodrigo Tavares Dantas, Alba Fabíola Costa Torres, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes** e **Ticiano Praciano Pereira** pela amizade, companheirismo e ajuda na realização dos experimentos com células MDCK. À **Kamila Soares Lopes, Gdayllon Cavalcante Meneses** e **Isabel Cristina Moraes Oliveira** pela disponibilidade e contribuição na parte experimental.

A todos os amigos que conquistei ao longo da Pós-Graduação especialmente a **Rondinelle Ribeiro Castro, Carlos Tiago Martins Moura** e **Kristiana Cerqueira Mousinho**.

À amiga **Patrícia Matias Soares** por ser para mim uma irmã querida. Obrigada pela amizade, companheirismo e pela presença constante nos momentos de dificuldade.

Às bibliotecárias **Norma de Carvalho Linhares** e **Rosane Maria Costa** pela orientação nas referências bibliográficas.

Aos funcionários **Valder Cavalcante Maia Mendonça** e **Raimundo Cezar Campos do Nascimento** pela gentileza e cooperação na busca dos papers.

Aos funcionários: **Terezinha Freire de França, Juciê Andrade da Silva, Bento Francisco de Oliveira, José Amadeus Souza, Joana Barbosa Carvalho, Fabiana Maria da Silva Nascimento, Kátia Maria Lima Nogueira, Fernando Rodrigues Teixeira** e **Francisco Eliezer Martins da Silva** por toda ajuda e respeito com que sempre me trataram.

Às secretárias da pós-graduação **Aura Rhanes Nogueira Yida** e **Márcia Hermínia Pinheiro Borges** pela gentileza e presteza.

Aos **professores Doutores**, que prontamente aceitaram o convite para participarem da Banca Examinadora.

A todos os **professores, colegas de Mestrado e Doutorado e funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas e Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC** que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

A cada um que me acompanhou de perto (ou mesmo de longe), deixando uma marca neste trabalho, com todo meu carinho, obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo financiamento do trabalho que gerou esta Tese.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

(Leonardo da Vinci)

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria. Um o ajuda a ganhar a vida; O outro a construir uma vida.”

(Sandra Carey)

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS INDUZIDOS PELO VENENO E PLA₂ LYS 49 E ASP 49 DA SERPENTE *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923): ANÁLISE DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS. FABIÓLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA. Tese de Doutorado. Orientação: Dra. Helena Serra Azul Monteiro, Universidade Federal do Ceará, Pós-Graduação em Farmacologia, 2010.

Bothropoides erythromelas é responsável por muitos acidentes no Nordeste do Brasil. O veneno desta serpente induz insuficiência renal aguda. Rins isolados de ratos *Wistar*, pesando 250 a 300g, foram perfundidos durante 120 min com solução Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina. O veneno total de *Bothropoides erythromelas* foi estudado anteriormente (SOUSA, 2004) e utilizado neste estudo para posterior comparação com os grupos tratados com as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno. O veneno total (10µg/mL) e as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 (5µg/mL) de *B. erythromelas* foram adicionados ao sistema 30 min após o início de cada experimento. Os parâmetros estudados incluíram pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU), percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (%TNa⁺, %TK⁺ e %TCl⁻), percentual de transporte proximal de sódio, potássio e cloreto (%pTNa⁺, %pTK⁺ e %pTCl⁻), excreção de sódio, potássio e cloreto (ENa⁺, EK⁺ e ECl⁻) e *clearance* osmótico (*C_{osm}*) ($p < 0,05^*$). O grupo controle perfundido com albumina foi funcionalmente estável por todos os 120 min. A infusão do veneno causou um aumento significativo no FU, ENa⁺, ECl⁻ e *C_{osm}* e uma diminuição na PP, RVR, %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻, %pTNa⁺, %pTK⁺ e %pTCl⁻. O RFG e a EK⁺ diminuíram aos 60 min e aumentaram aos 90 e 120 min quando comparado com o grupo controle. A infusão de Lys 49 causou um aumento significativo na PP, FU, ENa⁺, EK⁺ e *C_{osm}* e diminuiu o RFG e o %TNa⁺ quando comparada com o grupo controle. Lys 49 não modificou os outros parâmetros funcionais renais. A infusão de Asp 49 modificou apenas os parâmetros funcionais renais %pTK⁺ (diminuição) e EK⁺ (aumento) quando comparada ao grupo controle. Lys 49 apresentou um efeito similar ao veneno total nos parâmetros FU, %TNa⁺, ENa⁺, EK⁺ e *C_{osm}* e Asp 49 nos parâmetros %pTK⁺ e EK⁺. A análise histológica mostrou uma quantidade moderada de material proteináceo nos glomérulos e túbulos de rins perfundidos com o veneno, Lys 49 e Asp 49, bem como regiões focais de apoptose/necrose em rins perfundidos com Lys 49 e Asp 49. Células MDCK foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% vv de soro bovino fetal e então avaliadas na presença do veneno total, Lys 49 e Asp 49 de *B. erythromelas* nas concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL). A análise dos efeitos citotóxicos em células MDCK foi executada pelo método MTT. O veneno promoveu efeito citotóxico nas concentrações de 50 e 100µg/mL ($IC_{50} = 93,31 \mu\text{g/mL}$). Lys 49 promoveu efeito citotóxico nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL ($IC_{50} = 38,29 \mu\text{g/mL}$). Asp 49 promoveu efeito citotóxico nas concentrações de 50 e 100µg/mL ($IC_{50} = 158 \mu\text{g/mL}$). Também foram mensurados os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e nenhum aumento significativo foi observado com veneno total e Asp 49. Lys 49 promoveu um aumento significativo nos níveis de lactato desidrogenase apenas na concentração de 100µg/mL. Após o cultivo de células MDCK com o veneno total, nas concentrações de 46,65 e 23,32µg/mL, foi realizada a reação de polimerase em cadeia em tempo real para a avaliação da expressão de genes pró (Caspase-3, Caspase-8 e *Bax*) e antiapoptóticos (*Bcl-X_L* e *Mcl-1*). Não foi realizada avaliação da expressão de genes pró e antiapoptóticos com Lys 49 e Asp 49. Na expressão de genes pró-apoptóticos o veneno total promoveu um aumento da expressão de caspase-3 na concentração de 23,32µg/mL e de caspase-8 nas concentrações de 46,65 e 23,32µg/mL, quando comparado com os controles positivo (DOXO) e negativo (PBS) e diminuiu a expressão de *Bax* em ambas as concentrações. Na expressão de genes antiapoptóticos o veneno total promoveu indução significativa de *Mcl-1* somente na concentração de 46,65µg/mL e não modificou a expressão de *Bcl-X_L*, quando comparado com o controle negativo. O veneno e as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* é capaz de promover significativos efeitos sobre os parâmetros de função renal e sobre células MDCK, com indicativo de morte celular por apoptose através da via extrínseca.

Palavras-chave: *Bothropoides erythromelas*. Veneno total. Lys 49. Asp 49. Efeitos renais. Células MDCK. Apoptose.

ABSTRACT

EVALUATION OF RENAL EFFECTS OF *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923) WHOLE VENOM AND ITS PLA₂ LYS 49 AND ASP 49: ANALYSIS OF MEDIATORS INVOLVED. **FABÍOLA CARINE MONTEIRO DE SOUSA. Doctoral Thesis. Mentor: Dra. Helena Serra Azul Monteiro, Ceará Federal University, Post-Graduation in Pharmacology, 2010.**

Bothropoides erythromelas is responsible for a great deal of snakebites in Northeastern from Brazil. The venom of this snake induces acute renal failure. Isolated kidneys from *Wistar* rats, weighting 250 to 300g, were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6g% of bovine serum albumin for 120 min. The whole venom of *Bothropoides erythromelas* been previously studied (SOUSA, 2004) and used in this study for comparison with the treated groups with the PLA₂ fractions Lys 49 and Asp 49 of the venom. The whole venom (10µg/mL) and the fractions PLA₂ Lys 49 and Asp 49 of *B. erythromelas* (5µg/mL) were added into the system 30 min after the beginning of each experiment. The parameters studied included perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR), urinary flow (UF), percent sodium, potassium and chloride tubular transport (%TNa⁺, %TK⁺ and %TCl⁻), percent sodium, potassium and chloride proximal transport (%pTNa⁺, %pTK⁺ and %pTCl⁻), sodium, potassium and chloride excretion (ENa⁺, EK⁺ e ECl⁻) and osmotic clearance (*C_{osm}*) (*p* < 0.05*). The control group perfused with albumin was functionally stable for over 120 min. The infusion of venom caused a significant increase in UF, ENa⁺, ECl⁻ and *C_{osm}* and a decreased in PP, RVR, %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻, %pTNa⁺, %pTK⁺ and %pTCl⁻. The GFR and the EK⁺ decreased at 60 min and increased at 90 and 120 min when compared with control group. The infusion of Lys 49 caused a significant increase in PP, UF, ENa⁺, EK⁺ and *C_{osm}* and decreased the GFR and the %TNa⁺ when compared with control group. Lys49 did not modify the others functional kidney parameters. The infusion of Asp 49 only modify the functional kidney parameters %pTK⁺ (decreased) and EK⁺ (increase) when compared with control group. Lys 49 showed a similar effect at whole venom in parameters UF, %TNa⁺, ENa⁺, EK⁺ and *C_{osm}* and Asp 49 in parameters %pTK⁺ and EK⁺. The histological analysis showed a mild amount of a proteinaceous substance in the renal tubules and glomeruli of kidneys perfused with the venom, Lys 49 and Asp 49, as well as focal areas of apoptosis/necrosis in perfused kidneys with Lys 49 e Asp 49. MDCK cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum and then assessed in the presence of the whole venom, Lys 49 and Asp 49 of *B. erythromelas* in the concentrations (100; 50; 25; 12.5; 6.25 and 3.125µg/mL). The analysis of cytotoxic effects on MDCK cells was performed by MTT method. The venom promoted cytotoxic effect in the concentrations of 50 and 100µg/mL (IC₅₀ = 93.31µg/mL). Lys 49 promoted cytotoxic effect in the concentrations of 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 µg/mL (IC₅₀ = 38.29µg/mL). Asp 49 promoted cytotoxic effect in the concentrations of 50 and 100 µg/mL (IC₅₀ = 158µg/mL). Also the levels of lactic dehydrogenase (LDH) were measured and no significant increase was observed with whole venom and Asp 49. Lys 49 promoted a significant increase in the levels of LDH only in the concentration of 100µg/mL. After culture of MDCK cells with the whole venom, at concentrations of 46.65 and 23.32µg/mL, was performed the real time polymerase chain reaction for evaluation of pro (Caspase-3, Caspase-8 and *Bax*) and antiapoptotic (*Bcl-X_L* and *Mcl-1*) genes expression. The evaluation of pro and antiapoptotic genes expression with Lys 49 e Asp 49 did not realized. In the expression of pro-apoptotic genes the whole venom caused increase of caspase-3 at concentration of 23.32µg/mL and of caspase-8 at concentrations of 46.65 and 23.32µg/mL, when compared with negative (PBS) and positive (DOXO) controls and decreased the expression of *Bax* in both concentrations. In the expression of anti-apoptotic genes the whole venom caused significant induction of *Mcl-1* only at a concentration of 46.65µg/mL and did not modify the expression of *Bcl-X_L*, when compared with the negative control. The venom and the fractions PLA₂ Lys 49 e Asp 49 of *Bothropoides erythromelas* is able to promote significant effects on renal function parameters and on MDCK cells, with indications of cell death by apoptosis through the extrinsic pathway.

Key-words: *Bothropoides erythromelas*. Whole venom. Lys 49. Asp 49. Renal effects. MDCK cells. Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ABF – Fator antibotrópico

AIF – Fator Indutor de Apoptose

ANOVA – Análise de Variância

APAF-1 – Fator de ativação das proteases pró-apoptóticas -1

Apo-1 – Apolipoproteína -1

Asp 49 – Ácido aspártico 49

Atm – Atmosfera

ATP – Adenosina trifosfato

dATP – Deoxiadenosina trifosfato

B. – *Bothropoides*

B.E. – *Bothropoides erythromelas*

BeV / VBE – Veneno de *Bothropoides erythromelas*

Céls – Células

CEPA – Comissão de Ética em Pesquisa Animal

CIVD – Coagulação Intravascular Disseminada

CK – Creatinina kinase

COBEA – Conselho Brasileiro de Experimentação Animal

C_{osm} - *Clearance* osmótico

COX – Ciclooxigenase

DD – Domínio de morte

DED – Efetor do domínio de morte

DNA – Ácido desoxirribonucleico

cDNA – DNA complementar

DL₅₀ – Dose Letal capaz de matar 50%

DOU in – Densidade ótica da inulina na urina

DOP in – Densidade ótica da inulina no perfusato

DTT – Ditionitrito

DOXO – Doxorubicina

ECl⁻ – Excreção de cloreto

EK⁺ – Excreção de potássio

ENa⁺ – Excreção de sódio

EETs – Epoxieicosatrienóicos

E.P.M. – Erro Padrão da Média

EROS - Espécies reativas do oxigênio

FCl⁻ – Cloreto filtrado

FK⁺ – Potássio filtrado

FNa⁺ – Sódio filtrado

FPR – Fluxo de perfusão renal

FU – Fluxo Urinário

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HE – Hematoxilina-eosina

HETEs – Hidroxieicosatetraenóicos

HCL – Ácido clorídrico

IBIMED – Instituto de Biomedicina

IC₅₀ – Concentração inibitória capaz de provocar 50% de inibição

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

i.p. – Intraperitoneal

IRA – Insuficiência Renal Aguda

LAAOs – L-aminoácido oxidases

LFAFVET – Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas

LCC – Laboratório de Cultivo Celular

LDH – Lactato desidrogenase

Lys 49 – Lisina 49

liso-PAF – Lisogliceril-fosforilcolina

LTs – Leucotrienos

MDCK – Madin-Darby Canine Kidney

MTT – 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico

NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NUROF – Núcleo Regional de Ofiologia

PAF – Fator de agregação plaquetária

PBS – Solução salina tamponada

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

qPCR – Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real

PE – Polietileno

PGs – Prostaglandinas

PGA₁– Prostaglandina A₁

PGA₂– Prostaglandina A₂

PGE₁– Prostaglandina E₁

PGE₂– Prostaglandina E₂

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

PGG₂ – Prostaglandina G₂

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ – Prostaglandina I₂ ou Prostaciclina

pH – Potencial de Hidrogênio

PLA_S – Fosfolipases

PLA₂ – Fosfolipase A₂

cPLA₂ – Fosfolipases A₂ citosólicas

iPLA₂ – Fosfolipases A₂ intracelulares

sPLA₂ – Fosfolipases A₂ secretórias

vPLA₂ – Fosfolipase A₂ de venenos

PLIs – Inibidores endógenos de fosfolipase A₂

PCI – Concentração de cloreto no perfusato

PK⁺ – Concentração de potássio no perfusato

PNa⁺ – Concentração de sódio no perfusato

Posm – Osmolaridade do perfusato

PP – Pressão de perfusão

RFG – Ritmo de filtração glomerular

RNA – Ácido Ribonucléico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RVR – Resistência vascular renal

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SESA – Secretaria de Saúde

TCl⁻ – Cloreto transportado

%TCl⁻ – Percentual de transporte tubular de cloreto

%pTCl⁻ – Percentual de transporte proximal de cloreto

TK⁺ – Potássio transportado

%TK⁺ – Percentual de transporte tubular de potássio

%pTK⁺ – Percentual de transporte proximal de potássio

TNa⁺ – Sódio transportado

%TNa⁺ – Percentual de transporte tubular de sódio

%pTNa⁺ – Percentual de transporte proximal de sódio

TNF – Fator de Necrose Tumoral

rTNF – Receptores de Fatores de Necrose Tumoral

TPM – Transição da Permeabilidade Mitocondrial

TX_s – Tromboxanos

TXA₂ – Tromboxano A₂

UCI⁻ – Concentração de cloreto na urina

UK⁺ – Concentração de potássio na urina

UNa⁺ – Concentração de sódio na urina

Uosm – Osmolaridade Urinária

ΔΨ – Potencial da membrana mitocondrial interna

UNIDADES

°C – Grau Celsius

Céls. – Células

g – Grama

h – Horas

Kb – Kilobase (uma unidade de informação genética igual à informação transportada por 1000 pares de unidades de base na dupla-hélice do DNA)

Kg – Kilograma

L – Litro

M – Molar

m – Metro

mg – Miligrama

mmHg – Milímetro de mercúrio

min – Minutos

mL – Mililitro

mM – Milimolar

n – Número de experimentos realizados

N – Normal

nm – Nanômetro

p – Significância estatística

v – Volume

U – Unidade

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrometro

µM – Micromolar

µEq – Microequivalente

% – Percentual

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Fotografia da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	29
FIGURA 02 – Distribuição dos acidentes ofídicos de 2001 a 2007 no estado do Ceará - Brasil, segundo o gênero da serpente.....	32
FIGURA 03 – Sinais de perda tecidual de acidente por <i>Bothrops sp</i>	35
FIGURA 04 – Esquema das três principais vias metabólicas do ácido araquidônico	47
FIGURA 05 – Características morfológicas da apoptose e da necrose	52
FIGURA 06 – Vias de sinalização da apoptose.....	53
FIGURA 07 – Via extrínseca de ativação da apoptose.....	54
FIGURA 08 – Via intrínseca de ativação da apoptose	56
FIGURA 09 – Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado	71
FIGURA 10 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.	73
FIGURA 11 – Valores registrados em manômetro de mercúrio (PP em mmHg) durante a calibração do sistema (n=6).....	74
FIGURA 12 – Valores registrados pelo fluxômetro (fluxo em L/min) durante a calibração do sistema (n=6)	75
FIGURA 13 – Valores registrados pela ponta da cânula (volume de salina em mL/min) durante a calibração do sistema (n=6).....	75
FIGURA 14 – Fotografias da técnica cirúrgica	77
FIGURA 15 – Fotografia do rim isolado de rato no sistema de perfusão.....	78
FIGURA 16 – Esquema simplificado do cultivo e tratamento das células MDCK	84
FIGURA 17 – Esquema simplificado dos ensaios de viabilidade e proliferação celular	84
FIGURA 18 – Esquema gráfico do isolamento de RNA total	87
FIGURA 19 – Fotomicrografia do rim esquerdo (controle) demonstrando glomérulos e túbulos normais.....	103
FIGURA 20 – Fotomicrografia do rim perfundido com a fração Lys 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> na concentração de 5µg/mL	105

FIGURA 21 – Fotomicrografia do rim perfundido com a fração Asp 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> na concentração de 5µg/mL.....	107
FIGURA 22 – Fotomicrografia do rim perfundido com o veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i> na concentração de 10µg/mL.....	108
FIGURA 23 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) na ausência de veneno total e frações Lys 49 e Asp 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i>	114
FIGURA 24 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição ao veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i> (50µg/mL).....	114
FIGURA 25 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição ao veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100µg/mL).....	115
FIGURA 26 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (6,25µg/mL).....	115
FIGURA 27 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (12,5µg/mL).....	116
FIGURA 28 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (25µg/mL).....	116
FIGURA 29 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (50µg/mL).....	117
FIGURA 30 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100µg/mL).....	117
FIGURA 31 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Asp 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (50µg/mL).....	118
FIGURA 32 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Asp 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100µg/mL).....	118
FIGURA 33 – Resumo da expressão de genes nas vias de sinalização da apoptose.....	142

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – Acidente Botrópico - Classificação quanto à gravidade e a soroterapia recomendada.....	36
QUADRO 02 – Componentes protéicos presentes nos venenos ofídicos	39
QUADRO 03 – Sequência dos iniciadores usados na reação de qPCR.....	90
QUADRO 04 – Avaliação dos parâmetros renais utilizando as frações PLA ₂ Lys 49 e Asp 49 e o veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i>	102
QUADRO 05 – Resumo dos efeitos renais do veneno total e das frações Lys 49 e Asp 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> em rim isolado de rato.....	141
QUADRO 06 – Resumo dos efeitos do veneno total e das frações Lys 49 e Asp 49 de <i>Bothropoides erythromelas</i> em células MDCK.....	141

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.0** - Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*. **95**
- GRÁFICO 2.0** - Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **95**
- GRÁFICO 3.0** - Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*..... **96**
- GRÁFICO 4.0** - Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **96**
- GRÁFICO 5.0** - Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **97**
- GRÁFICO 6.0** - Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **97**
- GRÁFICO 7.0** - Efeitos no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **98**
- GRÁFICO 8.0** - Efeitos no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **98**
- GRÁFICO 9.0** - Efeitos no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **99**
- GRÁFICO 10.0** - Efeitos no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas* **99**
- GRÁFICO 11.0** - Efeitos na excreção de sódio (ENa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*..... **100**
- GRÁFICO 12.0** - Efeitos na excreção de potássio (EK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*..... **100**

GRÁFICO 13.0 - Efeitos na excreção de cloreto (ECI ⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i>	101
GRÁFICO 14.0 - Efeitos no <i>clearance</i> osmótico (C_{osm}) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i>	101
GRÁFICO 1.1 - Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS)	198
GRÁFICO 2.1 - Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	198
GRÁFICO 3.1 - Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS)	198
GRÁFICO 4.1 - Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	199
GRÁFICO 5.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	199
GRÁFICO 6.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	199
GRÁFICO 7.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl ⁻) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	200
GRÁFICO 8.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	200
GRÁFICO 9.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	200
GRÁFICO 10.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	201
GRÁFICO 11.1 - Efeitos na excreção de sódio (ENa ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> . (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	201
GRÁFICO 12.1 - Efeitos na excreção de potássio (EK ⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E =10µg/mL) (ANEXOS).....	201

GRÁFICO 13.1 - Efeitos na excreção de cloreto (ECl ⁻) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E=10µg/mL) (ANEXOS).....	202
GRÁFICO 14.1 - Efeitos no <i>clearance</i> osmótico (C_{osm}) na ausência (controle) e presença do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (B.E=10µg/mL) (ANEXOS)	202
GRÁFICO 15 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).....	110
GRÁFICO 16 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).....	110
GRÁFICO 17 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).....	111
GRÁFICO 18 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL)	112
GRÁFICO 19 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL)	112
GRÁFICO 20 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL)	113
GRÁFICO 21 – Expressão gênica de caspase-3 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	119
GRÁFICO 22 – Expressão gênica de caspase-8 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	120
GRÁFICO 23 – Expressão gênica de <i>Bax</i> em células MDCK tratadas com veneno total da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	120
GRÁFICO 24 – Expressão gênica de <i>Bcl-X_L</i> em células MDCK tratadas com veneno total da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	121
GRÁFICO 25 – Expressão gênica de <i>Mcl-1</i> em células MDCK tratadas com veneno total da serpente <i>Bothropoides erythromelas</i>	122

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 SERPENTES PEÇONHENTAS BRASILEIRAS.....	25
1.2 O GÊNERO <i>BOTHROPS</i> E OUTROS AFINS.....	26
1.3 PRINCIPAIS SERPENTES DO GÊNERO <i>BOTHROPS</i> E OUTROS AFINS.....	26
1.3.1 GÊNERO <i>BOTHROPOIDES</i>.....	28
1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	29
1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS ENVENENAMENTOS BOTRÓPICOS... 	33
1.6 COMPONENTES E AÇÕES DOS VENENOS OFÍDICOS.....	37
1.7 O VENENO DE <i>Bothropoides erythromelas</i>.....	40
1.8 FOSFOLIPASES (PLA_s).....	41
1.9 EFEITOS BIOLÓGICOS DE METABÓLICOS DA FOSFOLIPASE A₂ SOBRE A FUNÇÃO RENAL.....	47
1.10 APOPTOSE.....	50
1.11 ALTERAÇÕES RENAIIS.....	57
2 JUSTIFICATIVA.....	63
3 OBJETIVOS.....	66
3.1 OBJETIVO GERAL.....	66
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO.....	68
4.1.1 VENENO E SUAS FRAÇÕES.....	68
4.1.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	68
4.1.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	69
4.1.4 SOLUÇÃO PERFUSORA E SEU PREPARO.....	70

4.1.5 SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL	70
4.1.5.1 COMPONENTES DO SISTEMA DE PERFUSÃO	72
4.1.6 PREPARO DO SISTEMA	74
4.1.7 TÉCNICA CIRÚRGICA	76
4.1.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	78
4.1.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	79
4.1.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA	79
4.1.11 CÁLCULO DOS PARÂMETROS RENAI s.....	80
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	81
4.3 CÉLULAS MDCK – MADIN-DARBY CANINE KIDNEY	82
4.3.1 LINHAGENS CELULARES	82
4.3.2 CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS MDCK	82
4.3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	83
4.3.3.1 ENSAIO COM MTT	83
4.3.3.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE	85
4.4 INVESTIGAÇÃO DE MEDIADORES MOLECULARES	85
4.4.1 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA	86
4.4.2 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL	87
4.4.3 SÍNTESE DE cDNA PELA REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA	88
4.4.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)	88
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	90
5 RESULTADOS	92
5.1 ESTUDO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS RENAI s.....	92
5.1.1 GRUPO CONTROLE	92
5.1.2 EFEITOS DA FRAÇÃO LYS 49 DO VENENO DE <i>BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS</i>	92

5.1.3 EFEITOS DA FRAÇÃO ASP 49 DO VENENO DE <i>BOTHOPOIDES ERYTHROMELAS</i>	93
5.1.4 EFEITOS DO VENENO TOTAL DE <i>BOTHOPOIDES ERYTHROMELAS</i>	93
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	103
5.3 CÉLULAS MDCK – MADIN-DARBY CANINE KIDNEY	109
5.3.1 EFEITOS DO VENENO TOTAL E DAS FRAÇÕES LYS 49 E ASP 49 DE <i>BOTHOPOIDES ERYTHROMELAS</i> EM CÉLULAS MDCK	109
5.3.2 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH) PELAS CÉLULAS MDCK	111
5.4 FOTOMICROGRAFIA DE CÉLULAS MDCK	113
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ E ANTIAPOPTÓTICOS EM CÉLULAS MDCK	119
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	124
6.1 ESTUDO DO VENENO TOTAL DE <i>BOTHOPOIDES ERYTHROMELAS</i>	124
6.2 ESTUDO DAS FRAÇÕES LYS 49 E ASP 49 DO VENENO TOTAL DE <i>BOTHOPOIDES ERYTHROMELAS</i>	130
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
8 CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS	150
ANEXOS	188

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 SERPENTES PEÇONHENTAS BRASILEIRAS

Calcula-se que existam cerca de 3.149 espécies de serpentes no mundo, das quais 15% são peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas, compreendendo cinco famílias: Viperidae, Elapidae, Lamprophiidae, Colubridae e Dipsadidae (BÉRNILS, 2010; UETZ, 2010). No Brasil existem 371 espécies, distribuídas em 82 gêneros (BÉRNILS, 2010). As duas principais famílias de serpentes peçonhentas existentes em nosso país são a Elapidae e a Viperidae as quais possuem importância epidemiológica e despertam interesse na saúde pública (BRASIL, 2001, 2010).

A família Viperidae é representada pelos gêneros *Bothrops* (com 8 espécies), *Bothriopsis* (com 2 espécies), *Bothrocophias* (monotípico), *Bothropoides* (com 11 espécies), *Rhinocerophis* (com 4 espécies), *Caudisona* (com 1 espécie) e *Lachesis* (com 1 espécie). Os representantes desta família possuem a cabeça triangular com escamas quilhadas, fosseta loreal, olhos com a pupila em forma de fenda. Os dentes inoculadores de veneno são grandes, móveis e implantados no osso maxilar superior situado na parte anterior, denominada de dentição solenóglifa. O seu corpo tende a ser grosso, com a pele áspera e o reconhecimento é relativamente fácil pela presença da fosseta loreal. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, e postam-se em posição de defesa em S quando molestadas (BARRAVIERA, 1991; RAGE, 1997; BÉRNILS, 2010).

A família Elapidae é representada pelos gêneros *Leptomicrurus* (com 3 espécies) e *Micrurus* (com 24 espécies). Os representantes desta família possuem a cabeça arredondada pouco diferenciada do corpo, ausência de fosseta loreal, olhos pequenos com as pupilas arredondadas. Os dentes inoculadores de veneno são pequenos, fixos e situados no maxilar superior, denominada de dentição proteróglifa. O seu corpo tende a ser cilíndrico e longo, a pele é áspera e o seu reconhecimento é difícil e perigoso por necessidade da identificação através do exame dos dentes. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares e em situação de perigo apresentam o comportamento de elevar a cauda para dar a impressão de que se trata da cabeça (BARRAVIERA, 1991; RAGE, 1997; BÉRNILS, 2010).

1.2 O GÊNERO *BOTHROPS* E OUTROS AFINS

O gênero *Bothrops*, juntamente com os recém criados *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerothis*, constituem o mais numeroso, com 26 espécies catalogadas, apresentando grande variedade de cores (variando do verde ao negro), desenhos, tamanhos e hábitos. Ocorrem na América Central e América do Sul, ocupando todo território brasileiro. Em virtude do número de espécies há grande dificuldade na sua identificação por nome popular em todo o território nacional. Alguns nomes mais conhecidos são jararaca, jararacuçu, jararaca pintada, urutu e cotiara. Possuem cauda lisa, sem chocalho ou escamas diferenciadas e a variação de cores depende da espécie e da região onde vivem. A denticção solenóglifa e a fosseta loreal, um orifício que abriga um órgão termorreceptor situado entre o olho e a narina, indica que o animal é peçonhento. Habitam preferencialmente ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, podendo ser encontradas penduradas em árvores, enterradas à beira de rios ou dentro d'água, além de zonas rurais, locais de proliferação de ratos e periferia de grandes cidades. Apresentam tamanhos que variam de 40 centímetros a 2 metros de comprimento. Têm hábitos noturnos ou crepusculares (PUERTO, 1992; ARAÚJO; MARTINS, 2007; BRASIL, 2010).

No Brasil, este grupo possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico. São anualmente notificados ao Ministério da Saúde mais de 20.000 casos de envenenamentos ofídicos, sendo esse complexo taxonômico responsável por 90% dos casos. Como cerca de 45% dos casos são apenas da Região Sudeste do país, provavelmente ocorre importante falha na notificação nas demais regiões (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; BRASIL, 2010). As espécies *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops atrox* são responsáveis pela maior parte desses acidentes em humanos e estão distribuídas em diferentes regiões do Brasil (BOECHAT *et al.*, 2001).

1.3 PRINCIPAIS SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS* E OUTROS AFINS¹

¹ Os recém criados gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerothis* pertenciam ao antigo gênero *Bothrops*.

Principais espécies do gênero *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* existentes no Brasil (CAMPBELL; LAMAR, 1989, 2004; BÉRNILS, 2010):

- *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758)
- *Bothrops brazili* (HOGE, 1954)
- *Bothrops jararacussu* (LACERDA, 1884)
- *Bothrops leucurus* (WAGLER, 1824)
- *Bothrops marajoensis* (HOGE, 1966)
- *Bothrops moojeni* (HOGE, 1966)
- *Bothrops muriciensis* (FERRAREZZI; FREIRE, 2001)
- *Bothrops pirajai* (AMARAL, 1923)
- *Bothriopsis bilineata* (WIED, 1825)
- *Bothriopsis taeniata* (WAGLER, 1824)
- *Bothrocophias hyoprora* (AMARAL, 1935)
- *Bothropoides alcatraz* (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002)
- *Bothropoides diporus* (COPE, 1862)
- *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923)
- *Bothropoides insularis* (AMARAL, 1921)
- *Bothropoides jararaca* (WIED, 1824)
- *Bothropoides lutzi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1915)
- *Bothropoides marmoratus* (SILVA; RODRIGUES, 2008)
- *Bothropoides mattogrossensis* (AMARAL, 1925)
- *Bothropoides neuwiedi* (WAGLER, 1824)
- *Bothropoides pauloensis* (AMARAL, 1925)
- *Bothropoides pubescens* (COPE, 1870)
- *Rhinocerophis alternatus* (DUMÉRIL; BIBRON; DUMÉRIL, 1854)
- *Rhinocerophis cotiara* (GOMES, 1913)
- *Rhinocerophis fonsecai* (HOGE; BELLUOMINI, 1959)
- *Rhinocerophis itapetiningae* (BOULENGER, 1907)

1.3.1 GÊNERO *BOTHROPOIDES*

Etimologia: O nome genérico é derivado do grego *Bothros*, que significa fosseta referindo-se também ao gênero atualmente nomeado *Bothrops*, onde “ops” significa olho ou face, em alusão à fosseta loreal, localizada entre o olho e a narina destas serpentes.

No gênero *Bothropoides*, o termo “oides” significa “semelhante a” ou “que tem a natureza de”, reconhecendo a afinidade destas espécies com outros piperídeos da América do Sul. Nomes terminados neste sufixo são masculinos.

Membros: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides insularis*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*.

Os membros são terrestres e de comprimento moderado. Apresentam manchas dorsais coloridas variando do dourado ao marrom ou preto, com manchas dorsais de bordas bem marcadas e presença de manchas intercalares entre as manchas principais (*B. neuwiedi*, *B. mattogrossensis*, *B. pubescens*, *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*) e com manchas dorsais de bordas difusas e presença de manchas intercalares ausentes ou pouco nítidas (*B. pauloensis* e *B. lutzi*). Uma faixa postocular está presente (mas na maioria dos espécimes de *B. insularis* esta faixa apresenta-se pálida). Quanto ao hábito alimentar, a maioria das espécies do gênero é generalista, com variação ontogenética, de modo que os exemplares juvenis alimentam-se preferencialmente de presas ectotérmicas (centopéias, lagartos e anfíbios) e os adultos, de presas endotérmicas (roedores e aves). As exceções são *B. neuwiedi* (exclusivamente roedores), *B. pubescens* (especialmente mamíferos), *B. insularis* (elevada proporção de pássaros) e *B. alcatraz* (66,7% de centopéias).

As serpentes *Bothropoides* diferem de outros viperídeos da América do Sul em 38 caracteres mitocondriais. Ocorrem na América do Sul, ocupando todo território brasileiro incluindo ilhas continentais, Bolívia, Peru, Paraguai, Uruguai e Argentina. Habitam ambientes secos a úmidos sendo encontradas em vegetações como a caatinga, cerrados, áreas de gramíneas, matas e florestas (CAMPBELL; LAMAR, 2004; FENWICK *et al.*, 2009).

➤ *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923) - conhecida por Jararaca-da-seca por habitar áreas xerófilas como a caatinga. Encontrada no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Maranhão, Bahia e norte de Minas Gerais.

Apresenta porte pequeno, aproximadamente 0,5 metros de comprimento. Sua coloração vai do marrom avermelhado a cinza, com manchas dorsais irregulares, lembrando trapézios. Possui faixa postocular e ventre ligeiramente manchado em tons escuros, sendo a serpente objeto do estudo em questão (CAMPBELL; LAMAR, 1989, 2004; FENWICK *et al.*, 2009). (**Figura 01**).

FIGURA 01 – Fotografia da serpente *Bothropoides erythromelas*.



Fonte: NUROF – UFC.

1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo Troiano (1991), os ofídicos são classificados na classe Reptilia, subclasse Lepidosauria, ordem Squamata, subordem Serpentes, sendo uma das classes mais estudadas (BARRAVIERA, 1993; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001; MELGAREJO, 2009). O valor global da incidência dos acidentes por picadas de serpentes e de sua severidade permanece desconhecido, seja por falta de registro ou por metodologia deficiente na captação dos dados (LIZANO *et al.*, 2003).

A Organização Mundial de Saúde estima que, no mundo, ocorram cerca de 5.400.000 acidentes com serpentes peçonhentas. Desses acidentes, ocorrem cerca de 125.345 mortes ao ano, com taxa de mortalidade de 2,3%. Na Ásia ocorrem por volta de 100.000 acidentes, enquanto que na África devem ocorrer 20.000 casos de picadas por serpentes. Discuti-se que esses dados são subestimados, o que torna preocupante a ocorrência do grande número de casos de envenenamentos ofídicos (SITPRIJA, 2006).

Devido ao Programa Nacional de Ofidismo a notificação dos acidentes ofídicos tornou-se obrigatória em 1986, e condicionada à distribuição de soro aos estados (BOCHNER; STRUCHINER, 2003a). Foram registrados no Brasil, de junho a dezembro de 1986, 8.574 casos. Nos três anos seguintes, 1987, 1988 e 1989, respectivamente 21.463, 19.815 e 20.947 casos (BARRAVIERA, 1997).

No Brasil, apesar das falhas nas notificações, o Ministério da Saúde calcula que ocorreram entre 1990 e 1993, 20.000 acidentes por ano, com 359 óbitos, principalmente por serpentes do gênero *Bothrops sp.* (CHIPPAUX, 1998; BRASIL, 2001; CASTRO, 2006). Em 314 desses óbitos o tempo decorrido entre a picada e o atendimento foi informado. Em 39,49% dos óbitos o tratamento ocorreu nas primeiras 6 horas, enquanto na maioria, 60,51% o atendimento deu-se após esse tempo. Dos acidentes por serpentes peçonhentas 90,5% foram atribuídos ao gênero *Bothrops* (BRASIL, 2001; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001).

Bochner e Struchiner (2003a) realizaram um extenso levantamento de casos registrados na literatura entre 1901 e 2000, concluindo que as análises epidemiológicas realizadas nos últimos 100 anos no Brasil eram baseadas nas mesmas variáveis utilizadas por Vital Brazil no início do século passado, com todas as mesmas deficiências de subnotificação. Os registros limitavam-se a informes regionais (DA SILVA; JORGE; RIBEIRO, 2003; PINHO; OLIVEIRA; FALEIROS, 2004). Os acidentes eram mais comuns em indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária dos 15 aos 49 anos, atingindo principalmente os membros inferiores, sendo a maioria deles atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops* (BOCHNER; STRUCHINER, 2003a).

A região Nordeste aparece nos dados do Ministério da Saúde, nos anos de 1990 a 1993, com o menor coeficiente de incidência anual de acidentes ofídicos. Sendo uma das regiões mais pobres, tradicionalmente agrícolas, e de localização geográfica equatorial, provavelmente tem sua situação subestimada em virtude de subnotificações, como se observa nos registros sanitários brasileiros relativos ao assunto (BOCHNER; STRUCHINER, 2003a).

No Ceará existem poucos trabalhos sobre ofidismo. A notificação dos acidentes ofídicos no Ceará é realizada pela Secretaria de Saúde do Estado (SESA), através da

Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. Em nosso Estado, os acidentes ofídicos podem ser considerados acidentes de trabalho, acometendo principalmente os trabalhadores rurais e constituindo causa de óbito. Compreendem uma boa parte das ações dispensadas aos cuidados de saúde pública, seja na disponibilização do soro, ou nos cuidados especializados necessários. O registro de casos é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia (CEARÁ, 1991).

Guimarães *et al.* (1989) verificaram nos dados da Divisão de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde do Estado, entre 1986 e 1988, a ocorrência de 1.079 casos de acidentes por serpentes peçonhentas e não peçonhentas, com 17 óbitos e uma letalidade de 1,6%. A Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará registrou, entre 1987 e 1990, 1.256 casos, com 18 óbitos e letalidade de 1,4% (CEARÁ, 1991).

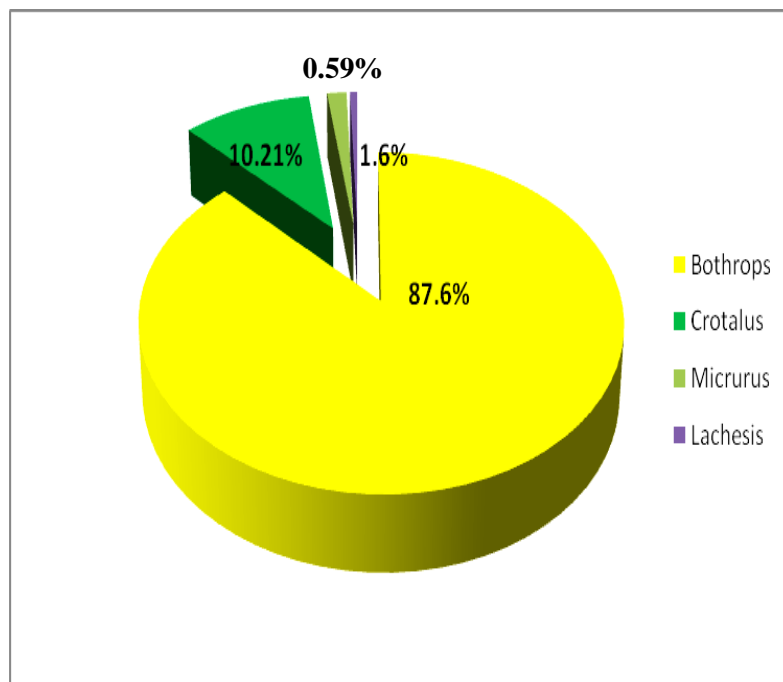
Feitosa *et al.* (1997) observaram a notificação de 688 casos no período de 1992 a 1995, acometendo pessoas do sexo masculino em 75% dos casos, na faixa etária entre 10 e 49 anos em 72% das ocorrências, sendo atingidos principalmente os membros de trabalhadores agrícolas (62,7%). As regiões anatômicas mais frequentemente picadas foram os membros inferiores (81,9%) e superiores (14,7%). Houve uma sazonalidade, com os acidentes ocorrendo nos meses de abril a setembro. A maioria dos acidentes foi provocada por serpentes do gênero *Bothrops* e afins, 88,3%, seguida pelas do gênero *Caudisona*, 10,7%, *Micrurus*, 0,8% e *Lachesis*, 0,2%. O perfil clínico-epidemiológico dos acidentes ofídicos depende da distribuição das espécies dentro de cada região, dos hábitos destes animais e do grau de exposição das populações humanas a estes agentes. A mortalidade foi de 0,7%, embora os casos sem informação tenham chegado a 33,6% do total. A maioria dos óbitos ocorreu entre pacientes que foram tratados nas primeiras 6 horas após a picada, fato que provavelmente deveu-se ao uso inadequado da dose ou do soro. Apesar da baixa incidência dos acidentes com *Caudisona* e de poucos dados disponíveis, o soro anticrotálico foi o mais utilizado no Estado do Ceará no período analisado.

Segundo o Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores, da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA), no período de 1998 a 2002 as estatísticas mostraram que houve um aumento do número de acidentes provocados por animais peçonhentos. Em 1998, foram registrados 344 casos; em 1999, 165; em 2000, 542; em 2001, 825; e em 2002, 1.003. Esse aumento é resultado do trabalho de notificação que o Núcleo de Controle vem mantendo. Nestes anos, não houve registro de óbito. O maior número de acidentes registrados se deve ao gênero *Bothrops* e afins enquanto o gênero *Caudisona* responde pelo maior número de óbitos. Os acidentes envolvendo o gênero *Micrurus* são raros,

ocorrendo em menos de 0,5% dos casos (CEARÁ, 2003). O gênero *Lachesis* é exclusivamente encontrado no Maciço de Baturité sendo responsável pelos acidentes ocorridos nesta área. Algumas espécies já foram encontradas em Guaramiranga e Pacoti (BORGES-NOJOSA; LIMA-VERDE, 1999).

Rocha (2008) em uma pesquisa realizada no estado do Ceará mostrou que o maior número de casos de acidentes ofídicos em humanos era devido às serpentes do gênero *Bothrops*, sendo responsáveis por 87,6% dos acidentes. No período de 2001 a 2007 foram notificados no Ceará, 3.877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas. Mais uma vez, foram mais acometidas as pessoas do sexo masculino (74,2%), porém a faixa etária mais atingida foi de 21 a 50 anos, considerando que este tipo de acidente está relacionado à atividade agrícola (**Figura 02**).

FIGURA 02 – Distribuição dos acidentes ofídicos de 2001 a 2007 no estado do Ceará - Brasil, segundo o gênero da serpente.



Fonte: ROCHA, 2008.

Os dados apresentados até aqui mostram que tanto no Ceará quanto no Brasil a maior prevalência de casos de acidentes ofídicos envolveu o gênero *Bothrops* e afins vistos serem populacionalmente mais numérico e possuir grande adaptabilidade a áreas devastadas, o que em si já eleva as estatísticas dos acidentes humanos. No Ceará, os acidentes envolvendo estes gêneros representaram 88,3% do total, estatística bem próxima a encontrada nacional que é de 90,5%. É interessante notar que o gênero *Lachesis*, a nível nacional, contribui com 1,4% do total de acidentes, mas no Ceará ele representa apenas 0,2% dos casos. Por se tratar de serpentes encontradas apenas em faixas preservadas de mata atlântica e ilhas úmidas como as que ocorrem no maciço de Baturité, onde a densidade populacional é baixa, os acidentes provocados por este gênero são pouco observados (HARDY; HAAD, 1998).

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública no Brasil, não só pela frequência com que ocorrem mais também pela morbidade e mortalidade que ocasionam, ocorrendo principalmente em países tropicais, o que engloba toda América Latina. Além da mortalidade, estes acidentes devem ser tratados com bastante relevância nos países em desenvolvimento, na medida em que resultam em morbidades crônicas associadas com amputações, deformidades, falência renal, e suas consequências socioeconômicas (LIZANO *et al.*, 2003; WARRELL, 2004; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008). O gênero *Bothrops* e afins possuem algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, tanto pela porcentagem predominante dos acidentes ofídicos registrados, quanto pelo seu potencial farmacológico (BOECHAT *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2010).

As serpentes *Bothrops* e *Bothropoides* são responsáveis por 70% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em 2008, em nosso país, ocorreram cerca de 27.000 acidentes ofídicos no qual as serpentes *Bothrops* e *Bothropoides* foram responsáveis por cerca de 70% dos casos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO- SINAN, 2009).

1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS ENVENENAMENTOS BOTRÓPICOS

O quadro clínico causado pelo acidente botrópico se caracteriza por uma sintomatologia local, alterações no tempo de coagulação, hemorragias sistêmicas e complicações locais e/ou sistêmicas. Trinta minutos após a picada observamos dor, edema e

eritema causados pelas atividades enzimáticas e proteolíticas do veneno, que serão mais intensos de acordo com a quantidade de veneno inoculado durante a picada. A dor é imediata e o edema se forma nas primeiras 6 horas (BARRAVIERA, 1993). Estes efeitos locais tendem a progredir para bolhas, equimoses e necrose as quais surgem geralmente após 12 horas do acidente. Pode ocorrer também liberação de peptídeos para a circulação com choque periférico e eventualmente óbito (BOER-LIMA *et al.*, 1999; RUIZ DE TORRENT *et al.*, 1999; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006). (**Figura 03**).

Náuseas, vômitos, sudorese, hemorragia, efeitos no sistema nervoso como mialgia e paralisia, dor abdominal, insuficiência renal aguda (IRA), hipotensão arterial e, mais raramente, choque, podem também acometer o paciente acidentado. Estes sintomas e complicações podem variar dependendo do tipo de acidente que pode ser classificado como leve, moderado ou grave (BRASIL, 2001; SITPRIJA, 2006; SANTORO *et al.*, 2008). A distância interposta aos sinais da picada nem sempre se correlaciona com as dimensões da serpente e com a quantidade de veneno inoculada (BRASIL, 2001; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

A necrose local pode complicar-se com infecção por bactérias, sobretudo provenientes da boca da serpente, e formação de abscesso (JORGE *et al.*, 1994; BRASIL, 2001). Geralmente limita-se ao tecido subcutâneo, mas pode comprometer estruturas mais profundas como, tendões, músculos e ossos. O período de instalação é variável, ocorrendo, na maioria dos casos, a partir do segundo dia após o acidente. A intensidade e a extensão da necrose estão fortemente relacionadas ao uso de torniquetes e outras intervenções bastante difundidas, porém extremamente prejudiciais. A demora entre o acidente e o tratamento soroterápico também pode agravar o caso (FERREIRA *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 2005).

Experimentos mostram que os antídotos são efetivos na neutralização da necrose e hemorragia local, somente quando injetados imediatamente ou pouco tempo depois da inoculação do veneno (BOCHEAT *et al.*, 2001).

Esses sinais podem, ainda, ser agravados pela presença de fatores da coagulação no veneno (SANCHEZ *et al.*, 1992) que causam alteração da coagulação sanguínea e sangramento. Além de hemorragia sistêmica, o veneno pode promover choque hemodinâmico e coagulação intravascular disseminada (CIVD). Todos esses sinais são características comuns do envenenamento botrópico (MILANI *et al.*, 1997; WHITE, 2005). (**Quadro 01**).

FIGURA 03 – Sinais de perda tecidual de acidente por *Bothrops sp.*



A complicação comum que tem sido bastante reportada em acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* é a hipotensão, sendo uma consequência grave nos acidentes botrópicos. Esse efeito sistêmico é capaz de produzir um estado de perfusão insuficiente para vários órgãos. Nessas condições, pode ocorrer desde uma redução da pressão intraglomerular renal, até uma falência cardíaca ou hipóxia (ABUELO, 1995; JOSEPH *et al.*, 2004). A hipotensão é causada pela liberação de óxido nítrico de macrófagos, levando a formação de peroxinitrito, depois de reação com ânions superóxido gerado localmente (ZAMUNÉR *et al.*, 2001).

Sintomas neurológicos raramente são atribuídos a acidentes causados por serpentes desse gênero. São poucos os casos clínicos no qual é diagnosticada a presença de alterações nervosas (BOCHNER; STRUCHINER, 2003b; MISE, 2007).

Considerando o curso clínico dos envenenamentos nas conclusões de atendimentos rotineiros no Brasil, a letalidade nos casos tratados é baixa (0,3%) (BRASIL, 2001), mas um número maior de pacientes apresenta sequelas como perda do membro ou de um segmento deste (JORGE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

QUADRO 01 – Acidente Botrópico - Classificação quanto à gravidade e a soroterapia recomendada.

Manifestações e tratamento	Caso leve	Caso moderado	Caso grave
Locais: • Dor • Edema • Equimose	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas**
Sistêmicas: • Hemorragia grave • Choque • Anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de coagulação (TC)*	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia SAB-SABC-SABL***	2 a 4 ampolas	4 a 8 ampolas	12 ampolas
Via de administração	Endovenosa	Endovenosa	Endovenosa

Fonte: PINHO; PEREIRA, 2001; BRASIL, 2010.

*TC normal: até 10 min; TC prolongado: de 10 a 30 min; TC incoagulável: > 30 min.

**Manifestações locais intensas podem ser o único critério para classificação de gravidade.

***SAB = Soro antibotrópico/SABC = Soro antibotrópico-crotálico/SABL = Soro antibotrópico-laquéico.

1.6 COMPONENTES E AÇÕES DOS VENENOS OFÍDICOS

O veneno representa uma importante inovação durante o processo evolutivo das serpentes. Ele possibilitou a transição de um modo mecânico (construção) para um modo químico de dominar e digerir grandes presas. Na verdade o veneno apresenta múltiplas funções como imobilização, paralisação, morte e digestão (CARDOSO, 2009).

Os venenos de serpentes contêm muitos componentes de valor biológico e/ou biotecnológico. Segundo Calvete *et al.* (2007) sua caracterização proteômica apresenta potenciais benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico e desenvolvimento de novos instrumentos de pesquisa e drogas de potencial uso clínico. Também é relevante para o entendimento da evolução e dos efeitos biológicos dos venenos, e gerar protocolos de imunização para eleger anticorpos específicos para as toxinas com maior especificidade e efetividade do que o sistema convencional.

Os venenos de serpentes apresentam-se como uma fonte natural para a pesquisa biológica, uma vez que contêm vários componentes que podem apresentar potencial terapêutico. São compostos por substâncias simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as diferentes espécies. Apresentam componentes protéicos e não protéicos com diferentes estruturas e atividades bioquímicas específicas (PAL *et al.*, 2002; KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006; PORTO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

O veneno consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Diferenças intraespecíficas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas, sazonais, estacionais e dieta (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990a, 1990b; CHIPPAUX *et al.*, 1991; FURTADO *et al.*, 1991; BRASIL, 2001; DA SILVA, 2002).

Os componentes protéicos constituem enzimas e proteínas não enzimáticas além de polipeptídeos como neurotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, desintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteases, fosfolipases, fosfodiesterases, nucleotidases, L-aminoácido oxidases, entre outros (**Quadro 02**). Os componentes não protéicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004).

Entre os componentes orgânicos não protéicos encontramos aminoácidos livres e pequenos peptídeos, carboidratos, lipídios (principalmente fosfolipídios) e aminas biogênicas (VARANDA; GIANNINI, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2008).

Os constituintes não orgânicos conhecidos são cálcio, cobre ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971; PONCE-SOTO *et al.*, 2006). Porém esses elementos não são encontrados em todos os venenos e a quantidade também varia para cada espécie. O papel biológico de cada um desses constituintes inorgânicos não está claro. Alguns estudos sugerem que o cálcio, o manganês e o magnésio, por exemplo, são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto que outros, em particular o zinco, o cobre, o ferro e o cobalto, possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos, como metaloproteínas (BJARNASON; FOX, 1994; AIRD, 2002).

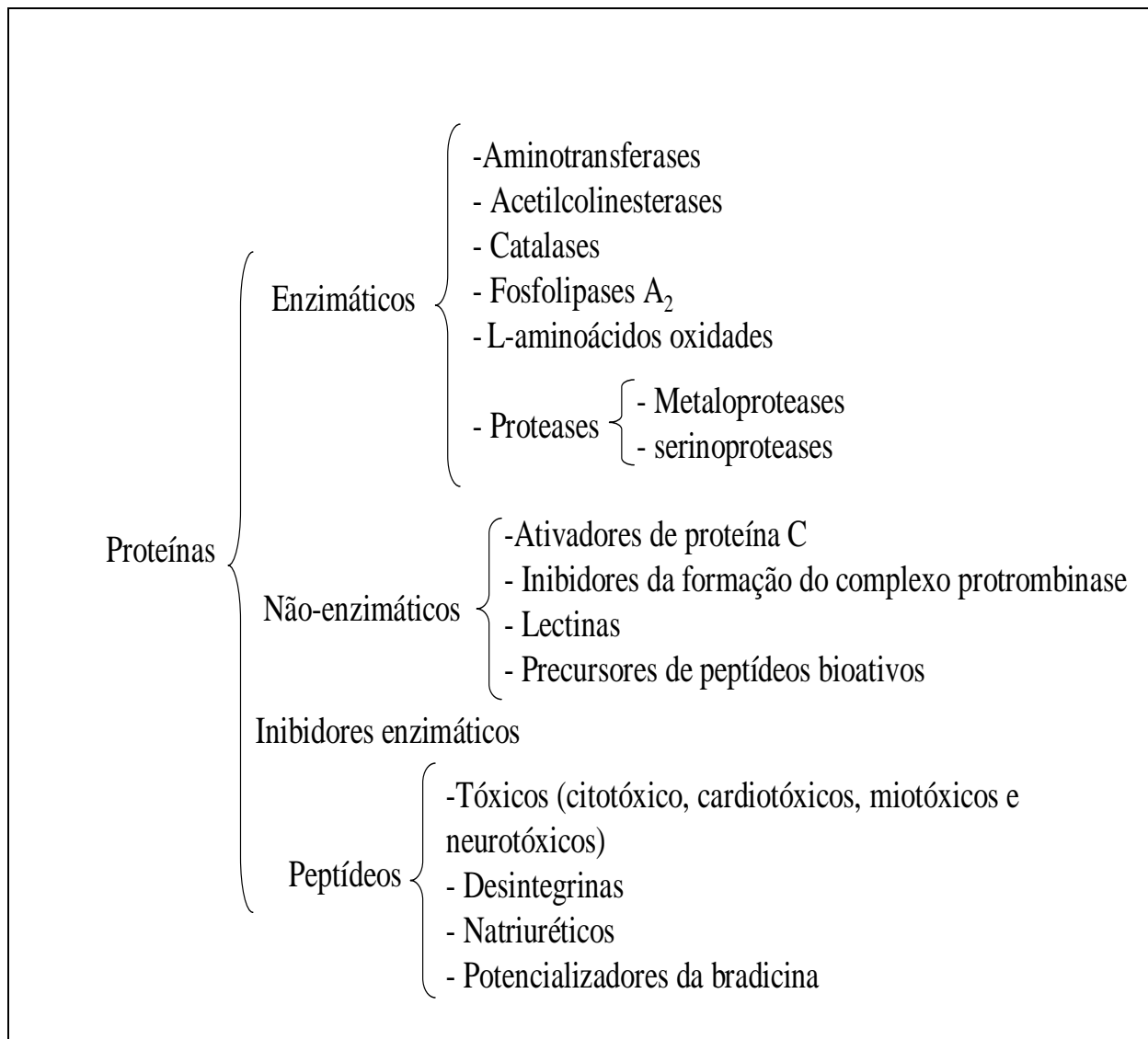
Cerca de 90-95% do peso seco dos venenos ofídicos tem composição protéica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BON, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2008). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados (ÂNGULO; LOMONTE, 2009).

Dentre as proteínas que exibem atividades enzimáticas encontramos as proteinases, as nucleotidasas, as fosfodiesterases, as fosfolipases A₂ (PLA₂) relacionadas à produção de derivados do ácido aracônico (SIX; DENNIS, 2000), as metaloproteínas com atividade proteolítica sobre as membranas basais dos vasos, sendo responsáveis pela indução de hemorragia, bolhas e mionecroses (VARANDA; GIANNINI, 1994; FRANCESCHI *et al.*, 2000; TANJONI *et al.*, 2003; MITCHELL, 2005), as trombinas símeles (serinoproteínas) que ativam fatores da coagulação, induzem a agregação plaquetária e atuam no fibrinogênio do tipo A ou do tipo B com a formação de um complexo de fibrina facilmente degradada pela plasmina, ocasionando um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio com diminuição da coagulação sanguínea (HAVT, 1999; BRAUD, 2000; SANTOS *et al.*, 2000, WHITE *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; MITCHELL, 2005) e as L-aminoácido oxidases (LAAOs) que provocam ou inibem a agregação plaquetária além de induzirem apoptose (DU; CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; ZHANG; WU, 2008). Em adição às suas propriedades catalíticas, as quais podem contribuir para a ação digestiva do veneno, estas enzimas também induzem vários efeitos farmacológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes, hipotensivos e edematogênicos (BAILEY; WILCE, 2001; KINI, 2003).

Os membros de cada família de proteínas têm um padrão molecular semelhante, mas eles exibem múltiplas funções. Sugere-se que com o processo evolutivo, alguns dos padrões moleculares dos venenos têm sido “selecionados”, e vários sítios funcionais foram gerados por uma evolução acelerada até um padrão molecular comum (TORRES *et al.*, 2003).

Segundo Daltry *et al.* (1996), os componentes dos venenos apresentam uma considerável variação geográfica mesmo dentro de cada espécie de serpente, em uma relação estreita com sua alimentação, de acordo com observações prévias que os componentes dos venenos extraídos da mesma espécie de serpente podem ser diferentes.

QUADRO 02 – Componentes protéicos presentes nos venenos ofídicos.



Fonte: RAMOS; SELISTRE-DE ARAÚJO, 2006.

1.7 O VENENO DE *Bothropoides erythromelas*

Bothropoides erythromelas, comumente conhecida como “jararaca da seca” ou “jararaca malha-de-cascavel”, é responsável por muitos acidentes no Nordeste do Brasil (WEN *et al.*, 1989; ROMANO-HOGE, 1990; VASCONCELOS *et al.*, 1998; AIRD, 2004; ROCHA *et al.*, 2008). Esta espécie é particularmente interessante porque não apresenta atividade trombina-like (NAHAS *et al.*, 1975; NAHAS *et al.*, 1979; FURTADO *et al.*, 1991). Assim como as serpentes do gênero *Bothrops*, a atividade coagulante (alto nível) deste veneno foi atribuída à presença de ativadores de protrombina e fator X (NAHAS *et al.*, 1979; FURTADO *et al.*, 1991; MARUYAMA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2003), exibindo poderosa ação pró-coagulante nos fatores X e II (NAHAS *et al.*, 1979; FURTADO *et al.*, 1991; VASCONCELOS, 1996; SILVA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006). Pacientes com envenenamento sistêmico podem desenvolver coagulação intravascular disseminada seguida por incoagulabilidade sanguínea devido ao consumo de fatores coagulantes (MARUYAMA *et al.*, 1992). O veneno também possui elevada atividade hemorrágica (MARUYAMA *et al.*, 1992; VASCONCELOS, 1996), fibrinolítica (NAHAS *et al.*, 1979; PEREIRA *et al.*, 2006), proteolítica (FURTADO *et al.*, 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992), e significativa atividade de fosfolipase A₂ (FLORES *et al.*, 1993; AIRD, 2004; DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006), induz edema e necrose (SANCHEZ *et al.*, 1992; VASCONCELOS, 1996), provoca hipotensão (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2004; SCHATTNER, *et al.*, 2005), induz migração dose-dependente de neutrófilos (FLORES *et al.*, 1993), inibe a agregação plaquetária (ZAPPELLINI; PRADO-FRANCESCHI, 1990; DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2008) e apresenta atividade de inibidores endógenos de fosfolipase A₂ (PLIs) (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008). A atividade miotóxica direta do veneno é baixa (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991; ZAMUNÉR *et al.*, 2004) sugerindo que a fosfolipase abrange outros alvos biológicos. Um estudo em cães mostrou que o veneno induz mudanças hemostáticas envolvendo hipercoagulabilidade sanguínea seguida por incoagulabilidade sanguínea (VASCONCELOS, 1996) e intensa hemorragia nos pulmões, rins e fígado (VALENÇA *et al.*, 1996).

O veneno da *B. erythromelas* é o mais letal de todos quando comparado aos venenos de *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* causando mionecrose com dano intermediário aos venenos da *Bothrops jararacussu* (98-100%) e *Bothropoides jararaca* (74%) (ZAMUNÉR *et al.*, 2004).

1.8 FOSFOLIPASES (PLA_s)

As enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂) são os componentes protéicos mais amplamente encontrados nos venenos de serpentes (VALENTIM; LAMBEAU, 2000a; CHACUR *et al.*, 2003). São classificadas segundo quatro critérios: a) a capacidade de catalisar a hidrólise do éster do substrato fosfolipídico; b) a sequência completa de aminoácidos; c) a homologia de sequências; d) a variação no segmento cataliticamente ativo (SIX; DENNIS, 2000).

Constituem uma superfamília de enzimas as quais liberam precursores de mediadores químicos relacionados ao processo inflamatório (BONFIN *et al.*, 2009). Estas enzimas catalizam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (KINI, 2003; KOH *et al.*, 2006; SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Os ácidos graxos liberados por essas enzimas, como ácido araquidônico e ácido oléico, podem ser importantes fornecedores de energia. O ácido araquidônico também pode funcionar como segundo mensageiro, bem como precursor de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas), os quais são potentes mediadores da inflamação. Os lisofosfolipídios, por sua vez, são importantes na sinalização celular, remodelagem fosfolipídica e perturbação da membrana (SIX; DENNIS, 2000; BALSINDE *et al.*, 2002; KUDO; MURAKAMI, 2002; KAMANNA *et al.*, 2005; RIGONI *et al.*, 2005; LOMONTE *et al.*, 2009a).

Baseando-se nas características das PLA₂ tem sido difícil compreender muito dos seus efeitos. Inúmeras atividades inflamatórias têm sido descritas para as fosfolipases A₂ de venenos como indução de edema, recrutamento de células inflamatórias, desgranulação de mastócitos entre outras (CHACUR *et al.*, 2003; CÂMARA *et al.*, 2003). Desde a descoberta que as fosfolipases A₂ são as principais enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico, responsável pela biosíntese de lipídios mediadores da inflamação como prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX_s) e leucotrienos, muito interesse tem sido focalizado nesta família de enzimas no estudo da inflamação (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

As PLA₂ estão agrupadas em três famílias principais: (I) citosólicas (cPLA₂) de alto peso molecular (31-110kDa), intracelulares e dependentes de concentrações micromolares de cálcio para sua atividade enzimática; (II) secretórias dependente de Ca²⁺ (sPLA₂) que são extracelulares, de baixo peso molecular (14-18kDa) e que requerem concentrações milimolares de cálcio e (III) intracelulares não dependentes de Ca²⁺ (iPLA₂)

estas também intracelulares e com peso molecular entre 29-85kDa (FORTE-DIAS *et al.*, 1999; LANDUCCI *et al.*, 2000a; MONTECUCCO; ROSSETO, 2000; CHAKRABORTI, 2003; BALSINDE *et al.*, 2006; HIGUCHI *et al.*, 2007). As fosfolipases A₂ intracelular ou citosólica (cPLA₂) são encontradas em várias células, enquanto as fosfolipases A₂ extracelular ou secretória (sPLA₂) são encontradas nos venenos de serpentes e suco pancreático dos mamíferos (GLASER *et al.*, 1993; DE CASTRO *et al.*, 2000; VALENTIN; LAMBEAU, 2000a).

De acordo com as estruturas primárias e locação das células, as fosfolipases secretórias podem ser divididas em três subgrupos: o primeiro foi obtido dos venenos de serpentes da família Elapidae e Lamprophiidae e do pâncreas de mamíferos (suco pancreático); o segundo grupo obtido dos venenos de serpentes da família Viperidae bem como do líquido sinovial e das plaquetas de seres humanos; o terceiro grupo foi obtido através do veneno de vespas (DENNIS 1994; PFEILSCHIFTER, 1995; NEVALAINEN *et al.*, 2004).

O segundo subgrupo de fosfolipase A₂ pode ser dividido em:

1 Miotoxinas pequenas - são peptídeos básicos de cadeia simples, não enzimáticos, possuindo em sua estrutura primária 42 a 45 aminoácidos ligados por três pontes dissulfetos, possuindo como exemplo a crotamina encontrada no gênero *Caudisona*.

2 Cardiotoxinas - são proteínas básicas, não enzimáticas, possuindo em sua estrutura primária aproximadamente 60 aminoácidos. Seu principal mecanismo de ação consiste em alterar a integridade do sarcolema (MEBS, 1998; OWNBY *et al.*, 1999).

3 Miotoxinas com característica de fosfolipase A₂ - divididas em:

3.a Neurotóxicas - são proteínas básicas e multiméricas, com atividade fosfolipásica e neurotoxicidade pré-sináptica, possuindo em sua estrutura primária aproximadamente 120 aminoácidos. Estas miotoxinas são comumente encontradas nos venenos de serpente dos gêneros *Micrurus* e *Caudisona* sendo responsáveis pela letalidade dos venenos devido ao efeito pré-sináptico na junção neuromuscular, além de necrose do músculo esquelético. Os conjuntos destes efeitos fazem com que estas miotoxinas tenham uma DL₅₀ muito baixa (LOMONTE *et al.*, 2003a), como exemplo a crotoxina do veneno da *Caudisona durrisus cascavella* comumente encontrada em nossa região (MARTINS *et al.*, 1998).

Pesquisas com neurotoxinas têm demonstrado muita utilidade para o entendimento dos eventos da transmissão sináptica e tem contribuído no desenho de novas drogas para o tratamento de desordens neurológicas e da dor (MORTARI *et al.*, 2007).

3.b Não neurotóxicas - são proteínas básicas e diméricas, possuindo aproximadamente 120 aminoácidos, comumente encontradas nos venenos das serpentes Viperidae. São proteínas abundantes, possuem baixa letalidade e uma DL_{50} alta. Seu potencial miotóxico é baixo quando comparado com a miotoxina fosfolipásica neurotóxica (LOMONTE *et al.*, 2003a). Dividem-se em três tipos diferentes: 1) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49 (Asp 49), a qual apresenta atividade catalítica; 2) as variantes (também denominadas proteínas semelhantes a PLA_2 sendo classificadas como PLA_2 símile por serem estruturalmente semelhantes, mas destituídas de atividade enzimática) contendo lisina no carbono 49 (Lys 49) (LOMONTE *et al.*, 2003a); 3) as variantes com serina ocupando a posição 49 (Ser 49) (KRIZAJ *et al.*, 1991; POLGÁR *et al.*, 1996), as duas últimas enzimaticamente inativas (LOMONTE *et al.*, 2003a).

3.b.1 Asp 49 s PLA_2 - fosfolipases que contêm na posição 49 da sua cadeia primária, um ácido aspártico que atua como sítio de ligação para o íon Ca^{2+} , em geral não são agentes hemolíticos, possuem alta atividade enzimática, ligando-se a sítios específicos na membrana ou interagindo com seus componentes causando hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular provocando sua desorganização (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997a; SIX; DENNIS, 2000; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE *et al.*, 2003a).

3.b.2 Lys 49 s PLA_2 - contêm uma lisina homóloga na posição 49, são destituídas de atividades enzimáticas, são citotóxicas e cálcio independente. Seu mecanismo de ação ocorre por susceptibilidade da membrana celular que requer a presença de fosfolipídio de carga negativa seguido de penetração e desorganização da bicamada da membrana celular. Essa desorganização é seguida por um descontrolado influxo de cálcio e sódio para o interior da célula causando alteração intracelular irreversível e morte. O C terminal da enzima, rico em lisina, é o responsável pelos efeitos ocorridos (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997a; LOMONTE *et al.*, 1994a; CALDERÓN; LOMONTE, 1998; FLETCHER; JIANG, 1998; NÚÑEZ *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; WARD, 2002; CHIOATO; WARD, 2003; LOMONTE *et al.*, 2003a, 2003b; NÚÑEZ *et al.*, 2004).

As fosfolipases A_2 mantêm uma homologia estrutural que se mantém constante dentro de cada grupo. Existe uma clara distinção entre as PLA_2 Asp 49 e Lys 49. Estruturalmente são constituídas por 125 resíduos de aminoácidos, unidos por seis pontes dissulfídricas e contêm uma extensão C-terminal com cinco a sete resíduos (LOMONTE *et al.*, 2003a; DOS SANTOS *et al.*, 2009). Lee *et al.* (2001) propõem que as características estruturais das PLA_2 destituídas de atividade enzimática impedem a liberação do ácido graxo produzido após a hidrólise inicial do fosfolipídio, interrompendo o ciclo catalítico. Seu efeito

mionecrótico transcorre por uma via catalítica independente da atividade enzimática, sendo acompanhado, *in vivo*, por edema, hiperalgesia, liberação de citosinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), além de atividade letal quando injetada por via endovenosa ou intraperitoneal em camundongos (LOMONTE *et al.*, 2003a).

3.b.3 Ser 49 sPLA₂ - essa miotoxina apresenta um resíduo de serina na posição 49 sem atividade enzimática, tendo como característica o grupamento de hidroxila da serina que substitui a carboxila do ácido aspártico na estabilização do cálcio (POLGÁR *et al.*, 1996).

Na verdade, nem todas as fosfolipase A₂ de venenos (vPLA₂) cataliticamente ativas induzem efeitos tóxicos. Além do mais, existem várias vPLA₂ cataliticamente inativas que podem ter efeitos miotóxicos, cardiotoxicos e citotóxicos (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997b; VALENTIN; LAMBEAU, 2000b).

Dentre as atividades causadas pelas miotoxinas classificadas como não neurotóxicas encontra-se “*in vivo*” miotoxicidade acompanhada de edema utilizando a técnica de edema de pata (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; LIU *et al.*, 1991; CHAVES *et al.*, 1998; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; ÂNGULO *et al.*, 2000; LANDUCCI *et al.*, 2000a, 2000b; SOARES *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008), hiperalgesia (CHACUR *et al.*, 2001; CHACUR *et al.*, 2003), liberação de citocina pró-inflamatória (LOMONTE *et al.*, 1993; CHACUR *et al.*, 2003), capacidade de atrair leucócitos para cavidade pleural (DE CASTRO *et al.*, 2000; ZULIANI *et al.*, 2005).

In vitro as fosfolipases A₂ apresentam efeitos na placa neuromuscular, atividade citolítica que se expressa pela ruptura de lipossomos compostos de fosfolipídios carregados negativamente (LOMONTE *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2000a, 2000b; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; ÂNGULO *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2002), destruição de lipossomo (DÍAZ *et al.*, 2001), promoção da degranulação de mastócitos com consequente aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (CHAVES *et al.*, 1998; LANDUCCI, *et al.*, 1998), ação quimiotóxica com migração de neutrófilo (RIZZO *et al.*, 2000; GAMBERO *et al.*, 2002), atividade antibactericida de largo espectro (PÁRAMO *et al.*, 1998; BUCKLAND; WILTON, 2000), proliferação, apoptose e necrose em células de linha de linfoblastoide B (MORA *et al.*, 2005), além de provocarem lesão renal em sistema de rim isolado de rato (BARBOSA *et al.*, 2002, 2005, 2006; BRAGA *et al.*, 2008; EVANGELISTA *et al.*, 2010).

As PLA₂ isoladas dos venenos de serpentes variam consideravelmente em termos de toxicidade e complexidade estrutural. Possuem várias bioatividades, como indução da

motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante, antitumoral, inibição da agregação plaquetária (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAGRO *et al.*, 2004; ROBERTO *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2008), neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, coagulação e efeitos hipotensivos (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; GALBIATTI *et al.*, 2007; SAI-NGAM, 2008). Há evidências crescentes de que as PLA₂ são um dos componentes mais tóxicos presentes nos venenos de serpentes (OWNBY *et al.*, 1999).

Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as fosfolipases A₂ desestabilizam os fosfolípidos das membranas celulares e induzem lesão da membrana celular, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular (LOMONTE *et al.*, 2003a).

Uma fosfolipase A₂ Asp 49 (BE-I-PLA₂) de *Bothropoides erythromelas*, a qual apresenta alta similaridade com as PLA₂ de serpentes do gênero *Bothrops*, foi isolada, clonada e caracterizada como um potente antiplaquetário e indutor da liberação de prostaglandina I₂ (PGI₂) por células endoteliais. BE-I-PLA₂ inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico, sem interferência nos receptores plaquetários e a habilidade de estimular as células endoteliais a liberar PGI₂ sugere um aumento do potencial antiplaquetário do veneno *in vivo* (DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006).

Inibidores endógenos de fosfolipase A₂ (PLIs) têm sido descritos no soro de serpentes. Estudos têm demonstrado a existência de três classes estruturais distintas de PLIs de fosfolipase A₂ (α , β e γ). Os membros da classe γ são potentes inibidores de fosfolipase A₂ (PLA₂) dos venenos da família Viperidae. Os γ PLIs estão presentes no veneno da *Bothropoides erythromelas* (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2008).

Flores *et al.* (1993) demonstraram que o veneno de *Bothropoides erythromelas* (BeV) possuía significativa atividade de fosfolipase A₂. O BeV induzia migração dose-dependente de neutrófilos na cavidade peritoneal, o qual era dependente do número de macrófagos encontrados, quando injetado via intraperitoneal (IP) em ratos. Esta resposta era devido à atividade da fosfolipase A₂ e que metabólicos da via da lipoxigenase derivada do ácido araquidônico, como o leucotrieno B₄, atuava como mediador quimiotático.

A ação mionecrótica se deve as miotoxinas de estrutura fosfolipásica (destituída ou não de atividade enzimática) que levam a transtornos vasculares e hemostáticos, podendo causar um processo tissular isquêmico levando a uma amputação de membro ou lesão músculo tendinosa permanente (ROODT *et al.*, 2000).

Moura-da-Silva *et al.* (1991) demonstraram que o veneno de *Bothropoides erythromelas* tem baixa capacidade de ligação ao tecido muscular o qual é consistente com a baixa miotoxidade do veneno, quando comparada com outras espécies de *Bothrops*.

Zamunér *et al.* (2004) compararam os efeitos neurotóxico e miotóxico dos venenos das *Bothrops* e *Bothropoides* (*Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides jararaca*, e *Bothropoides neuwiedi*) e sua neutralização pelo antiveneno comercial. O veneno da *B. erythromelas* apresentou ser o mais letal de todos com DL₅₀ de 0,55mg/kg, produziu bloqueio neuromuscular tempo e concentração dependente. Na mais alta concentração o veneno causou 50% de bloqueio em $47,4 \pm 6,4$ minutos. A ordem de proteção contra o bloqueio neuromuscular do antiveneno botrópico foi de 40%. A atividade miotóxica da *B. erythromelas* foi considerada baixa, com pequena liberação de creatinina kinase (CK). O antiveneno botrópico neutralizou a liberação de CK com ordem de potência de 41,5%. O veneno causou mionecrose com dano intermediário aos venenos da *Bothrops jararacussu* (98-100%) e *Bothropoides jararaca* (74%). O antiveneno neutralizou a habilidade do veneno em produzir mionecrose com extensa neutralização (65,8%).

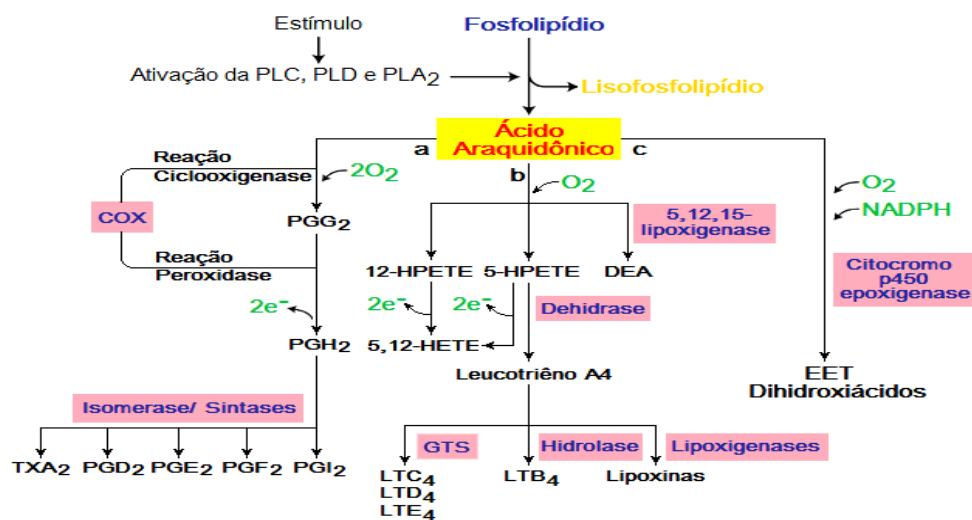
Os resultados desse estudo estão em concordância com o estudos de Camey *et al.* (2002) sobre a neutralização de venenos usados na produção de antiveneno botrópico no Brasil, no qual alguns efeitos farmacológicos dos venenos de cinco diferentes espécies do gênero *Bothrops* e afins (*Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedi* e *Rhinocerophis alternatus*) e um pool antigênico desses venenos foram quantificados, assim como os efeitos farmacológicos dos venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops leucurus* e *Bothropoides erythromelas* os quais não foram incluídos no pool antigênico. A habilidade do antiveneno botrópico produzido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Brasil) em neutralizar as principais atividades tóxicas e enzimáticas foram estudadas usando ensaios *in vivo* e *in vitro*. O antiveneno botrópico tem elevada efetividade na neutralização dos principais efeitos tóxicos *in vivo* (letalidade, toxicidade, necrose e hemorragia) e *in vitro* (ação proteolítica, fosfolipásica, pró-coagulante e fibrinolítica) de todos os venenos testados inclusive do veneno de *B. erythromelas* o qual não estava incluído no pool antigênico.

1.9 EFEITOS BIOLÓGICOS DE METABÓLICOS DA FOSFOLIPASE A₂ SOBRE A FUNÇÃO RENAL

A ação das fosfolipases enzimaticamente ativas sobre as diferentes células, incluindo as células renais, leva à liberação de ácido araquidônico (AA) que pode ser posteriormente metabolizado por três vias principais: a via da enzima ciclooxigenase que resulta na formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXs); a via da lipooxigenase levando à produção de leucotrienos (LTs); e a via do citocromo P450 com produção dos ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs) e ácidos hidroxieicosatetraenólicos (HETEs) (NATARAJAN; REDDY, 2003).

Os principais metabólitos da fosfolipase A₂ estão representados na **Figura 04**.

FIGURA 04 – Esquema das três principais vias metabólicas do ácido araquidônico.



Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Fonte: BELTON; FITZGERALD, 2003.

A ciclooxigenase (COX), também conhecida por prostaglandina H sintetase, é uma enzima que limita a velocidade do catabolismo do ácido araquidônico às várias prostaglandinas bioativas. Existem as isoformas COX-1 e COX-2 que são as formas constitutiva e induzível, respectivamente (YANG, 2003). A primeira é utilizada, principalmente, na biossíntese imediata de prostaglandinas, o que ocorre dentro de alguns

minutos após o estímulo por mobilizadores de cálcio (UENO *et al.*, 2001). A segunda um produto gênico de resposta imediata nas células inflamatórias e imunes (FOEGH; RAMWELL, 2001).

O mecanismo de ação das prostaglandinas envolve a ativação de receptores celulares resultando na iniciação subsequente de cascatas sinalizadoras envolvendo proteínas G e AMP cíclico (CUMMINGS *et al.*, 2000).

Sabe-se que em várias condições fisiológicas e fisiopatológicas, como o excesso no consumo de sais, a privação de água, entre outros, a estimulação renal da COX-2 é restrita à medula renal, apesar do mecanismo da indução da COX-2 nesse local não ser completamente elucidado (YANG, 2003).

Estudos têm mostrado que a produção de prostaglandinas regula a hemodinâmica renal (DENG *et al.*, 1996; UENO *et al.*, 2001; YANG, 2003). Tanto a medula renal quanto o córtex renal sintetizam prostaglandinas, porém a capacidade de síntese da medula é significativamente maior (FOEGH; RAMWELL, 2001). Algumas delas, particularmente PGE₂ e PGI₂, causam vasodilatação no rim e aumentam a liberação de renina (KRAMER *et al.*, 1985; FOEGH; RAMWELL, 2001).

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

A atividade fosfolipásica produz prostaglandinas (PG_s) vasodilatadoras renais, PGE₁, PGE₂, PGA₁, PGA₂, PGH₂, PGI₂, PGG₂, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e consequente diurese, natriurese e caliurese ou produz PGF_{2α} cuja ação é vasoconstritora. Além das prostaglandinas, a PLA₂, através da ciclooxigenase, pode ativar o tromboxano A₂ (TXA₂) que também possui ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI, 2000).

A PGE₂, um modulador importante da hemodinâmica renal, exerce efeitos diuréticos e natriuréticos. Em coelhos, as células renais capazes de produzir PGE₂ em quantidades significativas incluem: mácula densa, ductos coletores medulares e corticais e células intersticiais medulares, enquanto que os túbulos proximais produzem pouca PGE₂ (SCHNEIDER *et al.*, 2004).

A PGE₁, a PGE₂ e a PGI₂ aumentam a excreção de água e de sódio (FOEGH; RAMWELL, 2001). A PGI₂ é preferencialmente produzida em macrófagos via COX-2, sendo esta enzima a maior fonte de PGI sistêmica produzida em humanos normais (UENO *et al.*, 2001).

Em relação à produção e ao metabolismo das prostaglandinas, sabe-se que a ciclooxigenase está localizada principalmente na medula renal, enquanto a enzima inativadora - prostaglandina desidrogenase - está localizada principalmente no córtex. As células endoteliais contêm, primariamente, prostaciclina sintetase (BOWMAN; RAND, 1980; FOEGH; RAMWELL, 2001). No caso específico da PGE₂, sua biosíntese envolve múltiplas etapas enzimáticas e requer a ação sequencial da fosfolipase A₂, das ciclooxigenases e das PGE₂ sintetases (SCHNEIDER *et al.*, 2004).

A ação da PLA₂ sobre os fosfolipídios dá origem ao liso-PAF (lisoglicerilfosforilcolina) que é acetilado para produzir o PAF. Existem indícios que o PAF esteja associado com os efeitos tóxicos do TNF- α e IL-1. No rim o PAF causa vasoconstrição renal com diminuição do fluxo sanguíneo, redução da taxa de filtração glomerular, excreção reduzida de sódio pela urina, com oligúria e retenção hidroeletrolítica. Como efeito compensador pode atuar na liberação de prostaglandinas vasodilatadoras no rim (DOUGLAS, 2000, 2001).

O papel desempenhado por leucotrienos e produtos do citocromo P450 em rins humanos continua especulativo. Constatou-se que o 5,6-epóxido é um poderoso vasodilatador em experimentos realizados em animais, e que os radicais livres atuam em fosfolipídios que contêm ácido araquidônico, produzindo uma 8-epi-PGF₂ α cujas propriedades poderosas se assemelham às do tromboxano (HONDEGHEM; RODEN, 2001). Diversas pesquisas têm direcionado os estudos para os mediadores produzidos pelo citocromo P450, em especial o 20-HETE, que adquiriu o *status* de principal eicosanóide renal (IMIG; NAVAR, 1996; OYEKAN *et al.*, 1999; ROMAN, 2002; OGUNGBADE *et al.*, 2003; SACERDOTI *et al.*, 2003).

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

Nos rins, os metabólitos do citocromo P450 têm importantes funções fisiopatológicas ao modular o transporte de íons, o tônus e a reatividade vasculares em respostas inflamatórias (GU; WANG, 2002; NATARAJAN; REDDY, 2003). Foi demonstrado, por exemplo, que o metabolismo do ácido araquidônico via monooxigenases dependentes do citocromo P450, a ativação de canais de potássio dependentes de cálcio assim como a liberação de óxido nítrico estão envolvidos na vasodilatação induzida pela bradicinina em rim isolado de rato (POMPERMAYER *et al.*, 2002).

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

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

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

1.10 APOPTOSE

O termo “apoptose” descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose (ANAZETTI; MELO, 2007). A apoptose ocorre a fim de eliminar células indesejáveis ou desnecessárias ao organismo, mediante a ativação de um programa bioquímico de desmontagem dos componentes celulares, internamente controlado, que requer energia e não envolve inflamação (MALUF; POMPÉIA, 2005). Ocorre individualmente, de forma que a morte de uma célula não leva à morte de outras células diferentemente da necrose a qual envolve, geralmente, grupos de células (BONINI *et al.*, 2000).

A necrose é o ponto final das alterações celulares, resultado de injúria celular irreversível, em que a homeostase não pode ser restabelecida. Este tipo de morte celular geralmente acomete um grupo de células vizinhas e envolve inflamação (MALUF; POMPÉIA, 2005).

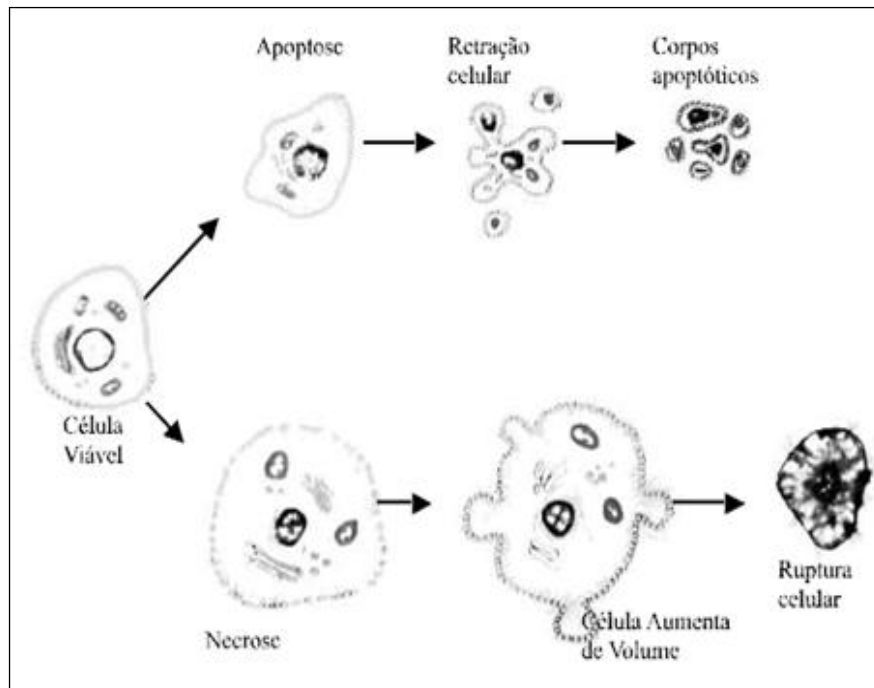
A necrose representa uma forma acidental de morte celular cujas principais características morfológicas são aumento do volume celular, agregação de cromatina,

desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (**Figura 05**). O conteúdo citoplasmático é liberado causando dano às células vizinhas além de uma reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN *et al.*, 2002). Entretanto, embora considerada uma resposta passiva à injúria celular, estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas (**Figura 05**). De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. A formação de corpos apoptóticos impede o extravasamento de material citoplasmático para o meio extracelular. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Outras características muito marcantes da morte por apoptose são as alterações na assimetria de fosfolipídios de membrana plasmática e a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000).

Em outras palavras, a apoptose é um mecanismo rigidamente controlado pela expressão de genes decorrentes da interação célula e meio externos, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfolologicamente (ISRAELS; ISRAELS, 1999).

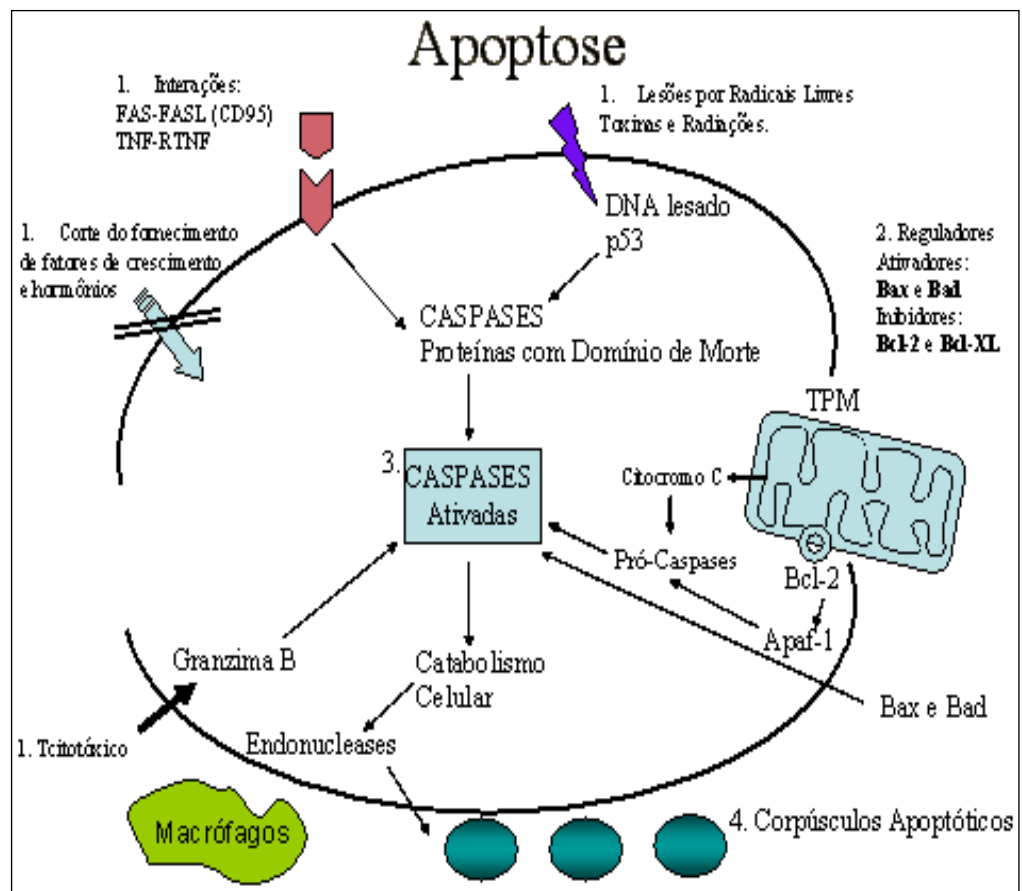
FIGURA 05 – Características morfológicas da apoptose e da necrose.



Fonte: GRIVICICH *et al.*, 2007.

A ativação da apoptose pode ocorrer através de duas vias principais: a via extrínseca ou dos receptores de morte (citoplasmática) e a via intrínseca ou mitocondrial (**Figura 06**). A primeira é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o fator de necrose tumoral (TNF) e o Fas (membro da família dos receptores de TNF) os mais conhecidos. A via intrínseca depende da participação da mitocôndria, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromo *c*, o fator indutor de apoptose (AIF), ATP e proteínas de choque térmico. Como resultado final de ambas as vias, ocorre a ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (HALE *et al.*, 1996; FISHER, 2001; GESKE; GERSCHENSON, 2001; LORO *et al.*, 2003; MALUF; POMPÉIA, 2005).

FIGURA 06 – Vias de sinalização da apoptose.



Fonte: DAMIANI, 2004.

TPM: transição da permeabilidade mitocondrial.

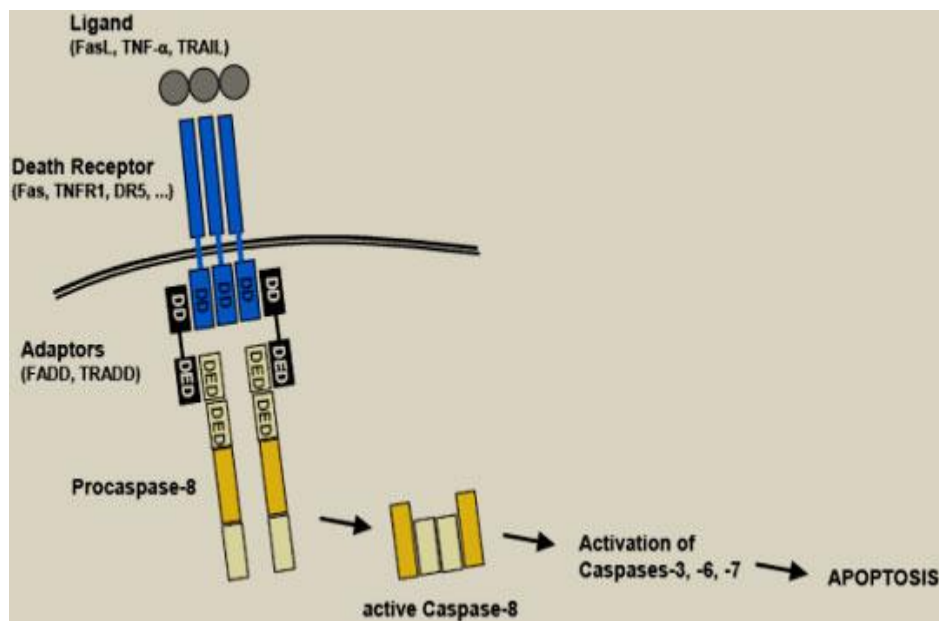
VIA EXTRÍNSECA

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIHARDJO *et al.*, 1999; GRIVICICH *et al.*, 2007). As caspases reconhecem e clivam substratos que possuem resíduos de aspartato levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar fagocitose por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que sete (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) participam da apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 estão envolvidas na maturação de

citocinas e sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (DENAULT; SALVESEN, 2002).

Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos (**Figura 07**).

FIGURA 07 – Via extrínseca de ativação da apoptose.



Fonte: Liga de Neurocirurgia Sistemarnervoso.com

DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte.

A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH; SPRANG, 1998; GRIVICICH *et al.*, 2007).

Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL *et al.*, 2001; GRIVICICH *et al.*, 2007).

VIA INTRÍNSECA

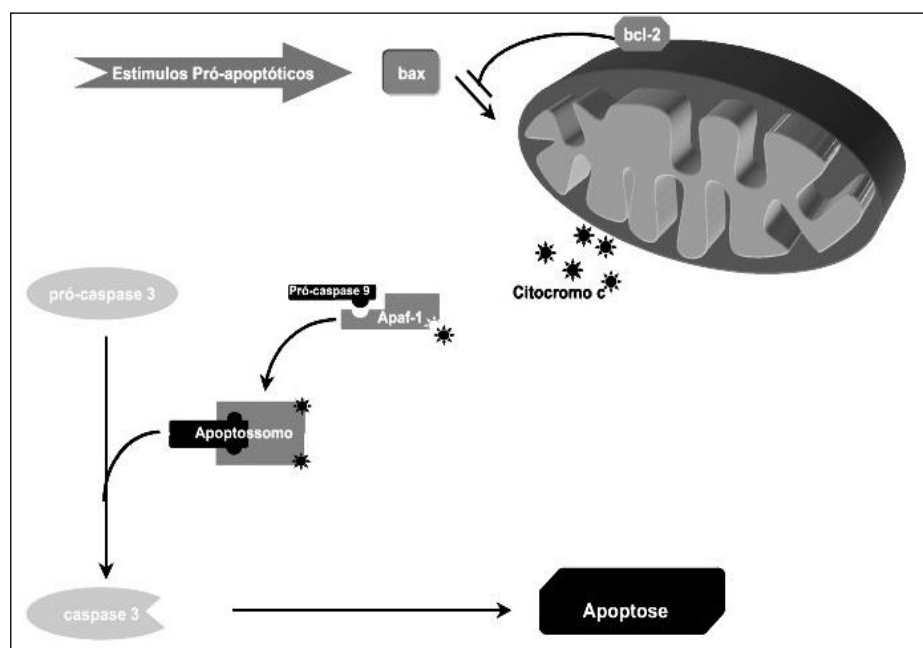
A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER; MARTINOU, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007). (**Figura 08**).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (LOEFFLER; KREMER, 2000; GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\Psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER; REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\Psi$ (GREEN; KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as EROS induzem a ativação das caspases 9 e 3 (GOTTLIEB *et al.*, 2000; GOTTLIEB, 2001).

Alguns estudos indicam que durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria (WETZEL; GREEN, 1999). Através desse poro ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, o qual promove a clivagem da pró-caspase-9 liberando a caspase-9 ativa (BUDIARDJO *et al.*, 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (DEVARAJAN *et al.*, 2002; PETROS *et al.*, 2004; RUPNARAIN *et al.*, 2004). (**Figura 08**).

Mais recentemente, foi descrita a participação, na via mitocondrial, de uma flavoproteína conhecida por Fator Indutor de Apoptose (AIF). O AIF migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50Kb, independente da ativação das caspases (BRÖKER *et al.*, 2005).

FIGURA 08 – Via intrínseca de ativação da apoptose.



Fonte: GRIVICICH *et al.*, 2007.

Apaf-1=fator de ativação de protease associada à apoptose 1.

PROTEÍNAS DA FAMÍLIA *Bcl-2*

A família *Bcl-2* é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (BORNER, 2003). Os membros da família *Bcl-2*, como *Bcl-2* e *Bcl-X_L* inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, *Bax*, *Bid* e *Bak* são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de *Bcl-2* é capaz de inibir

a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN; THOMPSON, 1999).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS *et al.*, 2004). Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a *Bax* (pró-apoptótica) e a *Bcl-2* (antiapoptótica) a qual é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais (BRONNER *et al.*, 1995).

As proteínas *Bax* e *Bcl-2* são capazes de formar homodímeros (*Bax-Bax* e *Bcl-2-Bcl-2*) e heterodímeros (*Bax-Bcl-2*), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula (PETROS *et al.*, 2004). Após um estímulo de morte, a *Bcl-2* inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de *Bax* ou por competir por sítios que seriam ocupados pela *Bax* na membrana externa mitocondrial (MURPHY *et al.*, 2000). A *Bax* pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (PETROS *et al.*, 2004).

1.11 ALTERAÇÕES RENAIIS

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Entre elas podemos citar glomerulonefrite (SEEDAT *et al.*, 1974), glomerulite e nefrite intersticial (SANT; PUNDARE, 1972), arterite e necrose tubular (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979), necrose cortical (VARAGUNAM; PENABOKKE, 1970) e insuficiência renal (RAAB; KAISER, 1966; SILVA *et al.*, 1979; BRADY; BRENNER, 1998; LIEBERTHAL; NIGAM, 1998; BOER-LIMA *et al.*, 2002; SCHRIER *et al.*, 2004; SANTOS; FERANI; ROCHA, 2009). Foram descritas ainda a ocorrência de hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (SANO-MARTINS *et al.*, 2001).

Dentre as complicações locais e/ou sistêmicas mais comuns após o envenenamento ofídico encontramos a Insuficiência Renal Aguda (IRA). Os efeitos renais provocados por envenenamento ofídico revelam uma via complexa. Vários componentes tóxicos dos venenos podem agir direto ou indiretamente nas células renais (SCHRIER *et al.*, 2004).

A fisiopatologia da IRA caracteriza-se por uma proeminente resposta molecular subjacente aos distúrbios funcionais, morfológicos e celulares encontrados nessa síndrome. Vários genes são expressos em resposta ao insulto renal inicial. Alguns genes desempenham um papel importante no desencadeamento e na manutenção da IRA, assim como na expressão morfológica da síndrome, enquanto outros têm papel decisivo na eventual recuperação da IRA. Após a lesão renal inicial, o rim desenvolve uma resposta molecular que determinará o destino da célula (VIEIRA, 2001).

A Insuficiência Renal Aguda (IRA) descrita por vários autores (RIBEIRO *et al.*, 1998; AIRD, 2002) é a causa principal de mortes nos acidentes ofídicos (CASTRO, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2008), mesmo após o tratamento com soro antiofídico. O tratamento com soro não previne o surgimento de insuficiência renal embora ele melhore o estado geral dos pacientes (AMARAL *et al.*, 1986; SITPRIJA; CHAIYABUTR, 1999; MAROTTA *et al.*, 2006).

A IRA tem sido relatada como a causa mais frequente de mortes causada por serpentes do gênero *Bothrops* sendo motivo de muitos estudos (WARRELL, 2004; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). Dependendo da quantidade do veneno injetado, o paciente pode progredir para um quadro de falência renal e óbito (OTERO *et al.*, 1997; MAROTTA *et al.*, 2006). Outro fator agravante é a idade do indivíduo. Um estudo realizado no Instituto Butantan, em São Paulo, mostrou que os adultos ≥ 60 anos, em relação aos mais jovens, têm maior probabilidade de desenvolverem insuficiência renal (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Diversas pesquisas descrevem a ação nefrotóxica induzida pelo veneno das serpentes do gênero. Alguns autores atribuem a nefrotoxicidade às mudanças hemodinâmicas causadas por uma vasoconstrição e conseqüente isquemia renal, hemólise, deposição de fibrina nos glomérulos e injúria vascular (CHAVES *et al.*, 1989; REZENDE *et al.*, 1989; BURDMANN *et al.*, 1993; CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001). Outros autores atribuem aos componentes do veneno que têm ação direta sobre o epitélio renal (RATCLIFFLE, *et al.*, 1989; WILLINGER *et al.*, 1995; COLARES-BUZATO *et al.*, 2002; DE CASTRO *et al.*, 2004; CALGAROTTO *et al.*, 2008). Estes efeitos renais podem estar associados a ações de lectinas, miotoxinas, e fosfolipases, dentre outros constituintes do veneno bruto das espécies (HAVT *et al.*, 2001, 2005; BARBOSA *et al.*, 2005, 2006; BRAGA *et al.*, 2006, 2008; EVANGELISTA *et al.*, 2010).

A IRA ocorre secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e necrose cortical renal (SCHRIER *et al.*, 2004). Contudo a sua patogênese não está totalmente esclarecida. As lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou

combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos, desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008).

Os venenos ofídicos causam em nível glomerular uma proliferação do endotélio e células mesangiais, com deposição de fibrina e crescimento epitelial ocasional, sem provocar alterações na membrana basal. Três teorias foram propostas para explicar a patogênese da lesão glomerular. A presença de um componente irritante, a deposição de fibrina decorrente do processo de coagulação intravascular ou uma reação imunológica (CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001).

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

O grupo de pesquisa LFAVET (Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas) vem desde 1993 se dedicando ao estudo dos venenos de serpentes brasileiras, principalmente do gênero *Bothrops* e afins e do gênero *Caudisona*, assim como o veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*, do escorpião *Tityus serrulatus*, da anêmona *Bunodosoma caissarum*, além dos estudos com outros produtos naturais como as lectinas vegetais tendo em vista a fauna riquíssima que tem o Brasil e o potencial genético de biodiversidade existente, visando encontrar uma fonte para futuros agentes terapêuticos e/ou ferramentas para elucidação de mecanismos causadores de nefrotoxicidade.

O estudo da toxicidade renal em perfusão de rim isolado de rato tem despertado grande interesse na linha de pesquisa em venenos ofídicos, haja visto a capacidade destes venenos de provocar insuficiência renal.

Monteiro e Fonteles (1999) ao estudarem o veneno da *Bothropoides jararaca* observaram nefrotoxicidade direta no rim isolado de rato, com alteração principalmente dos parâmetros funcionais (diminuição da pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU), ritmo de filtração glomerular (RFG), percentual de transporte total de sódio (%Na⁺_{tot}) e potássio (%K⁺_{tot}) bem como diminuição dos íons sódio e potássio no tecido renal após exposição) e compararam estas alterações ao observado na insuficiência renal aguda, atribuindo ao fator de agregação plaquetária (PAF) como sendo um dos possíveis responsáveis.

Havt *et al.* (2001) ao estudarem o veneno da *Bothrops jararacussu* observaram alterações dos parâmetros funcionais (diminuição da pressão de perfusão (PP), da resistência

vascular renal (RVR) e dos percentuais de transporte total de sódio ($\%Na^{+}_{tot}$) e potássio ($\%K^{+}_{tot}$). Ocorreu aumento do fluxo urinário (FU) e do ritmo de filtração glomerular (RFG), concluindo que algumas das alterações observadas foram promovidas pelo PAF. Eles sugeriram que a miotoxina encontrada no veneno poderia estar envolvida nos efeitos desde que destituída de atividade de PLA₂.

Barbosa *et al.* (2002) ao estudarem o veneno da serpente da *Bothrops moojeni* observaram que as alterações renais promovidas eram similares aos promovidos pela *Bothrops jararacussu*. Eles atribuíram aos peptídeos potenciadores de bradicinina a possível causa da diminuição da pressão de perfusão e resistência vascular renal. Os pesquisadores usaram duas miotoxinas purificadas, que foram classificadas como Lys 49, sendo atribuído ao C-Terminal rico em lisina como responsável pela alteração renal somente na miotoxina I. Em 2006, Barbosa *et al.* estudaram o papel da indometacina e do tezosentan nos efeitos renais induzidos pela miotoxina I (Lys 49) purificada do veneno da serpente da *Bothrops moojeni*. Observou-se que com a indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase) ocorria bloqueio parcial indicativo de prostaglandinas como mediadores. Com o uso do tezosentan (antagonista da endotelina) o bloqueio era total. Os autores concluíram que a endotelina era a principal responsável pelas alterações dos parâmetros renais observados.

Havt *et al.* (2005) ao estudarem o veneno da serpente *Bothrops pirajai* observaram efeitos similares às outras *Bothrops* estudadas em rim isolado de rato. Neste trabalho os autores concluíram que a queda na pressão de perfusão e resistência vascular renal não seria causada pelos peptídeos potenciadores de bradicinina e que outros fatores poderiam estar envolvidos, como a lectina purificada da *Bothrops pirajai* que demonstrou um efeito similar ao apresentado pelo veneno.

Braga *et al.* (2006) ao estudarem a lectina tipo C purificada da *Bothropoides insularis* observaram aumento da pressão de perfusão e resistência vascular renal e concluíram que os efeitos promovidos pela lectina devia-se à interação com células endoteliais ou liberação de mediadores por células endoteliais, mesangiais e tubulares.

Martins *et al.* (2005) ao estudarem os efeitos renais do veneno da *Bothropoides erythromelas* observou citotoxicidade renal e alterações dos parâmetros renais afirmando que o veneno era diurético, natriurético, caliurético e reduz a pressão de perfusão e a resistência vascular renal e que potenciadores de bradicinina poderiam estar envolvidos. O grupo de pesquisa bloqueou os efeitos observados utilizando o ABF (Fator antibotrópico) purificado do soro do gambá *Didelphis marsupialis* o qual se mostrou eficaz na inibição

(bloqueio dose-dependente) dos efeitos induzidos pelo veneno no modelo de rim isolado de rato.

Diversas PLA₂s extraídas de venenos de serpentes têm demonstrado potencial em provocar lesão renal em perfusão de rim isolado, em particular aquelas extraídas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides*, como a PLA₂ extraída do veneno de *Bothrops jararacussu* que apresenta importante capacidade de induzir alterações em parâmetros renais como pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, apresentando ainda importante diminuição dos transportes renais de sódio e potássio. Estes efeitos parecem ser bloqueados em parte pela adição de indometacina, o que reforça a possível ação direta, em proteínas específicas, da PLA₂ (BARBOSA *et al.*, 2005). Efeitos semelhantes foram obtidos com a PLA₂ extraída do veneno de *Bothropoides insularis*, cuja ação assemelhou-se aquela observada no veneno de *Bothrops jararacussu*, exceto pelo fato da *B. insularis* não afetar o transporte de potássio. A PLA₂ isolada de veneno botrópico causou alterações renais, o que pode refletir sua atividade enzimática sobre os fosfolipídios de membrana de células renais e produção de derivados do ácido araquidônico (BRAGA *et al.*, 2008).

Evangelista *et al.* (2010) ao estudarem o efeito do veneno de *Bothrops marajoensis*, no sistema de perfusão de rim isolado, observou que os efeitos eram diretos e similares aos observados nos outros venenos botrópicos. A PLA₂ isolada do veneno não alterou os parâmetros renais.

O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos renais do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* em rim isolado de rato e em células MDCK na perspectiva de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do envenenamento.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento dos mecanismos de ação das toxinas e antitoxinas animais e vegetais faz-se necessário para a busca de técnicas de diagnóstico, melhorias no tratamento do paciente envenenado e/ou para o desenvolvimento de novos fármacos (SOARES *et al.*, 2005).

A complicação sistêmica mais séria após um acidente botrópico é a insuficiência renal aguda (IRA). Além de bastante grave, esse quadro é muito comum nos casos em que o paciente evolui ao óbito (BOER-LIMA *et al.*, 2002). O soro usado para terapia humana no Brasil não é suficientemente capaz de neutralizar as atividades tóxicas presentes em todos os venenos de serpentes além de não prevenir o aparecimento da IRA. Uma melhor caracterização das atividades biológicas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e afins é muito importante, não somente para elucidar os mecanismos moleculares da ação do veneno, mas também para buscar novas abordagens de tratamento (QUEIROZ *et al.*, 2008).

A utilização de modelos experimentais para investigar a patogênese das lesões renais causados por venenos botrópicos tem mostrado severas alterações renais. Porém, a patogênese dessas complicações após envenenamentos por espécies do gênero *Bothrops* e afins ainda não é bem definido (SITPRIJA, 2006).

A utilização de modelos animais para o estudo dos efeitos sistêmicos e locais produzidos pelos venenos ofídicos tem auxiliado no diagnóstico e tratamento de pacientes picados por serpentes, além de contribuir para a implementação de medidas preventivas de tais envenenamentos (CHIPPAUX *et al.*, 1991; PURCHASE *et al.*, 1998; AIRD, 2002; SELLS, 2003). A utilização de sistemas de órgãos isolados tem contribuído para o estudo de eventos celulares e/ou teciduais (SELLS, 2003; TAFT, 2004).

Apesar de muito se discutir sobre os efeitos citotóxicos dos venenos ofídicos, pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos de ação sobre as diversas células, e em especial, sobre as células renais. Atualmente, muitos estudos visam descobrir a ação de toxinas, bem como, os mecanismos pelos quais estas causam seus efeitos locais e sistêmicos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos em diversas linhagens celulares busca, na biodiversidade, ferramentas para a construção de fármacos biologicamente ativos e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos. A elucidação destes mecanismos pode permitir a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização de respostas com vistas à interrupção da sequência de eventos celulares/moleculares que podem culminar em lesão (PEIXOTO, 2003).

A serpente *Bothropoides erythromelas* (Jararaca-da-seca) é responsável por muitos dos acidentes ocorridos no Nordeste, principalmente no Ceará, razão pela qual foi escolhida para ser o objeto deste estudo.

Sousa (2004) ao estudar os efeitos renais do veneno da *Bothropoides erythromelas* observou nefrotoxicidade direta através da alteração dos parâmetros funcionais renais. O veneno diminuiu a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR) e os percentuais de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (%TNa⁺, %TK⁺ e %TCl). Em contraste, ocorreu aumento do fluxo urinário (FU), do ritmo de filtração glomerular (RFG) e da excreção de sódio, potássio e cloreto (ENa⁺, EK⁺ e ECl).

Baseado nos resultados encontrados por Sousa (2004) resolveu-se continuar a linha de pesquisa com a serpente *Bothropoides erythromelas* estudando o veneno total e frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 em rim isolado de rato e em células MDCK bem como a participação de alguns mediadores moleculares (Caspase-8, Caspase-3, *Bax*, *Mcl-1* e *Bcl-X_L*), utilizando o veneno total, envolvidos na injúria renal na perspectiva de elucidação dos mecanismos responsáveis pela nefrotoxicidade.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos renais do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* e a participação de alguns mediadores moleculares da apoptose (Caspase-8, Caspase-3, *Bax*, *Mcl-1* e *Bcl-X_L*), utilizando o veneno total, visando obter resultados que possam subsidiar a elucidação de seus mecanismos de ação fisiopatológicos, bem como buscar a descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou substâncias de valor terapêutico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar os efeitos das PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas* em rim isolado de rato;
- ✓ Comparar os efeitos encontrados das PLA₂ Lys 49 e Asp 49 com os efeitos induzidos pelo veneno total da *Bothropoides erythromelas*, estudados anteriorente, no mesmo modelo;
- ✓ Avaliar as alterações histopatológicas renais provocadas pelas PLA₂ Lys 49 e Asp 49;
- ✓ Comparar as análises histológicas das frações Lys 49 e Asp 49 com o veneno total;
- ✓ Estudar o efeito do veneno total e das PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da *Bothropoides erythromelas* sobre a viabilidade e proliferação de células tubulares renais (MDCK);
- ✓ Estudar a ação do veneno total sobre a expressão de genes pró e antiapoptóticos através de técnicas de Biologia Molecular.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET) da Universidade Federal do Ceará.

Utilizaram-se ratos *Wistar* machos, adultos, pesando entre 250 e 300g, oriundos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em jejum alimentar de 24 horas antes dos experimentos e com fornecimento de água “*ad libitum*”.

4.1.1 VENENO E SUAS FRAÇÕES

O veneno total da *Bothropoides erythromelas* foi obtido pelo NUROF (Núcleo Regional de Ofiologia - Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, Brasil) coordenado pela Profa. Dra. Diva Maria Borges Nojosa.

As frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas* foram purificadas e isoladas na UNESP (Depto. de Bioquímica - Inst. Biologia, São Paulo, SP, Brasil) coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama.

A purificação e isolamento das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 encontram-se em anexo (**ver páginas 189 - 195**).

4.1.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Grupo controle: Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6g% de albumina bovina (n=6).
- Grupo tratado (veneno): Neste grupo, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionado o veneno da *Bothropoides erythromelas* (10µg/mL) aos 30 minutos de perfusão (n=6). O grupo foi estudado anteriormente, sendo utilizado neste estudo para posteriores comparações.

- Grupo tratado (fração Lys 49): Neste grupo, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionada a fração Lys 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) aos 30 minutos de perfusão (n=6).
- Grupo tratado (fração Asp 49): Neste grupo, os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g% de albumina bovina e foi adicionada a fração Asp 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) aos 30 minutos de perfusão (n=6).

4.1.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Nos experimentos com perfusão renal foram utilizadas as seguintes substâncias:

- NaHCO₃ (Synth)
- NaH₂PO₄ . H₂O (Synth)
- NaCl (Synth)
- MgSO₄. 7H₂O (Reagen)
- CaCl₂. 2H₂O (Reagen)
- Manitol (Reagen)
- Uréia (Reagen)
- KCl (Merck)
- Glicose (Squibb)
- Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)
- Heparina (Roche)
- Fração V de albumina bovina (Sigma)
- Inulina (Sigma)
- Pentobarbital sódico (Cristália)

4.1.4 SOLUÇÃO PERFUSORA E SEU PREPARO

A solução empregada nos experimentos foi a de Krebs-Henseleit modificada, associada com albumina bovina 6g%. Essa adição à solução foi desenvolvida para manter as funções renais sem alterações durante o experimento.

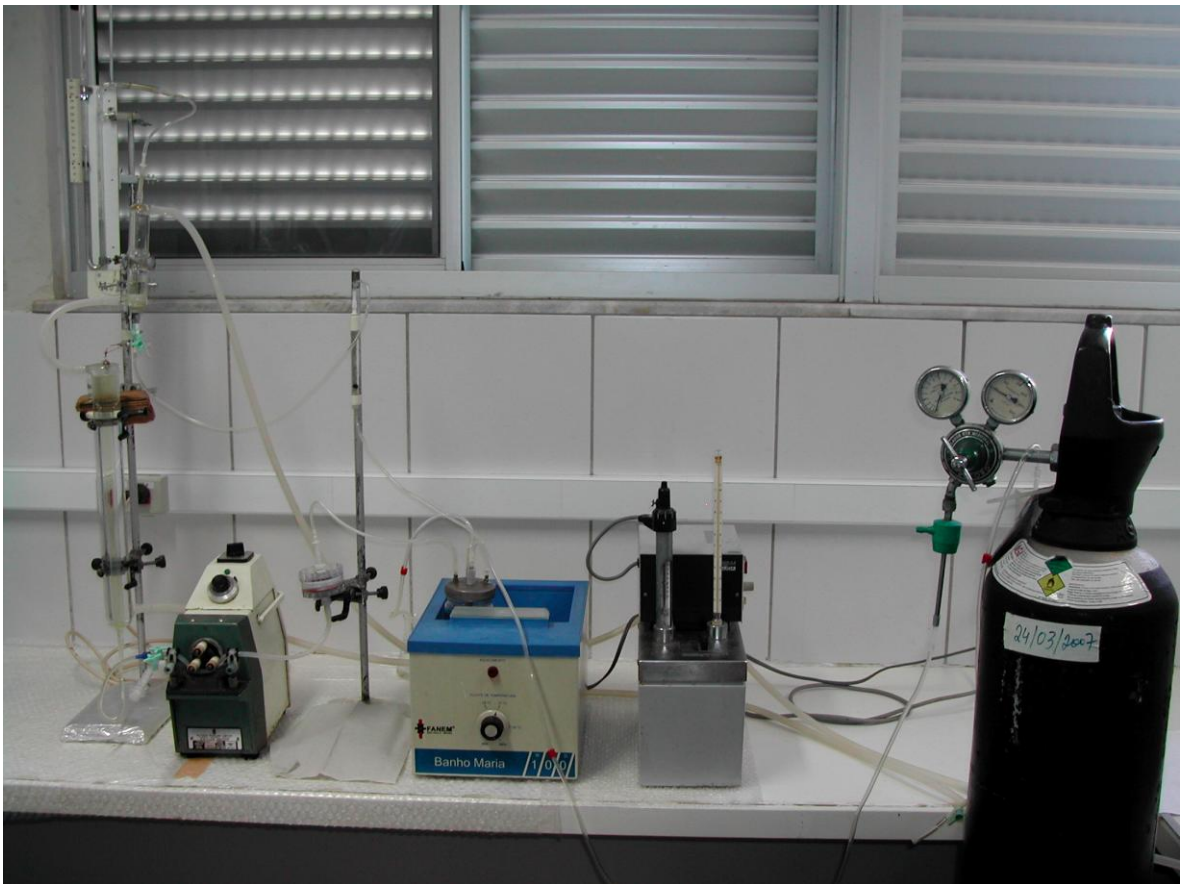
A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes, continha NaCl (138g), KCl (7,0g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3,2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,8g), e Uréia (10g). No tempo de 48 horas antes do experimento, separou-se 100mL desta solução e acrescentou-se NaHCO_3 (4,2g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,74g), glicose (2,0g), e penicilina G Potássica Cristalina (0,050g). Em seguida, o volume foi completado para 2.000mL com água bidestilada. Retirou-se 300mL desta última solução, na qual foi adicionada albumina bovina (6g%). Procedeu-se, em seguida, à diálise desta solução com albumina, auxiliada por um homogeneizador. Esta diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvato, citrato e lactato. (HANSON; BALLARD, 1968; SCHUREK *et al.*, 1970; COHEN *et al.*, 1977; ROSS, 1978; STOLTE *et al.*, 1979). Os 1.700mL restantes foram usados como solução para a diálise, a qual trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, foram acrescentadas 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3-7,4.

4.1.5 SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. Existem atualmente dois sistemas de perfusão de rim isolado. O sistema aberto, no qual o perfusato não recircula através rim possuindo como principal vantagem a manutenção constante de parâmetros funcionais. No outro tipo conhecido, o sistema fechado, o perfusato recircula no rim e apresenta inúmeras vantagens sobre o primeiro, como a utilização de albumina e outras substâncias na solução perfusora em pequenas quantidades. Além disso, as substâncias dialisadas se mantêm constantes na solução e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dialisador (FONTELES *et al.*, 1983; MONTEIRO, 1990).

O sistema fechado, utilizado nos experimentos, emprega uma quantidade de 100 mL de solução de Krebs-Henseleit modificada, com dois subsistemas, um “*in situ*” e outro com circuito fechado para perfusão “*in vitro*,” ambos mantidos a uma temperatura de 37°C (Figura 09).

FIGURA 09 – Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.

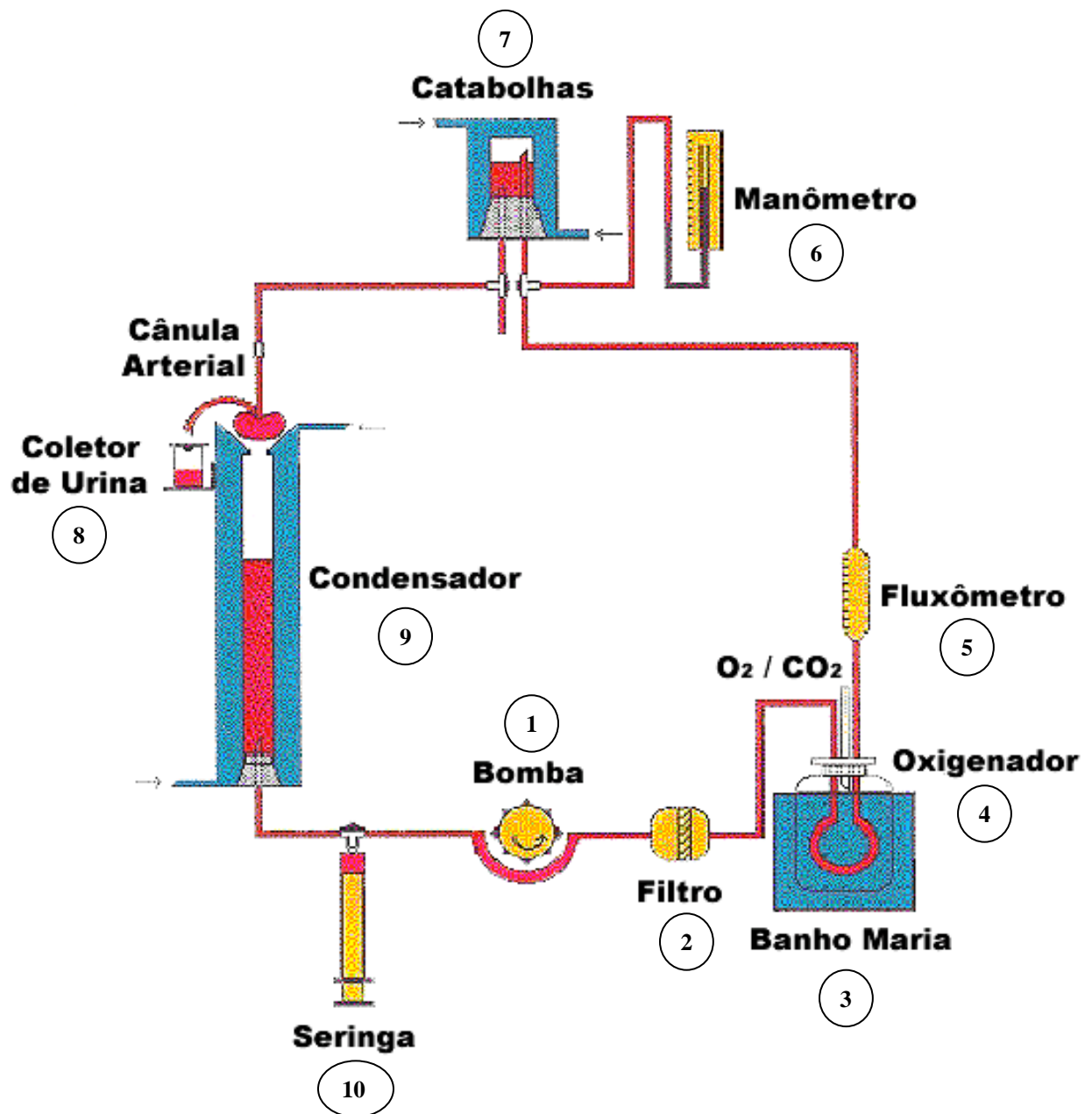


Fonte: LAFAVET - UFC.

4.1.5.1 COMPONENTES DO SISTEMA DE PERFUSÃO (Figura 10)

1. Bomba de perfusão (Watson) - para manutenção do fluxo de perfusão renal. Bombeia a solução de perfusão no sistema, apresenta cinco velocidades;
2. Filtro (USA-Millipore-5 μ m) - promove uma melhor perfusão através da filtração constante da solução perfusora;
3. Banho Maria (Fanem-modelo 100) - aquece e mantém o pulmão conservando a temperatura constante entre 36 e 37°C;
4. Oxigenador (pulmão artificial) - onde acontecem as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂) sendo constituído de tubos silásticos;
5. Fluxômetro - permite a leitura do fluxo de perfusão durante o experimento;
6. Manômetro de mercúrio - permite fazer a leitura direta da pressão de perfusão;
7. Catabolhas - câmara que retém bolhas, evitando o embolismo gasoso do órgão;
8. Coletor de urina - frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocado em intervalos de 10 minutos;
9. Condensador - serve de reservatório de aquecimento da solução perfusora mantendo aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
10. Seringa graduada - para retirada de amostra de perfusato feita em intervalos de 10 minutos;
11. Bomba aquecedora com termostato - para manutenção de todo o sistema de perfusão a 37°C.

FIGURA 10 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.



Fonte: LAFAVET – UFC.

4.1.6 PREPARO DO SISTEMA

Antes de cada experimento o sistema foi lavado com detergente e água destilada aquecida e depois calibrado.

A calibração foi feita sempre com o sistema em funcionamento na presença de solução salina a 0,9%, aquecida entre as temperaturas de 36 - 37°C. A cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5), foi coletada a solução por 1 minuto em proveta milimetrada (fluxo na ponta da cânula) e anotada a medida do fluxômetro e da pressão de perfusão, através do manômetro de mercúrio ligado ao sistema. Para melhor adaptação do sistema às unidades da bomba, foram estabelecidos 3 minutos de intervalo entre cada coleta.

A calibração foi feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Para tanto, os resultados de calibração obtidos nos grupos tratados foram compilados em curvas, onde foi plotado a velocidade da bomba nos eixos das abscissas (X) contra a pressão de perfusão (PP em mmHg), o valor obtido no fluxômetro (fluxo urinário em L/min) e volume de salina coletado (volume urinário mL/min) no eixo das ordenadas (Y) (**Figuras 11, 12 e 13**).

FIGURA 11 – Valores registrados em manômetro de mercúrio (PP em mmHg) durante a calibração do sistema (n=6).

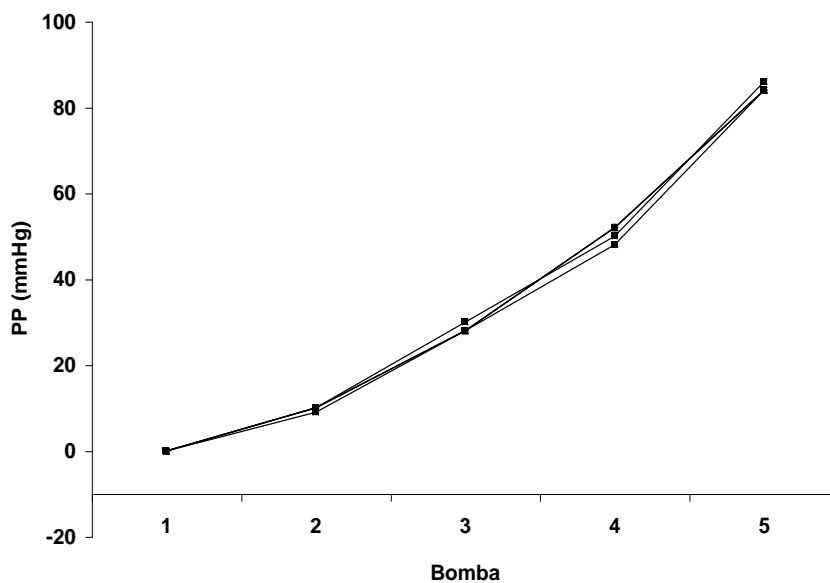


FIGURA 12 – Valores registrados pelo fluxômetro (fluxo em L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

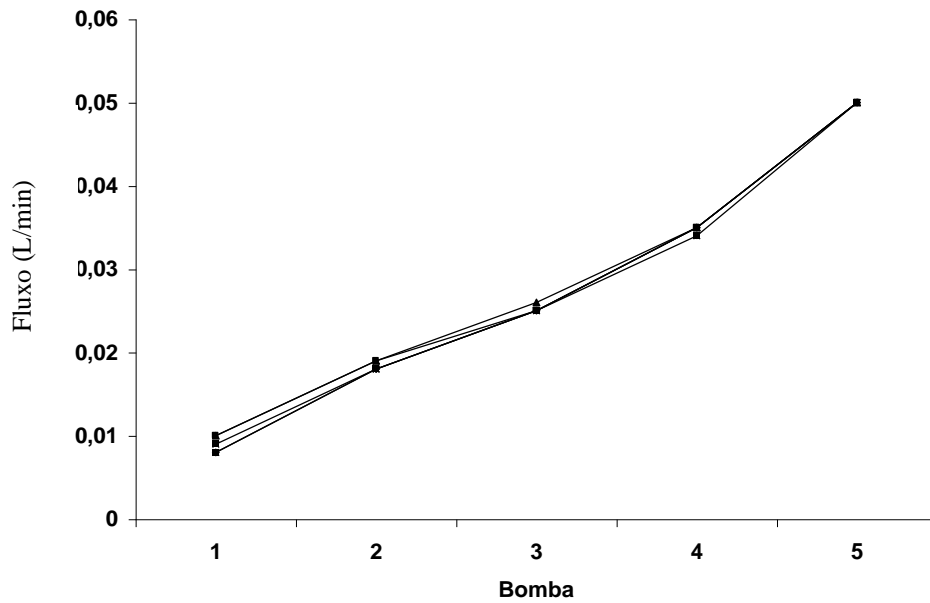
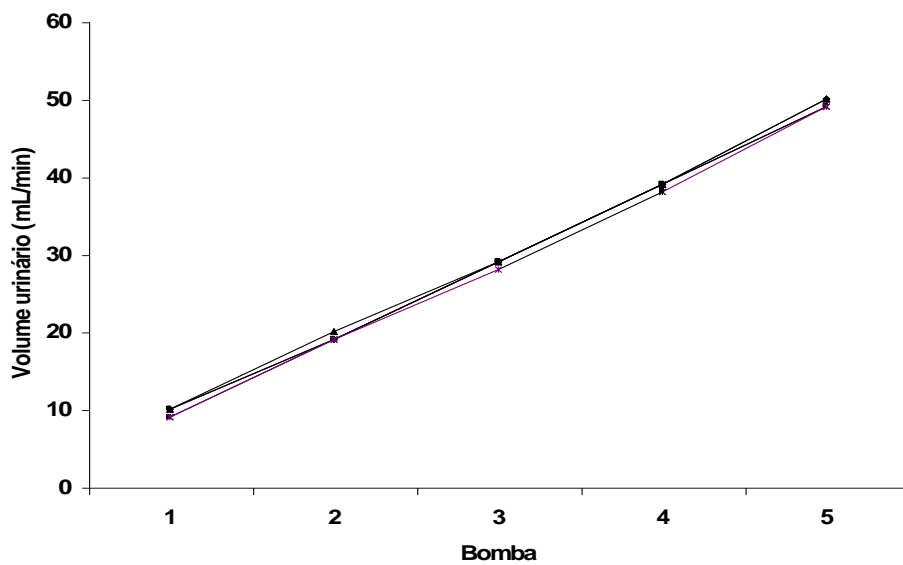


FIGURA 13 – Valores registrados pela ponta da cânula (volume de salina em mL/min) durante a calibração do sistema (n=6).



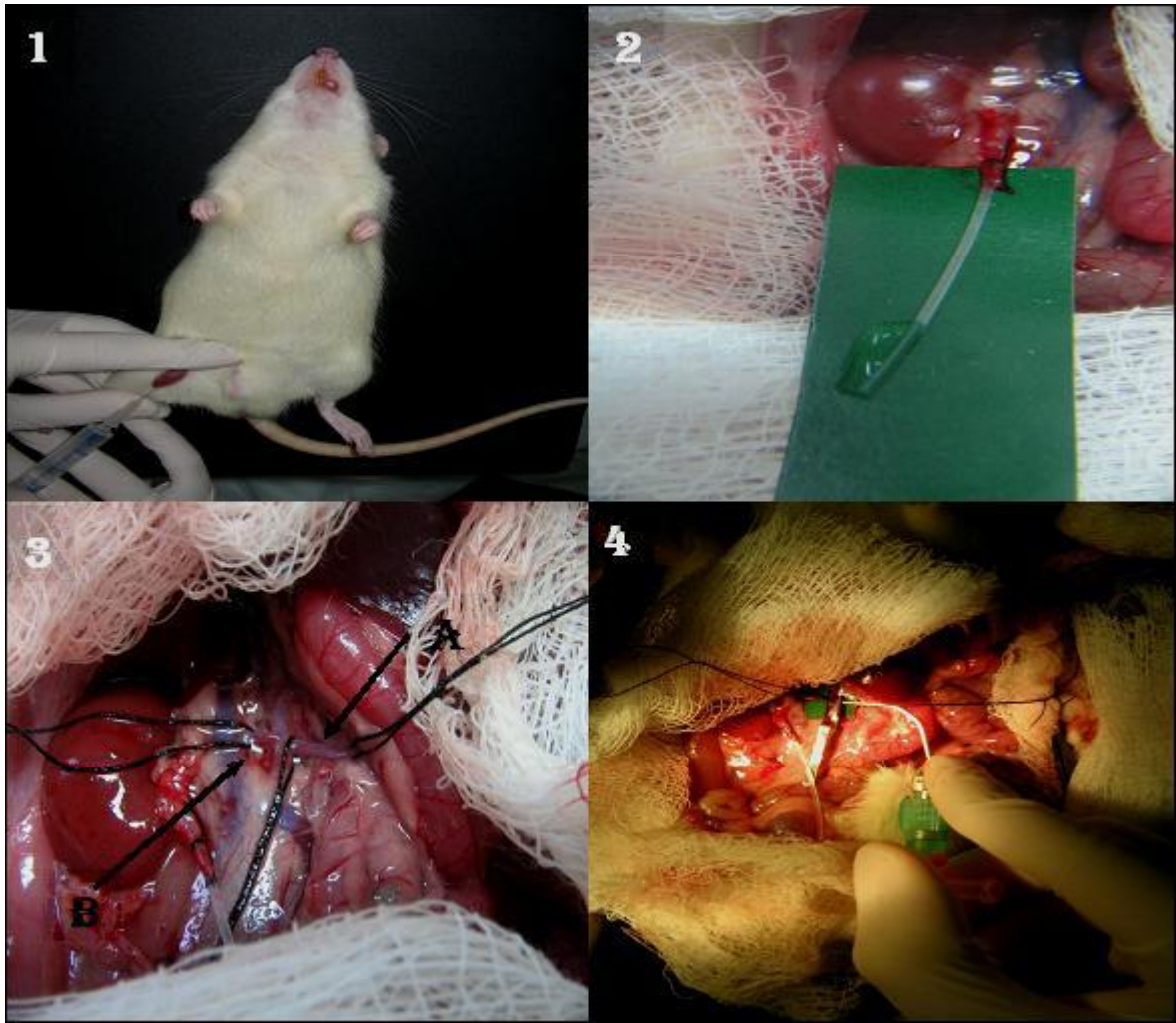
4.1.7 TÉCNICA CIRÚRGICA

Após a pesagem, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente a veia femoral esquerda foi isolada e 3mL de manitol a 20% foram administrados com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter facilitando sua canulação (**Figura 14 - 1**). Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Rebateram-se as vísceras abdominais para o lado esquerdo a fim de facilitar a visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.

Após este procedimento, com uma lupa (aumento de 7 vezes), o ureter direito foi identificado, isolado e dissecado do tecido conjuntivo e do tecido adiposo que o envolve, sendo em seguida canulado através de tubo de polietileno (PE50) para a coleta de urina (**Figura 14 - 2**). Com o intuito de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para com isso providenciar-se a descapsulação do rim. A artéria mesentérica superior e a artéria renal foram identificadas e dissecadas (**Figura 14 - 3**). A cânula arterial renal foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi feita a fixação da cânula (**Figura 14 - 4**).

Uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Logo a seguir, o órgão foi isolado e seccionado, promovendo a retirada do rim e ureter, devidamente liberados. Com o rim já acoplado ao sistema, esperou-se um período de aproximadamente 30 minutos para sua adaptação ao sistema *in vitro*, sem interrupção do fluxo (**Figura 15**).

FIGURA 14 – Fotografias da técnica cirúrgica. **1=** Administração de manitol a 20% (3 mL) pela veia femoral no animal anestesiado.; **2=** Canulação do ureter; **3=** Visualização das artérias mesentérica superior (A) e renal (B); **4=** Canulação da artéria renal através da artéria mesentérica.



Fonte: LAFAVET – UFC.

FIGURA 15 – Fotografia do rim isolado de rato no sistema de perfusão.



Fonte: LFAVET-UFC.

4.1.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o rim ter sido colocado no sistema, os 20 minutos iniciais foram considerados de estabilização e adaptação às novas condições. Após esse período, marcou-se o tempo zero e determinou-se 30 minutos de controle interno. O tempo total de perfusão do órgão foi sempre de 120 minutos. Durante esse período, foram registradas a cada 5 minutos as medidas da pressão de perfusão e do fluxo de perfusão em nanômetro e fluxômetro, respectivamente. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, foram coletadas amostras de urina e perfusato as quais foram mantidas em temperatura de -20°C para posteriores dosagens de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal. Sempre aos 30 minutos, foram adicionadas as frações Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* ($5\mu\text{g/mL}$).

O mesmo procedimento foi realizado com o grupo tratado apenas com o veneno total ($10\mu\text{g/mL}$) de *Bothropoides erythromelas*, o qual foi utilizado para comparação com os grupos tratados com as frações PLA₂ Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) do veneno.

Com o rim direito montado no sistema, o rim esquerdo foi coletado para controle, o qual foi pesado e dele retirado um fragmento para posterior exame histopatológico. Após o fim do experimento, foi realizado o mesmo procedimento com o rim direito.

4.1.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Biomedicina (IBIMED) da Universidade Federal do Ceará. Em amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio e potássio pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443 IL). As dosagens de cloreto foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi determinada por hidrólise direta descrita por Fonteles e Leibach (1982), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras foi medida com um osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR).

4.1.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As lâminas usadas em nosso estudo histológico foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse e avaliadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo professor Dalgimar Beserra de Menezes.

Após cada experimento, foi retirado um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e do não perfundido (esquerdo), os quais foram acondicionados em frascos com formol 10%. Para proceder a análise histológica, estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5µm. Procedeu-se a coloração do material por hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon).

Também foi realizado o estudo histológico dos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada para servir de controle perfundido.

Fotomicrografias foram realizadas para documentar os aspectos morfológicos celulares dos grupos estudados com câmera digital (FUJIFILM® S3300).

4.1.11 CÁLCULO DOS PARÂMETROS RENAIIS

As seguintes fórmulas foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980; FONTELES *et al.*, 1993).

- **FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo Urinário**

FU = Peso do volume urinário/ Peso do rim esquerdo x 10

- **PP (mmHg) = Pressão de perfusão**

* Obtida diretamente através da análise em manômetro de mercúrio

- **FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal**

* Fluxo registrado a cada 10min/ intervalo de tempo x Peso do rim

- **RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal**

RVR = PP (mmHg) / FPR

- **RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular**

RFG = DOU in/ DOP in x FU

* onde DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato

- **FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio filtrado**

FNa⁺ = RFG x PNa⁺ * onde PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato

- **ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Excreção de sódio**

ENa⁺ = FU x UNa⁺ * onde UNa⁺ = Concentração de sódio na urina

- **TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio transportado**

TNa⁺ = FNa⁺ - ENa⁺

- **%TNa⁺ = Percentual de transporte tubular de sódio**

%TNa⁺ = TNa⁺ x 100/FNa⁺

- **%pTNa⁺ = Percentual de transporte proximal de sódio**

%pTNa⁺ = pTNa⁺ x 100 / FNa⁺

- **FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio filtrado**

FK⁺ = RFG x PK⁺ * onde PK⁺ = Concentração de potássio no perfusato

- **EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Excreção de potássio**

EK⁺ = FU x UK⁺ * onde UK⁺ = Concentração de potássio na urina

- **TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio transportado**

TK⁺ = FK⁺ - EK⁺

- **%TK⁺ = Percentual de transporte tubular de potássio**

$$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$$

- **%pTK⁺ = Percentual de transporte proximal de potássio**

$$\%pTK^+ = pTK^+ \times 100 / FK^+$$

- **FCI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto filtrado**

$$FCI^- = RFG \times PCI^- \quad * \text{ onde } PCI^- = \text{Concentração de cloreto no perfusato}$$

- **ECI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Excreção de cloreto**

$$ECI^- = FU \times UCI^- \quad * \text{ onde } UCI^- = \text{Concentração de cloreto na urina}$$

- **TCI⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto transportado**

$$TCI^- = FCI^- - ECI^-$$

- **%TCI⁻ = Percentual de transporte tubular de cloreto**

$$\%TCI^- = TCI^- \times 100 / FCI^-$$

- **%pTCI⁻ = Percentual de transporte proximal de cloreto**

$$\%pTCI^- = pTCI^- \times 100 / FCI^-$$

- **C_{osm} (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico**

$$C_{osm} = (U_{osm} / P_{osm}) \times FU$$

* onde U_{osm} = Osmolaridade Urinária e P_{osm} = Osmolaridade do perfusato

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais realizados no presente estudo seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), atualmente Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), respeitando a legislação vigente, e sob autorização da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética sob o número 17/2010 no dia 07 de abril de 2010 (ver **Declaração em anexo - página 196**).

4.3 CÉLULAS MDCK – MADIN-DARBY CANINE KIDNEY

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

4.3.1 LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular utilizada foi células renais epiteliais tubulares de cão (Células MDCK – Madin-Darby Canine Kidney) obtidas do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

4.3.2 CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS MDCK

As células foram cultivadas em garrafas de plástico (75m², volume de 250mL), em meio RPMI 1640 (o qual contém insulina, hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, transferrina, prostaglandinas e L-glutamina) acrescido de penicilina (100U/mL) /estreptomicina (100µg/mL) e 10% v/v de Soro Bovino Fetal (SBF). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂, sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio óptico invertido (Olympus[®] CKX41[®]). Antes de cada experimento, as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24 horas para a obtenção de células na fase G₀ do ciclo celular.

Para cada experimento, foi removido o meio da cultura e as células foram incubadas com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C/5 minutos. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF a 10%. A suspensão foi então centrifugada a 200g/5 minutos (CHAIM, 2005). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura. As células foram então quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (1 x 10⁵ células/mL) permitindo o crescimento confluyente por 24 horas.

As células foram então avaliadas na presença de diferentes concentrações do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL), solubilizados em PBS estéril, pH 7,4. Durante o experimento, as placas foram avaliadas qualitativamente com 24 horas de cultivo, usando o microscópio óptico (40x). Após esse período, também foram realizados ensaios de viabilidade e proliferação celular (**Figura 16**).

4.3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.3.3.1 ENSAIO COM MTT

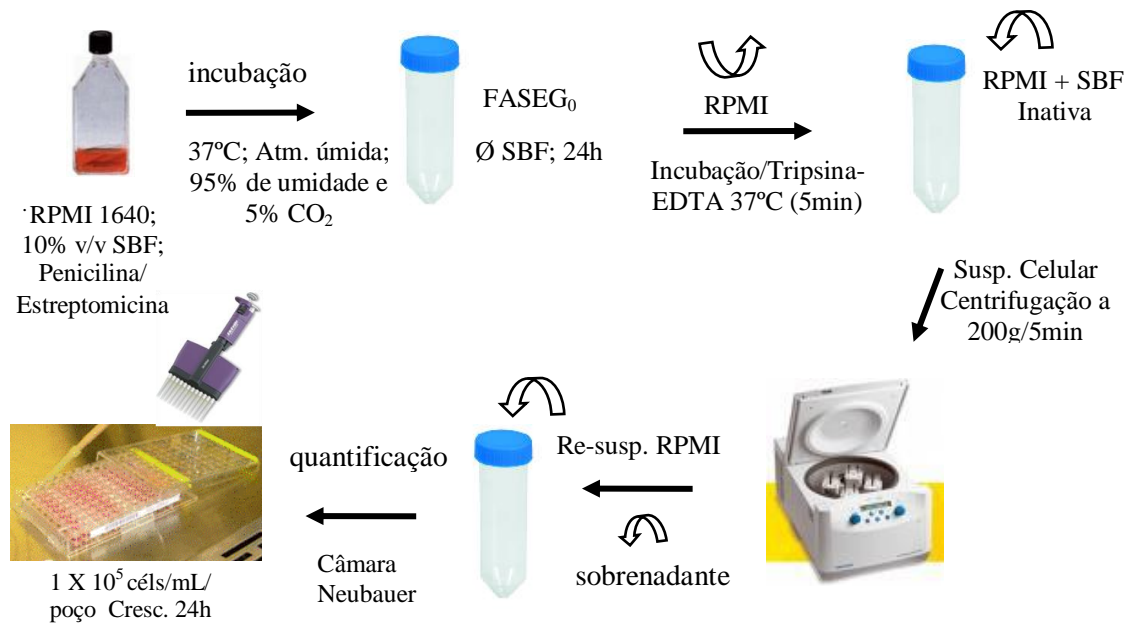
As células MDCK foram adicionadas em placas de 96 poços com densidade de 1×10^5 células/mL e tratadas com diferentes concentrações do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* por 24 horas. Após o período de incubação, foi retirado 100µL do sobrenadante e então adicionado 10µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) (Sigma) 2,5mg/mL dissolvido em PBS estéril.

Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis que são capazes de reduzir o MTT e formar um produto colorido insolúvel em água, o sal formazan. Após incubação por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e então adicionado 90µL de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram incubadas por 17 horas e, em seguida, realizadas as leituras em espectrofotômetro a 570nm (MOSMANN, 1983). Os ensaios foram realizados em triplicata (n=5). A viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais de viabilidade celular dos grupos teste e do grupo controle (**Figura 17**).

Fotomicrografias foram realizadas para documentar os aspectos morfológicos celulares dos grupos estudados através do microscópio Olympus[®] CKX41[®] com câmera digital acoplada (Evolt E330[®] Olympus[®]).

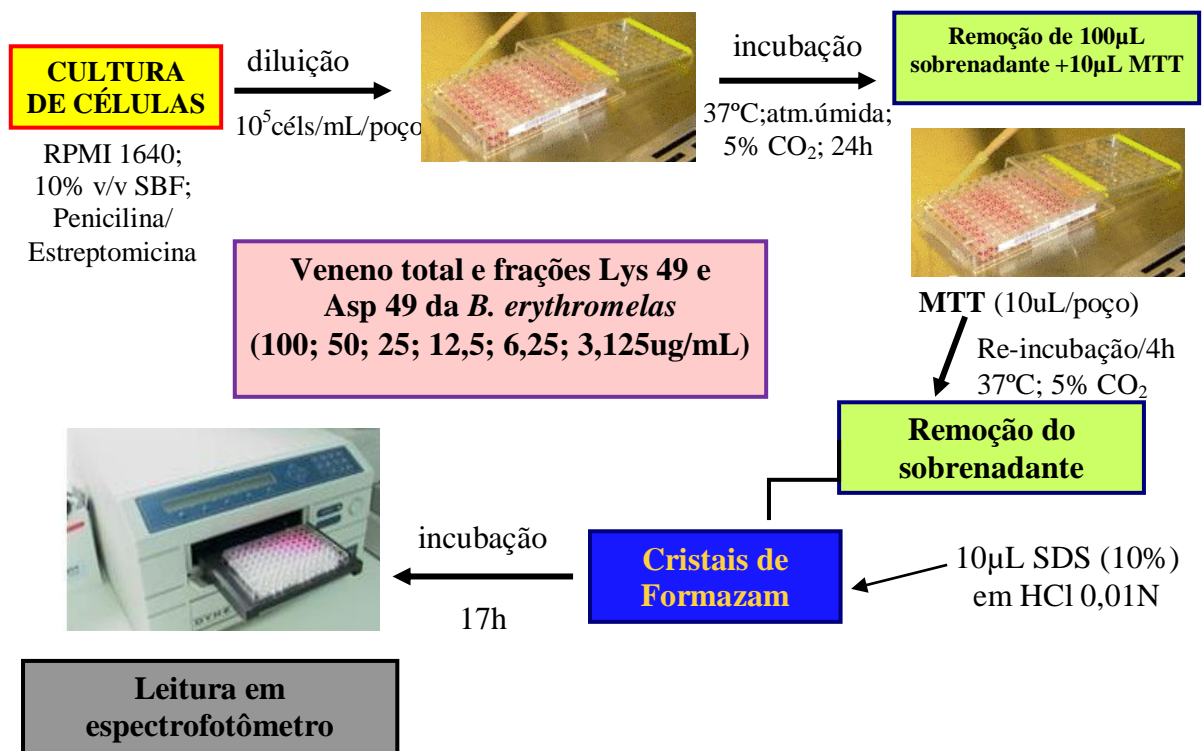
A partir dos resultados obtidos, foram também calculados os valores de IC₅₀, que é definida como a concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células em estudo. Esse valor foi determinado através de um teste de regressão não linear utilizando o programa Graphpad Prism 5[®].

FIGURA 16 – Esquema simplificado do cultivo e tratamento das células MDCK.



Fonte: PRACIANO, 2009.

FIGURA 17 – Esquema simplificado dos ensaios de viabilidade e proliferação celular.



Fonte: PRACIANO, 2009.

4.3.3.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE

A viabilidade celular foi igualmente determinada através do teste de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Realizou-se a dosagem da enzima nos grupos nos quais se observou efeito citotóxico após tratamento com células MDCK. Para essa determinação utilizou-se o sobrenadante resultante da etapa de adição do MTT. Este teste baseia-se na redução de piruvato a lactato, com consequente oxidação do NADH.



Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular fornece indicação sobre a integridade da membrana plasmática e é possível inferir o tipo de morte celular, quando ocorre. Foi utilizado um método de determinação cinética segundo as especificações contidas no kit do fabricante (Wiener Lab). Adicionou-se 1mL do reagente a 20 μ L do sobrenadante e realizou-se as leituras das absorbâncias (inicial e final) a 37°C com tempo de reação de 3 minutos e 30 segundos.

Os resultados foram obtidos através de leitura em espectrofotômetro (340nm). O decréscimo da absorbância foi proporcional à atividade da enzima. A atividade da LDH foi determinada a partir da fórmula abaixo:

$\text{Atividade LDH (U/L)} = \frac{(\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final})}{\text{Tempo (minutos)}} \times F$
--

Onde :

F é o fator do reagente informado pelo fabricante (8095)

Tempo (minutos): 3,5

4.4 INVESTIGAÇÃO DE MEDIADORES MOLECULARES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Genoma da Universidade Federal do Ceará.

Analisou-se a expressão dos genes pró-apotóticos (Caspase-3, Caspase-8 e *Bax*) e antiapoptóticos (*Mcl-1* e *Bcl-X_L*).

As sequências dos RNA mensageiros dos genes pró-apotóticos e antiapoptóticos foram obtidas no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para o desenho dos *primers* foi utilizado o Oligo Perfect™ Designer disponível no sítio eletrônico <http://www.invitrogen.com>.

Células MDCK tratadas com veneno total de *Bothropoides erythromelas* foram submetidas à análise da expressão gênica a fim de verificar a participação de mediadores moleculares responsáveis pelas alterações renais. Para tanto, utilizou-se as técnicas descritas a seguir.

Não foi realizada avaliação da expressão de genes pró e antiapoptóticos utilizando as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas*.

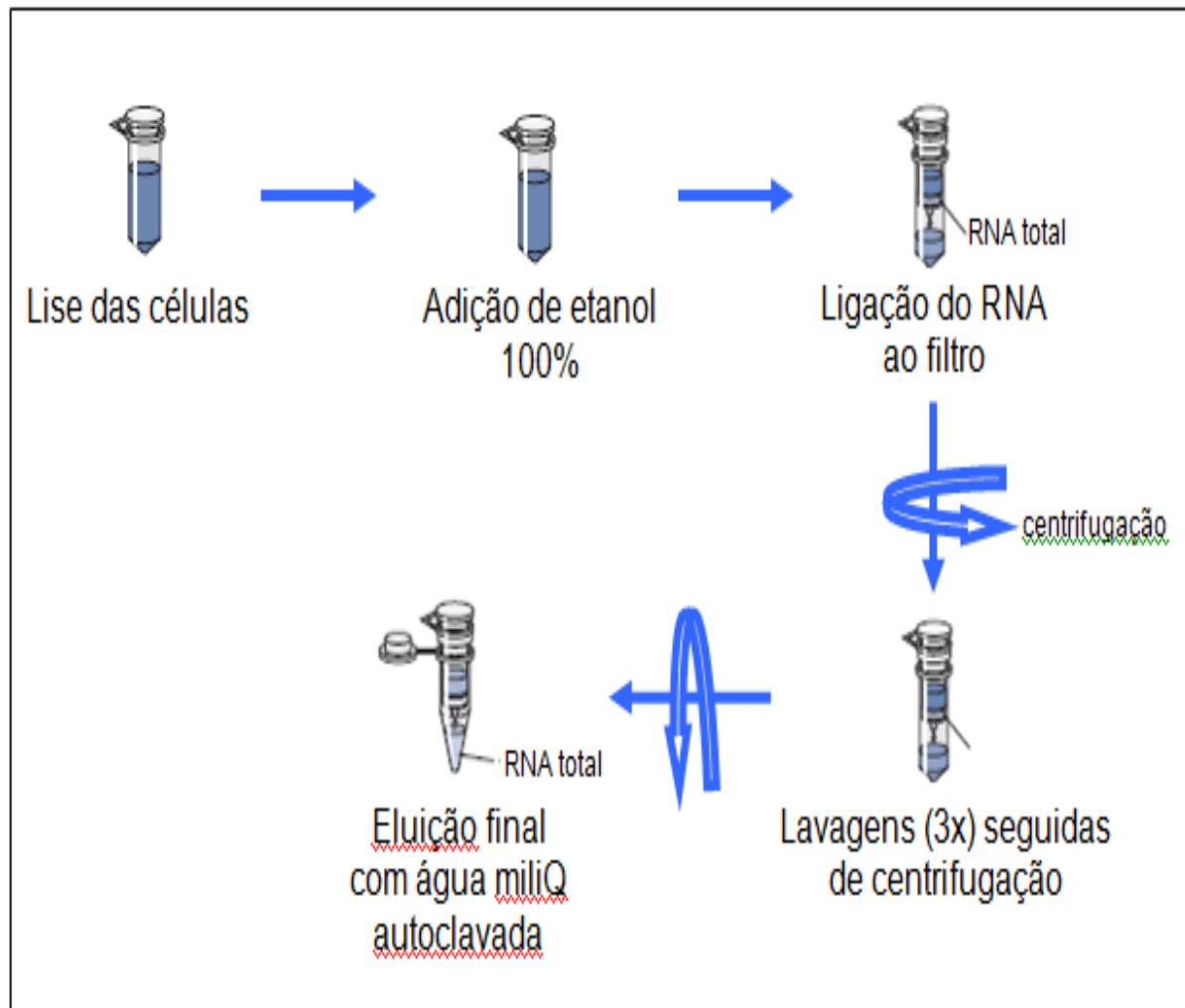
4.4.1 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para os ensaios de avaliação da expressão gênica, as células MDCK foram cultivadas em placas de cultivo de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL. Após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, adicionou-se em cada poço o veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* nas concentrações de 46,65 e 23,32µg/mL (respectivamente 1/2 e 1/4 da IC₅₀ do veneno total) em hexaplicata (n=6) e incubaram-se as células novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Como controle positivo foi utilizado Doxorubicina na concentração 3,12µg/mL. Decorridas 24 horas, as células foram retiradas dos poços por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) e centrifugadas. Para cada concentração das substâncias-testes foram obtidos seis precipitados, os quais foram misturados para obter-se apenas uma amostra de cada concentração. O experimento teve sequência com os procedimentos de isolamento de RNA total utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen) e automação pelo equipamento QiaCube. Foram realizados três experimentos independentes.

4.4.2 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL

Para o isolamento do RNA total, adicionou-se ao precipitado de células o volume de 350 μ L do tampão de lise contendo β -mercaptoetanol. As células foram lisadas quando submetidas ao êmbolo de agulha hipodérmica (13 x 4,5cm). A solução com o lisado foi colocado em um microtubo de 2,0mL, o qual foi aplicado ao equipamento QiaCube (Qiagen). A partir de então todo o isolamento foi realizado automaticamente, seguindo o protocolo descrito pelo kit e já programado ao equipamento. A **Figura 18** demonstra as etapas realizadas automaticamente pelo equipamento QiaCube (Qiagen).

FIGURA 18 – Esquema gráfico do isolamento de RNA total.



Fonte: DANTAS, 2010.

4.4.3 SÍNTESE DE cDNA PELA REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA

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

Uma quantidade de 1µg de RNA total extraído foi adicionado a um tubo eppendorf (0,2µL) contendo 1µL de primer oligo(dT)₂₀ (50µM), 1µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (dNTPmix, 10mM) e água miliQ foi adicionada para completar um volume de 10µL (master mix 1). Essa primeira mistura (reação A) foi aquecida a 65°C para a desnaturação do RNA e anelamento do primer oligo(dT)₂₀ com a cauda polyA do RNA mensageiro por 5 minutos. Durante o aquecimento foi preparado o master mix 2 contendo 2 µL de tampão de síntese de cDNA (10X), 4µL de MgCl₂ (25mM), 2µL de ditioneitol (DTT - 0,1M), 1µL de uma solução RNaseOUT (40U/µL) e 1µL da enzima SuperScript™ III RT (200 unidades/µL) (reação B). Imediatamente após este período, a reação foi resfriada em gelo por pelo menos 1 minuto e, a esta solução, foi adicionada a reação A. O tubo contendo as duas misturas (20µL) foi levado a um termociclador onde permaneceu inicialmente por 50 minutos a uma temperatura de 50°C. Passado este período, a reação foi aquecida a uma temperatura de 85°C por 5 minutos e então resfriada imediatamente a uma temperatura de 4°C. Finalizando o processo, o cDNA sintetizado foi acrescido de 1µL de RNase H e incubado por 20 minutos a 37°C. O cDNA sintetizado foi mantido em freezer -20°C até a realização de sua amplificação pela técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) em Tempo Real (qPCR).

4.4.4 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (qPCR)

Analisou-se a expressão dos genes pró-apoptóticos (Caspase-3, Caspase-8 e *Bax*) e antiapoptóticos (*Mcl-1* e *Bcl-X_L*) utilizando o equipamento iQ5 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de PCR. Através dessa tecnologia é possível a

quantificação das amostras de cDNA na fase exponencial da cinética de amplificação, período no qual a PCR pode ser quantificada. Isto foi possível com a utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR Green, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores (**Quadro 03**) de DNA (*primers*) aqui utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos genes investigados, acima descritos, obtidas no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

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

Com o intuito de analisar a especificidade das amplificações, ou seja, saber se os produtos formados eram específicos para os genes testados, foi realizada, após cada reação, uma curva de fusão (Melting Curve) onde a temperatura da reação era acrescida em 1°C a cada 20 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento de cada iniciador e terminando a 95°C. Os dados obtidos pelo iQ5Optical System Software (Version 2.0) foram baseados no valor do ciclo limiar (C_T – Threshold cycle), ou ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 x maior que a fluorescência basal. A avaliação da expressão gênica foi obtida utilizando o método matemático descrito por Pfaffl (2001).

QUADRO 03 – Sequência dos iniciadores usados na reação de qPCR.

Genes	Sequência dos Iniciadores (5' - 3') senso (F) e antisenso (R)
<i>Bax</i>	F - CGAGCTGATCAGGACCATCA R - CACGTGGGTGTCCCAAAGTA
<i>Mcl-1</i>	F - AACAAACTGGGGCAGGATTG R - AAACCCATCCCAGCCTCTTT
<i>Bcl-X_L</i>	F - GGCCTTTTTCTCCTTCGGTG R - CTCTCGGCTGCTGCATTGTT
Caspase-3	F - TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG R - TTCTGACAGGCCATGTCATCCTCA
Caspase-8	F - ACAAGGGCATCATCTATGGCTCTGA R - CCAGTGAAGTAGAGGTCAGCTCAT

Fonte: NCBI.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os resultados dos experimentos de perfusão renal (n=6), células MDCK (n=5) e Biologia Molecular (n=6) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni (múltipla comparação entre os grupos) seguido do teste t Student, como comparativo entre os grupos controle e tratado, com significância de *p<0,05. Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo e os dados compilados em intervalos de 30 minutos. A IC₅₀ foi estimada por curva de interpolação como a concentração inibitória média capaz de provocar 50% de inibição celular. O software Graphpad Prism 5[®] foi utilizado para as análises estatísticas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS RENAIIS

5.1.1 GRUPO CONTROLE

Foram realizados seis experimentos controle para avaliação dos parâmetros funcionais renais sob a influência apenas da solução de Krebs-Henseleit modificada a 6g%, para posterior comparação com os grupos tratados com as frações PLA₂ Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*. O grupo apresentou todos os parâmetros estáveis durante os 120 minutos de experimento (**Gráficos 1.0 a 14.0**).

O mesmo procedimento foi realizado anteriormente com o grupo tratado com o veneno total (10µg/mL) de *Bothropoides erythromelas*. O grupo controle apresentou todos os parâmetros estáveis durante os 120 minutos de experimento (**Gráficos 1.1 a 14.1 - ver Anexos**).

O veneno total (10µg/mL) de *Bothropoides erythromelas* foi utilizado neste estudo para posterior comparação com os grupos tratados com as frações PLA₂ Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno.

5.1.2 EFEITOS DA FRAÇÃO LYS 49 DO VENENO DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

A infusão da fração PLA₂ Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) ocorreu aos 30 minutos após o início do experimento.

Comparada ao grupo controle, a fração Lys 49 apresentou um aumento significativo da pressão da perfusão (PP) aos 60 minutos permanecendo até do final experimento (**Gráfico 1.0**), da excreção de sódio (ENa⁺) (**Gráfico 11.0**) e de potássio (EK⁺) (**Gráfico 12.0**) aos 90 e 120 minutos, do fluxo urinário (FU) (**Gráfico 3.0**) e do *clearance* osmótico (C_{osm}) (capacidade de depuração do rim isolado em relação às moléculas osmoticamente ativas) (**Gráfico 14.0**), somente aos 120 minutos.

A fração Lys 49 causou uma diminuição significativa do ritmo de filtração glomerular (RFG) somente aos 60 minutos (**Gráfico 4.0**) e do percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) aos 120 minutos (**Gráfico 5.0**).

Não ocorreu alteração dos parâmetros resistência vascular renal (RVR) (**Gráfico 2.0**), percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) (**Gráfico 6.0**), percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) (**Gráfico 7.0**), percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) (**Gráfico 8.0**), percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) (**Gráfico 9.0**), percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) (**Gráfico 10.0**) e excreção de cloreto (ECI) (**Gráfico 13.0**), em relação ao grupo controle.

5.1.3 EFEITOS DA FRAÇÃO ASP 49 DO VENENO DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

A infusão da fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) ocorreu aos 30 minutos após o início do experimento.

Comparada ao grupo controle, a fração Asp 49 causou uma diminuição significativa do %pTK⁺ somente aos 60 minutos (**Gráfico 9.0**) e e um aumento da EK⁺ aos 60 minutos permanecendo até o final do experimento (**Gráfico 12.0**).

Em relação aos parâmetros renais analisados PP, RVR, FU, RFG, %TNa⁺, %TK⁺, %TCl⁻, %pTNa⁺, %pTCl⁻, ENa⁺, ECl⁻ e C_{osm} observou-se que a fração Asp 49 não provocou nenhuma alteração significativa quando comparada ao grupo controle (**Gráficos 1.0 a 8.0; 10.0 e 11.0; 13.0 e 14.0**).

5.1.4 EFEITOS DO VENENO TOTAL DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

Os resultados descritos abaixo foram estudados anteriormente e descritos na Dissertação de Mestrado intitulada Efeito renal do veneno da *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo Fator Antibotrópico do *Didelphis marsupialis* (SOUSA, 2004).

A infusão do veneno de *Bothropoides erythromelas* (10µg/mL) ocorreu aos 30 minutos após o início do experimento.

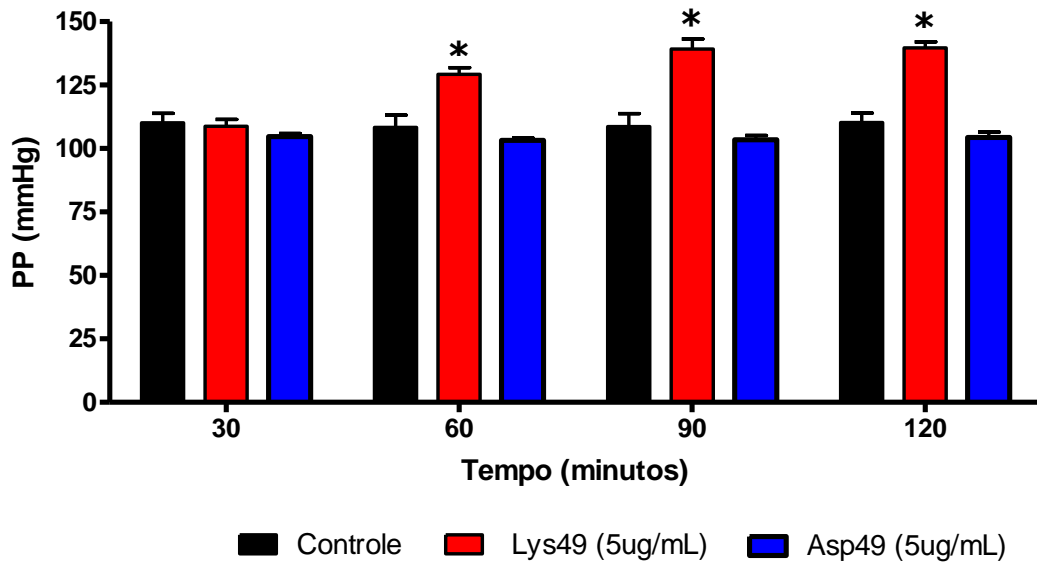
Comparado ao grupo controle, o veneno total apresentou uma diminuição significativa da PP, da RVR, do %TNa⁺, do %pTNa⁺, do %TCl⁻ e do %pTCl⁻ aos 60 minutos prosseguindo até os 120 minutos (**Gráficos 1.1, 2.1, 5.1, 6.1, 9.1 e 10.1 - ver Anexos páginas 198, 199, 200 e 201**).

Ocorreu uma diminuição significativa do %TK⁺ e do %pTK⁺ aos 90 minutos persistindo até o final do experimento (**Gráficos 7.1 e 8.1 - ver Anexos página 200**).

Observou-se uma diminuição significativa aos 60 minutos do RFG e da EK⁺ seguida por um aumento significativo aos 90 e 120 minutos, quando comparado ao grupo controle (**Gráficos 4.1 e 12.1 - ver Anexos páginas 199 e 201**).

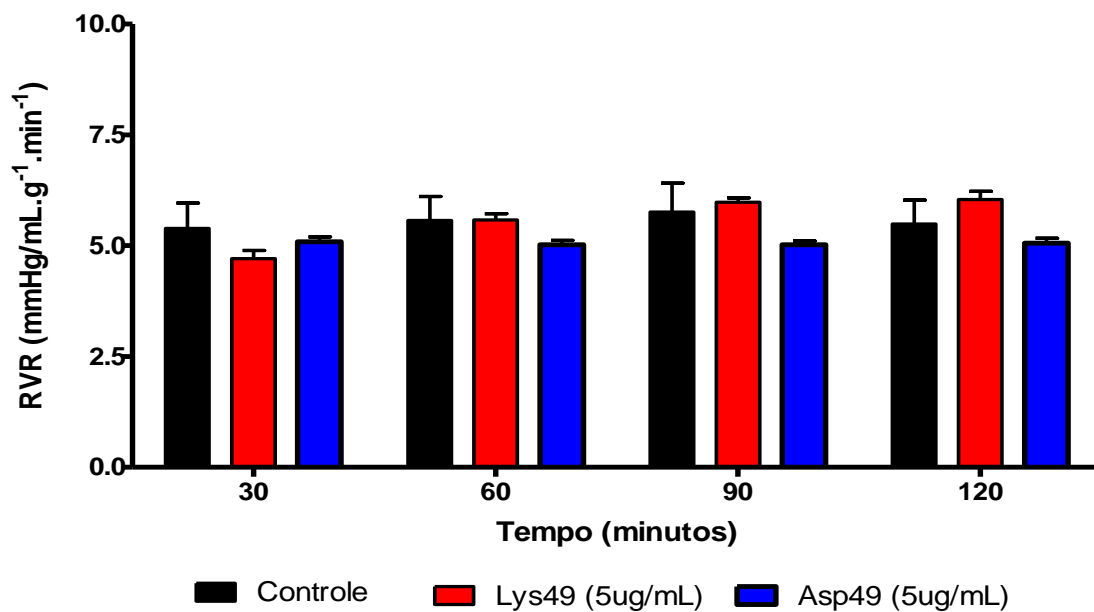
Comparado ao grupo controle, o veneno total ocasionou um aumento significativo do FU, da ENa⁺, da ECl⁻ e do C_{osm} aos 90 e 120 minutos (**Gráficos 3.1, 11.1, 13.1 e 14.1 - ver Anexos páginas 198, 201 e 202**).

GRÁFICO 1.0 - Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



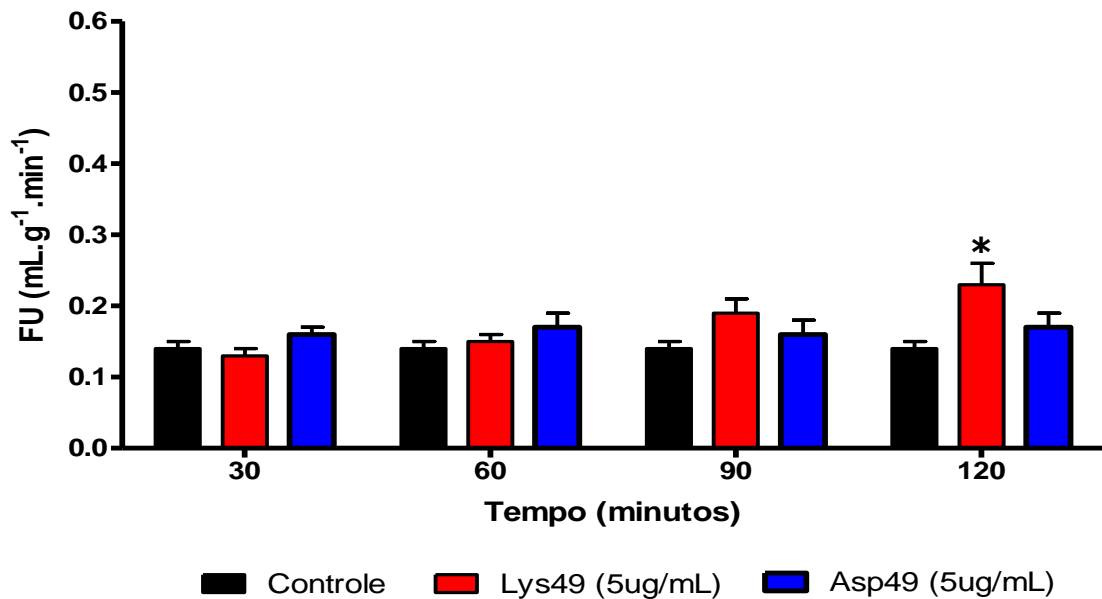
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 2.0 - Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



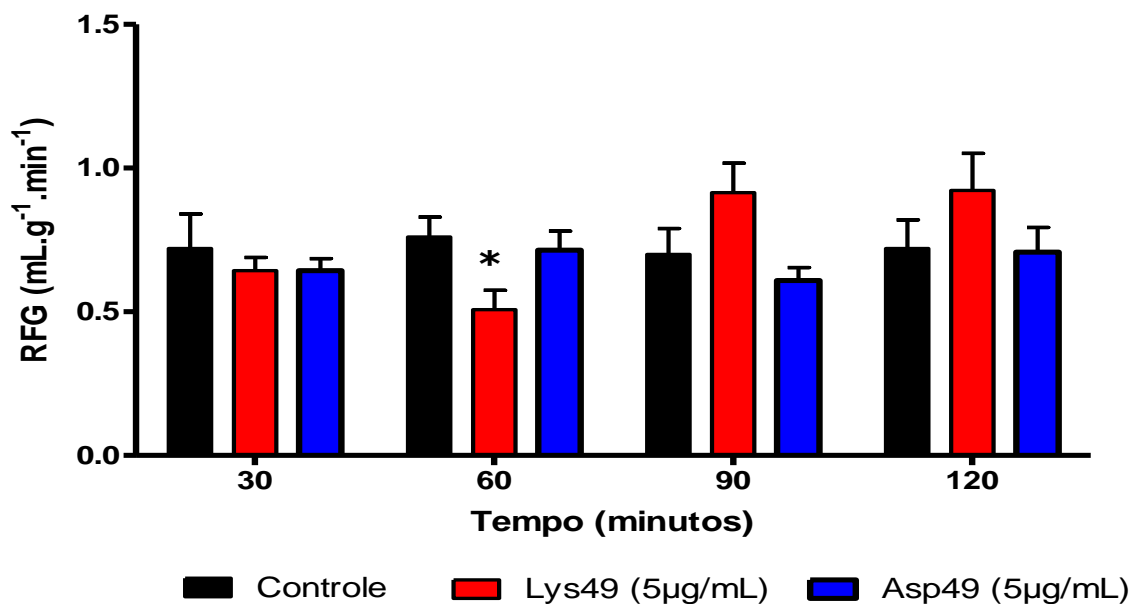
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 3.0 - Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5 μ g/mL) e Asp 49 (5 μ g/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



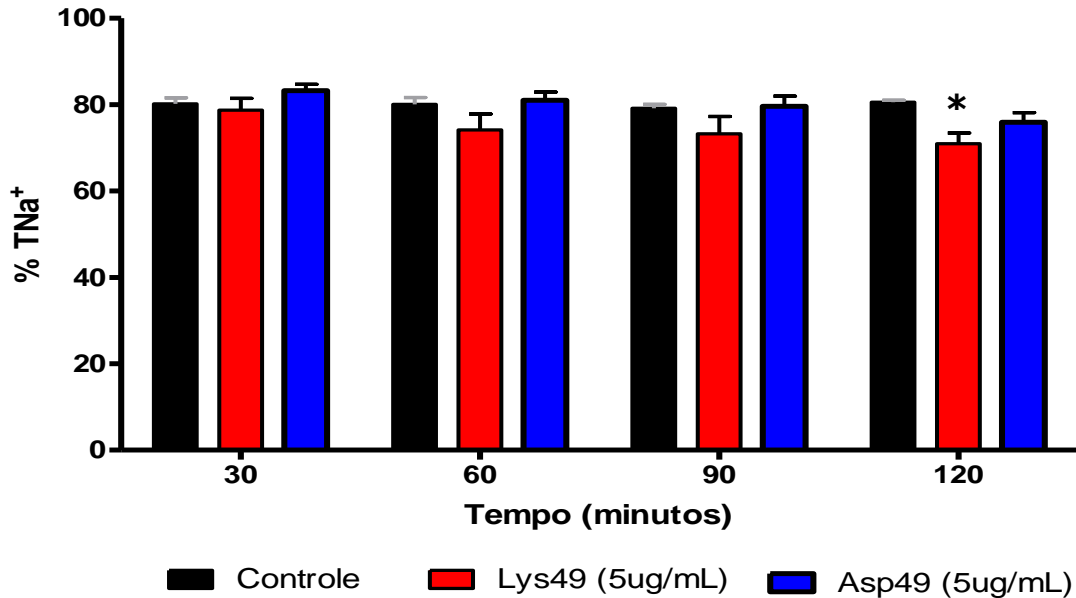
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 4.0 - Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5 μ g/mL) e Asp 49 (5 μ g/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



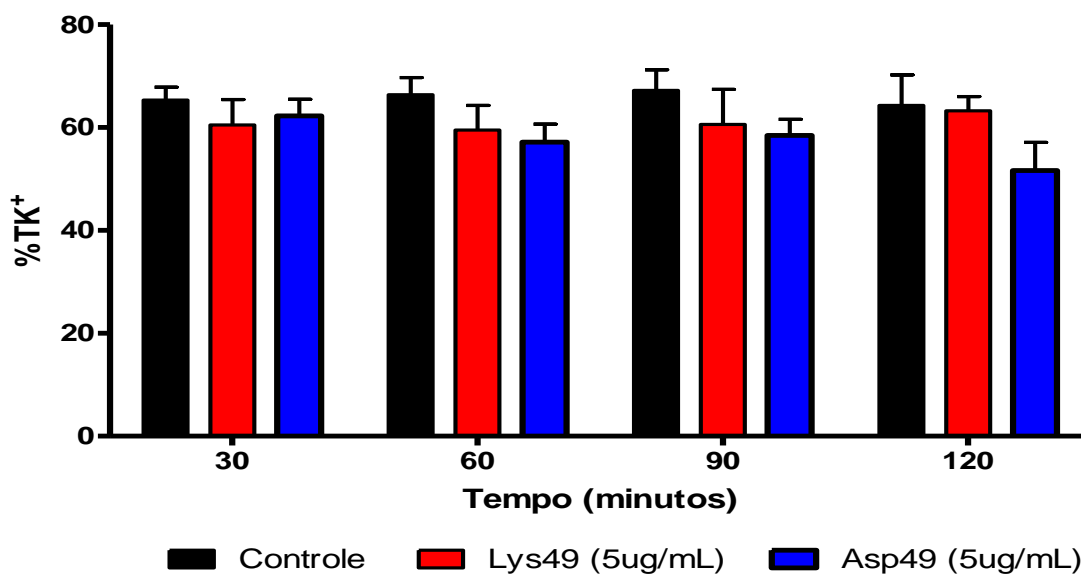
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 5.0 - Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



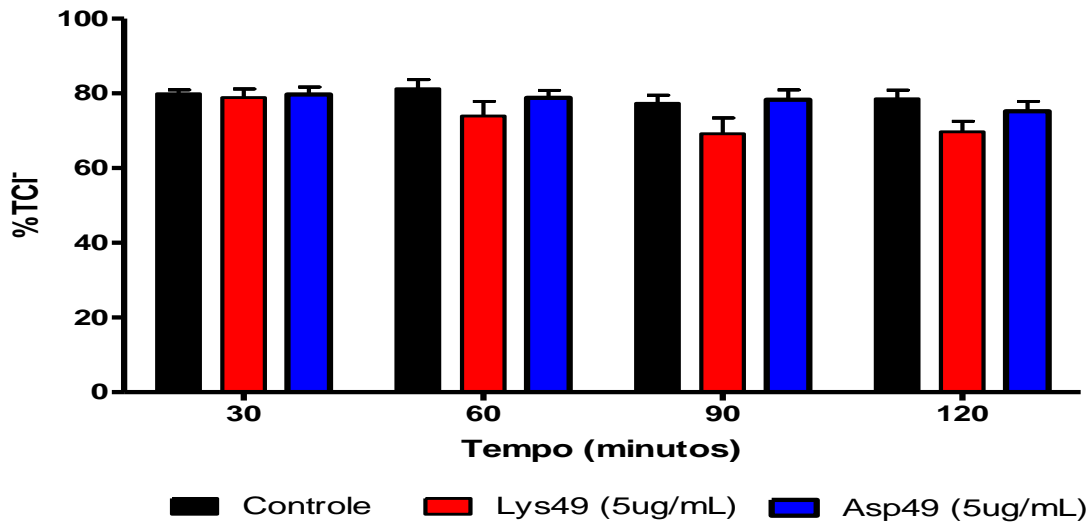
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 6.0 - Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



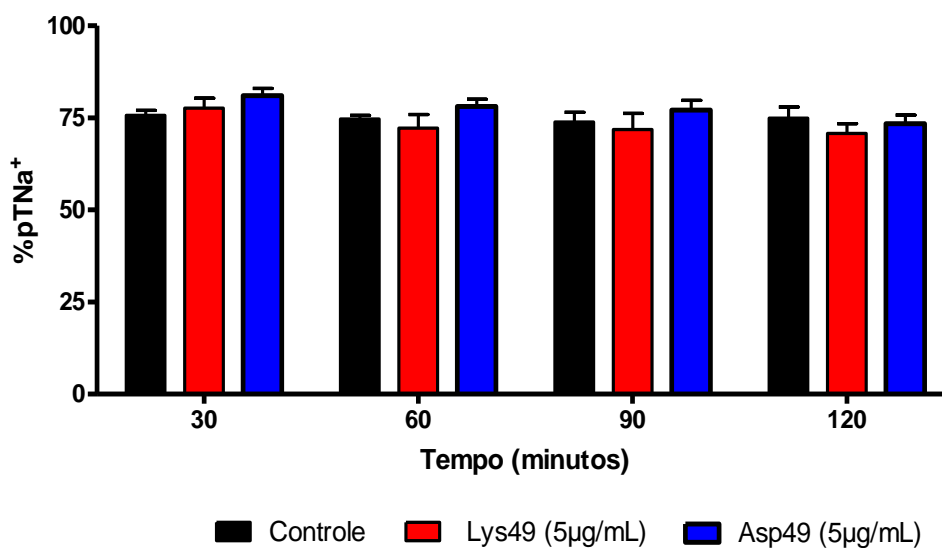
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 7.0 - Efeitos no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



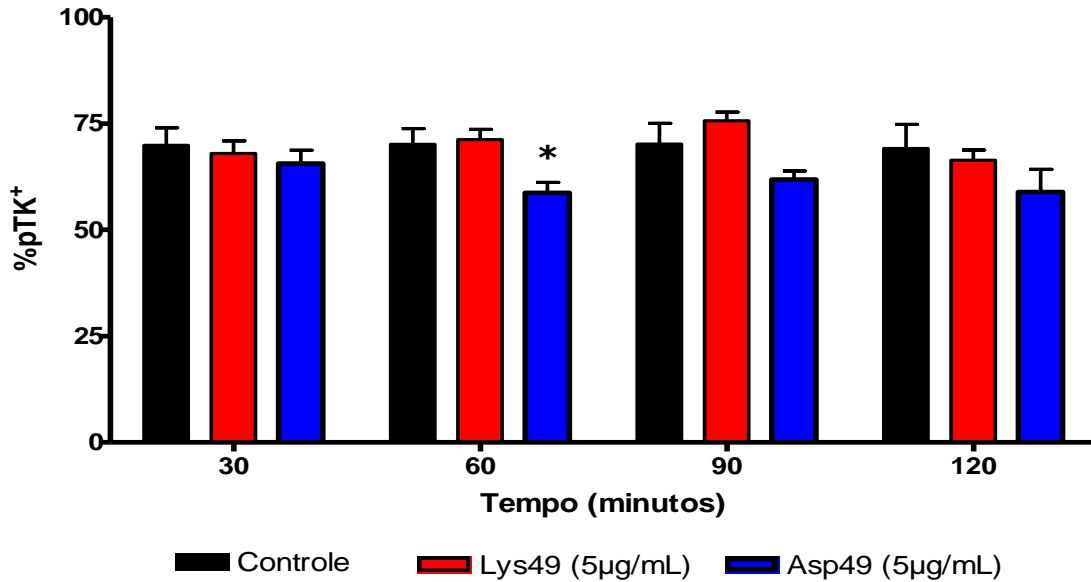
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 8.0 - Efeitos no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



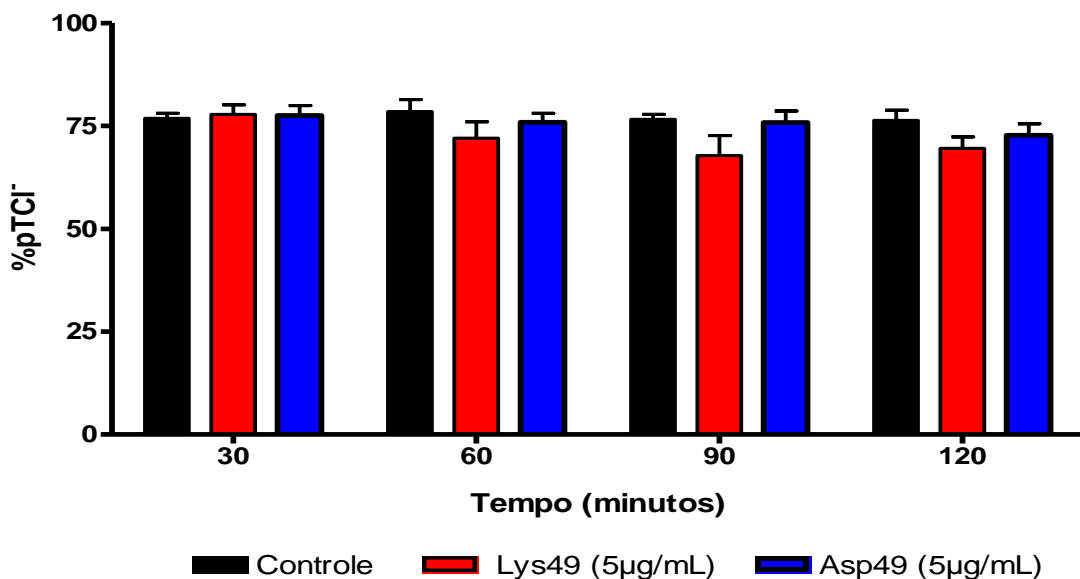
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 9.0 - Efeitos no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



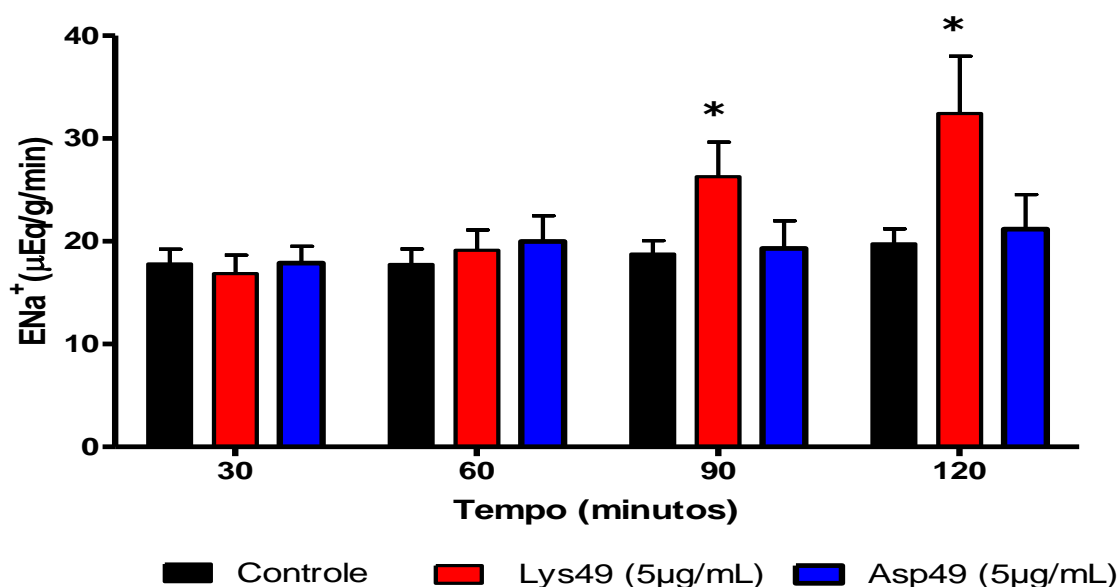
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 10.0 - Efeitos no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



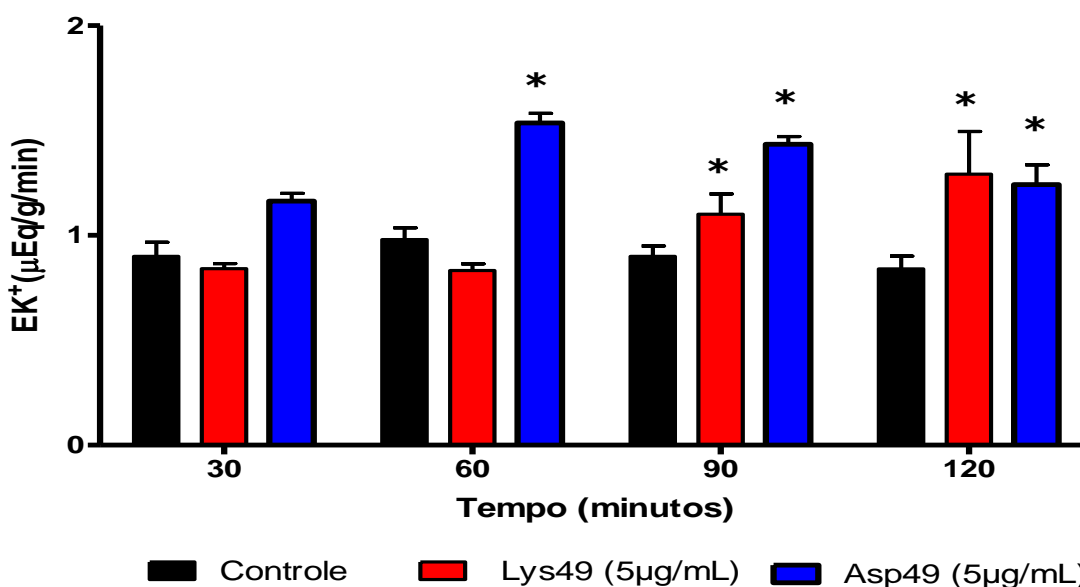
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 11.0 - Efeitos na excreção de sódio (ENa^+) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



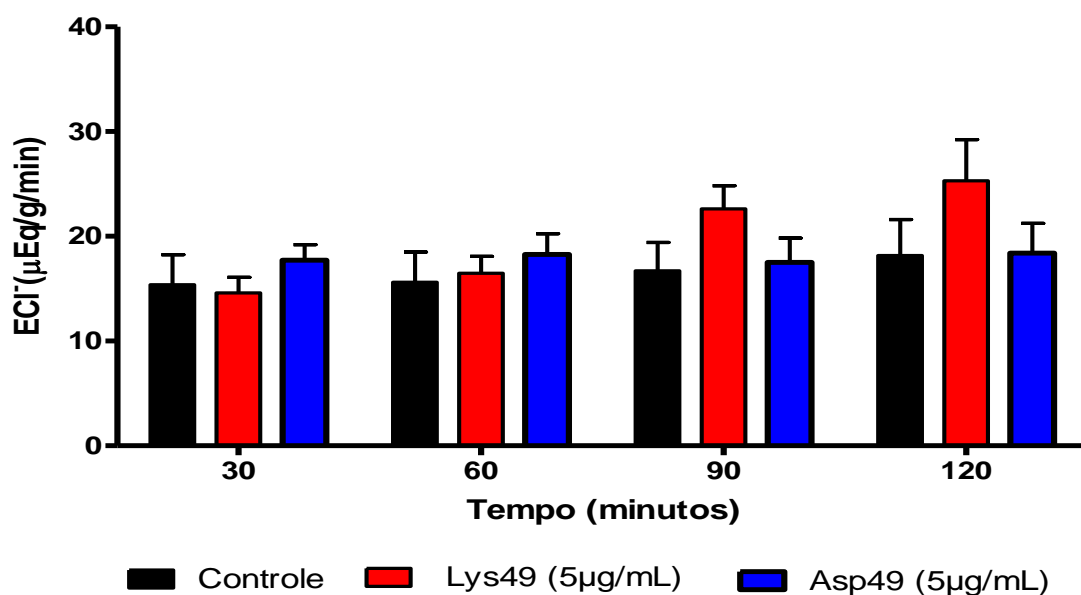
Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 12.0 - Efeitos na excreção de potássio (EK^+) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



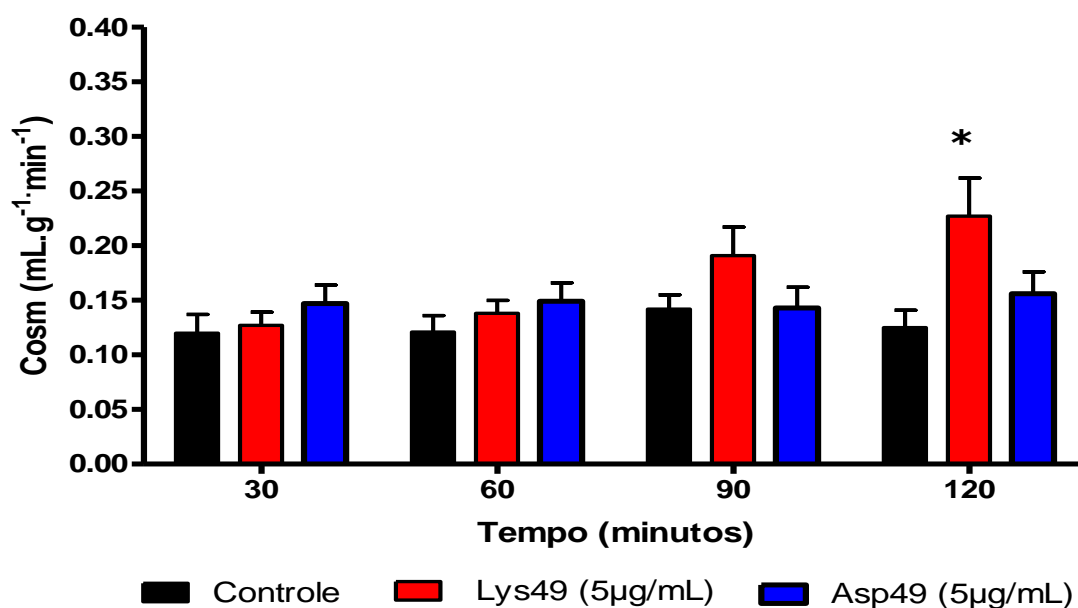
Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 13.0 - Efeitos na excreção de cloreto (ECI^-) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 14.0 - Efeitos no *clearance* osmótico (C_{osm}) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) do veneno de *Bothropoides erythromelas*.



Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

QUADRO 04 – Avaliação dos parâmetros renais utilizando as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 e o veneno total de *Bothropoides erythromelas*.

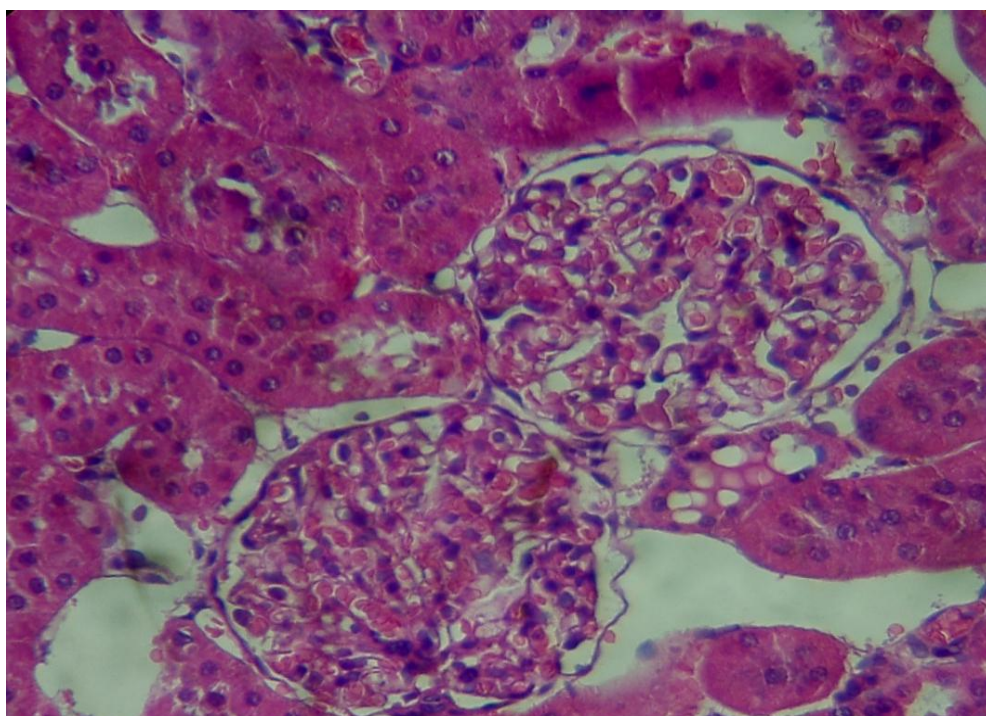
<i>B. erythromelas</i>	Lys 49				Asp 49				Veneno total			
	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
TEMPO												
PARÂMETROS												
PP (mmHg)	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
RVR (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑
RFG (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	↑	↑
%TNa ⁺	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
%TK ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓
%TCl ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
%pTNa ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
%pTK ⁺	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	↓	↓
%pTCl ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
ENa ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑
EK ⁺ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	-	↓	↑	↑
ECl ⁻ (μEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑
C _{osm} (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑

PP = Pressão de perfusão renal; RVR = resistência vascular renal; FU = fluxo urinário; RFG = ritmo de filtração glomerular; %TNa⁺ = percentual de transporte tubular de sódio; %TK⁺ = percentual de transporte tubular de potássio; %TCl⁻ = percentual de transporte tubular de cloreto; %pTNa⁺ = percentual de transporte proximal de sódio; %pTK⁺ = percentual de transporte proximal de potássio; %pTCl⁻ = percentual de transporte proximal de cloreto; ENa⁺ = excreção de sódio; EK⁺ = excreção de potássio; ECl⁻ = excreção de cloreto; C_{osm} = clearance osmótico.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os rins esquerdos serviram como grupo controle não apresentando qualquer alteração em glomérulos, túbulos, vasos e interstício (**Figura 19**).

FIGURA 19 – Fotomicrografia do rim esquerdo (controle) demonstrando glomérulos e túbulos normais.

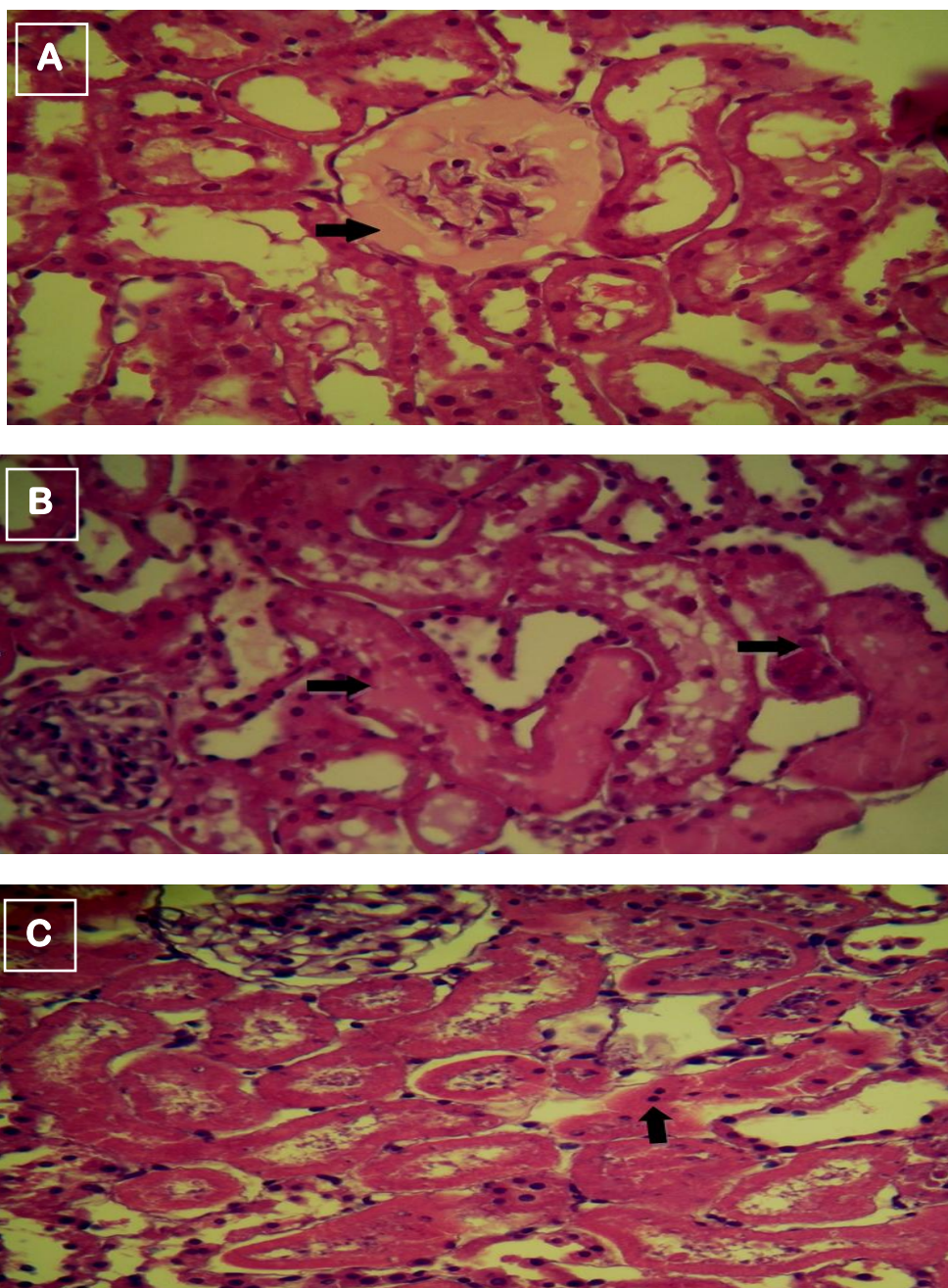


Fonte: Câmera digital FUJIFILM® S3300.
Coloração hematoxilina-eosina (HE) – Aumento 400x.

No grupo em que os rins foram perfundidos com a fração PLA₂ Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) foi observada a presença de vacúolos nos glomérulos e depósito de material protéico nos glomérulos e túbulos quando comparado ao controle. Observou-se também a presença de células tubulares com núcleos picnóticos indicativas de morte celular (apoptose/necrose) (**Figura 20**).

Não foi encontrada qualquer anormalidade em vasos e interstício.

FIGURA 20 – Fotomicrografia do rim perfundido com a fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* na concentração de 5µg/mL. **A:** Glomérulos (depósito de material protéico nos espaços urinários); **B:** Túbulos (depósito de material protéico em células tubulares); **C:** Túbulos (células tubulares com núcleos picnóticos indicando morte celular apoptose/necrose).

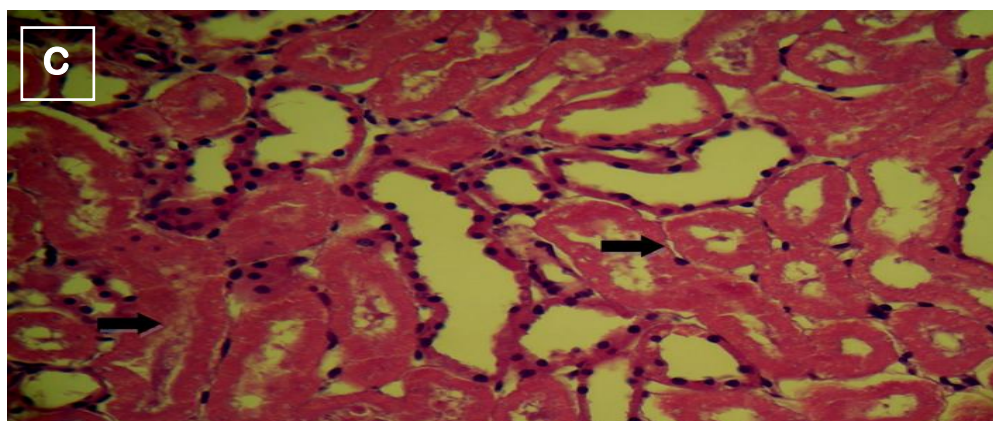
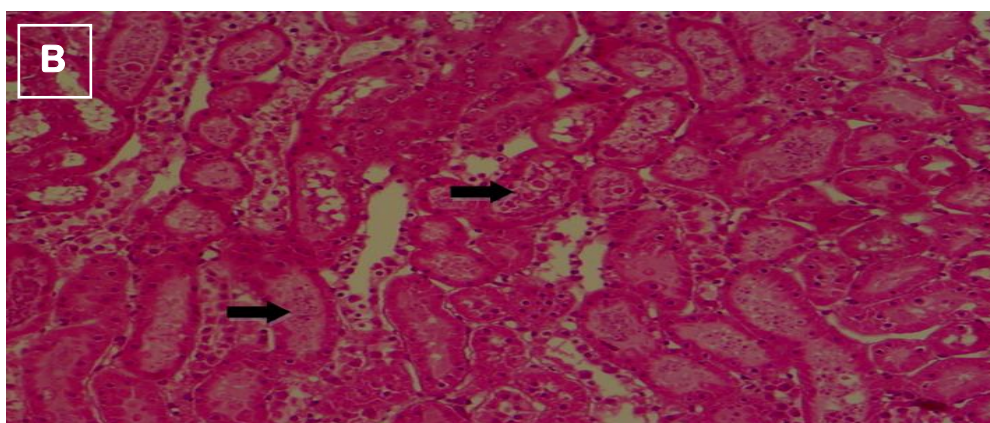
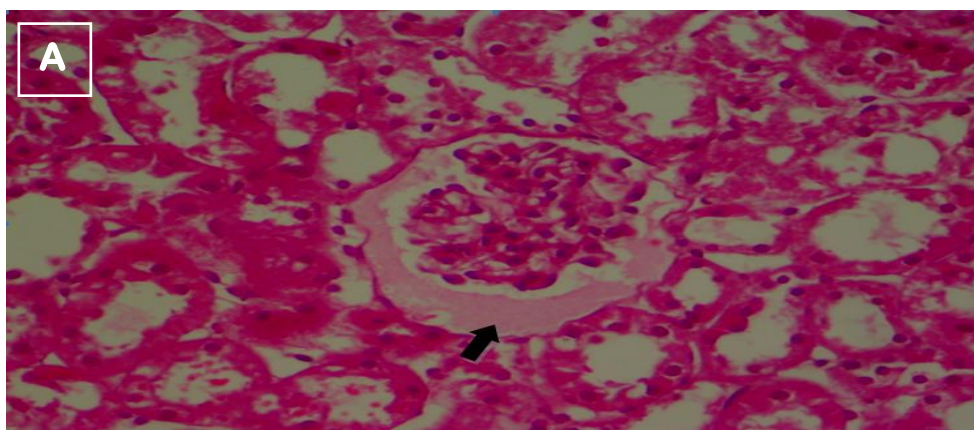


Fonte: Câmera digital FUJIFILM® S3300.
Coloração hematoxilina-eosina (HE) – Aumento 400x.

Nos rins perfundidos com 5µg/mL da fração PLA₂ Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* foi observado depósito de material protéico nos glomérulos e túbulos quando comparado ao controle. Observou-se também a presença de células tubulares anucleadas indicativas de morte celular (apoptose/necrose) (**Figura 21**).

Não foi encontrada qualquer anormalidade em vasos e interstício.

FIGURA 21 – Fotomicrografia do rim perfundido com a fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* na concentração de 5µg/mL. **A:** Glomérulos (depósito de material protéico nos espaços urinários); **B:** Túbulos (depósito de material protéico em células tubulares); **C:** Túbulos (células tubulares anucleadas indicando morte celular apoptose/necrose).

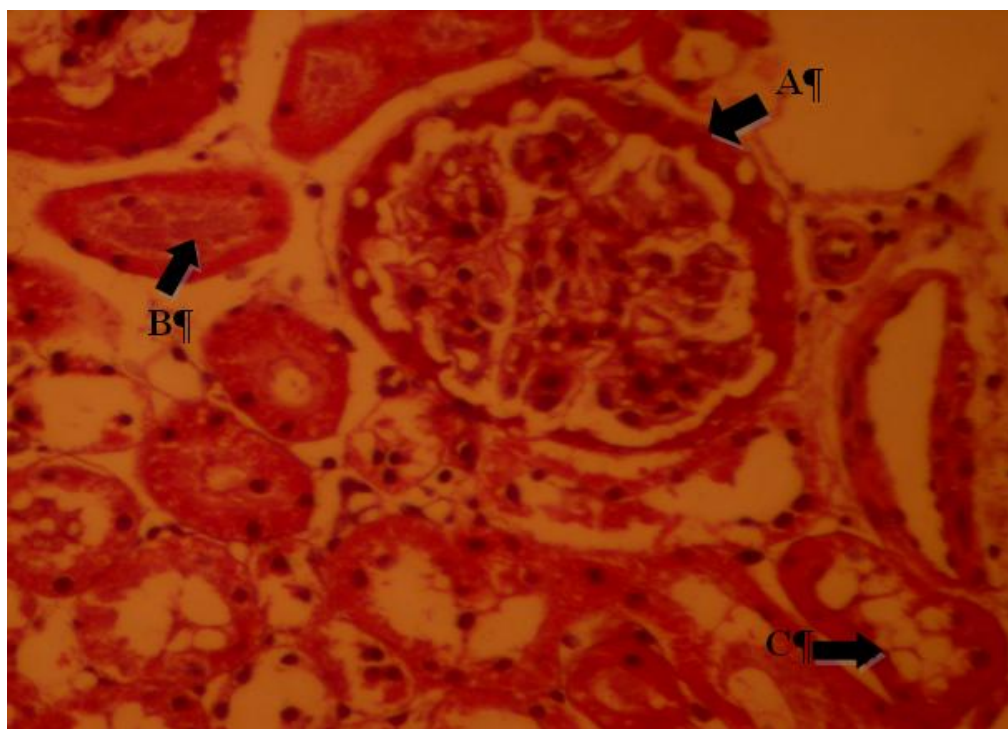


Fonte: Câmera digital FUJIFILM® S3300.
Coloração hematoxilina-eosina (HE) – Aumento 400x.

No grupo em que os rins foram perfundidos com 10 μ g/mL do veneno total de *Bothropoides erythromelas* foi observado depósito de material protéico nos glomérulos e túbulos quando comparado ao controle. Observou-se também a presença de degeneração hidrópico vacuolar nos túbulos renais (**Figura 22**).

Não foi encontrada qualquer anormalidade em vasos e interstício.

FIGURA 22 – Fotomicrografia do rim perfundido com o veneno total de *Bothropoides erythromelas* na concentração de 10 μ g/mL. **A**: Glomérulos (depósito de material protéico nos espaços urinários); **B**: Túbulos (depósito de material protéico em células tubulares); **C**: Túbulos (células tubulares com degeneração hidrópico vacuolar).



Fonte: SOUSA, 2004.
Coloração hematoxilina-eosina (HE) – Aumento 200x.

5.3 CÉLULAS MDCK – MADIN-DARBY CANINE KIDNEY

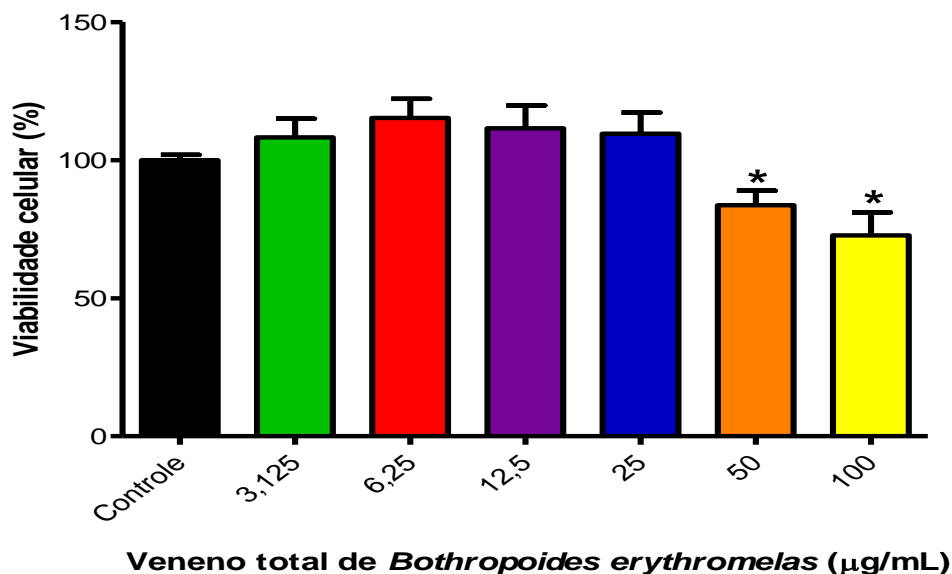
5.3.1 EFEITOS DO VENENO TOTAL E DAS FRAÇÕES LYS 49 E ASP 49 DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS* EM CÉLULAS MDCK

O efeito do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* em células tubulares renais foi avaliado através da cultura de células MDCK. A viabilidade das culturas ($1,0 \times 10^5$ céls/mL) tratadas com veneno total e frações (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL) foi analisada pelo método MTT após 24 horas de incubação (n=5).

A citotoxicidade foi estimada, por curva de interpolação, com a concentração do veneno total e frações capazes de inibir o crescimento de 50% das células em estudo (IC₅₀), correlacionando à média do percentual de células mortas com a concentração do veneno e frações examinadas por análise de regressão não linear utilizando o programa Graphpad Prism 5[®].

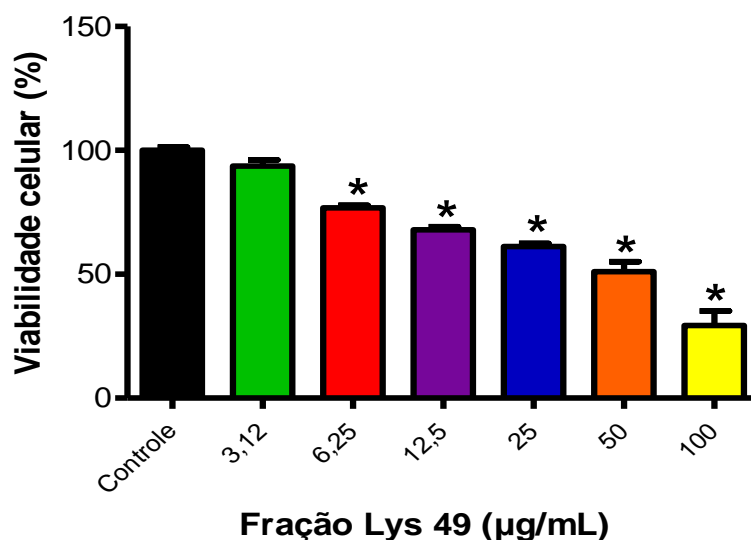
Os resultados demonstraram um efeito citotóxico do veneno total e das frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49. Observou-se diminuição significativa da viabilidade celular com o veneno total nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (IC₅₀ = 93,31 µg/mL) (**Gráfico 15**), com a fração Lys 49 nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL (IC₅₀ = 38,29 µg/mL) (**Gráfico 16**) e com a fração Asp 49 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (IC₅₀ = 158 µg/mL) (**Gráfico 17**).

GRÁFICO 15 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).



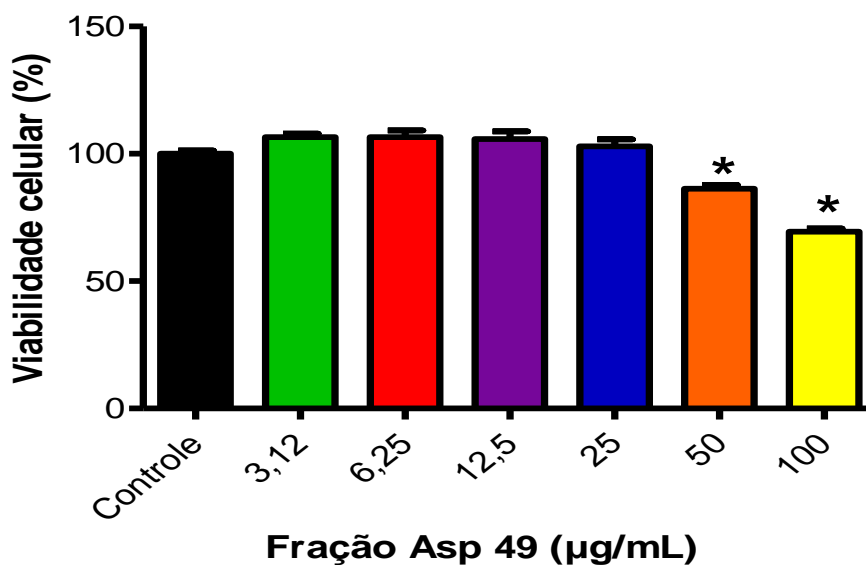
Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 16 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 17 – Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL).



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH) PELAS CÉLULAS MDCK

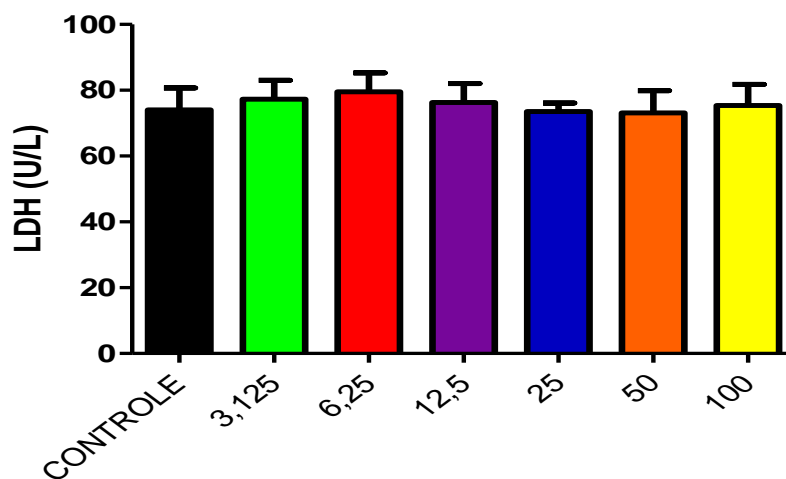
Para investigar se o veneno total e as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* foram capazes de alterar a integridade da membrana avaliou-se a liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) pelas células MDCK (n=5).

Nos grupos tratados com o veneno total (**Gráfico 18**) e a fração Asp 49 (**Gráfico 20**) de *B. erythromelas*, não foi observada liberação estatisticamente significativa de LDH em relação ao grupo não tratado (controle), indicando que não houve liberação de conteúdo citoplasmático em proporções significativas, ou seja, não houve ruptura da membrana celular.

A fração Lys 49 (**Gráfico 19**) apresentou liberação estatisticamente significativa de LDH apenas na concentração de 100 μ g/mL.

Como a enzima LDH é de origem citoplasmática, sua presença no meio extracelular pode indicar alteração na integridade da membrana plasmática e inferir no tipo de morte celular.

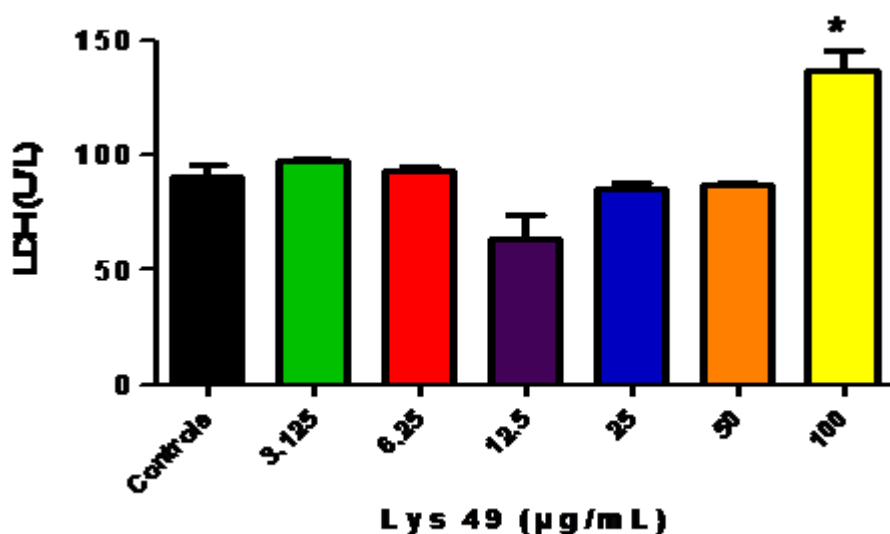
GRÁFICO 18 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$).



Veneno total de *Bothropoides erythromelas* ($\mu\text{g/mL}$)

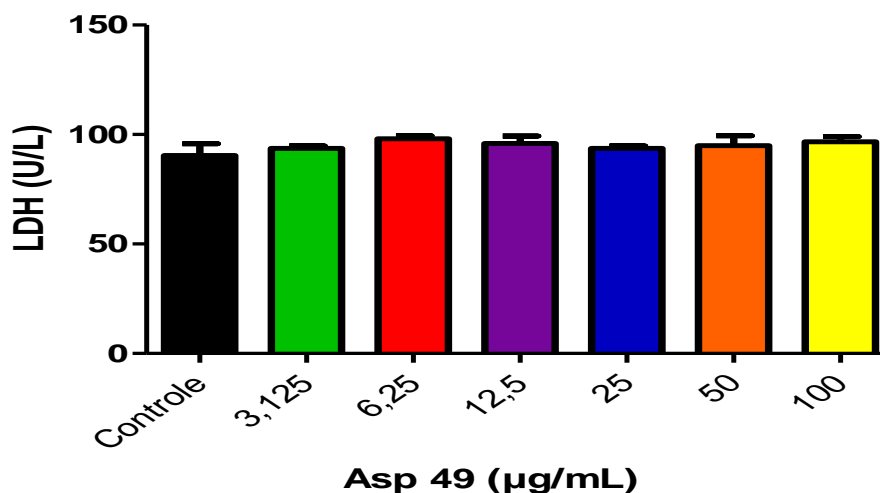
Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 19 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$).



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 20 – Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).



Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

5.4 FOTOMICROGRAFIA DE CÉLULAS MDCK

Tanto o veneno total como as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 resultaram em visíveis alterações morfológicas tais como: morte celular sem rompimento aparente da membrana, perda do formato característico, perda de aderência, presença de agregado celular com citoplasma granuloso.

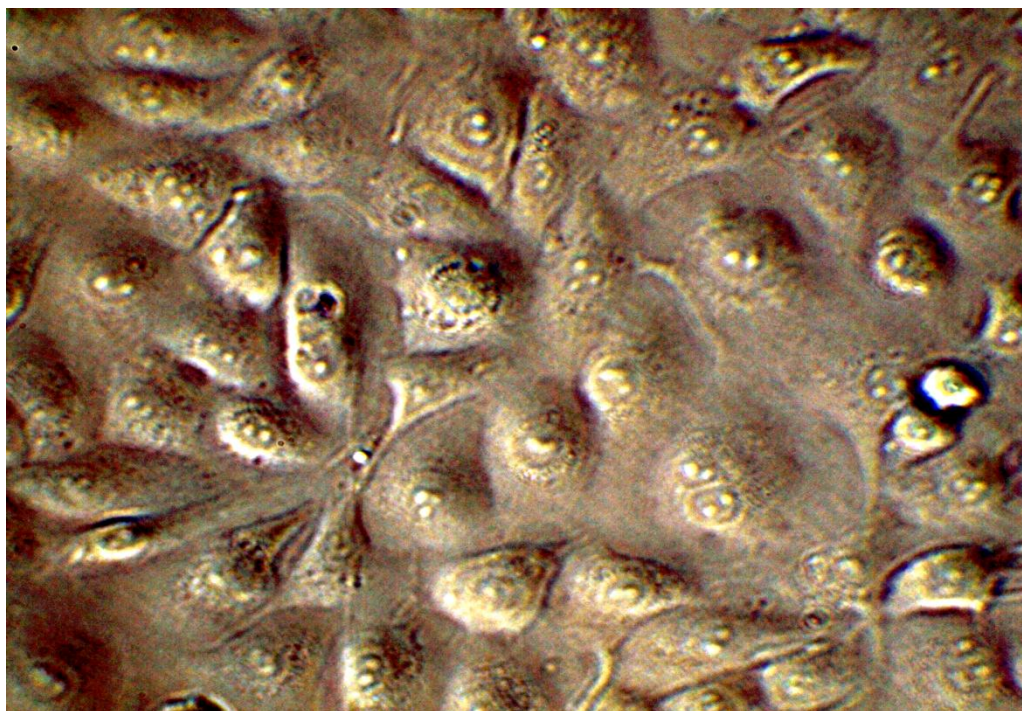
☐ Controle = Células MDCK na ausência de veneno total e frações Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (**Figura 23**).

☐ Veneno total nas concentrações de 50 e 100µg/mL (**Figuras 24 e 25**).

☐ Fração Lys 49 nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL (**Figuras 26, 27, 28, 29 e 30**).

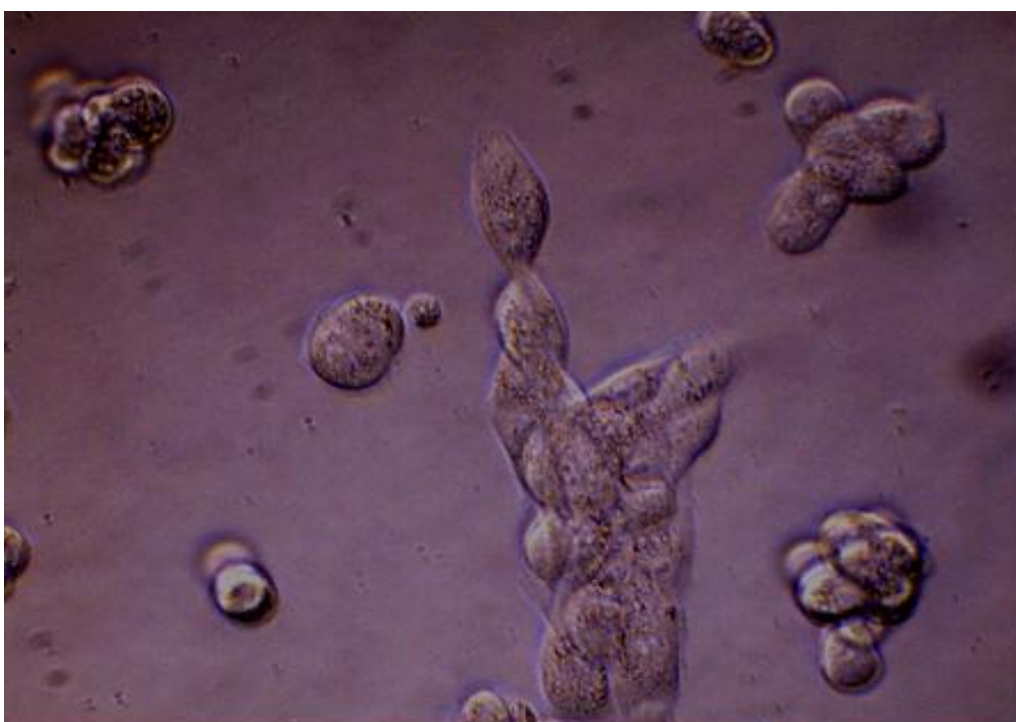
☐ Fração Asp 49 nas concentrações de 50 e 100µg/mL (**Figuras 31 e 32**).

FIGURA 23 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) na ausência de veneno total e frações Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas*.



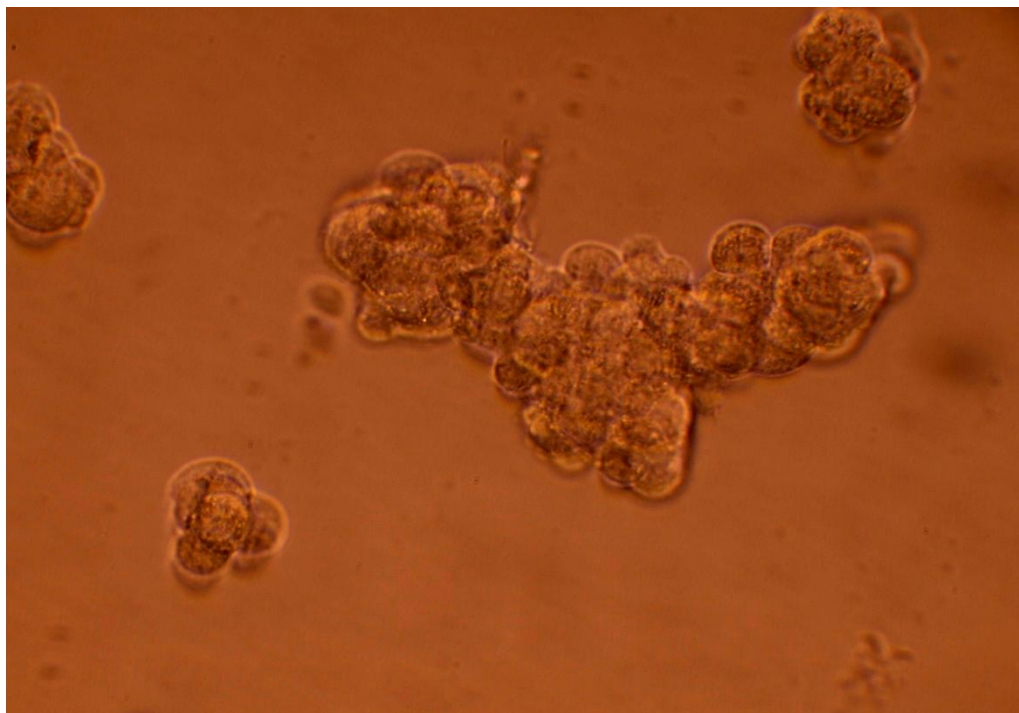
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 24 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição ao veneno total de *Bothropoides erythromelas* (50µg/mL).



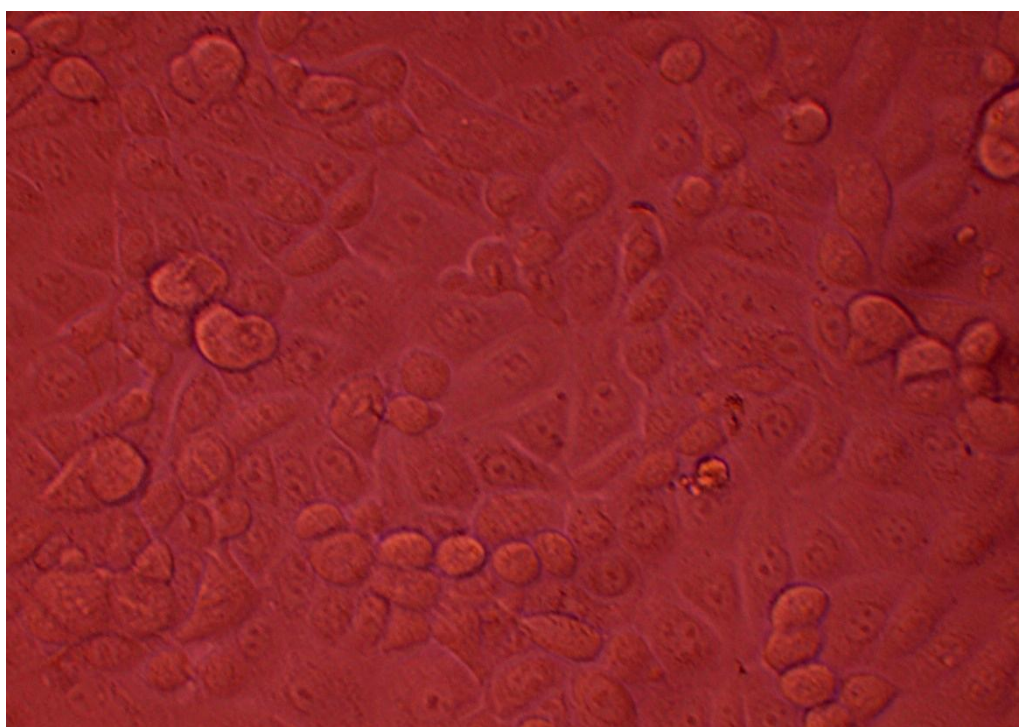
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 25 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição ao veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100 μ g/mL).



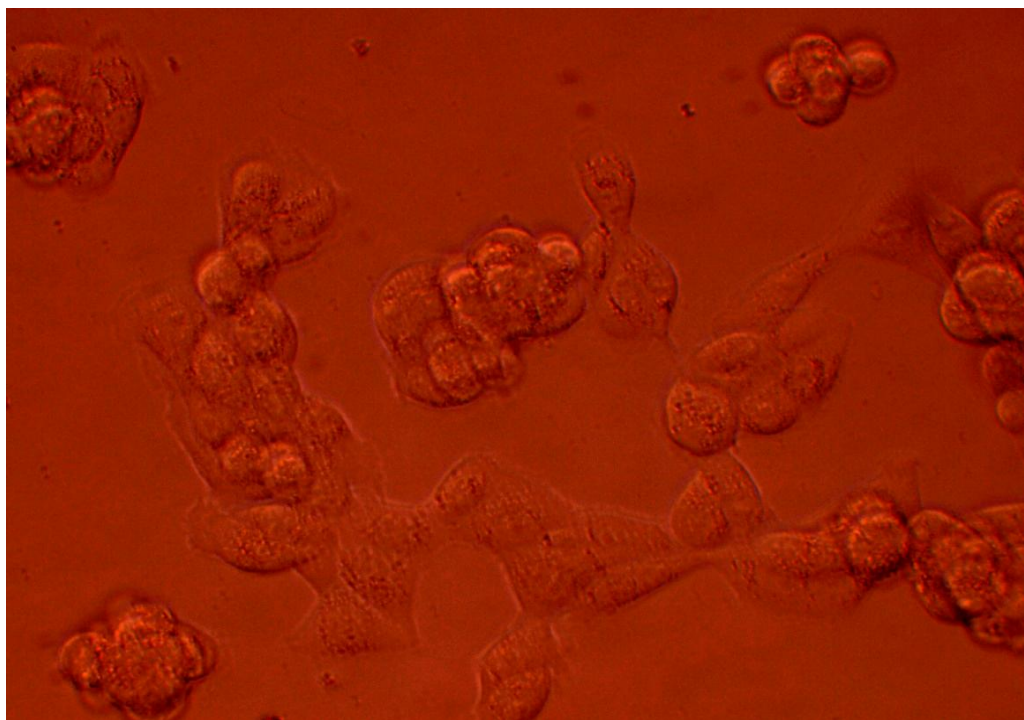
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 26 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* (6,25 μ g/mL).



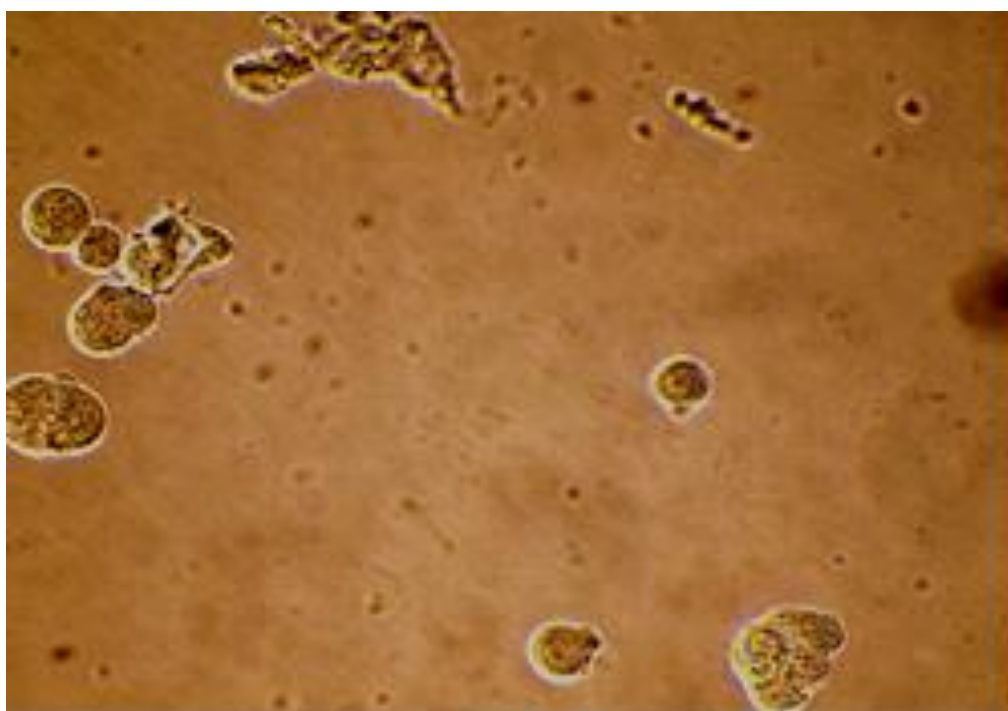
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 27 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* (12,5µg/mL).



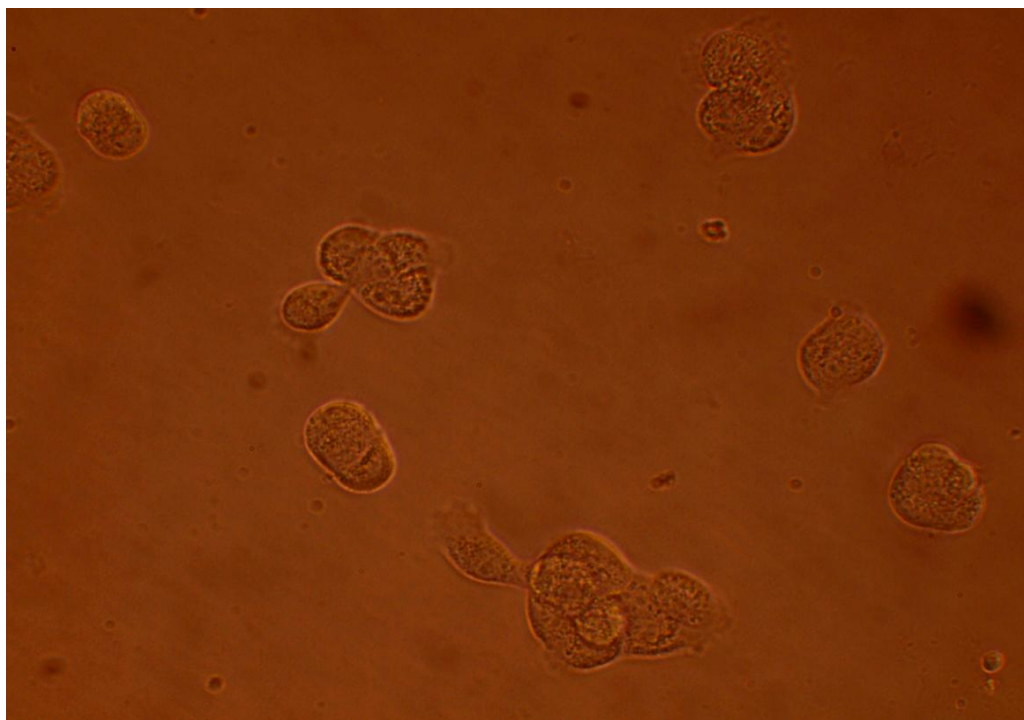
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 28 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* (25µg/mL).



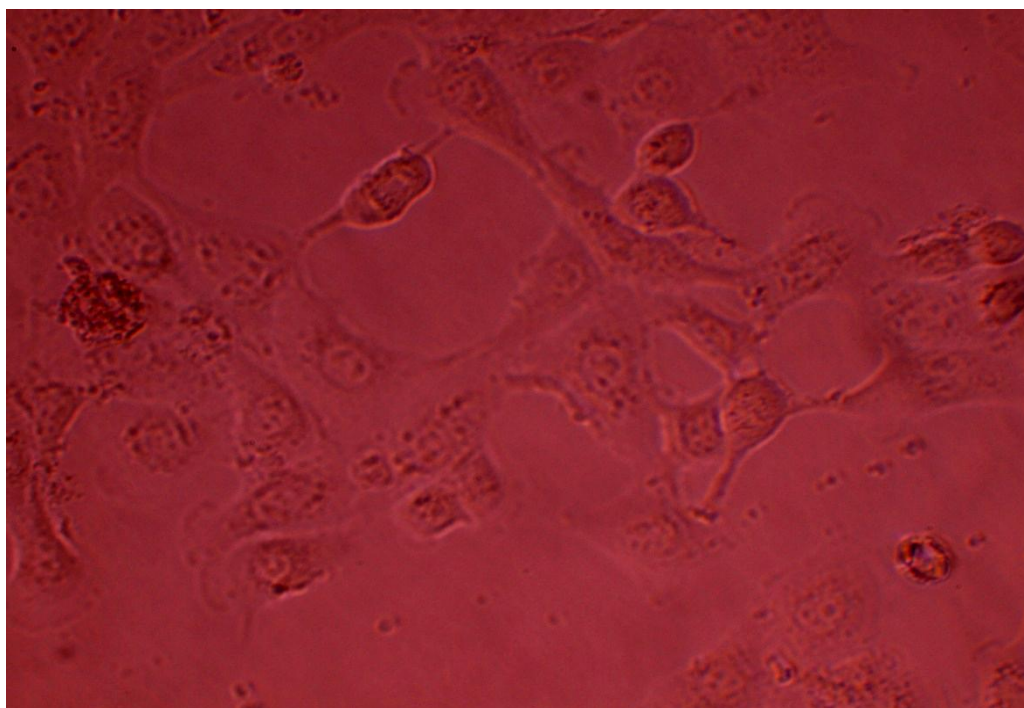
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 29 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* (50µg/mL).



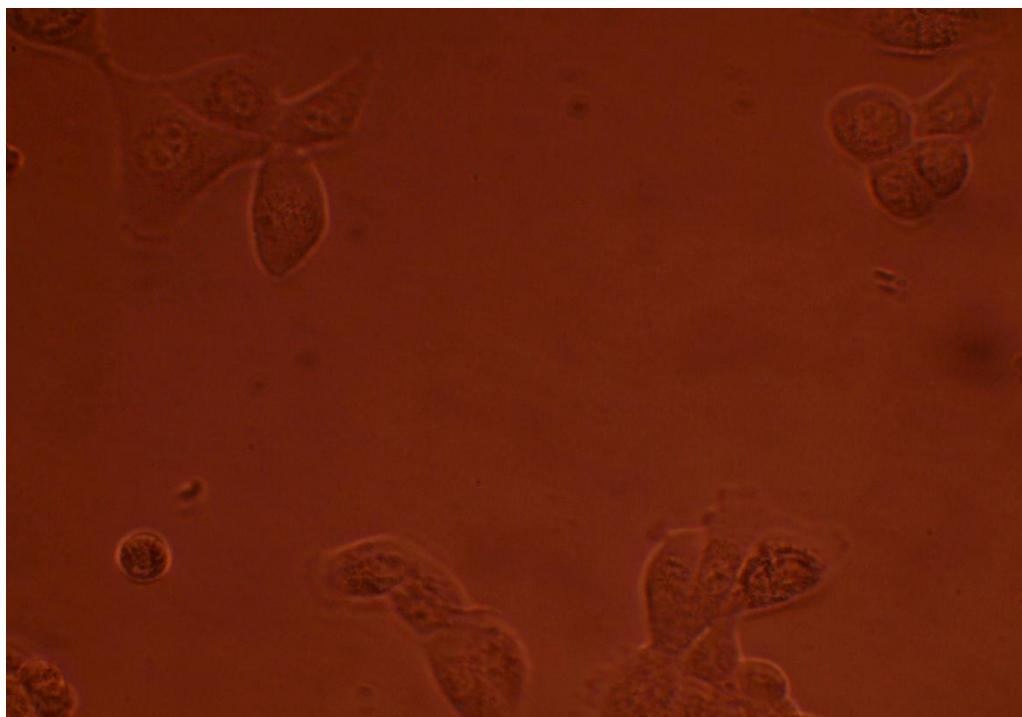
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 30 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* (100µg/mL).



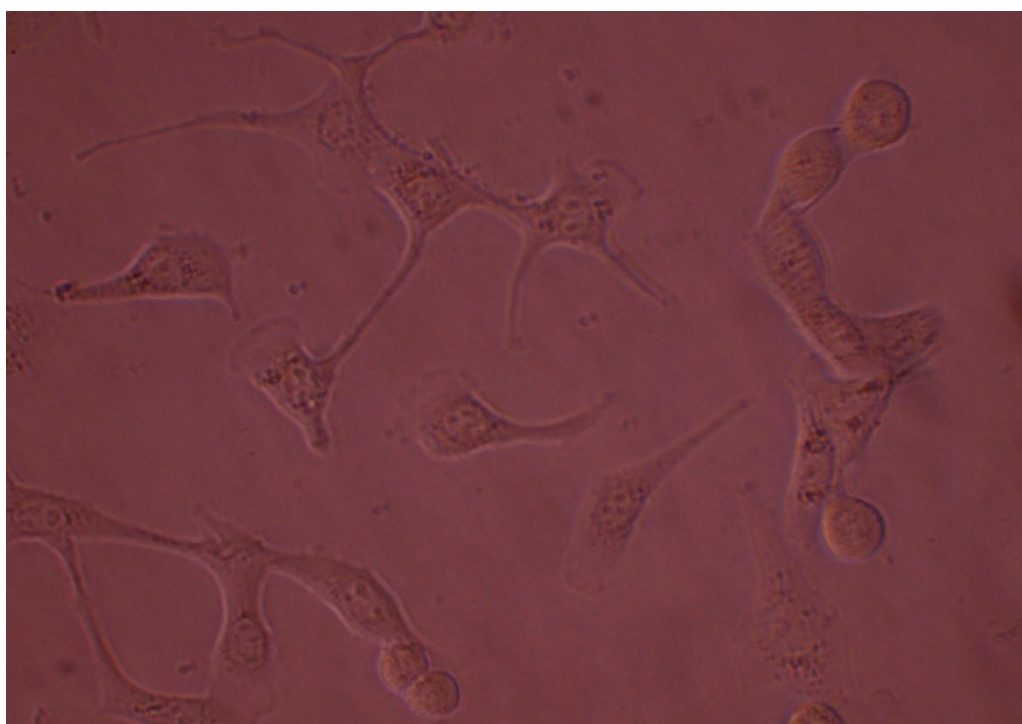
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 31 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* (50µg/mL).



Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

FIGURA 32 – Fotomicrografia de células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição à fração Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* (100µg/mL).



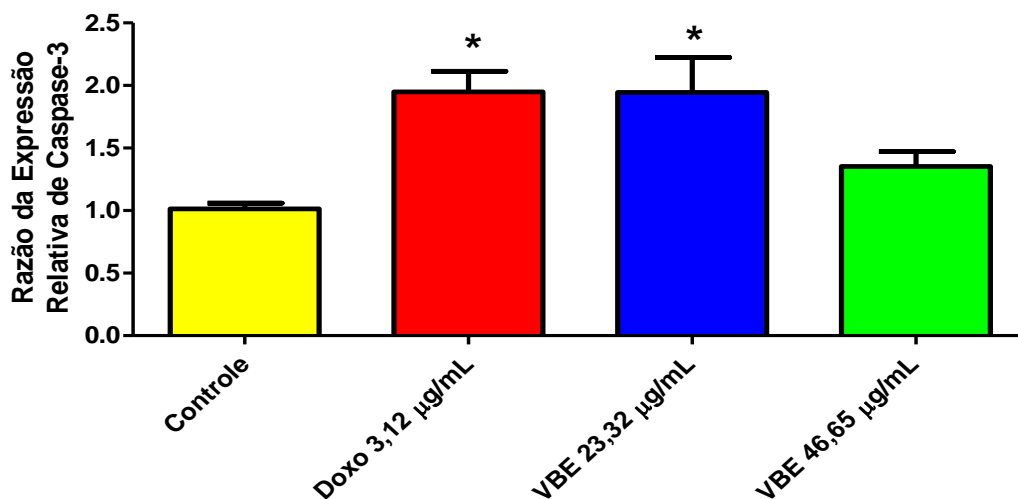
Fonte: Câmera digital acoplada Evolt E330[®] Olympus[®] - Aumento 40x.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ E ANTIAPOPTÓTICOS EM CÉLULAS MDCK

Após o cultivo de células MDCK (24hs) com o veneno total, nas concentrações de 46,65µg/mL e 23,32µg/mL (1/2 e 1/4 da IC₅₀, respectivamente), foi realizada a avaliação da expressão de genes envolvidos na cascata da apoptose, em comparação com controle negativo (células + PBS) e com o controle positivo (Doxorrubicina 3,12µg/mL). Foram avaliados os genes pró-apoptóticos (Caspase-3, Caspase-8 e *Bax*) e antiapoptóticos (*Mcl-1* e *Bcl-X_L*).

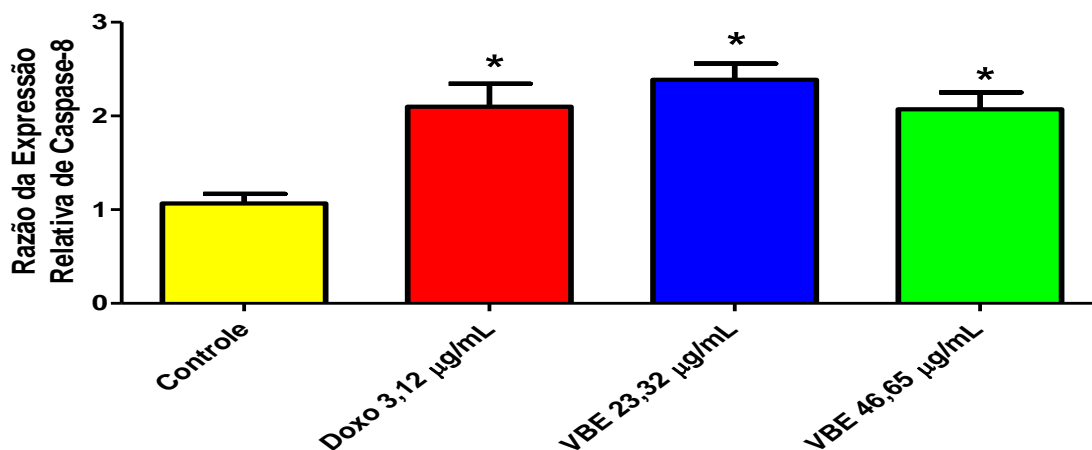
O veneno total estimulou a expressão de caspase-3 na concentração de 23,32 µg/mL e de caspase-8 em ambas as concentrações estudadas. Estes efeitos foram semelhantes aos apresentados pela Doxorrubicina (**Gráficos 21 e 22**). O gene *Bax* teve sua expressão inibida em ambas as concentrações estudadas, tanto quando comparado com o controle negativo quanto em comparação com o controle positivo (**Gráfico 23**).

GRÁFICO 21 – Expressão gênica de caspase-3 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorrubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).



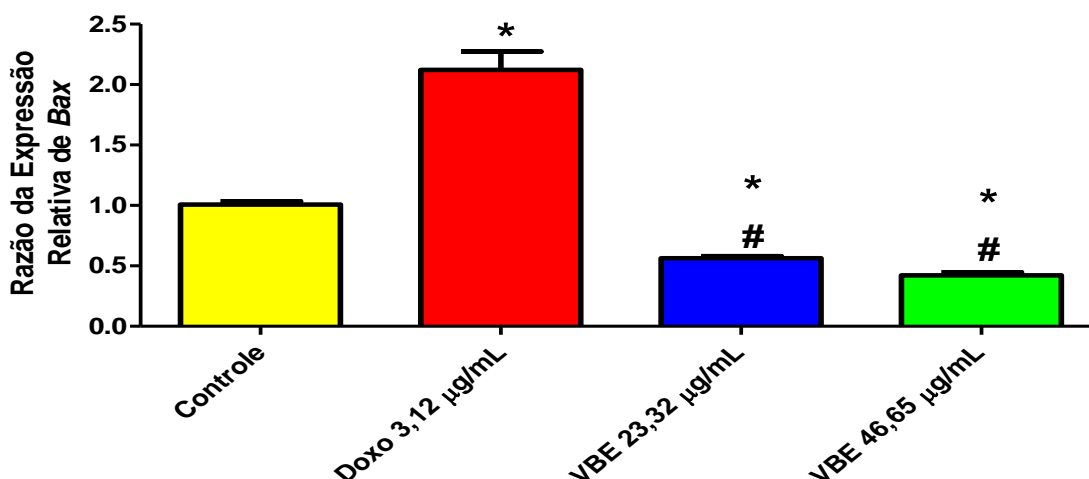
Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

GRÁFICO 22 – Expressão gênica de caspase-8 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorrubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

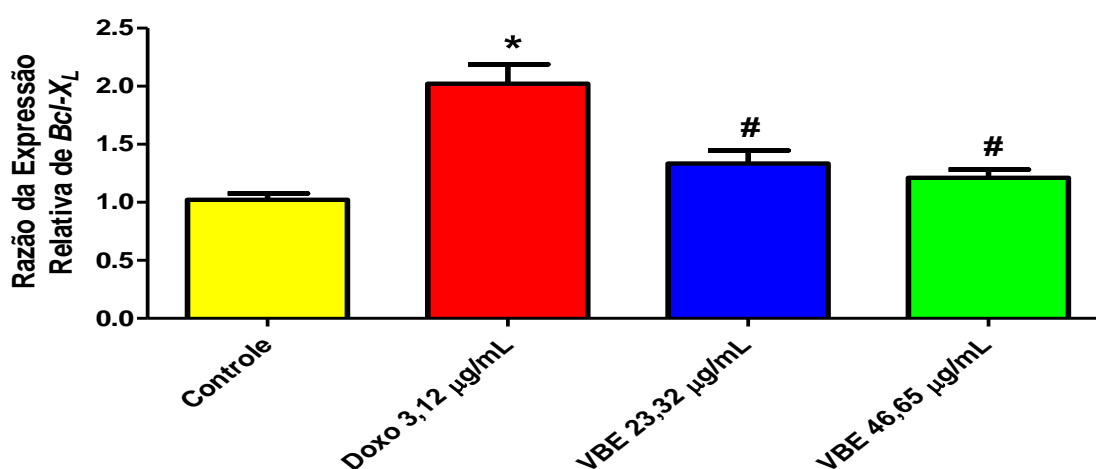
GRÁFICO 23 – Expressão gênica de *Bax* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorrubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

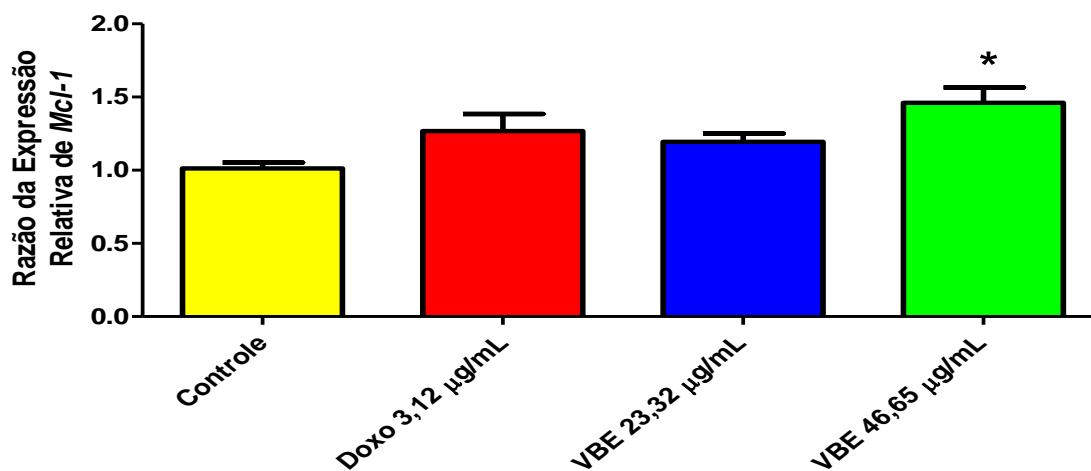
O veneno total não alterou a expressão de *Bcl-X_L* nas concentrações estudadas quando comparado com o controle negativo (**Gráfico 24**). O gene *Mcl-1* teve sua expressão aumentada na concentração de 46,65µg/mL, quando comparado com o controle negativo (**Gráfico 25**).

GRÁFICO 24– Expressão gênica de *Bcl-X_L* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^{\#}$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

GRÁFICO 25 – Expressão gênica de *Mcl-1* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 ESTUDO DO VENENO TOTAL DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

Os venenos de serpentes são usados como ferramentas de novas abordagens terapêuticas, com uma ampla variedade de ações farmacológicas e aplicações biotecnológicas sendo descritas para as substâncias que compõem estes venenos. Assim o isolamento e a caracterização funcional dos componentes dos venenos podem fornecer informações para o seu mecanismo de ação e tornar possível o seu uso como agentes terapêuticos e/ou futuros modelos moleculares.

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma das complicações sistêmicas mais comuns após o envenenamento ofídico, podendo envolver todas as estruturas renais, sendo a causa primária de morte após envenenamento (QUEIROZ *et al.*, 2008). Apesar dos avanços significativos no entendimento da patogênese da insuficiência renal aguda (DAGHER *et al.*, 2003; SCHRIER *et al.*, 2004), pouco ainda é conhecido acerca dos mecanismos de nefrotoxicidade dos venenos ofídicos (SCHRIER *et al.*, 2004).

Sousa (2004) ao estudar os efeitos renais do veneno total da *Bothropoides erythromelas* (10 μ g/mL) observou nefrotoxicidade direta através da alteração dos parâmetros funcionais renais. O veneno diminuiu a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), os percentuais de transporte proximal de sódio, potássio e cloreto (%pTNa⁺, %pTK⁺ e %pTCl) e os percentuais de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (%TNa⁺, %TK⁺ e %TCl). Em contraste, aumentou o fluxo urinário (FU), o ritmo de filtração glomerular (RFG), a excreção de sódio, potássio e cloreto (ENa⁺, EK⁺ e ECl⁻) e o *clearance* osmótico (C_{osm}). Foi sugerido que a atividade proteolítica e fosfolipásica encontradas no veneno da *Bothropoides erythromelas* podem ter sido responsáveis pela queda da pressão de perfusão e da resistência vascular renal e pelos efeitos deletérios encontrados no epitélio renal com aumento da diurese e diminuição dos transportes dos íons sódio, potássio e cloreto e que o aumento do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário presentes nos experimentos foi causado pelas alterações tanto glomerulares como tubulares observadas no exame histológico. O estudo demonstrou que o veneno era diurético, natriurético, caliurético e reduzia a pressão de perfusão em rim isolado de rato e que potenciadores de bradicinina poderiam estar envolvidos.

A análise histopatológica dos rins perfundidos com o veneno da *Bothropoides erythromelas* demonstrou a presença de discreta quantidade de material protéico nos glomérulos e túbulos renais e a presença de degeneração hidrópico vacuolar presente nos túbulos levando à injúria renal, sugerindo que a falência renal aguda se deve ao processo de citotoxicidade direta no modelo de rim isolado de rato. O fator antibotrópico (ABF) purificado do soro do gambá *Didelphis marsupialis* e apontado como sendo o responsável pela resistência aos venenos ofídicos, especialmente do gênero *Bothrops* se mostrou eficaz na inibição (bloqueio dose-dependente) dos efeitos induzidos pelo veneno de *B. erythromelas* no modelo de rim isolado de rato. Essa inibição pode ser atribuída à formação de um complexo inativo solúvel entre o fator antibotrópico e o veneno.

O veneno de *Bothropoides erythromelas* causou efeito nefrotóxico direto no modelo de rim isolado de rato comprovado através da análise histológica do tecido renal a qual mostrou lesões em glomérulos e túbulos (SOUSA, 2004).

Com base nos achados de Sousa (degeneração hidrópico vacuolar nos túbulos renais e a diminuição dos percentuais de transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCl), nosso grupo de pesquisa resolveu estudar os efeitos do veneno total da *Bothropoides erythromelas* em cultura de células renais, mais especificamente células do epitélio tubular (MDCK) usadas como modelo de células de túbulo distal e ducto coletor. As células MDCK constituem uma linhagem de rápido crescimento *in vitro* e de fácil manutenção constituindo um modelo adequado para o estudo em questão.

Células MDCK constituem uma linhagem celular bem estabilizada, estando entre as melhores culturas de células epiteliais renais caracterizadas (MADIN; DARBY, 1958; FERNANDEZ; OLIVEIRA-SOUSA; MALNIC, 2000; PEIXOTO, 2003). São extensivamente empregadas na investigação de uma variedade de processos celulares, incluindo transporte epitelial e celular em resposta a agentes tóxicos e venenos (CHAN *et al.*, 1989; WIEGELE; BRANDIS; ZIMMERHACKL, 1998; COLLARES-BUZATO *et al.*, 1994, 1998, 2002; SCHWERDT *et al.*, 2004; PEIXOTO; COLLARES-BUZATO, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006; DAMICO *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007; KUSMA *et al.*, 2008).

Collares-Buzato *et al.* (2002) investigaram *in vitro* os efeitos do veneno total de *Bothrops moojeni* usando cultura de células MDCK. O veneno resultou em visíveis alterações morfológicas como perda de aderência (porém as junções intercelulares permaneceram intactas) e um desarranjo no citoesqueleto, especificamente das fibras de tensão e da adesão focal associada à actina F na região de contato da matrix celular. Observou-se também um

aumento significativo na permeabilidade da membrana celular através de um aumento da liberação de lactato desidrogenase pelas células. O veneno causou efeito nefrotóxico direto nas células renais tubulares derivadas da linhagem celular também induzindo deterioração da interação da matrix celular. As células mostraram mitocôndrias inchadas, vacúolos citoplasmáticos e sinais de degeneração nuclear. Os pesquisadores demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* induzia falência renal aguda como uma consequência de alterações morfológicas e funcionais em células glomerulares e tubulares. A falência renal aguda resulta de um efeito citotóxico direto no epitélio tubular renal ou de uma isquemia renal devido a distúrbios hemodinâmicos sistêmicos.

Ensaio de citotoxicidade celular estão entre os primeiros métodos de bioensaio *in vitro* para prever a toxicidade de substâncias para vários tecidos (HARBELL *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2009; WEDI; KAPP, 2010). No caso dos venenos de serpentes, apesar da sua complexidade de composição, este ensaio pode prover uma interessante alternativa para avaliação de toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A citotoxicidade foi estimada através da IC₅₀ e da viabilidade das culturas (1,0 x 10⁵ céls./mL) tratadas com veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL) e analisadas pelo método MTT após 24 horas de incubação. O veneno apresentou efeito citotóxico caracterizado pela redução significativa da viabilidade celular nas concentrações de 50 e 100µg/mL (IC₅₀ = 93,31µg/mL) e visíveis alterações morfológicas tais como: morte celular sem rompimento aparente da membrana, perda do formato característico, perda de aderência, presença de agregado celular com citoplasma granuloso. Os resultados indicaram que o veneno de *B. erythromelas* é citotóxico para a cultura de células MDCK estando de acordo com os resultados de Collares-Buzato *et al.* (2002).

A injúria celular foi analisada através da liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), usada como marcador. Nos grupos tratados com o veneno total de *B. erythromelas* não foi observada liberação estatisticamente significante de LDH indicando que não houve ruptura da membrana celular. Como a perda da integridade da membrana é acompanhada pelo aumento da liberação de LDH, pode-se sugerir que a morte celular é consequência de apoptose e não de necrose.

Apoptose é um processo ativo, um tipo de morte celular, que pode ocorrer tanto em situações fisiológicas como patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual regulado por proteínas que são expressas pelas próprias células durante o processo de injúria (ANAZETTI; MELO, 2007).

Doxorrubicina (DOXO) é um agente antineoplásico altamente ativo (antibiótico da família das antraciclinas) envolvido na formação de radicais livres, indução de dano ao DNA, inibição da proliferação celular, deterioração da mitocôndria, efeitos citotóxicos e morte celular (KIM *et al.*, 2009). Nefrotoxicidade é um dos efeitos dos antibióticos da família das antraciclinas. O estresse oxidativo é o principal fator na nefrotoxicidade induzida por Doxorrubicina. DOXO induz lesões glomerulares e tubulares caracterizadas por vacuolização glomerular, proteinúria, congestão glomerular, deterioração da função tubular proximal, danos às células tubulares proximais e distais, dilatação tubular, material proteináceo nos túbulos, necrose tubular, apoptose em células epiteliais tubulares (ZHANG *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1997; DECORTI *et al.*, 1998; MASSART *et al.*, 2004; BÁRDI *et al.*, 2007; MOHAN *et al.*, 2010). DOXO induz apoptose via ativação de caspases e interrupção do potencial de membrana (GAMEN *et al.*, 2000; EOM *et al.*, 2005). Estudos recentes indicam que a DOXO induz apoptose em diversas linhagens celulares (KIM *et al.*, 2009; BOCCCELLINO *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2010; MARTIROSYAN *et al.*, 2010; SAFA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Baseado na toxicidade tubular e indução de apoptose em células epiteliais tubulares induzidas por Doxorrubicina utilizou-se a DOXO como controle positivo na análise da expressão gênica de alguns mediadores moleculares envolvidos na morte celular por apoptose.

As caspases são proteases aspartato específicas com resíduos de cisteína que clivam os substratos sempre depois de um resíduo de ácido aspártico, estando presentes entre as membranas mitocondriais e na matriz nuclear na forma de zimogênios que são ativadas especificamente em células em apoptose. Agem numa reação em cadeia, onde a “hierarquia” começa com as caspases iniciadoras ou desencadeantes (caspases 2, 8, 9 e 10), que por sua vez, ativam as propagadoras (1) e estas as efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7). Os receptores da família do TNF induzem morte por ativação dessas proteases (caspases-8) pelas suas porções intracelulares (GESKE; GERSCHENSON, 2001; MINKO *et al.*, 2001; CAMARGO; SCHOR, 2004; ANAZETTI; MELO, 2007). A apoptose pode ser iniciada por duas vias básicas, conhecidas como intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou dos receptores de morte (SCHMITZ *et al.*, 2000; FERRI; KROEMER, 2001a, 2001b; BAETU; HISCOTT, 2002).

A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desmontagem da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e

citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000; LAVRIK *et al.*, 2005).

A Família de proteínas *Bcl-2* são proteínas reguladoras que integram sinais de morte ou de sobrevivência celular para ativar ou não a maquinaria da apoptose. Localiza-se no retículo endoplasmático, membrana nuclear, citoplasma e membrana mitocondrial externa, tendo estas últimas localizações papel conhecido e importante na apoptose. Dividem-se em antiapoptóticas (*Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-w*, *Mcl-1* e *A1/Bfl-1*) e pró-apoptóticas (*Bax*, *Bak*, *Mtd/Bok* e *Bcl-rambo*) (HENGARTNER, 2000; GESKE; GERSCHENSON, 2001; BORNER, 2003; MALUF; POMPÉIA, 2005).

Para avaliar se a morte celular envolvida nos experimentos era consequência de apoptose avaliou-se a expressão de genes pró-apoptóticos (Caspase-3, Caspase-8 e *Bax*) e antiapoptóticos (*Mcl-1* e *Bcl-X_L*), envolvidos na cascata da apoptose, em comparação com o controle negativo (células + PBS) e com o controle positivo (Doxorrubicina 3,12µg/mL) em células MDCK tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 46,65 µg/mL e 23,32µg/mL.

O veneno de *B. erythromelas* estimulou a expressão de caspase-3 na concentração de 23,32µg/mL e de caspase-8 em ambas as concentrações estudadas. Estes efeitos foram semelhantes aos apresentados pela Doxorrubicina. A caspase-8 inicia a apoptose ao ativar a caspase efetora (caspase-3) que uma vez ativada cliva proteínas-chave que processam a apoptose. A caspase-8 ativa a via extrínseca da apoptose enquanto a caspase-3 é comum às duas vias. A DOXO atua de forma inespecífica ativando ambas as vias da apoptose. O gene *Bax* (pró-apoptótico – atua na via intrínseca) teve sua expressão inibida em ambas as concentrações estudadas, tanto quando comparado com o controle negativo quanto em comparação com o controle positivo (DOXO). O veneno total não alterou a expressão de *Bcl-X_L* nas concentrações estudadas quando comparado com o controle negativo. O gene *Mcl-1* teve sua expressão aumentada na concentração de 46,65µg/mL, quando comparado com o controle negativo indicando que somente na concentração mais alta há reversão dos efeitos do veneno.

Diversos estudos sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte, sendo que, em geral, duas vias distintas podem estar ativas (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; SLEE *et al.*, 1999; HENGARTNER, 2000; PHILCHENKOV, 2004; HARRINGTON *et al.*, 2008; PUHR

et al., 2009; MACKENZIE; SCHIPPER; CLARK, 2010). A apoptose iniciada via receptores de morte (via extrínseca) tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral), requerem pró-caspase-8 ou 10 no complexo (CAMARGO; SCHOR, 2004; MALUF; POMPEIA, 2005). Porém, estímulos apoptóticos induzidos por agentes quimioterapêuticos em várias linhagens de leucemia parecem ser independentes desta via (EISCHEN *et al.*, 1997; DEBATIN, 2000).

A via mitocondrial (via intrínseca) é ativada predominantemente, com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, APAF-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). Portanto, a ativação da caspase-9 mediada pelo citocromo c serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico (LI *et al.*, 1997; GREEN; REED, 1998; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; SLEE *et al.*, 1999; DESAGHER; MARTINOU, 2000; KUIDA, 2000; HERR; DEBATIN, 2001; ANAZETTI *et al.*, 2003a, 2003b).

A via mitocondrial é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família *Bcl-2* (*Bax*, *Bid*). Membros pró e antiapoptóticos da família *Bcl-2* regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros antiapoptóticos da família *Bcl-2* inibem a morte celular por apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, consequentemente, inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol (GOTTLIEB, 2000). Este se associa com APAF-1, dATP e pró-caspase-9, formando o apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (ANURADHA; KANNO; HIRANO, 2001).

De acordo com os resultados encontrados e as evidências anteriormente expostas, pode-se propor que a apoptose causada pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* provavelmente atue através da via extrínseca ou dos receptores de morte.

Venenos de serpentes causam apoptose em uma variedade de células (SUHR; KIM, 1996; ARAKI *et al.*, 2002) e este efeito é mediado por diversos componentes tais como LAAO (DU; CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006; STÁBELI *et al.*, 2007), metaloproteinases (WU *et al.*, 2001; TANJONI *et al.*, 2005), desintegrinas (COMINETTI *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2006) e PLA₂ (ZHAO *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2006).

Existem indícios que o PAF esteja associado com os efeitos tóxicos do TNF- α e IL-1. Os receptores da família do TNF induz morte celular por ativação da caspase-8. Uma

vez ativada, a caspase-8 ativa as pró-caspases-6 e 3, e outras caspases efetoras, induzindo a apoptose (GUPTA, 2001; CHEN; GOEDEL, 2002; JOZA *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm sugerido a correlação entre a liberação de ácido araquidônico e as PLA₂ no processo de apoptose (PENZO *et al.*, 2004; MAIA *et al.*, 2006).

Estudos com as PLA₂ Lys 49 de *Bothrops asper* (MORA *et al.*, 2005, 2006) e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* (DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006) demonstraram uma série de atividades tóxicas, particularmente citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Estudos posteriores com as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* em células MDCK poderiam vir esclarecer o mecanismo responsável pela apoptose.

Diversos estudos comprovam o envolvimento de componentes dos venenos de *Bothrops* e *Bothropoides* na apoptose (DÍAZ *et al.*, 2005; LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005; MORA *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005; MORA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; JIMÉNEZ *et al.*, 2008).

Através dos estudos com o veneno de *Bothropoides erythromelas* conclui-se que o veneno causa apoptose em células MDCK provavelmente através da via extrínseca ou dos receptores de morte. Estudos posteriores com os componentes purificados deste veneno poderiam vir esclarecer quais as frações responsáveis pelos efeitos observados.

6.2 ESTUDO DAS FRAÇÕES LYS 49 E ASP 49 DO VENENO TOTAL DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

As fosfolipases A₂ (PLA₂) miotóxicas exercem um papel principal na patogênese dos envenenamentos causados por picadas de serpentes, sendo amplamente encontradas nos venenos botrópicos (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010a). Devido a sua abundância e a variedade de efeitos tóxicos (citotoxicidade, miotoxicidade e atividades inflamatórias) é um dos componentes mais estudados (LYNCH, 2007; BONFIM *et al.*, 2009; DE PAULA *et al.*, 2009).

Comparando as sequências de miotoxinas e fosfolipases isoladas de venenos de serpentes, Kini e Iwanaga (1986) sugeriram que o sítio catiônico associado com a região hidrofóbica, localizado na região C-terminal, é responsável pela miotoxicidade, sendo independente da atividade fosfolipásica (podendo determinar lesão celular pela

desorganização da barreira lipídica, afetando em consequência o influxo de cálcio e causando necrose) sugerindo que a atividade fosfolipásica não é essencial para o efeito farmacológico.

Gutiérrez *et al.* (1989) afirmaram que o “sítio miotóxico” nessas toxinas pode ser responsável pela ligação e penetração à membrana plasmática do músculo esquelético possivelmente por interações hidrofóbicas, enquanto o sítio catiônico pode ligar fosfolipídios ácidos ou proteínas ácidas do retículo sarcoplasmático. Isto resulta na desorganização da bicamada lipídica resultando no influxo de cálcio para a célula através dos canais de cálcio alterando de forma generalizada a membrana plasmática, sendo o provável mecanismo para as lesões causadas por estas toxinas.

Kini e Evans (1989) propuseram um modelo para explicar os diferentes efeitos farmacológicos das vPLA₂. Este modelo é baseado na presença de sítios de ligação específicos na superfície das células alvo que possuem elevada afinidade por vPLA₂ tóxicas, mas não para vPLA₂ não tóxicas. Subsequentemente, para este nível de ligação primária, as vPLA₂ podem induzir um efeito farmacológico por mecanismos dependentes ou independentes da hidrólise fosfolipídica. As vPLA₂ não tóxicas não podem se ligar com alta afinidade à esses sítios, e então não são especificamente direcionadas para as células alvo. Espera-se que essas vPLA₂ sejam tóxicas somente em elevadas doses, ou seja, em concentrações elevadas o suficiente para se ligar a outros sítios celulares ou, não especificamente, hidrolisar fosfolipídios celulares na superfície tanto de células alvo como de células não alvo.

Diversas PLA₂ extraídas de venenos de serpentes têm demonstrado potencial em provocar lesão renal em perfusão de rim isolado, em particular aquelas extraídas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* (BARBOSA *et al.*, 2002, 2005, 2006; BRAGA *et al.*, 2008; EVANGELISTA *et al.*, 2010).

Sousa (2004) ao estudar o veneno total de *Bothropoides erythromelas* (10µg/mL) no modelo de rim isolado sugeriu que a atividade fosfolipásica poderia estar envolvida nas alterações dos parâmetros renais observados. Baseado nos estudos de Sousa, resolveu-se estudar os efeitos das frações Lys 49 e Asp 49 deste veneno no modelo de rim isolado de rato e em células MDCK na perspectiva de comprovar o envolvimento das PLA₂ na nefrotoxicidade.

A fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) causou nefrotoxicidade através da alteração dos parâmetros funcionais renais. Lys 49 aumentou a pressão de perfusão (PP), o fluxo urinário (FU), a excreção de sódio e potássio (ENa⁺, EK⁺) e o *clearance* osmótico (*C_{osm}*). Ocorreu diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do

percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺). Não foram observadas alterações na resistência vascular renal (RVR), nos percentuais de transporte proximal de sódio, potássio e cloreto (%pTNa⁺, %pTK⁺ e %pTCl), nos percentuais de transporte tubular de potássio e cloreto (%TK⁺ e %TCl) e na excreção de cloreto (ECI). O estudo demonstrou que fração Lys 49 do veneno era diurética, natriurética, caliurética e aumentava a pressão de perfusão em rim isolado de rato e que substâncias vasoconstritoras poderiam estar envolvidas.

A fração Lys 49 apresentou um efeito similar ao veneno total nos parâmetros FU, %TNa⁺, ENa⁺, EK⁺ e C_{osm} .

A fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (5µg/mL) possui ação nefrotóxica apresentando uma diminuição significativa no %pTK⁺ e um aumento na EK⁺. Estes efeitos foram similares aos apresentados pelo veneno total.

Barbosa *et al.* (2002) ao estudarem os efeitos renais das miotoxinas (BmTx-I e BmTx-II) do veneno da *Bothrops moojeni*, classificadas como Lys 49, observaram que na estrutura primária da BmTx-I a região C-terminal rica em lisina é altamente conservada, porém na BmTx-II esta região está ausente. Atribuiu-se à região C-terminal rica em lisina da BmTx-I como responsável pela toxicidade renal encontrada no modelo de rim isolado de rato. BmTx-I seria a indutora da atividade tóxica por agressão direta à membrana celular, podendo estimular a liberação de vasoconstritores, liberados por estímulos agressores diretos independentemente de atividade enzimática como ocorre com muitas PLA₂ com Lys 49 de veneno de serpentes (LOMONTE *et al.*, 2003a). BmTx-I apresentou um efeito deletério (similar ao veneno total) na função renal em perfusão de rim isolado de rato.

A atividade enzimática da PLA₂ Lys 49 utilizada nesse estudo, poderia induzir a produção de derivados do ácido araquidônico (atuação indireta), como a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), o Tromboxano A₂ (TXA₂) e o fator de agregação plaquetária (PAF) que têm ação vasoconstritora, e fisiologicamente promovem redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI, 2000). Observou-se um aumento da PP com consequente aumento do FU levando ao aumento da excreção dos íons Na⁺ e K⁺ com maior formação de urina possivelmente devido ao envolvimento de substâncias vasoconstritoras.

No sistema de rim isolado de rato utilizado, o fluxo do perfusato é mantido constante devido o permanente bombeamento, transitando sob maior pressão nos capilares glomerulares e produzindo maior filtrado em decorrência da pressão vascular aumentada, resultando em um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário. No entanto, observou-se uma diminuição do ritmo de filtração glomerular com aumento do fluxo urinário.

Com base nesses achados, pode-se propor que a Lys 49 poderia estar atuando na barreira de filtração glomerular. Uma vez que ocorre lesão da barreira de filtração, o ritmo de filtração diminui com uma maior quantidade de proteínas sendo filtradas e consequente passagem destas proteínas para os túbulos com aumento do fluxo urinário. A análise histológica confirma os resultados encontrados.

Em algumas Lys 49 PLA₂ a região C-terminal rica em lisina é responsável pela atividade tóxica e citotóxica (ARNI; WARD, 1996; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997a, 1997b; NÚÑEZ *et al.*, 2001; CHIOATO *et al.*, 2002; CHACUR *et al.*, 2003; CHIOATO; WARD, 2003; LOMONTE *et al.*, 2003a, 2003b; AMBROSIO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2008; DOS SANTOS; SOARES; FONTES, 2009; LOMONTE *et al.*, 2009b).

Barbosa *et al.* (2006) estudaram os efeitos renais induzidos pela miotoxina I (Lys 49 - BmTx-I) purificada do veneno da serpente da *Bothrops moojeni*. Indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase) bloqueou parcialmente os efeitos da BmTx-I. O bloqueio parcial exercido pela indometacina demonstrou que prostaglandinas poderiam ser importantes mediadores nos efeitos renais produzidos pela Lys 49, porém a participação de outras substâncias não poderia ser excluída. Com o uso do tezosentan (antagonista da endotelina) o bloqueio das alterações renais foi total. Os autores concluíram que a endotelina era a principal responsável pelas alterações dos parâmetros renais promovidas pela Lys 49.

Barbosa *et al.* (2005) estudaram os efeitos renais induzidos pelas miotoxinas I (BthTx-I- Lys-49) e II (BthTx-II- Asp 49) de *Bothrops jararacussu* e um possível bloqueio por indometacina no sistema de perfusão de rim isolado de rato. Ambas as miotoxinas aumentaram a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), o fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG). Em contraste ambas diminuíram os percentuais de transporte tubular de sódio e potássio (%TNa⁺ e %TK⁺). Indometacina antagonizou totalmente os efeitos vasculares, glomerulares e tubulares promovidos pela Lys 49 e parcialmente os efeitos promovidos pela Asp 49 sugerindo o envolvimento de mediadores inflamatórios (possivelmente eicosanóides) e do domínio C-terminal nos efeitos promovidos pelas PLA₂. Por outro lado, outros sítios farmacológicos poderiam estar envolvidos na atividade encontrada independente da atividade da BthTx-II. BthTx-I e BthTx-II apresentam propriedades estruturais e bioquímicas variadas as quais podem induzir diferentes atividades. Proteínas específicas das PLA₂ podem causar efeitos similares por diferentes modos de ação.

Os resultados com a Lys 49 de *Bothropoides erythromelas* foram similares aos da Lys 49 de *Bothrops moojeni* e a Lys 49 de *Bothrops jararacussu*, com exceção dos parâmetros RFG, RVR, %TK⁺ e %TCI. Pode-se sugerir o envolvimento de derivados do

ácido araquidônico vasoconstritores e do domínio C-terminal como responsáveis pelas alterações nos parâmetros renais, porém a participação de outras substâncias vasoconstritoras não pode ser excluída.

O córtex renal normal produz grande quantidade de PGE₂ e PGI₂ (PG_S vasodilatadoras) e pouca quantidade de TXA₂. O epitélio glomerular e células mesangiais têm a capacidade de sintetizar ambas as formas de PGI₂ e PGE₂. Estes prostanóides seriam responsáveis por influenciar o fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e liberação de renina. Tanto PGI₂ como PGE₂ sintetizadas pelo córtex renal são importantes estimuladores para liberação de renina e agentes vasoconstritores (HACKENTAL *et al.*, 1990; SCHNERMANN, 2001; GOMEZ; STRICK; ROMERO, 2008).

De Albuquerque Modesto *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram uma fosfolipase A₂ Asp 49 (BE-I-PLA₂) de *Bothropoides erythromelas*, a qual apresenta alta similaridade com as PLA₂ de serpentes do gênero *Bothrops*, sendo um potente antiplaquetário e indutor da liberação de prostaglandina I₂ (PGI₂) por células endoteliais.

As alterações nos parâmetros funcionais renais causados pelas frações Lys 49 e Asp 49 demonstraram injúria nos glomérulos e túbulos renais comprovados pela análise histológica.

No grupo em que os rins foram perfundidos com a fração Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas*, foi observado depósito de material protéico nos glomérulos e túbulos possivelmente devido ao efeito citotóxico das PLA₂. A deposição proteinácea na cápsula de Bowman reflete bem a elevação da permeabilidade vascular nos capilares glomerulares, permitindo o extravasamento de proteínas. Este extravasamento levou consequentemente ao aumento da deposição de proteínas nos túbulos renais. O aumento da pressão de perfusão renal ocasionado pela fração Lys 49 pode ter sido responsável pela passagem de proteínas dos capilares para o filtrado glomerular. A fração Asp 49 não apresentou aumento da pressão de perfusão renal podendo-se sugerir que o efeito observado se deve à citotoxicidade direta. Observou-se também a presença de células tubulares com núcleos picnóticos (Lys 49) e a presença de células tubulares anucleadas (Asp 49) indicativas de morte celular as quais refletem lesão irreversível dos túbulos, possivelmente em resposta à atividade citotóxica da PLA₂ sobre os fosfolipídios das membranas celulares reforçando a suposição de agressão direta nas células. A análise histológica demonstra que as frações Lys 49 e Asp 49 são citotóxicas, com efeitos similares nos glomérulos e túbulos renais, porém com diferentes modos de ação.

Essas alterações histopatológicas foram condizentes com as demais modificações funcionais renais observadas, especialmente se levadas em consideração a presença de vacúolos e de massas proteináceas nos túbulos, sinais comuns de injúria e disfunção renais (BOER-LIMA *et al.*, 1999, 2002; CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001).

Pode-se propor também que a perda da função de transporte das células epiteliais tubulares em virtude da lesão renal promovida pela ação citotóxica da Lys 49 ocasionaria a diminuição da reabsorção de sódio com conseqüente aumento de sua excreção, da diurese e do *clearance* osmótico.

A retenção de íons pode ser apontada como um dos fatores responsáveis pela injúria tubular visto ter ocorrido uma diminuição da reabsorção tubular dos íons sódio e potássio promovendo uma maior retenção desses solutos nos túbulos renais com conseqüente aumento do volume urinário com maior concentração desses solutos na urina. Isto explicaria o aumento da excreção assim como aumento do *clearance* osmótico.

O *clearance* osmótico (capacidade de depuração renal em relação às moléculas osmoticamente ativas) apresentou aumento significativo aos 120 minutos. Esse aumento pode ser devido a uma possível disfunção tubular. A diminuição da reabsorção tubular do sódio, molécula com grande capacidade de carrear água, pode ter sido responsável pela alteração desse parâmetro (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

Braga *et al.* (2008) estudaram os efeitos renais da PLA₂ Asp 49 extraída do veneno de *Bothropoides insularis* em rim isolado de rato. A PLA₂ aumentou a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), o fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) enquanto que os percentuais de transporte tubular de sódio e cloreto diminuíram (%TNa⁺ e %TCl⁻) sem alteração no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺). A sequência N-terminal da Asp 49 de *Bothropoides insularis* apresenta elevada identidade (até 95%) com as PLA₂ de *Bothropoides jararaca* e *Bothrops asper*.

As ações da Asp 49 de *Bothropoides insularis* assemelharam-se as ações da Asp 49 do veneno de *Bothrops jararacussu*, exceto pelo fato da *Bothropoides insularis* não afetar o transporte de potássio. As PLA₂ isoladas dos venenos causaram alterações renais no modelo de rim isolado, o que pode refletir sua atividade enzimática sobre os fosfolípidios de membrana de células renais, o envolvimento de mediadores inflamatórios e do domínio C-terminal nos efeitos observados (BARBOSA *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos com a fração Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* demonstraram uma diminuição significativa no transporte proximal de potássio (%pTK⁺) e um aumento na excreção de potássio (EK⁺).

As lesões tubulares causados pelas frações Lys 49 e Asp 49, comprovadas pela análise histológica, podem a vir justificar as alterações nos transportes de Na^+ e K^+ levando à excreção desses íons.

Levando-se em consideração os relatos da participação de mediadores inflamatórios na injúria celular produzidos pelas fosfolipases A_2 secretórias (sPLA₂) provenientes de venenos de serpentes, é possível sugerir que o aumento da excreção de potássio sem alteração nos transporte proximal e tubular promovidos pela PLA₂ Lys 49 seja uma consequência da diminuição no transporte de sódio o que resultaria em grande aporte deste íon para o néfron distal e, subsequentemente, em indução da secreção de potássio, levando à caliurese (FONTELES *et al.*, 1998).

O transporte distal de sódio é indispensável para a secreção de potássio e promove o potencial elétrico para o efluxo de K^+ via BK ou ROMK (MALNIC *et al.*, 1964; KAHLE *et al.*, 2003; PALMER; FRINDT, 2007a; RODAN; HUANG, 2009). Pode-se propor o envolvimento dos canais ROMK ou BK na caliurese induzida pela PLA₂ Lys 49.

ROMK é uma denominação para canais de potássio na porção externa da medula renal. Estes são canais de potássio ATP-dependentes que transportam o potássio para fora das células. Possuem uma elevada probabilidade de abertura e pequena condutância aos íons K^+ (HEBERT, 1995; WANG; HEBERT; GIEBISCH, 1997; WANG, 1999, 2006; RODAN; HUANG, 2009).

Canais BK (Big potássio), também chamados Maxi-K, são canais iônicos caracterizados por sua grande condutância aos íons potássio através das membranas celulares. Estes canais são ativados por mudanças no potencial elétrico da membrana e/ou pelo aumento da concentração intracelular do íon cálcio (Ca^{2+}). Diferentemente dos canais ROMK possuem baixa probabilidade de abertura (PLUZNICK; SANSOM, 2006; GRIMM; SANSOM, 2007; RIEG *et al.*, 2007).

Ambos os canais são encontrados na membrana apical da alça ascendente espessa, túbulo contorcido distal e ducto coletor cortical (RODAN; HUANG, 2009). Os canais ROMK e BK são expressos no néfron distal, porém os canais ROMK são responsáveis pela maior parte da secreção de K^+ devido à elevada probabilidade de abertura (LING; HILTON; EATON, 1991; PLUZNICK; SANSOM, 2006).

A fração Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* causou uma diminuição significativa no transporte proximal de potássio (%pTK⁺) e um aumento na excreção de potássio (EK⁺). Alguns estudos demonstram a existência de canais BK em túbulos proximais

(KAWAHARA; OGAWA; SUZUKI, 1991; HIRANO *et al.*, 2002). Baseado nestes estudos pode-se propor o envolvimento dos canais BK na caliurese induzida pela PLA₂ Asp 49.

O íon Ca²⁺ ativa os canais BK exercendo um importante papel na secreção de K⁺ no néfron distal (WODA *et al.*, 2001, 2002; LIU *et al.*, 2003; WANG, 2004; RODAN; HUANG, 2009).

Alguns estudos sugeriram que canais de K⁺ cálcio-ativados podem desempenhar um papel na secreção de K⁺ em condições que aumentam o Ca²⁺ intracelular (HUNTER *et al.*, 1986; PALMER; FRINDT, 2007b).

Cintra-Francischinelli *et al.* (2010a) ao estudarem as miotoxinas Lys 49 e Asp 49 do veneno da serpente *Bothrops asper* demonstraram que ambas induzem a liberação de grandes quantidades de K⁺ e ATP do músculo esquelético. Ambas miotoxinas causam um grande influxo de Ca²⁺ em células musculares, o que desencadeia uma cascata de eventos tais como a perda da função mitocondrial, proteólise generalizada, hipercontração miofibrilar e eventos degenerativos adicionais.

As miotoxinas Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* desestabilizam os fosfolipídios das membranas celulares induzindo a lesão da membrana permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio o qual promove alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular. Esses achados estão de acordo com os estudos de Cintra-Francischinelli *et al.* (2009, 2010b). Podemos propor que o aumento do Ca²⁺ intracelular promovido por ambas as miotoxinas ativa os canais BK exercendo um importante papel na secreção de K⁺.

Ambas PLA₂ utilizadas no estudo apresentaram ação nefrotóxica no modelo de rim isolado de rato. Atribuiu-se que a PLA₂ Asp 49 tem sua ação associada a seu sítio catalítico e a PLA₂ Lys 49 tem sua ação associada com a porção C-terminal e ao estímulo da liberação de agentes vasoconstritores. Os efeitos tóxicos das PLAs de venenos podem não ser atribuídos a sua atividade catalítica, sugerindo que elas podem ligar-se a alvos protéicos (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; VALENTIN; LAMBEAU, 2000a; BORTOLETO-BUGS; NETO; WARD, 2004; ZULIANI *et al.*, 2005). As PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* têm estrutura e propriedades bioquímicas distintas responsáveis por induzir diferentes atividades na fisiologia renal através de diferentes mecanismos.

Tanto as PLA₂ Lys 49 e Asp 49 como o veneno total de *Bothropoides erythromelas* apresentaram nefrotoxicidade direta no modelo de rim isolado de rato. Quando comparadas as análises histológicas das frações Lys 49 e Asp 49 com o veneno total, observou-se efeitos similares como o depósito de material protéico nos glomérulos e túbulos.

Em função das alterações histológicas e dos parâmetros funcionais encontradas nos rins perfundidos com as frações Lys 49 e Asp 49 do veneno da *Bothropoides erythromelas*, foi avaliada a citotoxicidade induzida pelas frações Lys 49 e Asp 49 em cultura de células MDCK.

A citotoxicidade foi estimada através da IC_{50} e da viabilidade das culturas ($1,0 \times 10^5$ céls./mL) tratadas com as frações Lys 49 e Asp 49 (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL) e analisadas pelo método MTT após 24 horas de incubação. Ambas as frações apresentaram efeito citotóxico caracterizado pela redução da viabilidade celular. Observou-se diminuição significativa da viabilidade celular com a fração Lys 49 nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL ($IC_{50} = 38,29 \mu$ g/mL) e com a fração Asp 49 nas concentrações de 50 e 100 μ g/mL ($IC_{50} = 158 \mu$ g/mL). Estes achados estão de acordo com as alterações encontradas nas fotomicrografias das células MDCK as quais apresentaram as mesmas alterações visualizadas com o veneno total de *B. erythromelas*.

O aumento na concentração das PLA_2 Lys 49 e Asp 49 causou uma redução da viabilidade celular. Diferenças na suscetibilidade podem estar relacionadas à existência de sítios específicos na membrana plasmática similares aos encontrados em células musculares esqueléticas. O estudo demonstrou que as frações Lys 49 e Asp 49 são citotóxicas e exibem atividade farmacológica independente da presença de atividade catalítica.

Os resultados indicaram efeito citotóxico das frações Lys 49 e Asp 49 de *B. erythromelas* em cultura de células MDCK estando de acordo com os resultados de Bonfim *et al.* (2009) o qual investigaram a citotoxicidade das fosfolipases A_2 D49 (Asp 49) e K49 (Lys 49) do veneno de *Bothrops jararacussu* em linhagem de células fibroblásticas.

A PLA_2 Lys 49 causou citotoxicidade a baixas doses enquanto a fração Asp 49 apresentou efeito citotóxico significativo apenas em concentrações elevadas. Estes resultados estão de acordo com os experimentos de Cintra-Francischinelli *et al.* (2009) o qual investigaram a ação das miotoxinas Lys 49 e Asp 49 de *Bothrops asper* e *Bothrops jararacussu* em células musculares. Os pesquisadores demonstraram que ambas as miotoxinas causaram morte celular embora a Lys 49 apresentasse ação citotóxica mais direta e rápida que a Asp 49.

As PLA_2 Lys 49 e Asp 49 exibiram efeitos similares na viabilidade celular em cultura de células MDCK. Esses achados estão de acordo com os estudos de Lomonte *et al.* (1999) o qual demonstraram que a atividade citolítica das classes de PLA_2 miotóxicas (Lys 49

e Asp 49) é a mesma, e é independente da atividade enzimática intrínseca *in vitro* destas proteínas.

Alguns estudos têm demonstrado que a citotoxicidade da PLA₂ Lys 49 em vários tipos de células é independente da hidrólise dos fosfolipídios de membrana (LOMONTE *et al.*, 1999; MORA *et al.*, 2005, 2006). No caso da Lys 49 a atividade citotóxica tem sido associada com uma modificação nos resíduos catiônicos e hidrofóbicos localizados na região C-terminal (LOMONTE *et al.*, 1994b; NÚÑEZ *et al.*, 2001; CHIOATO *et al.*, 2002). Assim, Lys 49 constitui um modelo interessante para a investigação de uma variedade de efeitos celulares independente da hidrólise dos fosfolipídios de membrana.

Ambas PLA₂ utilizadas no estudo apresentaram ação citotóxica em células MDCK. Assim como no modelo de rim isolado de rato, atribuiu-se que a PLA₂ Asp 49 tem sua ação associada a seu sítio catalítico enquanto que a região C-terminal da PLA₂ Lys 49 tem um papel crucial nos efeitos observados.

Para investigar se as frações Lys 49 e Asp 49 de *B. erythromelas* foram capazes de alterar a integridade da membrana avaliou-se a liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) pelas células MDCK.

Nos grupos tratados com a fração Asp 49 de *B. erythromelas* não foi observada liberação estatisticamente significativa de LDH indicando que não houve ruptura da membrana celular. Como a perda da integridade da membrana é acompanhada pelo aumento da liberação de LDH, pode-se sugerir que a morte celular é consequência de apoptose e não de necrose.

A fração Lys 49 apresentou liberação estatisticamente significativa de LDH apenas na concentração de 100µg/mL sugerindo que a morte celular ocorre via necrose e não via apoptose. Em geral a apoptose ocorre a baixas doses do agente tóxico enquanto a necrose requer altas doses (MORA *et al.*, 2005; SERVAIS *et al.*, 2005, 2008). As características predominantes de um ou outro tipo de morte geralmente são determinadas pela intensidade e não pela especificidade do estímulo (ORRENIUS *et al.*, 1992; DYPBUKT *et al.*, 1994; BONFOCO *et al.*, 1995; COTRAN *et al.*, 2000).

Com base nas afirmações acima e na observação de que não ocorreu liberação estatisticamente significativa de LDH a baixas doses da fração Lys 49, pode-se propor que a morte celular é consequência de apoptose. Estes resultados estão de acordo com os experimentos de Mora *et al.* (2005) o qual investigaram a ação da miotoxina Lys 49 de *Bothrops asper* em linhagem de células linfoblastóides. O estudo demonstrou que a PLA₂ Lys 49 foi capaz não apenas de induzir dano à membrana e necrose, mas também de promover apoptose e proliferação celular. Em concentrações mais elevadas ocorreu predominantemente

necrose enquanto que a baixas concentrações ocorreu apoptose. Assim, dependendo da concentração usada observaram-se diferentes efeitos em uma mesma linhagem celular.

O estudo com as frações Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* demonstrou que ambas as PLA₂ apresentam efeito citotóxico em células MDCK estando de acordo com os resultados de Lobner (2000) o qual comparou os ensaios de MTT e LDH para quantificar a morte celular e determinar se a morte de neurônios ocorria via apoptose ou necrose. Seus experimentos determinaram com precisão a morte de neurônios via apoptose.

A partir dos resultados encontrados pode-se sugerir que a morte celular ocasionada por ambas as frações Lys 49 e Asp 49 é consequência de apoptose o que viria confirmar os achados histológicos encontrados em rins perfundidos com ambas as frações do veneno. Estudos posteriores com a fração Lys 49 na concentração de 100µg/mL poderia confirmar se a morte celular é realmente consequência de necrose.

Diversos estudos demonstraram o envolvimento das PLA₂ no processo apoptótico (CUMMINGS *et al.*, 2000; TAKETO; SONOSHITA, 2002; AKIBA; SATO, 2004; BALSINDE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; CHU *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; CHIRICOZZI *et al.*, 2010; LEI *et al.*, 2010a, 2010b).

A correlação entre a hidrólise dos fosfolípidios de membrana e os efeitos citotóxicos da PLA₂ tem sido postulada (HUMES *et al.*, 1989; KUWATA *et al.*, 1999; KOHJIMOTO *et al.*, 2000; ZAGER *et al.*, 2001; FAROOQUI *et al.*, 2004; CARO; CEDERBAUM, 2006; VILLALOBOS *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm sugerido que as PLA₂ são importantes durante o processo de apoptose em decorrência da liberação de ácido araquidônico que, por sua vez, seria convertido em prostaglandinas ou leucotrienos apoptóticos (ATSUMI *et al.*, 2000; PENZO *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2004; MAIA *et al.*, 2006).

Várias PLA₂ isoladas a partir de venenos de serpentes induzem apoptose em diversos tipos de células (HERKERT *et al.*, 2001; TAKETO; SONOSHITA, 2002; SHAKHMAN *et al.*, 2003; MORA *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2007; GEORGIEVA *et al.*, 2008).

Alguns estudos com PLA₂ Asp 49 (HERKERT *et al.*, 2001; SHAKHMAN *et al.*, 2003; DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006) e Lys 49 (MORA *et al.*, 2005, 2006; LIU *et al.*, 2009; MURAKAMI *et al.*, 2011) de venenos de serpentes demonstraram seu envolvimento na apoptose em diferentes linhagens celulares.

A participação da apoptose na IRA não está totalmente esclarecida (VIERA, 2001). Estudos posteriores com as frações PLA₂ Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides*

erythromelas em células MDCK utilizando os mesmos mediadores moleculares da apoptose (Caspase-8, Caspase-3, *Bax*, *Mcl-1* e *Bcl-X_L*) utilizados para o veneno total poderiam vir esclarecer o mecanismo responsável pela apoptose e a participação das frações nos efeitos observados com o veneno total.

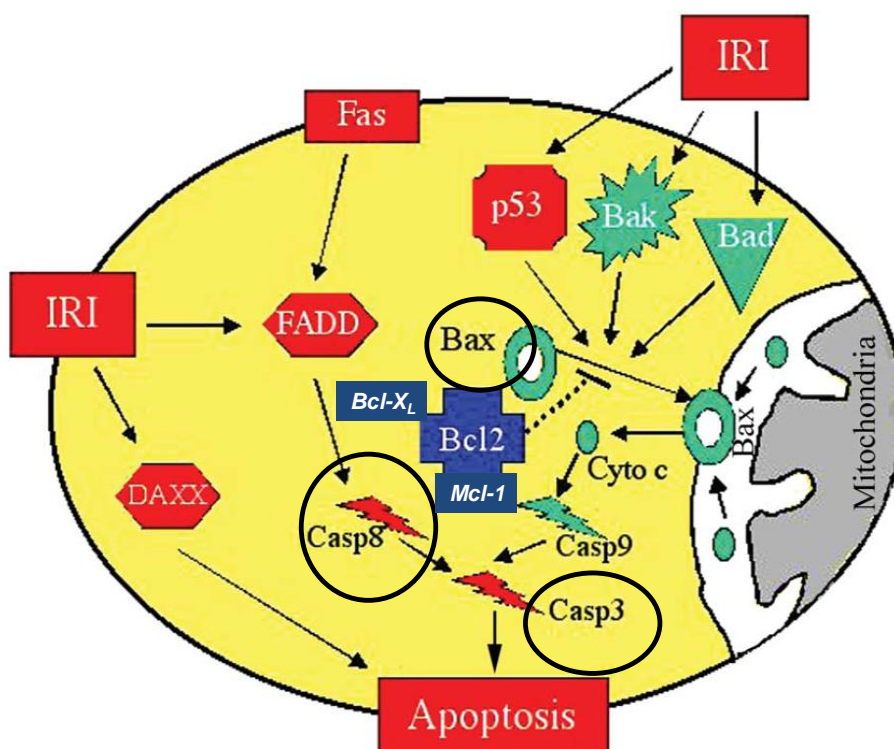
QUADRO 05 – Resumo dos efeitos renais do veneno total e das frações Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* em rim isolado de rato.

Parâmetros Funcionais	Efeitos observados Veneno Total	Efeitos observados Lys 49	Efeitos observados Asp 49
PP	↓	↑	-
RVR	↓	-	-
FU	↑	↑	-
RFG	↓ / ↑	↓	-
%TNa ⁺	↓	↓	-
%TK ⁺	↓	-	-
%TCI ⁻	↓	-	-
%pTNa ⁺	↓	-	-
%pTK ⁺	↓	-	↓
%pTCI ⁻	↓	-	-
ENa ⁺	↑	↑	-
EK ⁺	↓ / ↑	↑	↑
ECl ⁻	↑	-	-
<i>C_{osm}</i>	↑	↑	-

QUADRO 06 – Resumo dos efeitos do veneno total e das frações Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* em células MDCK.

Parâmetros Analisados	Efeitos observados Veneno Total	Efeitos observados Lys 49	Efeitos observados Asp 49
Viabilidade celular	↓	↓	↓
Liberação de LDH	NÃO	SIM	NÃO
Apoptose	SIM	SIM (?)	SIM (?)
Necrose	NÃO	SIM (?)	NÃO

FIGURA 33 – Resumo da expressão de genes nas vias de sinalização da apoptose.



Fonte: DEVARAJAN *et al.*, 2003.

Os genes pró-apoptóticos da via extrínseca são mostrados em vermelho enquanto que os genes da via intrínseca são mostrados em verde. Os genes antiapoptóticos da família *Bcl-2* são mostrados em azul.

A figura foi modificada pela autora da Tese a qual circulei os genes pró-apoptóticos (*Caspase-3*, *Caspase-8* e *Bax*) e introduzi os genes antiapoptóticos da família *Bcl-2* (*Bcl-X_L*, *Mcl-1*) mostrados em azul.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

➤ O veneno de *Bothropoides erythromelas* (10µg/mL) causou nefrotoxicidade direta no modelo de rim isolado de rato comprovada através da alteração dos parâmetros funcionais renais e da análise histológica do tecido renal a qual mostrou lesões em glomérulos e túbulos.

➤ O veneno de *B. erythromelas* causou efeito citotóxico em células MDCK nas concentrações de 50 e 100µg/mL (IC₅₀ = 93,31µg/mL) evidenciado através da diminuição da viabilidade celular e das alterações morfológicas visualizadas em fotomicrografias.

➤ A ação citotóxica observada com o veneno não promoveu a lise das membranas celulares das células MDCK sugerindo que a morte celular é consequência de apoptose e não de necrose.

➤ Estudos com os mediadores moleculares (Caspase-8, Caspase-3, *Bax*, *Mcl-1* e *Bcl-X_L*) envolvidos na injúria renal demonstraram que o veneno de *Bothropoides erythromelas* (46,65 e 23,32µg/mL) causou apoptose em células MDCK provavelmente através da via extrínseca ou dos receptores de morte.

➤ Estudos posteriores com os componentes purificados do veneno de *Bothropoides erythromelas* poderão esclarecer quais as frações responsáveis pelos efeitos observados.

➤ Ambas as frações Lys 49 e Asp 49 (5µg/mL) causaram efeito nefrotóxico no modelo de rim isolado de rato comprovado através das alterações dos parâmetros renais e da análise histológica do tecido renal a qual mostrou lesões tanto glomerulares como tubulares.

➤ A fração Lys 49 apresentou um efeito similar ao veneno total nos parâmetros FU, %TNa⁺, ENa⁺, EK⁺ e *C_{osm}*.

➤ A fração Asp 49 apresentou uma diminuição significativa no %pTK⁺ e um aumento na EK⁺. Estes efeitos foram similares aos apresentados pelo veneno total.

➤ Quando comparadas as análises histológicas das frações Lys 49 e Asp 49 com o veneno total de *B. erythromelas*, observou-se efeitos similares nos glomérulos e túbulos renais.

➤ A análise histológica demonstrou que as frações Lys 49 e Asp 49 são citotóxicas com efeitos similares nos glomérulos e túbulos renais, porém com diferentes modos de ação.

➤ As frações Lys 49 e Asp 49 do veneno de *B. erythromelas* causaram efeito citotóxico em células MDCK nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL ($IC_{50} = 38,29\mu\text{g/mL}$) e 50 e 100µg/mL ($IC_{50} = 158\mu\text{g/mL}$) respectivamente, evidenciado através diminuição da viabilidade celular e das alterações morfológicas visualizadas em fotomicrografias.

➤ Fotomicrografias das células MDCK com as frações Lys 49 e Asp 49 apresentaram as mesmas alterações visualizadas com o veneno total de *B. erythromelas*.

➤ A ação citotóxica observada com a Asp 49 não promoveu a lise das membranas celulares das células MDCK sugerindo que a morte celular é consequência de apoptose e não de necrose.

➤ A fração Lys 49 apresentou liberação estatisticamente significativa de LDH apenas na concentração de 100µg/mL sugerindo que a morte celular é consequência de necrose e não de apoptose. Em geral a apoptose ocorre a baixas doses do agente tóxico enquanto a necrose requer altas doses.

➤ Com base na observação de que não ocorreu liberação estatisticamente significativa de LDH a baixas doses da fração Lys 49, pode-se propor que a morte celular é consequência de apoptose.

➤ A partir dos resultados encontrados pode-se sugerir que a morte celular ocasionada por ambas as frações Lys 49 e Asp 49 é consequência de apoptose o que viria confirmar os achados histológicos encontrados em rins perfundidos com as frações do veneno.

➤ Estudos posteriores com a fração Lys 49 na concentração de 100µg/mL poderia confirmar se a morte celular é realmente consequência de necrose.

➤ Estudos posteriores com as frações Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* em células MDCK utilizando os mesmos mediadores moleculares da apoptose (Caspase-8, Caspase-3, *Bax*, *Mcl-1* e *Bcl-X_L*) utilizados para o veneno total poderiam vir esclarecer o mecanismo responsável pela apoptose e a participação das frações nos efeitos observados com o veneno total.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- O veneno total e as frações Lys 49 e Asp 49 de *Bothropoides erythromelas* possuem ação nefrotóxica e citotóxica.

- O veneno de *Bothropoides erythromelas* causou morte celular via apoptose provavelmente através da via extrínseca ou dos receptores de morte.

- Estudos posteriores com as frações Lys 49 e Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* sobre a expressão de genes pró e antiapoptóticos utilizados para o veneno total poderiam vir esclarecer o mecanismo responsável pela apoptose e a participação das frações nos efeitos observados com o veneno.

- Estudos utilizando o modelo de rim isolado de rato e cultura de células MDCK podem auxiliar na compreensão do mecanismo de ação responsável pela nefrotoxicidade e no desenvolvimento de fármacos com capacidade de prevenir a morte celular causada por uma variedade de injúrias teciduais produzidas por venenos de serpentes, assim como o desenvolvimento de substâncias com valor terapêutico.

- A compreensão dos mecanismos apoptóticos associados aos envenenamentos ofídicos permitirá o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABUELO, G. J. Diagnosing vascular causes of renal failure. **Ann. Inter. Med.**, v. 123, n. 8, p. 601-614, 1995.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335-393, 2002.
- AIRD, S. D. Chromatographic behavior of *Bothrops erythromelas* phospholipase and other venom constituents on Superdex 75. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, v. 34, n. 4, p. 345-364, 2004.
- AKIBA, S.; SATO, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 8, p. 1174-1178, 2004.
- ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.; GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, n. 4, p. 542-550, 2008.
- AMARAL, A. New genera and species of snakes. **Proc. N. Engl. Zool. Club**, v. 8, p. 85-105, 1923.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidente ofídico botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.28, n. 4, p.220-227, 1986.
- AMBROSIO, A. L.; NONATO, M. C.; DE ARAÚJO, H. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 8, p. 7326-7335, 2005.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007. Disponível em: <<http://www.metrocamp.com.br/pesquisa>>. Acesso em: 08 set. 2010.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicol.**, v. 188, n. 2/3, p. 261-274, 2003a.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicol.**, v. 203, n. 1/3, p. 123-137, 2003b.

ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 2006.

ANDRADE-FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. Ofidismo: toxicologia na prática clínica. **Folium Comunicação**, Belo Horizonte, p. 229-241, 2001.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venom: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie.**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

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

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

ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L. D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) mummifer* snake venom, a new Lys 49 phospholipase A₂ homologue. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.32, n. 1, p. 63-71, 2000.

ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondrial is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL60 cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2001.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidente ofídico botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.

ARAKI, S.; MASUDA, S.; MAEDA, H.; YING, M. J.; HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 535-542, 2002.

ARAÚJO, M. S.; MARTINS, M. The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperiadae). **Braz. J. Biol.**, v. 67, n. 2, p. 327-332, 2007.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂: a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJIMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 24, p. 18248-18258, 2000.

BAETU, T. M.; HISCOTT, J. On the TRAIL to apoptosis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n. 3, p. 199-207, 2002.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med. (Fremantle)**, v. 13, n. 1, p. 28-36, 2001.

BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M. A. Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1344-1350, 2006.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett.**, v. 531, n. 1, p. 2-6, 2002.

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

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; ALVES, R. S.; AMORA, D. N.; MARTINS, R. D.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NASCIMENTO, N. R. F.; ROCHA, V. L. C.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 831-837, 2006.

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 376-386, 2005.

BÁRDI, E.; BOBOK, I.; V OLÁH, A.; KAPPELMAYER, J.; KISS, C. Anthracycline antibiotics induce acute renal tubular toxicity in children with cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 13, n. 3, p. 249-253, 2007.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq. Bras. Med.**, v. 65, n. 4, p. 345-355, 1991.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **J. Bras. Med.**, v. 65, n. 4, p. 209-250, 1993.

BARRAVIERA, B. Acidentes ofídicos. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. cap. 129, p. 1561-1577.

BELTON, O., FITZGERALD, D. J. Cyclooxygenase isoforms and atherosclerosis. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 5, n. 9, p. 1-18, 2003.

BÉRNILS, R. S. (Org.). **Brazilian reptiles – List of species**. 2010. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>>. Acesso em: 08 sept. 2010.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BOCCCELLINO, M.; PEDATA, P.; CASTIGLIA, L.; LA PORTA, R.; PIERI, M.; QUAGLIUOLO, L.; ACAMPORA, A.; SANNOLO, N.; MIRAGLIA, N. Doxorubicin can penetrate nitrile gloves and induces apoptosis in keratinocytes cell lines. **Toxicol. Lett.**, v. 197, n. 2, p. 61-68, 2010.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003a.

BOCHNER, R., STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informações. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 735-746, 2003b.

BOECHAT, A. L. R.; PAIVA, C. S.; FRANÇA, F. O.; DOS-SANTOS, M. C. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 7-14, 2001.

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

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

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

BONFIN, V. L.; DE CARVALHO, D. D.; PONCE-SOTO, L. A.; KASSAB, B. H.; MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A₂ D-49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 25, n. 6, p. 523-532, 2009.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCROMA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 92, n. 16, p. 7162-7166, 1995.

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

BORTOLETO-BUGS, R. K.; NETO, A. A.; WARD, R. J. Activation of Ca²⁺-independent membrane-damaging activity in Lys49-phospholipase A₂ promoted by amphiphilic molecules. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 322, n. 2, p. 364-372, 2004.

BORGES-NOJOSA, D. M.; LIMA-VERDE, J. S. *Lachesis muta rhombeata* Geographical Distribution. **Herpetol. Rev.**, v. 30, n. 4, p. 235, 1999.

BORNER C. The *Bcl-2* protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, v. 39, n. 11, p. 615-647, 2003.

BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. **Textbook of Pharmacology**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980.

BRADY, H. R.; BRENNER, B. M. Acute Renal Failure. In: _____. **Harrison's: Principles of Internal Medicine**. 14th ed. New York: McGraw-Hill, 1998. cap. 20.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; BARBOSA, P. S. F.; OLIVEIRA, I. M. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; FILHO, E. B. S. D.; FAGUNDES, F. H. R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p.181-190, 2008.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S. F.; ALVES, R. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859-867, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em:< www.ebah.com.br/manual-de-diagnostico-e-tratamento-de-acidente-por-animaispeconhentos-pdf>. Acesso em: 08 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2010. Disponível em:< www.ebah.com.br/manual-de-diagnostico-e-tratamento-de-acidente-por-animaispeconhentos-pdf>. Acesso em: 03 out. 2010.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9/10, p. 851-859, 2000.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BRONNER, M. P.; CULIN, C.; REED, J. C.; FURTH, E. E. The *bcl-2* proto-oncogene and the gastrointestinal tumor progression model. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 20-26, 1995.

BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BUCKLAND, A. G.; WILTON, D. C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, n. 1/2, p. 71-82, 2000.

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

BYDŁOWSKI, S. P. Bioquímica e fisiologia dos Eicosanóides. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). **Patofisiologia geral, mecanismos das doenças**. São Paulo: Robe Editorial, 2000. p. 528-529.

CALDERÓN, L.; LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 358, n. 2, p. 343-350, 1998.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2008.

CALVETE, J. J.; JUARÈZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CÂMARA, P. R.; ESQUISATTO, L. C.; CAMARGO, E. A.; RIBELA, M. T.; TOYAMA M. H.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory o edema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 823-829, 2003.

CAMARGO, S. M. R.; SCHOR, N. Apoptose/Necrose: regeneração celular. In: SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. (Ed.). **Bases moleculares da nefrologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 3, cap. 15, p. 149-158.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Cornell Univ., 1989.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca, New York: Cornell Univ Press., 2004.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Role of cytochrome P450 in phospholipase A₂ and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, n. 3, p. 364-375, 2006.

CARROLL, M. A.; MCGIFF, J. C. A new class of lipid mediators: cytochrome P450 arachidonate metabolites. **Thorax**, v. 55, Suppl. 2, p. S13-16, 2000.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 7/8, p. 843-856, 2004.

CASTRO, I. Study of toxicity of crotalic and botropic species in ofidic accidents, with an emphasis in renal toxicity. **O mundo da saúde São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 2006.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. **Zoonoses no Ceará um desafio a vencer**. Fortaleza, 1991.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos ocorridos nos últimos cinco anos no estado do Ceará**. Fortaleza, 2003.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, n. 6, p. 667- 678, 2003.

CHAIM, O. M. **Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermédia*) com ênfase no efeito nefrotóxico**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 211, n. 1, p. 64-77, 2006.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. **Cell. Signal.**, v.15, n. 7, p. 637-665, 2003.

CHAN, A. B., ALLEN, C. N., SIMMONS, N. L., PARSONS, M. E., HIRST, B. H. Resistance to acid of canine kidney (MDCK) and human colonic (T84) and ileo-caecal (HCT-8) adenocarcinoma epithelial cell monolayers *in vitro*. **Q. J. Exp. Physiol.**, v. 74, n. 4, p. 553-556, 1989.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. 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.; LEÓN, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp 49 myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the Snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1861-1869, 1998.

CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p.1634-1635, 2002.

CHEN, S. C.; CHEN, C. H.; CHERN C. L.; HSU, L. S.; HUANG, Y. C.; CHUNG, K. T.; CHYE, S. M. p-Phenylenediamine induces p53-mediated apoptosis in Mardin-Darby canine kidney cells. **Toxicol. in Vitro**, v. 20, n. 6, p. 801-807, 2006.

CHENG, M. K.; DOUMAD, A. B.; JIANG, H.; FALCK, J. R.; McGIFF, J. G.; CARROL, M. A. Epoxyeicosatrienoic acids mediate adenosine-induced vasodilation in rat preglomerular microvessels (PGMV) via A_{2A} receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 3, p. 441-448, 2004.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. **Biochem. J.**, v. 366, Pt. 3, p. 971-976, 2002.

CHIOATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipase A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 869-883, 2003.

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

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

CHIRICOZZI, E.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, S.; NARDICCHI, V.; ALMEIDA, A.; BOLAMOS, J. P.; GORACCI, G. Group IIA secretory phospholipase A₂ (GIIA) mediates apoptotic death during NMDA receptor activation in rat primary cortical neurons. **J. Neurochem.**, v. 112, n. 6, p. 1574-1583, 2010.

CHU, S. T.; CHENG, H. H.; HUANG, C. J.; CHANG, H. C.; CHI, C. C.; SU, H. H.; HSU, S. S.; WANG, J. L.; CHEN, I. S.; LIU, S. I.; LU, Y. C.; HUANG, J. K.; HO, C. M.; JAN, C. R. Phospholipase A₂-independent Ca²⁺ entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. **Life Sci.**, v. 80, n. 4, p. 364-369, 2007.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 32, p. 14140-14145, 2010a.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. **Toxicon**, v. 55, n. 2/3, p. 590-596, 2010b.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PONCE-SOTO, L. A.; ROSSETTO, O.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; POZZAN, T.; MONTECUCCO, C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 10, p. 1718-1728, 2009.

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

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

COLLARES-BUZATO, C. B.; JEPSON, M. A.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 85-92, 1998.

COLLARES-BUZATO, C. B.; MCEWAN, G. T. A.; JEPSON, M. A.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca^{2+} in cultured epithelia. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1222, n. 2, p. 147-158, 1994.

COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 416, n. 2, p.171-179, 2003.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ-HÖFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. F. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhã) venom and a phospholipase A₂-containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, n. 1, p. 185-195, 2001.

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R. G. Phospholipase A₂ in cell injury and death. **JPET**, v. 294, n. 3, p. 793-799, 2000.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods**, v. 265, n. 1/2, p. 49-72, 2002.

DAGHER, P. C.; HERGET-ROSENTHAL, S.; RUEHM, S. G.; SANG-KYUNG, S.; STAR, R. A.; AGARWAL, R.; MOLITORIS, B. A. Newly Developed Techniques to Study and Diagnose Acute Renal Failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, n. 8, p. 2188-2198, 2003.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537-540, 1996.

DAMIANI, D. **Mecanismos da Apoptose**. 2004. Disponível em: <http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=202&materiaver=1>. Acesso em: 08 set. 2010.

DAMICO, D. C.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A₂ (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 678-692, 2007.

DANIEL P. T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, n. 7, p. 1022-1032, 2001.

DANTAS, R. T. **Avaliação dos efeitos renais da fração L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops marajoensis***. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

DA SILVA, M. M. S. **Estudo da variabilidade intraespecífica da peçonha de *Bothrops erythromelas* AMARAL, 1926 (Jaraca Malha de Cascavel)**. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 251-255, 2003.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L. V.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 3, p. 377-384, 2006.

DEBATIN, K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. **Toxicol. Lett.**, v. 112-113, p. 41-48, 2000.

DE CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. *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 CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipase A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, n. 12, p. 1773-1785, 2000.

DECORTI, G.; PELOSO, I.; FAVARIN, D.; KLUGMANN, F. B.; CANDUSSIO, L.; CRIVELLATO, E.; MALLARDI, F.; BALDINI, L. Handling of doxorubicin by the LLC-PK₁ kidney epithelial cell line. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 286, n. 1, p. 525-530, 1998.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem. Rev.**, v. 102, n. 12, p. 4489-4500, 2002.

DENG, X., WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. A. Role of nitric oxide in short term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics. **Hypertension**, v. 27, n. 5, p. 1173-1179, 1996.

- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.
- DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, A. L. Structural and pharmacological features of phospholipases A₂ from snake venoms. **Prot. Pep. Lett.**, v. 16, n. 8, p. 899-907, 2009.
- DEVARAJAN, P.; MISHRA, J.; SUPAVEKIN, S.; PATTERSON, L. T.; STEVEN POTTER, S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. **Mol. Genet. Metab.**, v. 80, n. 4, p. 365-376, 2003.
- DESAGHER, S.; MARTINO, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell. Biol.**, v. 10, n. 9, p. 369-376, 2000.
- DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 151-156, 2008.
- DEVARAJAN, E.; SAHIN, A. A.; CHEN, J. S.; KRISHNAMURTHY, R. R.; AGGARWAL, N.; BRUN, A. M.; SAPINO, A.; ZHANG, F.; SHARMA, D.; YANG, X. H.; TORA, A. D.; MEHTA, K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8843-8851, 2002.
- DÍAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipase A₂ role of negatively charge phospholipids as potential membrane binding sites. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391, n. 1, p. 56-64, 2001.
- DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 520-528, 2005.
- DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M. The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, n. 8, p. 887-893, 2009.
- DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol.**, v. 167, n. 2, p. 106-116, 2009.
- DOUGLAS, C. R. Patofisiologia da insuficiência renal aguda. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). **Patofisiologia de sistema renal**. São Paulo: Robe editorial, 2001. p. 272-274.
- DOUGLAS, C. R. Patofisiologia do processo inflamatório. In: DOUGLAS, C. R. (Ed.). **Patofisiologia geral, mecanismo das doenças**. São Paulo: Robe editorial, 2000. p. 549.
- DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCORONA, M.; BURKITT, M.; SJÖHOLM, A.; STRÖM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 48, p. 30553-30560, 1994.

EISCHEN, C. M. et al. EISCHEN, C. M.; KOTTKE, T. J.; MARTINS, L. M.; BASI, G. S.; TUNG, J. S.; EARNSHAW, W. C.; LEIBSON, P. J.; KAUFMANN, S. H. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. **Blood**, n. 90, v. 3, p. 935-943, 1997.

EOM, Y. W.; KIM, M. A.; PARK, S. S.; GOO, M. J.; KWON, H. J.; SOHN, S.; KIM, W. H.; YOON, G.; CHOI, K. S. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. **Oncogene**, v. 24, n. 30, p. 4765-4777, 2005.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; DE NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

ESTEVÃO-COSTA, M. I.; ROCHA, B. C.; DE ALVARENGA MUDADO, M.; REDONDO, R.; FRANCO, G. R.; FORTES-DIAS, C. L. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous γ phospholipase A₂ inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 122-129, 2008.

FAN, L. L.; SUN, G. P.; WEI, W.; WANG, Z. G.; GE, L.; FU, W. Z.; WANG, H. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 12, p. 1473-1481, 2010.

FAROOQUI, A. A.; ONG, W. Y.; HORROCKS, L. A. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A₂. **Neurochem. Res.**, v. 29, n. 11, p. 1961-1977, 2004.

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará – Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

FENWICK, A. M.; RONALD, L.; GUTBERLET, J. R. R.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.**, n. 156, v. 3, p. 617-640, 2009.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflügers Arch.**, v. 441, n. 2/3, p. 287-293, 2000.

FERREIRA, L. A.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 33-40, 1992.

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Mitochondria- the suicide organelles. **Bioessays**, v. 23, n. 2, p. 111-115, 2001a.

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 11, p. E255-263, 2001b.

FISHER, D. E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 15, n. 5, p. 931-956, 2001.

FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S. LYS49 phospholipase A₂ myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1549-1555, 1998.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCHESCHI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1551-1559, 1993.

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

FONTELES, M. V. C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim solado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal**. 1980. 121 f. Tese (Pós-Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J.; WERTHEIM, S. J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n. 3, p. F235-246, 1983.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S. A.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2, Pt. 2, p. F191-197, 1998.

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, v. 90, n. 3, p. 159-161, 1982.

FONTELES, M. C. C.; VILLAR-PALLASI, C.; FANG, G.; LARNER, J.; GUERRANT, R. L. Partial characterization of an ANF/urodilatin-like substance released from perfused rabbit kidney under hypoxia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, n. 1, p. 75-79, 1993.

FORTE-DIAS, C. L.; JANNOTTI, M. L. D.; FRANCO, F. J. L.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 12, p. 1747-1759, 1999.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, J. R. V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 72-86.

FRANCESCHI, A.; RUSCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, n. 1, p. 63-77, 2000.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmacol.**, v. 20, n. 7, p. 1549-1556, 1971.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.

GALBIATTI, C.; LEITE, G. B.; MARANGONI, S.; PONCE-SOTO, L.; CAVALCANTE, W. L. G.; BONFIM, V. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of a Phospholipase A₂ from *Bothrops marajoensis* venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 321, 2007.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Human neutrophil migration *in vitro* induced by secretory phospholipase A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 1, p. 65-72, 2002.

GAMEN, S.; ANEL, A.; PÉREZ-GALÁN, P.; LASIERRA, P.; JOHNSON, D.; PIÑEIRO, A.; NAVAL, J. Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltatapsim loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 258, n. 1, p. 223-235, 2000.

GEORGIEVA, D.; RISCH, M.; KARDAS, A.; BUCK, F.; VON BERGEN, M.; BETZEL, C. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 3, p. 866-886, 2008.

GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Hum. Pathol.**, v. 32, n. 10, p. 1029-1038, 2001.

GLASER, K. B.; MOBILIO, D.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. Secretory phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, n. 3, p. 92-98, 1993.

GOMEZ, S. I.; STRICK, D. M.; ROMERO, J. C. Role of nitric oxide and prostaglandin in the maintenance of cortical and renal medullary blood flow. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n.2, p. 170-175, 2008.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. *Bcl-XL* prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 15, p. 5680-5689, 2000.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**, v. 10, n. 3/4, p. 147-161, 2001.

GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, n. 10, n. 3/4, p. 231-239, 2000.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-629, 2004.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.

GRIMM, P. R.; SANSOM, S. C. BK channels in the kidney. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 16, n. 5, p. 430-436, 2007.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 44-54, 2006.

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

GU, R. M.; WANG, W. H. Arachidonic acid inhibits K channels in basolateral membrane of the thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol.**, v. 283, n. 3, p. F407-414, 2002.

GUIMARÃES, J. A.; FONSECA-NETO, M. D.; ROUQUAYROL, M. Z.; LIMA-VERDE, J. S. **Acidentes ofídicos: identifique-trate**. Fortaleza: Centro de Atendimento Toxicológico, 1989.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J. Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 15-20, 2003.

GUPTA, S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Life Sci.**, v. 69, n. 25/26, p. 2957-2964, 2001.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, S.; GENE, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 735-745, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997a. p. 321-352.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1997b.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 28, p. 2935-2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PloS Med.**, v. 3, n. 6, p. 727-731, 2006.

HACKENTAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D.; TAUGNER, R. Morphology, physiology and molecular biology of rennin secretion. **Physiol. Rev.**, v. 70, n. 4, p. 1067-1116, 1990.

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

HANSON, R. W.; BALLARD, F. S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid. Res.**, v. 9, n. 5, p. 667-668, 1968.

HARBELL, J. W.; KOONTZ, S. W.; LEWIS, R. W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell toxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, n. 1, p. 79-126, 1997.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Prática Médica**. 11. ed. New York: McGraw-Hill; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

HARDY D. L.; HAAD, J. J. S. A review of venom toxinology and epidemiology of envenoming of the bushmaster (*Lachesis*) with report of a fatal bite. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, v. 33, n. 6, p. 113-123, 1998.

HARRINGTON, H. A.; HO, K. L.; GHOSH, S.; TUNG, K. C. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. **Theor. Biol. Med. Model.**, v. 5, n. 26, p. 1-15, 2008.

HAVT, A. **Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente Bothrops jararacussu em ratos**. 1999. 161f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1841-1846, 2001.

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

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HEBERT, S. C. An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). **Kidney Int.**, v. 48, n. 4, p. 1010-1016, 1995.

HERKERT, M.; SHAKHMAN, O.; SCHWEINS, E.; BECKER, C. M. Beta-bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor-mediated internalization. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 5, p. 821-828, 2001.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603-2614, 2001.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie.**, v. 89, n. 3, p. 319-328, 2007.

HIRANO, J.; NAKAMURA, K.; ITAZAWA, S.; SOHMA, Y.; KUBOTA, T.; KUBOKAWA, M. Modulation of the Ca²⁺-activated large conductance K⁺ channel by intracellular pH in human renal proximal tubule cells. **Jpn J. Physiol.**, v. 52, n. 3, p. 267-276, 2002.

HONDEGHEM, L. M.; RODEN, D. M. Drogas utilizadas nas arritmias cardíacas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 193-215.

HUMES, H. D.; NGUYEN, V. D.; CIESLINSKI, D. A.; MESSANA, J. M. The role of free fatty acids in hypoxia-induced injury to renal proximal tubule cells. **Am. J. Physiol.**, v. 256, n. 4, Pt. 2, p. F688-696, 1989.

HUNTER, M.; LOPES, A. G.; BOULPAEP, E.; GIEBISCH, G. Regulation of single potassium ion channels from apical membrane of rabbit collecting tubule. **Am. J. Physiol.**, v. 251, n. 4, Pt. 2, p. F725-733, 1986.

IMIG J. D.; NAVAR L. G. Afferent arteriolar response to arachidonic acid: involvement of metabolic pathways. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 1, p. 87-93, 1996.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 1999.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A.; O'CONNELL, J.L. Prognostic factor for amputation in the case of envenoming by snake of the *Bothrops* genus (*Viperidae*). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 93, n. 4, p. 401-408, 1999.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, M. L.; KUSANO, E. J. U.; MENDONÇA, J. S. Bacteriology of abscesses complicating *Bothrops* snake bite in humans: a prospective study. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 743-788, 1994.

JOSEPH, R.; PAHARI, S.; HODGSON, W. C.; KINI, R. M.. Hipotensive agents from snake venoms. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.**, v. 4, n. 4, p. 437-759, 2004.

JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genet.**, v. 18, n. 3, p. 142-149, 2002.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; HO, P. L. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p.571-575, 2004.

KAHLE, K. T.; WILSON, F. H.; LENG, Q.; LALIOTI, M. D.; O'CONNELL, A. D.; DONG, K.; RAPSON A. K.; MACGREGOR, G. G.; GIEBISCH, G.; HEBERT, S. C.; LIFTON, R. P. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion. **Nat. Genet.**, v. 35, n. 4, p. 372-376, 2003.

KAMANNA, V. S.; BASSA, B. V.; GANJI, S. H.; ROH, D. D. Bioactive lysophospholipids and mesangial cell intracellular signaling pathways: role in the pathobiology of kidney disease. **Histol. Histopathol.**, v. 20, n. 2, p. 603-613, 2005.

KAWAHARA, K.; OGAWA, A.; SUZUKI, M. Hyposmotic activation of Ca-activated K channels in cultured rabbit kidney proximal tubule cells. **Am. J. Physiol.**, v.260, n. 1, Pt. 2, p. F27-33, 1991.

KIM, H. S.; LEE, Y. S.; KIM, D. K. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. **Pharmacol.**, v. 84, n. 5, p. 300-309, 2009.

KIM, H.; YOON, S. C.; LEE, T. Y.; JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicol. Lett.**, v. 184, n. 1, p. 13-17, 2009.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 895-905, 1986.

KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KOHJIMOTO, Y.; HONEYMAN, T. W.; JONASSEN, J.; GRAVEL, K.; KENNINGTON, L.; SCHEID, C. R. Phospholipase A₂ mediates immediate early genes in cultured renal epithelial cells: possible role of lysophospholipid. **Kidney Int.**, v. 58, n. 2, p. 638-646, 2000.

KRAMER, H. J.; STINNESBECK, B. A.; KLAUTKE, H. J.; KIPNOWSKI, J., GLAENZER, K. and DUESING, R. Interaction of renal prostaglandin with the renin-angiotensin and renal adrenergic nervous system in healthy subjects during dietary changes in sodium intake. **Clin. Sci.**, v. 68, n. 4, p. 387-393, 1985.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v.202, n. 3, p.1165-1168, 1991.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, n. 5, p. 513-516, 2000.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, p. 3-58, 2002.

KUIDA, K. Caspase-9. **Intern. J. Biochem.Cell Biol.**, v. 32, n. 2, p. 121-124, 2000.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.**, v. 90, n. 11/12, p.1722-1736, 2008.

KUWATA, H.; SAWADA, H.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. Role of type IIA secretory phospholipase A₂ in arachidonic acid metabolism. **Adv. Exp. Méd. Biol.**, v. 469, p.183-188, 1999.

LAINING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 987-996, 2005.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 4, p. 162-170, 1999.

LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; De NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 343, n. 2/3, p. 257-263, 1998.

LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Effect of crotoptin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000a.

LANDUCCI, E. C. T.; DE CASTRO, R. C.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, n. 10, p. 1289-1294, 2000b.

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 10, p. 2665-2672, 2005.

LEE, C.; PARK, D. W.; LEE, J.; LEE, T. I.; KIM, Y. J.; LEE, Y. S.; BAEK, S. H. Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis through TNF-alpha and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 536, n. 1/2, p. 47-53, 2006.

LEE, W. H.; DA-SILVA-GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLICARPOV, I.; GARRAT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochem.**, v. 40, n. 1, p. 28-36, 2001.

LEI, X.; BARBOUR, S. E.; RAMANADHAM, S. Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂β) and its role in beta-cell programmed cell death. **Biochimie.**, v. 92, n. 6, p. 627-637, 2010a.

LEI, X.; ZHANG, S.; EMANI, B.; BARBOUR, S. E.; RAMANADHAM, S. A link between endoplasmic reticulum stress-induced β-cell apoptosis and the group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂β). **Diabetes Obes. Metab.**, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2010b.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIARDJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell.**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.

LIEBERTHAL, W.; NIGAM, S. K. Acute Renal Failure. I. Relative Importance of Proximal vs. Distal Tubular Injury. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 5, Pt 2, p. F623-631, 1998.

LIGA DE NEUROCIRURGIA SISTEMANERVOSO.COM. **Mecanismos da apoptose.** Disponível em: <<http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materiaid=202&materiaver=1>>. Acesso em: 10 set. 2010.

LING, B. N.; HINTON, C. F.; EATON, D. C. Potassium permeable channels in primary cultures of rabbit cortical collecting tubule. **Kidney Int.**, v. 40, n. 3, p. 441-452, 1991.

LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, L. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1077, n. 3, p. 362-370, 1991.

LIU, W.; XU, S.; WODA, C.; KIM, P.; WEINBAUM, S.; SATLIN, L. M. Effect of flow and stretch on the [Ca²⁺]_i response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, n. 5, p. F998-1012, 2003.

LIU, W. H.; KAO, P. H.; CHIOU, Y. L.; LIN, S. R.; WU, M. J.; CHANG, L. S. Catalytic activity-independent pathway is involved in phospholipase A₂-induced apoptotic death of human leukemia U937 cells via Ca²⁺-mediated p38 MAPK activation and mitochondrial depolarization. **Toxicol. Lett.**, v. 185, n. 2, p. 102-109, 2009.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-977, 2003.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosci. Methods**, v. 96, n. 2, p. 147-152, 2000.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp. Cell. Res.**, v. 256, n. 1, p. 19-26, 2000.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003a.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J. M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 145-158, 1999.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; SANTAMARÍA C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307-312, 2003b.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: Biological activities and their possible adaptive roles. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, n. 8, p. 860-876, 2009b.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. A new muscle damaging toxin miotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. 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, 2009a.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 47, p. 29867-29873, 1994b.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom analysis of edema formation, inflammatory cell and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 41-45, 1994a.

LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 3, p. 125-138, 2003.

LYNCH, V. J. Investing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A₂ genes. **BMC Evol. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2007.

MA, A. D.; WU, S. Y.; ZHANG, J. J.; LI, Z. Q.; XU, W.; WEN, X. Y.; YU, L.; WU, S. G. Purification of a new phospholipase A₂ homologue from *Agkistrodon blomhoffii siniticus* and its effects on gene expression profile of Hep3B cells. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 26, n. 1, p. 75-79, 2006.

MACKENZIE, S. H.; SCHIPPER, J. L.; CLARK, A. C. The potential for caspases in drug discovery. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 13, n. 5, p. 568-576, 2010.

MADIN, S. H.; DARBY, N. B. As catalogued in American Type culture collection. **Catalog Strains**, v. 2, p. 574-576, 1958.

MAGRO, A. J.; MURAKAMI, M. T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K.; FONTES, M. R. M. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 323, n. 1, p. 24-31, 2004.

MAIA, R. C., CULVER, C. A.; LASTER, S. M. Evidence against Calcium as a Mediator of Mitochondrial Dysfunction during Apoptosis Induced by Arachidonic Acid and Other Free Fatty Acids. **J. Immunol.**, v. 177, n. 9, p. 6398-6404, 2006.

MAIER, K. G.; ROMAN, R. J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 10, n. 1, p. 81-87, 2001.

MALNIC, G.; KLOSE, R. M.; GIEBISCH, G. Micropuncture study of renal potassium excretion in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 206, p. 674-686, 1964.

MALUF, L. M. P.; POMPEIA, C. Morte Celular: Apoptose e Necrose. In: PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 30, p. 200-226.

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

MARTINEZ-MALDONATO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W.N.; EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: alterations in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 80, n. 3, p. 445-461, 1978.

MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; JÚNIOR, E. O. G.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1441-1450, 1998.

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M.; BARBOSA, P. S. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; APRÍGIO, C. C.; QUEIROZ, M. G. R.; GUARNIERI, M. C.; HAVT, A.; DE MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 595-599, 2005.

MARTIROSYAN, A.; CLENDENING, J. W.; GOARD, C. A.; PENN, L. Z. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. **BMC Cancer**, v. 10, n. 103, p. 1-13, 2010.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; TOMY, S. C.; ANTONIO, L. C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 86, n. 5, p. 549-556, 1992.

MASSART, C.; BARBET, R.; GENETET, N.; GIBASSIER, J. Doxorubicin induces Fas-mediated apoptosis in human thyroid carcinoma cells. **Thyroid**, v. 14, n. 4, p. 263-270, 2004.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1477, n. 1/2, p. 146-156, 2000.

MEBS, D. Enzymes in snake venom: an overview. In: BAILEY, G.S. (Ed.). **Enzymes from snake venom**. Fort Collins, USA: Alaken, 1998. p. 1-10.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p.33-61.

MILANI, J. R. R.; JORGE, M. T.; DE CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANCA, F. O.; SANO-MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; IDE FERNANDEZ, C.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Snake bites by the *jararacucu* (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil. **Q.J.M.**, v. 90, n. 5, p. 323-334, 1997.

MINKO, T.; KOPECKOVÁ, P.; KOPECEK, J. Primary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. **J. Control. Release**, v. 71, n. 3, p. 227-237, 2001.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenomation by *Bothrops* in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 5, p. 569-573, 2007.

MITCHELL, R. N. Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2005. cap. 4, p.119-144.

MOHAN, M.; KAMBLE, S.; GADHI, P.; KASTURE, S. Protective effect of *Solanum torvum* on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, n. 1, p. 436-440, 2010.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.

MONTECUCCO, C.; ROSSETO, O. How do presynaptic PLA₂ neurotoxins block nerve terminals? **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 6, p. 266-270, 2000.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato: estudo de antagonistas de PAF e da indometacina.** 1990. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1990.

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, n. 4, p. 198-200, 1999.

MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p.75-86, 2006.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DIAZ, C.; LOMONTE, B; GUTIERREZ, J. M. A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 651-660, 2005.

MORENO E.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; TAVARES-NETO, J. Clinical and epidemiological characteristics of snakebites in Rio Branco, Acre. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 38, n. 1, p. 15-21, 2005.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, n. 1, p. 171-183, 2007.

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

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M. Differences in distribution on myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v. 28, n. 11, p. 1293-1301. 1990a.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A. K.; BRODSKYN, C. I.; SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. D.; DIAS DA SILVA, W.D.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**, v. 28, n. 2, p. 181-188, 1990b.

MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; RAMOS, O. H. P.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J. S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M. S.; TANJONI, I.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; EBLE, J. A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie.**, v. 90, n. 3, p. 484-492, 2008.

MÜLLER, I.; JENNER, A.; BRUCHELT, G.; NIETHAMMER, D.; HALLIWELL, B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of Doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 230, n. 2, p. 254-257, 1997.

MURAKAMI, T.; KAMIKADO, N.; FUJIMOTO R.; HAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, H.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; ODA-UEDA, N. A [Lys⁴⁹] phospholipase A₂ from *Protobothrops flavoviridis* venom induces caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma-membrane rupture in human leukemia cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 75, n. 5, p. 864-870, 2011.

MURPHY, K. M.; RANGANATHAN, V.; FARNSWORTH, M. L.; KAVALLARIS, M.; LOCK, R. B. *Bcl-2* inhibits *Bax* translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. **Cell. Death Differ.**, v. 7, n. 1, p. 102-111, 2000.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X- activador components of *Bothrops* snake venom. **Thrombos. Haemostas.**, v. 41, n. 2, p. 314-328, 1979.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; RZEPPEA, H. W.; SANO, I. S.; MATSUNAGA, S. Effect of heparin on the coagulant action of snake venoms. **Toxicon**, v. 13, n. 6, p. 457-463, 1975.

NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, n. 2, p. 74-79, 1998.

NASCIMENTO, J. M.; FRANCHI, G. C. JR.; NOWILL, A. E.; COLLARES-BUZATO, C. B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 85, n. 5, p. 591-605, 2007.

NATARAJAN, R.; REDDY, M. A. HETEs/EEts in renal glomerular and epithelial cell functions. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 3, n. 2, p. 198-203, 2003.

NEVALAINEN, T. J.; PEURAVUORI, H. J.; QUINN, R. J.; LLEWELLYN, L.E.; BENZIE, J. A.; FENNER, P. J.; WINKEL, K. D. Phospholipase A₂ in cnidaria. **Comp. Biochem. Physiol. Mol. Biol.**, v. 139, n. 4, p. 731-735, 2004.

NÚÑEZ, C. E.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1587-1594, 2001.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 91-101, 2004.

OGUNGBADE, G. O.; AKINSANMI, L. A.; JIANG, H.; OYEKAN, A. O. Role of epoxyeicosatrienoic acids in renal functional response to inhibition of NO production in the rat. **Am. J. Ren. Physiol.**, v. 285, n. 5, p. F955-964, 2003.

OLIVEIRA, A. H. C.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO A. S.; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺- independent membrane damaging activity. **Biochem.**, v. 40, n. 23, p. 6912-6920, 2001.

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

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; BERIAM, L. O. S.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization off basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Prot. Chem.**, v. 21, n. 3, p. 161-168, 2002.

OLIVEIRA F. N.; BRITO, M. T.; DE MORAIS, I. C.; FOOK, S. M.; DE ALBUQUERQUE, H. N. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

OLIVEIRA, J. C. R.; DE OCA, H. M.; DUARTE, M. M.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L. Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 321-325, 2002.

ORRENIUS, S.; BURKITT M. J.; KASS, G. E.; DYPBUKT, J. M.; NICOTERA, P. Calcium íons and oxidative cell injury. **Ann. Neurol.**, v. 32, p. S33-42, 1992.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; OSÓRIO, R. G.; DEL-VALLE, G.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C. A. Neutralizing capacity of a new monovalent anti-*Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 3, p. 375-379, 1997.

OYEKAN, A. O.; YOUSEFF, T.; FULTON, D.; QUILLEY, J. and McGIFF, J. C. Renal cytochrome P450 ω -hydroxylase and epoxygenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 8, p. 1131-1137, 1999.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ protein. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-445, 1999.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 40, n. 2, p. 1353-1358, 2002.

PALMER, L. G.; FRINDT, G. Na⁺ and K⁺ transport by the renal connecting tubule. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 16, n. 5, p. 477-483, 2007a.

PALMER, L. G.; FRINDT, G. High-conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 292, n. 3, p. F966-973, 2007b.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129) peptide identifies its bactericidal region **Eur. J. Biochem.**, v. 253, n. 2, p. 452-461, 1998.

PEIXOTO, E. B. M. I. **Modulação *in vitro* da função de barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK.** 2003. 91f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

- PEIXOTO, E. B., COLLARES-BUZATO, C. B. Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased tight junction-associated protein expression in cultured MDCK strains. **Cell. Struct. Funct.**, v. 29, n. 5/6, p. 165–178, 2005.
- PENZO, D.; PETRONILLI, V.; ANGELIN, A.; CUSAN, C.; COLONNA, R.; SCORRANO, L.; PAGANO, F.; PRATO, M.; DI LISA, F.; BERNARDI, P. Arachidonic acid released by phospholipase A₂ activation triggers Ca²⁺-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25219-25225, 2004.
- PEREIRA, A. L. M.; FRITZEN, M.; FARIA, F.; MOTTA, G.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by Berythraivase and Jararhagin (SVMPs). **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 788-796, 2006.
- PÉREZ, R.; MELERO, R.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 39, p. 40385-40391, 2004.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1644, n. 2/3, p. 83-94, 2004.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.
- PFEILSCHIFTER, J. Regulation of synthesis and secretion of group II phospholipase A₂. In: GLASER, K. B.; VADAS, P. (Ed.). **Phospholipase A₂ in clinical inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology**. New York: CRC Press, 1995. p. 93-124.
- PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, n. 4, p. 432-444, 2004.
- PINHO, F. M.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Snakebites in the State of Goiás, Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 1, p. 93-96, 2004.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.
- PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDIMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: insuficiência renal após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 3, p. 162-168, 2000.
- PLUZNICK, J. L.; SANSOM, S. C. BK channels in the kidney: role in K⁺ secretion and localization of molecular components. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol.**, v. 291, n. 3, p. F517-529, 2006.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp 49 is not an absolute prerequisite for the enzymatic activity of low-Mr phospholipase A₂: purification characterization and computer modeling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v. 319, Pt. 3, p. 961-968, 1996.

POMPÉIA, C. Ácido Araquidônico. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYAKASA, C. K.; PROCOPIO, J. (Ed.). **Entendendo a Gordura: Os Ácidos Graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 343-366.

POMPERMAYER, K.; ASSREUY, J.; VIEIRA, M. A. R. Involvement of nitric oxide and potassium channels in the bradykinin-induced vasodilation in the rat kidney perfused ex situ. **Regul. Pept.**, v. 105, n. 3, p. 155-162, 2002.

PONCE-SOTO, L. A., BONFIM, V. L., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. **Protein J.**, v. 25, n. 2, p. 147-155, 2006.

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNER, M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270-277, 2007.

PRACIANO, T. P. **Estudo dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e fração isolada**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PUHR, M.; SANTER, F. R.; NEUWIRT, H.; SUSANI, M.; NEMETH, J. A.; HOBISCH, A.; KENNER, L.; CULIG, Z. Down-regulation of suppressor of cytokine signaling-3 causes prostate cancer cell death through activation of the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. **Cancer Res.**, v. 69, n. 18, p. 7375-7384, 2009.

PUORTO, G. Acidentes por Cobras In: SCHVARTSMAN, S. (Coord.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. cap.13, p. 143-149.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity tests. **Toxicol. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 86-101, 1998.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, F. M. D. E.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

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

RAGE, J. Diversity of snakes. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling, 1997. p. 34-47.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 1-17, 2004.

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

RATCLIFFLE, P. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LEDINGHAM, J. G. G.; WARREL, D. A. Direct nephrotoxicity of *Russell's viper* venom demonstrated in the isolated perfused rat kidney. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, n. 3, p. 312-319, 1989.

REN, A.; WANG, S.; CAI, W.; YANG, G.; ZHU, Y.; WU, X.; ZHANG, Y. Agkistin-s, a disintegrin domain, inhibits angiogenesis and induces BAECs apoptosis. **J. Cell. Biochem.**, v. 99, n. 6, p. 1517-1523, 2006.

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

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

RIBEIRO, L. A.; GADIA, R.; JORGE, M. T. Comparação entre a epidemiologia do acidente e a clínica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, em adultos idosos e não idosos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 1, p. 46-49, 2008.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-1174, 2007.

RIEG, T.; VALLON, V.; SAUSBIER, M.; SAUSBIER, U.; KAISLING, B.; RUTH, P.; OSSWALD, H. The role of the BK channel in potassium homeostasis and flow-induced renal potassium excretion. **Kidney Int.**, v. 72, n. 5, p. 566-573, 2007.

RIGONI, M.; CACCIN, P.; GSCHMEISSNER, S.; KOSTER, G.; POSTLE, A. D.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Equivalent effects of snake PLA₂ neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1678-1680, 2005.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A₂ induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3809-3815, 2000.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J.**, v. 23, n. 4, p. 273-285, 2004.

ROCHA, I. C. A. **Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado do Ceará no período de 2001 a 2007**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROCHA, M. L.; VALENÇA, R. C.; MAIA, M. B. S.; GUARNIERI, M. C.; ARAUJO, I. C.; ARAUJO, D. A. M. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with ¹³¹I in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 526-529, 2008.

RODAN, A. R.; HUANG, C. L. Distal potassium handling based on flow modulation of maxi-K channel activity. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 18, n. 4, p. 350-355, 2009.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAÚJO, A. L.; MALTANETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

ROMAN, R. J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 131-185, 2002.

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

ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETIAN, J. C. H.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J. C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 865-873, 2000.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.

RUIZ DE TORRENT, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK, S.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **APPTLA**, v. 49, n.3, p. 177-183, 1999.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, n. 385, n. 6, p. 449-464, 2004.

SACERDOTI, D.; GATTA, A.; MCGIFF, J. C. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 72, n. 1/2, p. 51-71, 2003.

SAFA, M.; KAZEMI, A.; ZAND, H.; AZARKEIVAN, A.; ZAKER, F.; HAYAT, P. Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells through dephosphorylation of p53 serine residues. **Apoptosis**, v. 15, n. 2, p. 196-203, 2010.

SAI-NGAM, A., PHONGTANANANT, S., NUCHPRAVOON, I. Phospholipase A₂ genes and their expressions in *Thai Russell's* viper venom glands. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 395-399, 2008.

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

SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CASTRO, S. C. B.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Q. J. Med.**, v. 95, n. 10, p. 551-559, 2001.

SANT, S. M.; PUNDARE, N. M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to renal lesions. **J. Postgrad. Med.**, v. 18, n. 4, p. 181-188, 1972.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; BIASG, D. A. W. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.

SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Lett.**, v. 477, n. 3, p. 199-202, 2000.

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

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J. S.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biol. Chem.**, v. 386, n. 4, p. 369-374, 2005.

SCHMITZ, I.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P. H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 32, n. 11/12, p. 1123-1136, 2000.

SCHNEIDER, A.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; LU, J. W.; RAO, R.; FAN, X.; REDHA, R.; DAVIS, L.; BREYER, R. M.; HARRIS, R.; GUAN, Y. and BREYER, M. D. Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGE-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. **Kidney Int.**, v. 65, n. 4, p. 1205-1213, 2004.

SCHNERMANN, J. Sodium transport deficiency and sodium balance in gene-targeted mice. **Acta Physiol. Scand.**, v. 173, n. 1, p. 59-66, 2001.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN J. C.; BREITENBÜCHER, F.; HOFFARTH, S.; WATERHOUSE, N. J.; GREEN, D. R. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial *Bax* translocation. **Cell. Death Differ.**, v. 10, n. 4, p. 451-460, 2003.

SCHUREK, H. J.; LOHFERT, H.; HIERHOLZER, K. Na⁺ reabsorption in the isolated perfused rat kidney (dependency on substrates and Na⁺-load). **Pflugers Arch. Ges. Physiol.**, v. 319, p. 1285, 1970.

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

SCHWERDT, G., FREUDINGER, R., SCHUSTER, C., SILBERNAGL, S., GEKLE, M. Inhibition of mitochondria and extracellular acidification enhance ochratoxin A-induced apoptosis in renal collecting duct-derived MDCK-C7 Cells. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 14, n. 1/2, p. 47-56, 2004.

SEEDAT, Y. K.; REDDY, J.; EDINGTON, D. A. Acute renal failure due to proliferative nephritis from snake bite poisoning. **Nephron.**, v. 13, n. 6, p. 455-463, 1974.

SELLS, P. G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 115-133, 2003.

SERVAIS, H.; VAN DER SMISSEN, P.; THIRION, G.; VAN DER ESSEN, G.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 206, n. 3, p. 321-333, 2005.

SERVAIS, H.; ORTIZ, A.; DEVUYST, O.; DENAMUR, S.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 11-32, 2008.

SHAKHMAN, O.; HERKERT, M.; ROSE, C.; HUMENY, A.; BECKER, C. M. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca²⁺-dependent formation of reactive oxygen species. **J. Neurochem.**, v. 87, n. 3, p. 598-608, 2003.

SILVA, O. A.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n. 2, p. 401-407, 1979.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A. M.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem. J.**, v. 369, Pt. 1, p. 129-139, 2003.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN/MS). **Acidentes por animais peçonhentos: notificação por tipo de serpente segundo ano. 2009.** Relatórios Gerenciais. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 10 set. 2010.

- SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, n. 5, p. 442-448, 2006.
- SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG, V. Snake and nephrotoxicity. In: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979. cap. 28, p. 997-1018.
- SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins**, v. 8, n. 2, p. 271-7, 1999.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, n. 1/2, p. 1-19, 2000.
- SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell. Death Differ.**, v. 6, n. 11, p. 1067-1074, 1999.
- SLEE, E. A.; HARTE, M. T.; KLUCK, R. M.; WOLF, B. B.; CASIANO, C. A.; NEWMAYER, D. D.; WANG, H. G.; REED, J. C.; NICHOLSON, D. W.; ALNEMRI, E. S.; GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J. Cell. Biol.**, v. 144, n. 2, p. 281-292, 1999.
- SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys 49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000a.
- SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000b.
- SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, T.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 34, n. 6, p. 668-677, 2002.
- SOARES, M. R.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; ZINGALI, R. B.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, L.; DINIZ, M. R. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 31-38, 2005.
- SOUSA, F. C. M. **Efeito renal do veneno da *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo Fator Antibotrópico do *Didelphis marsupialis***. 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

SOUZA, G. H. M. F.; CATHARINO, R. R.; IFA, D. R.; EBERLIN, M. N.; HYSLOP, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. **J. Mass Spectrom.**, v. 43, n. 5, p. 594-599, 2008.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, n. 2, p. 132-140, 2007.

STOLTE, H.; SCHUREK, H. J. and ALT, J. M. Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with *in vivo* experimental conditions. **Kidney Int.**, v. 16, n. 3, p. 377-384, 1979.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 1, p.134-139, 1996.

SUN, G. Y.; SHELAT, P. B.; JENSEN, M. B.; HE, Y.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A. Phospholipases A₂ and inflammatory responses in the central nervous system. **Neuromolecular Med.**, v. 12, n. 2, p. 133-148, 2010.

TAFT, D. R. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v. 1, n. 1, p. 97-111, 2004.

TAKETO, M. M.; SONOSHITA, M. Phospholipase A₂ and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1585, n. 2/3, p. 72-76, 2002.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIERREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TEIXEIRA, C. E. P.; LANDICCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHARCUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v.42, n. 8, p. 947-962, 2003.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TORRES, A. M.; WONG, H. Y.; DESAI, M.; MOOCHHLA, S.; KUCHEL, P. W.; KINI, R. M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms: purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 41, p. 40097-40104, 2003.

TROIANO, J. C. **Manejo sanitário de répteis em cativeiro**. Buenos Aires: RA Prensa Veterinária Argentina, 1991.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37-62, 1996.

UENO, N.; MURAKAMI, M.; TANIOKA, T.; FUJIMORI, K.; TANABE, T.; URADE, Y.; KUDO, I. Coupling between cyclooxygenase, terminal 100 prostanoid synthase and phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 37, p. 34918-34920, 2001.

UETZ, P. (Org.). **The reptile database**. 2010. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em: 08 Sept. 2010.

VALENÇA, R. C.; SILVA, L. B.; ARAUJO, L. M.; PAZ, S. T.; VASCONCELOS, C. L. M.; MONTEIRO, W. O.; PONTES, M. M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERI, M. C. *Bothrops erythromelas* venom action: morphological observations of the experimental study in dogs. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 4., 1996, Recife. **Resumos...** Recife, 1996. v. 163.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, n. 1/2, p. 59-70, 2000a.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie.**, v. 82, n. 9/10, p. 815-831, 2000b.

VANDER HEIDEN, M. G. V.; THOMPSON, C. B. *Bcl-2* proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nat. Cell. Biol.**, v. 1, n. 8, p. E209-216, 1999.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap. 14, p. 2005.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 1999. p. 205-223.

VARAGUNAM, T.; PANABOKKE, R. G. Bilateral cortical necrosis of the kidney following snake bite. **Postgrad. Med. J.**, v. 46, n. 537, p. 449-451, 1970.

VASCONCELOS, C. M. L. **Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: Caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição**. 112f. Dissertação (Mestrado em Biofísica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1996.

VASCONCELOS, C. M. L.; VALENÇA, R. C.; ARAUJO, E. A.; MODESTO, J. C. A.; PONTES, M. M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERE, M. C. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 3, p. 439-443, 1998.

VIEIRA, J. M. Jr. Atualização em insuficiência renal: expressão gênica na insuficiência renal aguda (IRA). **J. Bras. Nefrol.**, v. 23, n. 4, p. 230-233, 2001.

VILLALOBOS, J. C.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicol. in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1382-1389, 2007.

WANG, C. J.; ZHANG, H.; CHEN, K.; ZHENG, J. W.; XIAO, C. W.; JI, W. W.; YU, Y.; HU, H. Y.; LI, Y.; XUE, X. B. Ad.mda-7 (IL-24) selectively induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines, suppresses metastasis, and enhances the effect of doxorubicin on xenograft tumors. **Oncol. Res.**, v. 18, n. 11/12, p. 561-574, 2010.

WANG, W. H. Regulation of ROMK (Kir1.1) channels: new mechanisms and aspects. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 290, n. 1, p. F14-19, 2006.

WANG, W. H. Renal potassium channels: recent developments. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 13, n. 5, p. 549-555, 2004.

WANG, W. H. Regulation of the ROMK channel: interaction of the ROMK with associate proteins. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 6, Pt. 2, p. F826-831, 1999.

WANG, W. H.; HEBERT, S. C.; GIEBISCH, G. Renal K⁺ channels: structure and function. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 413-436, 1997.

WARD R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, Pt. 1, p. 89-96, 2002.

WARRELL D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J A.; LAMAR, W. W. (Ed.). **Venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, 2004. v. 2, p. 709-761.

WEDI, B.; KAPP, A. Cellular in-vitro assays. Applicability in daily routine. **Hautarzt**, v. 61, n. 11, p. 954-960, 2010.

WEN, F. H.; MARINHO, L. A. C.; SILVA, E. P.; MEDEIROS, G. E. Estudo retrospectivo dos acidentes botrópicos em região de alta prevalência de *Bothrops erythromelas*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, p. 69, 1989.

WETZEL, E. B.; GREEN, D. R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. **Mutat. Res.**, v. 434, n. 3, p. 243-251, 1999.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-967, 2005.

WHITE, J.; WARRELL, D.; EDDLESTON, M.; CURRIE, B. J.; WHYTE, I. M.; ISBISTER, G. K. Clinical toxicology--where are we now? **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 41, n. 3, p. 263-276, 2003.

WIEGELE, G.; BRANDIS, M.; ZIMMERHACKL, L. B. Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 13, n. 5, p. 1158-1167, 1998.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; Global Snake Bite Initiative Working Group; International Society on Toxinology. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet.**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, 2010.

WILLINGER, C. C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W. *In vitro* nephrotoxicity of *Russell's viper* venom. **Kidney Int.**, v. 47, n. 2, p. 518-528, 1995.

WODA, C. B.; BRAGIN, A.; KLEYMAN, T. R., SATLIN, L. M. Flow-dependent K⁺ secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 280, n. 5, p. F786-793, 2001.

WODA, C. B.; LEITE, M. JR.; ROHATGI, R.; SATLIN, L. M. Effects of luminal flow and nucleotides on [Ca²⁺]_i in rabbit cortical collecting duct. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, n. 3, p. F437-446, 2002.

WU, W. B.; CHANG, S. C.; LIAU, M. Y.; HUANG, T. F. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J.**, v. 357, Pt. 3, p. 719-728, 2001.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal homodimeric phospholipases A₂ from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 969-973, 2007.

XU, L.; HAN, C.; LIM, K.; WU, T. Activation of cytosolic phospholipase A₂alpha through nitric oxide-induced S-nitrosylation. Involvement of inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 6, p. 3077-3087, 2008.

YAN, C. H.; YANG, Y. P.; QIN, Z. H.; GU, Z. L.; REID, P.; LIANG, Z. Q. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, n. 4, p. 540-548, 2007.

YANG, T. Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 177, n.4, p. 417-421, 2003.

ZAGER, R. A.; ANDOH, T.; BENNETT, W. M. Renal cholesterol accumulation: a durable response after acute and subacute renal insults. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 2, p. 743-752, 2001.

ZAMUNÉR, S. R.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2004.

ZAMUNÉR, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1505-1513, 2001.

ZHANG, F.; SUAREZ, G.; SHA, J.; SIERRA, J. C.; PETERSON, J. W.; CHOPRA, A. K. Phospholipase A₂-activating protein (PLAA) enhances cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. **Cell. Signal.**, v. 21, n. 7, p. 1085-1099, 2009.

ZHANG, J.; CLARK, J.R. JR.; HERMAN, E. H.; FERRANS, V. J. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 28, n. 9, p. 1931-1943, 1996.

ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Nat. Prod. Res.**, v. 22, n.6, p. 554-63, 2008.
ZHAO, S.; DU, X. Y.; CHAI, M. Q.; CHEN, J. S.; ZHOU, Y. C.; SONG, J. G.; Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1581, n. 3, p. 75-88, 2002.

ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* na agregação plaquetária. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXICOLOGIA, 1., 1990, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 1990. v. 17.

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

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

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335-346, 2005.

PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DA PLA₂

A purificação e isolamento das sPLA₂ foram realizados seguindo três etapas cromatográficas. Na primeira fase, o veneno foi fracionado em uma coluna de exclusão molecular, utilizando uma coluna Superdex 75 empacotada em uma coluna Tricon (10 x 600mm, GE Healthcare do Brasil). A coluna foi acoplada em um sistema HPLC semipreparativo Jasco e foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônia 0,2M, pH 7,8, bombeada ao sistema cromatográfico a um fluxo de 0,6mL/min durante 60 minutos. A amostra de veneno, aproximadamente 15mg do veneno total, foi dissolvida em 250µL de tampão que foi homogeneizado e centrifugado a 4500xg por 5 minutos e filtrado em filtro millex 0,45µm e então aplicado a coluna. O fracionamento do veneno foi realizado a um fluxo constante de 0,3mL/min e o monitoramento da corrida foi realizado à absorvância de 280nm e as frações coletadas em um coletor de frações a razão de 3 minutos por tubo.

Após a coleta das frações foram realizados ensaios de caracterização enzimática específica para PLA₂ e para monitoramento da atividade miotóxica. O grau de homogeneidade molecular das PLA₂ miotóxicas foi realizado por eletroforese em PAGE-SDS. Uma vez confirmada a presença de sPLA₂ miotóxicas do primeiro fracionamento, as amostras dos tubos correspondentes foram agrupadas em um pool, liofilizadas e estocadas a -20°C.

Após a primeira etapa cromatográfica, as amostras de PLA₂ miotóxicas do primeiro fracionamento foram submetidas a um segundo procedimento cromatográfico utilizando uma coluna de troca iônica TSK SP5PW (8mm x 80mm) que foi previamente equilibrada com uma solução de bicarbonato de amônia 0,1M, pH 7,8 (tampão A) por um período de 30 minutos. Aproximadamente 10mg de amostra proveniente da primeira etapa foi dissolvida com 250µL de tampão A (Bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8) que foi então homogeneizado, centrifugado e filtrado antes de sua aplicação na coluna. A eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear contínuo de tampão B (bicarbonato de amônio 1,0M, pH 7,9) e o monitoramento do fracionamento foi realizado à absorvância de 280nm. Após a eluição das frações, estas foram liofilizadas para posterior monitoramento das atividades enzimática, miotóxica e PAGE-SDS.

A última etapa para o isolamento das sPLA₂ miotóxicas foi realizada em cromatografia de fase reversa C5. A coluna cromatográfica foi previamente equilibrada com tampão A (TFA 0,1%) durante 30 minutos a um fluxo de 1mL/min. As amostras de PLA₂ miotóxicas (1mg) foram dissolvidas em 250µL de tampão A e devidamente clarificadas e aplicadas a coluna cromatográfica. A eluição das sPLA₂ miotóxicas foi realizada com um gradiente linear contínuo de tampão B (66% Acetonitrila em TFA 0,1%) e o monitoramento do perfil cromatográfico foi monitorado a 280nm. As amostras foram então submetidas à análise de eletroforese de duas dimensões, atividade enzimática e miotóxica.

ATIVIDADE MIOTÓXICA (TESTE PARA CREATININA QUINASE)

Para determinação dos níveis séricos de creatinina quinase (CK) foi utilizado o Granustest 2,5 da Merck tanto nos animais tratados com as frações bem como nos animais controle. Foram utilizados 15 animais pesando aproximadamente 25g, divididos em três grupos de 5 animais, que foram inoculados intramuscularmente no músculo gastrocnemius direito com 25,0µL (2,0µg/µL de PBS) com amostras tratadas ou não.

Após 3 horas, o sangue dos animais foi colhido da aorta abdominal e colocado em banho-maria para a preparação do soro. Os animais controle (n=5) foram submetidos ao mesmo procedimento dos animais tratados, sendo inoculados somente com 25,0µL de PBS.

Os soros dos animais controle não foram diluídos para a determinação dos níveis de CK, sendo que os soros dos animais tratados foram diluídos 10 vezes. Após a adição dos reagentes ao soro diluído, as amostras foram colocadas em banho Maria a 37°C por 5 minutos. As leituras (a 365nm) foram realizadas em intervalos de 1 minuto. A atividade foi expressa como unidade por litro (U/L).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PLA₂

A avaliação da atividade fosfolipásica A₂ foi realizada medindo-se a conversão do substrato para PLA₂ em um produto cromogênico. Neste projeto foi utilizado substrato cromogênico derivado do p-nitroanilida (4N3OBA) (BIOMOL International). Inicialmente o tampão (Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,15M e CaCl₂ 5mM, pH 8,0) e a amostra de enzima, antes da adição do substrato, foram incubados por um período de 20 minutos. Após este tempo, a enzima foi adicionada ao meio de reação juntamente com o substrato. A mistura resultante foi então incubada por 20 minutos. Ao fim deste tempo estas amostras foram lidas em um espectrofotômetro para leitura UV-VIS a 450nm em um leitor de microplacas SPECTRA MAX (Molecular Devices, CA). A determinação do comportamento cinético da enzima foi realizada variando-se a concentração do substrato para determinação dos valores de V_{max} e K_m das proteases. Os experimentos foram realizados em triplicata.

ELETROFORESE EM PAGE-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli, 1970. As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 12,5%. As placas foram preparadas utilizando uma solução de acrilamida estoque (30%T e 0,8%C). O gel de concentração 5% foi preparado utilizando o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de corrida foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%.

A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras, pré e pós-incubação com os extratos e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol, 4% de SDS, 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40mA. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05% a 37°C, seu excesso foi removido em ácido acético 7%. Também foram utilizadas para a análise do grau de homogeneidade molecular das amostras as eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger; Von Jagow, 1987, usando um sistema de eletroforese descontínuo e um gel de corrida a 10%.

ELETROFORESE DE DUAS DIMENSÕES (ELETROFORESE 2D)

Para a eletroforese em primeira dimensão (focalização isoeletrica) amostras de proteínas liofilizadas (PLA₂ tratadas ou não com flavonóides e cumarina) foram solubilizadas em uma solução contendo 8M de uréia, 2M de tiouréia, 2% CHAPS, 28mM de DTT, 1,3% farmalytes (pH 3-10) e azul de bromofenol. As fitas "Dry stips" de 18cm com uma faixa de pH não linear de 4-7 foram reidratadas em 400µL desta solução por 30 horas em parafilme oleoso de baixa viscosidade. Estas tiras contendo 50g de proteínas foram colocadas durante o

processo de reidratação das tiras de isofocalização em um sistema Multiphor II a 20°C (SANCHEZ *et al.*, 1997). A corrida eletroforética foi realizada em um gradiente linear de voltagem de 0V a 500V para 1000V hora, 500V para 2000V hora, um aumento linear de 500 a 3500V para 10000V hora seguindo por um passo final de 3500V para 35000V hora para uma voltagem final de 48000V hora. Após a primeira dimensão, as tiras individuais foram consecutivamente incubadas em uma solução de equilíbrio A (50mM Tris-HCl, pH 6,8, 6M de uréia, 30% glicerol, 4% de SDS e completado com 3,5mg de DTT) e B (45mg/mL de iodoacetamida em lugar de DTT) por 15 minutos cada. Após o equilíbrio, as proteínas foram separadas em gel de segunda dimensão de 10 – 12,5% de PAGE-SDS usando um sistema Rubi (Pharmacia) a 12W/gel. Após equilíbrio as tiras foram seladas no topo de gel de eletroforese usando uma solução seladora com 1% de agarose, 0,4% de SDS, 0,5M Tris-HCl. Os tampões utilizados para esta corrida eletroforética seguiram os mesmos métodos descritos por Laemmli para gel de SDS (LAEMMLI, 1970). A corrida eletroforética foi interrompida pela marca azul de bromofenol. Os géis de PAGE-SDS foram corados por “overnight” com uma solução de Coomassie R350. A análise dos géis foi realizada em um sistema Melanie II (Bio Rad). Cerca de quatro géis foram analisados a fim de minimizar possíveis variações técnicas do procedimento eletroforético.

RESULTADOS

FRACIONAMENTO DO VENENO

A **Figura 1a** mostra o perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *Bothropoides erythromelas* em um coluna semipreparativa de Superdex 75 e monitorada a 280nm, que permitiu a identificação de 7 picos principais sendo que a fração IV corresponde a aproximadamente 21% do total da amostra de veneno aplicada a coluna. Ao longo do fracionamento do veneno foram coletados aproximadamente 50µL de amostra de cada um dos tubos a partir do tubo 50 até o 110 para ensaios enzimáticos das sPLA₂ e também foram coletados aproximadamente 75µL de cada uma das frações a partir do tubo 50 para determinação da atividade miotóxica. Os resultados desta análise inicial foram apresentados na **Figura 1b** a qual mostra a atividade PLA₂ residente nos tubos 4 até 12, enquanto a atividade CK mostrou a presença de três picos de miotoxinas, incluindo a fração IV.

A análise inicial dos dados do primeiro fracionamento do veneno mostrou que a fração IV era a que apresentava simultaneamente as atividades de PLA₂ e miotóxica. No inset da **Figura 2a** foram mostrados os resultados da eletroforese da PLA₂ e PAGE-SDS, onde a fração IV era composta por bandas de 30 e 15kDa. A partir destas informações reunidas, a fração IV foi então submetida à segunda etapa cromatográfica em coluna de troca iônica. O fracionamento da fração IV mostrou que ela era constituída por 11 diferentes picos, sendo que os de maior concentração seriam as frações 1, 7 e 9, contudo a fração 1 bem como a 2 eram proteínas não retidas e que foram todas eluídas ao mesmo tempo, significando que na prática a fração 7 e 9 eram as duas frações majoritárias do pico IV (**Figura 2b**).

A análise da atividade de PLA₂ das várias frações de 1 a 7 mostrou que as frações 1, 6 e 7 seriam as cataliticamente ativas e que estas eram as responsáveis pela atividade enzimática PLA₂ da fração IV (**Figura 2b**). Já atividade miotóxica foi detectada para as frações 1, 6, 7, 8 e 9 sendo maior para as frações 7 e 9 (**Figura 2b**).

A eletroforese PAGE-SDS mostrou que a fração 1 era constituída por diferentes bandas eletroforéticas desde de alto peso molecular a baixo peso molecular. As frações 2, 6, 7,

8 e 9 apresentaram uma quantidade de bandas menores, sugerindo que estas foram eluídas com relativo grau de pureza (**Figura 2c**).

A análise destes resultados mostrou que a fração 7 seria uma PLA₂ cataliticamente ativa e miotóxica e a fração 9 seria uma das principais isoformas de PLA₂ cataliticamente não ativas miotóxicas.

Ambas então foram submetidas a uma nova etapa cromatográfica em HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna analítica C5. Nestas condições tanto a fração 7 (PLA₂ Asp 49) quanto a fração 9 (PLA₂ Lys 49) foram eluídas como um único pico de eluição (**Figuras 3 e 4**, respectivamente). Ambas PLA₂ mostraram após esta última etapa cromatográfica serem proteínas básicas com um pI estimado ao redor de 8 e com uma massa molecular ao redor de 14kDa pela análise em eletroforese 2D.

FIGURA 1 – **1a** Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno total de *Bothropoides erythromelas* em coluna de exclusão molecular. **1b** Monitoramento da atividade PLA₂ e atividade miotóxica.

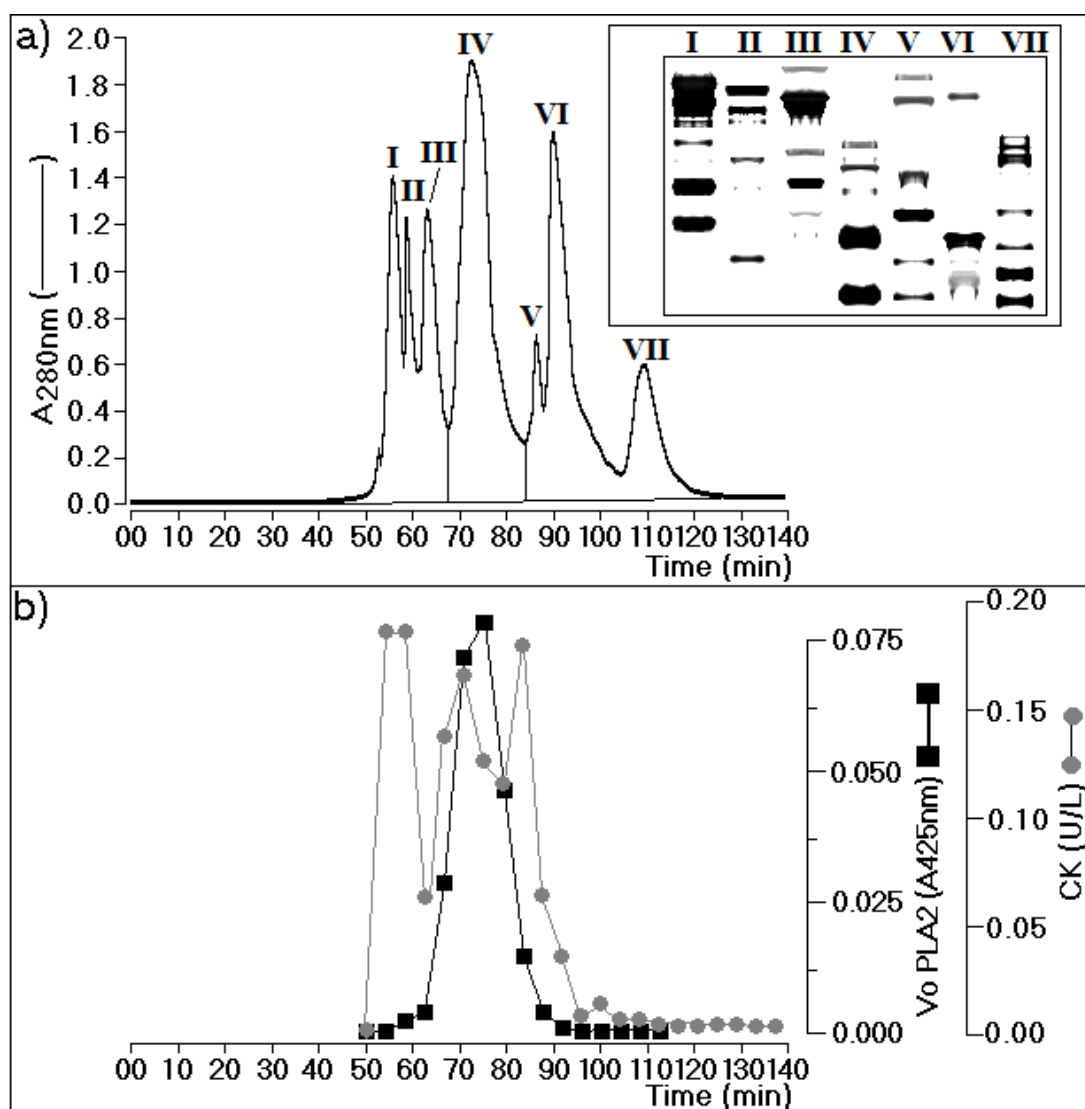


FIGURA 2 – **2a** Perfil cromatográfico do fracionamento da fração IV de *Bothropoides erythromelas*. **2b** Atividade enzimática fosfolipásica A₂ das frações 1, 2, 6, 7, 8 e 9 e as suas respectivas atividades miotóxicas. As outras frações não foram testadas devido a sua baixa concentração. **2c** Perfil eletroforético das frações 1, 2, 6, 7, 8 e 9.

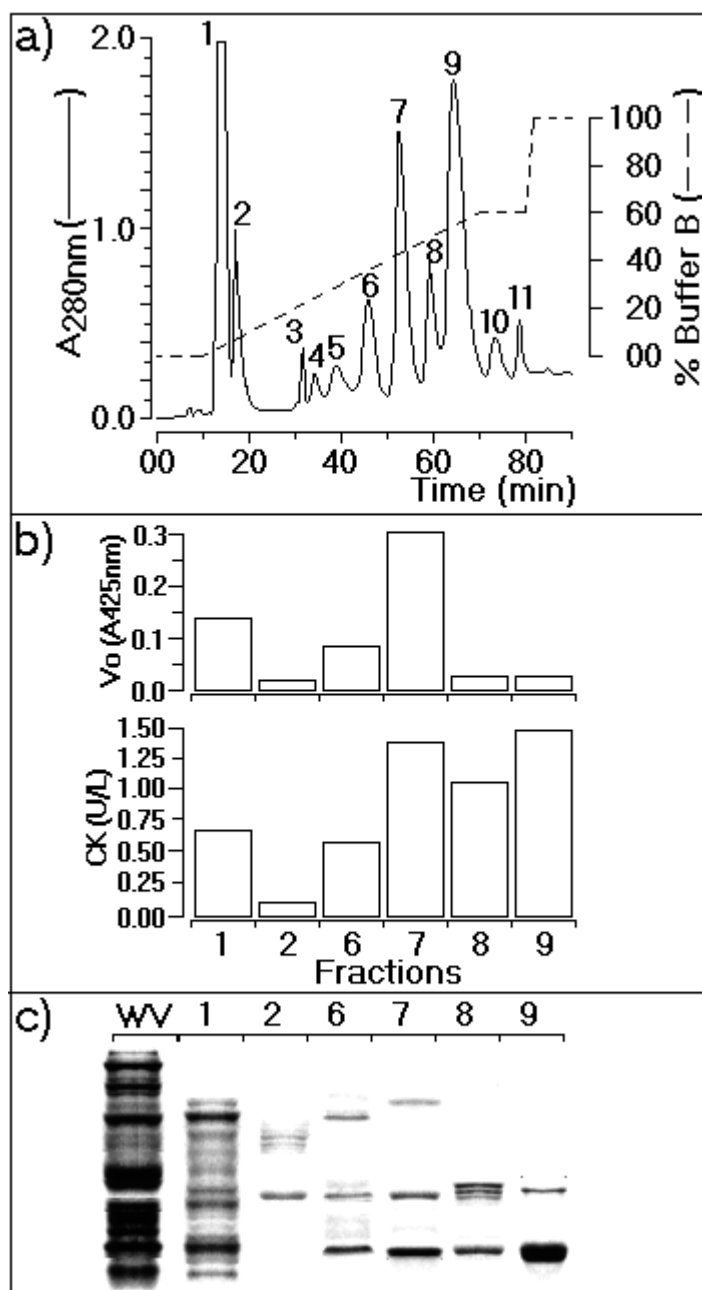


FIGURA 3 – 3a Perfil cromatográfico do fracionamento da fração 7 a qual foi definida como PLA₂ Asp 49. **3b** Perfil eletroforético da PLA₂.

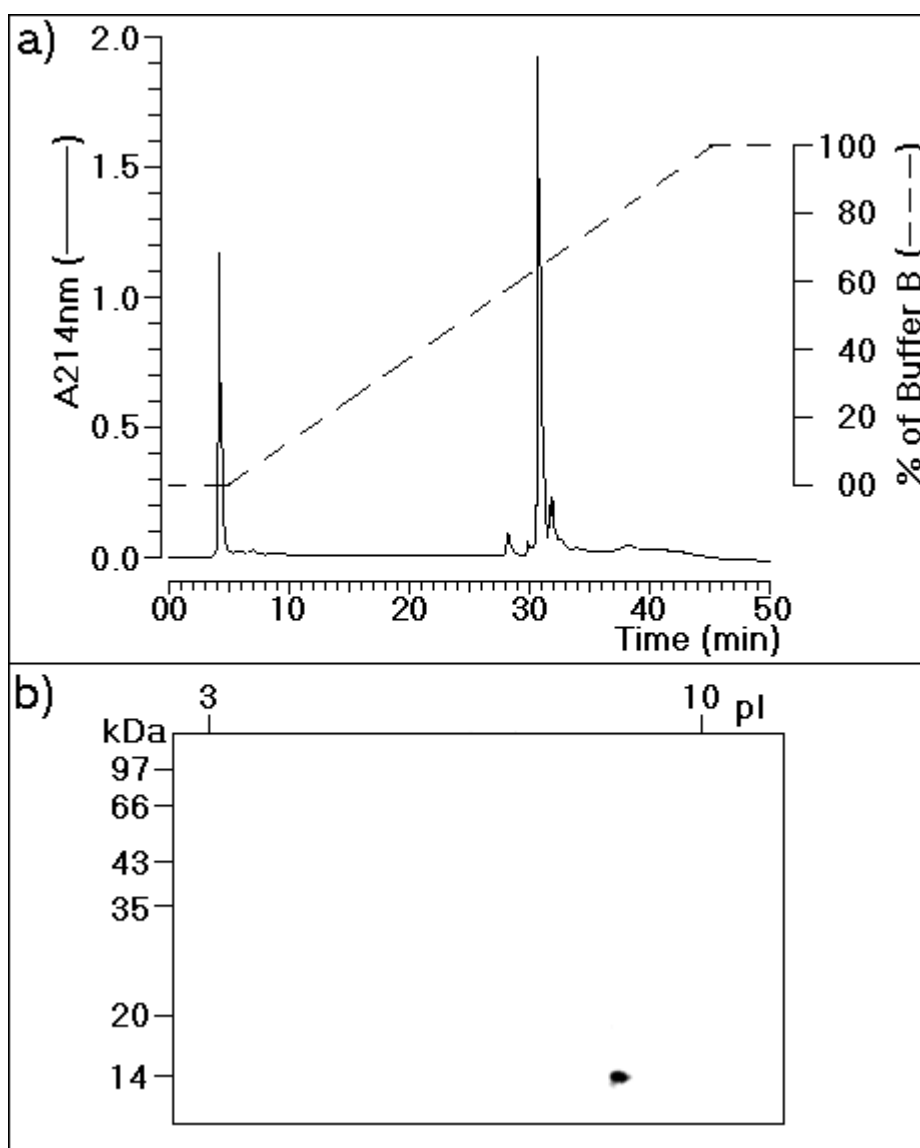
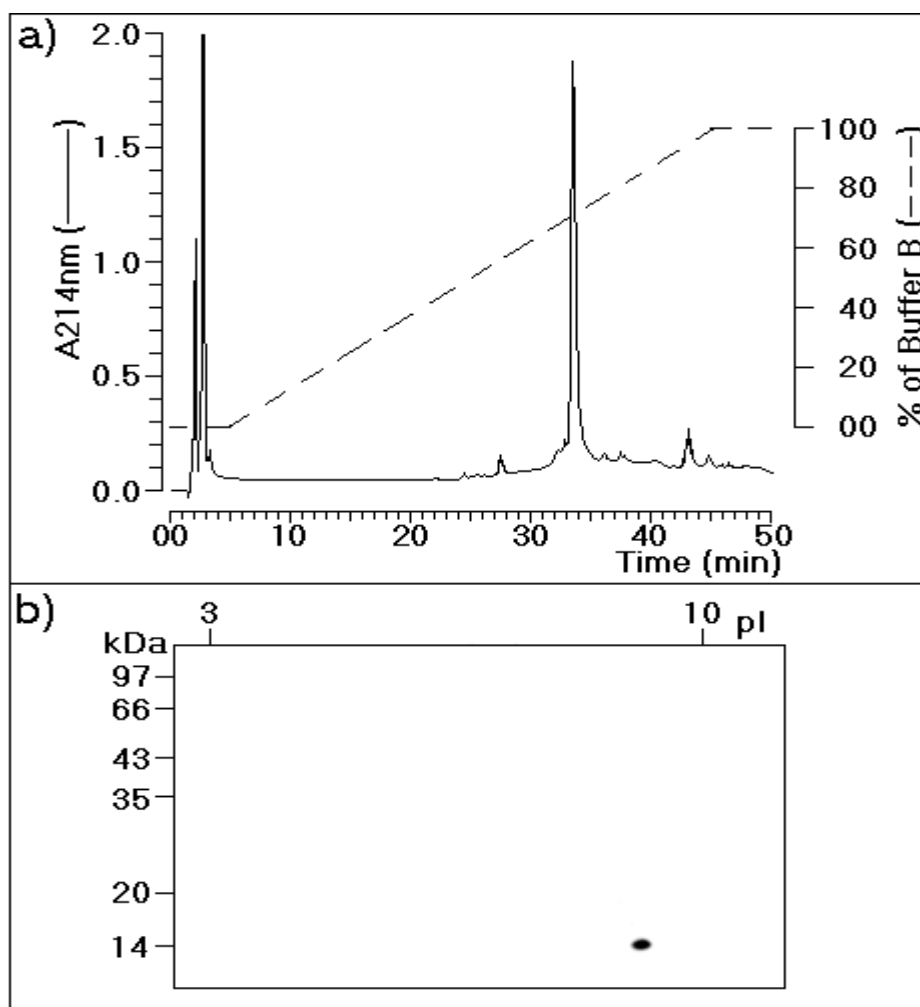


FIGURA 4 – 4a Perfil cromatográfico do fracionamento da fração 9 a qual foi definida como PLA₂ Lys 49. **4b** Perfil eletroforético da PLA₂.



REFERÊNCIAS

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SANCHEZ, J. C.; ROUGE, V.; PISTEUR, M.; RAVIER, F.; TONELLA, L.; MOOSMAYER, M.; WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F. Improved and simplified in gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 18, n. 3/4, p. 324-327, 1997.



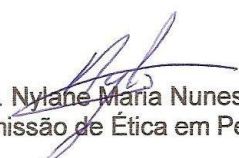
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº17/2010, sobre o projeto intitulado: “ESTUDO DOS EFEITOS RENAIAS DAS FRAÇÕES LYS49 E ASP49 DO VENENO DE *Bothrops erythromelas* EM RIM ISOLADO DE RATO” de responsabilidade de Fabíola Carine Monteiro de Sousa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

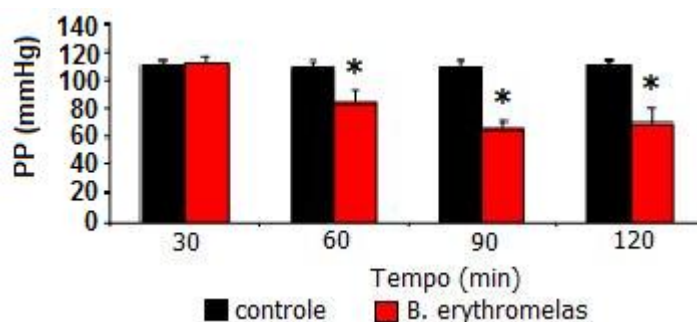
Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de abril de 2010.

Fortaleza, 19 de maio de 2010.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

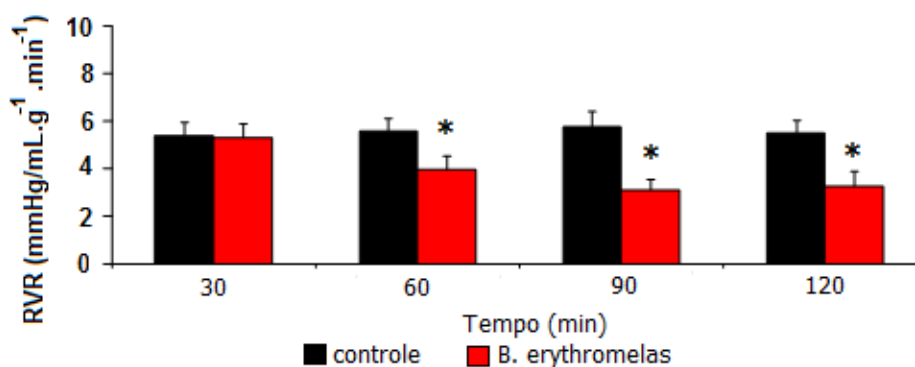
**GRÁFICOS DA PERFUSÃO RENAL DO VENENO
TOTAL DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS***

GRÁFICO 1.1 - Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



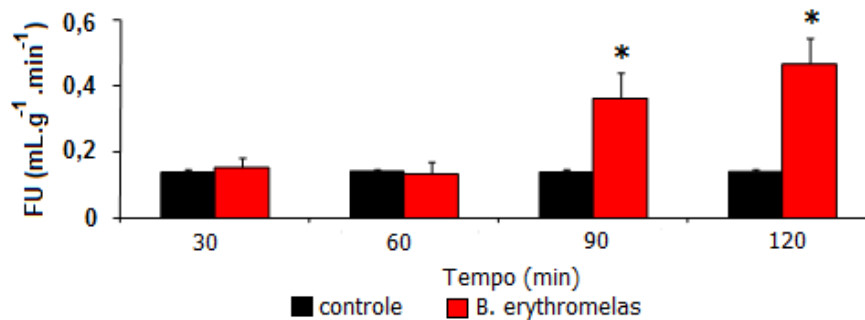
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 2.1 - Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



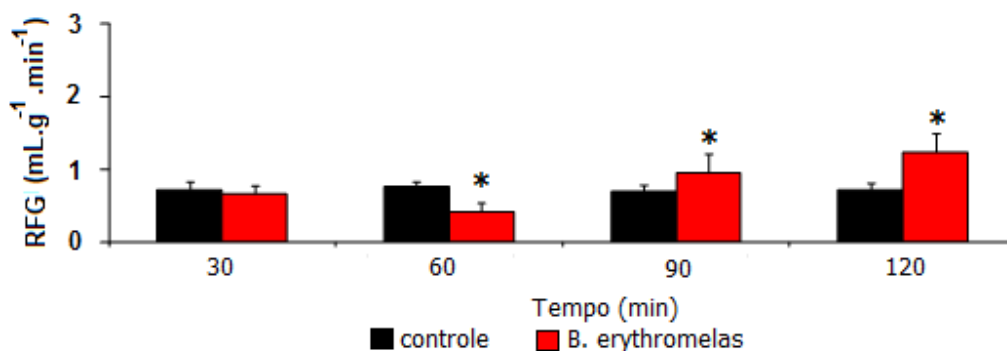
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 3.1 - Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



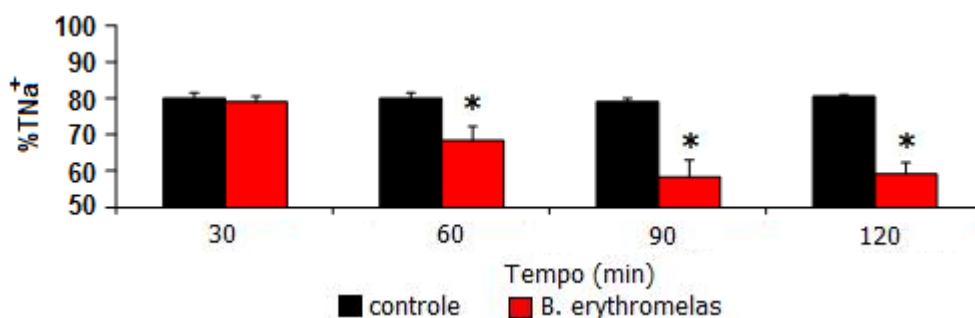
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 4.1 - Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10 μ g/mL).



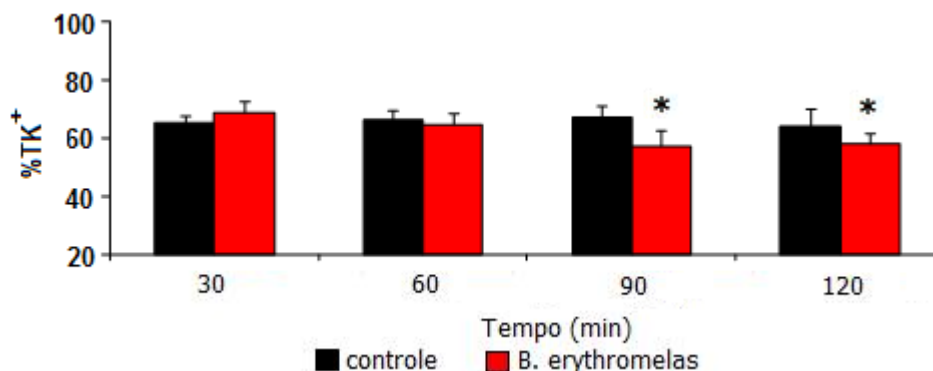
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 5.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10 μ g/mL).



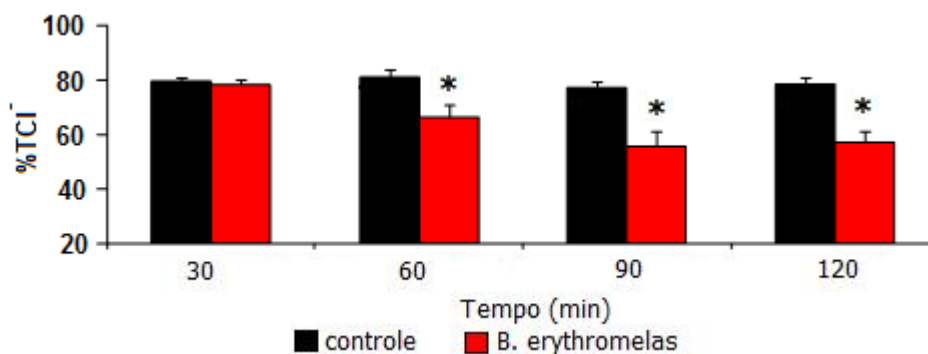
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 6.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10 μ g/mL).



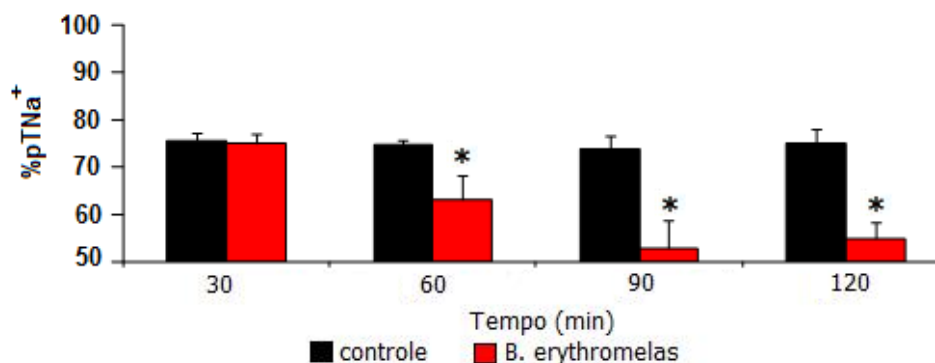
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 7.1 - Efeitos no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10μg/mL).



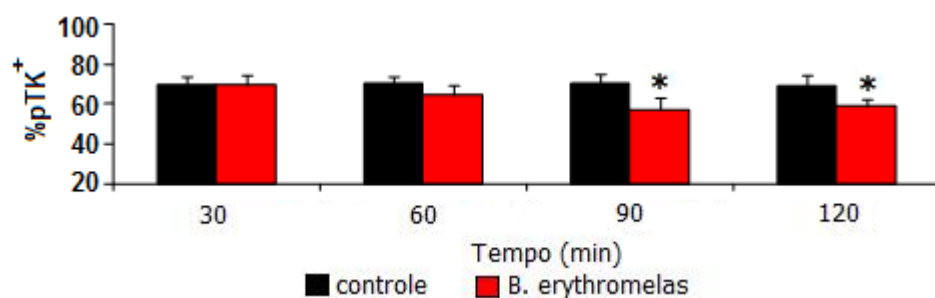
Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 8.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10μg/mL).



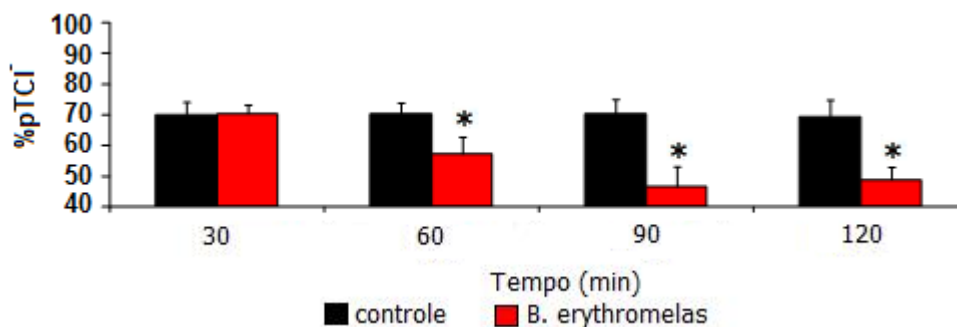
Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 9.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10μg/mL).



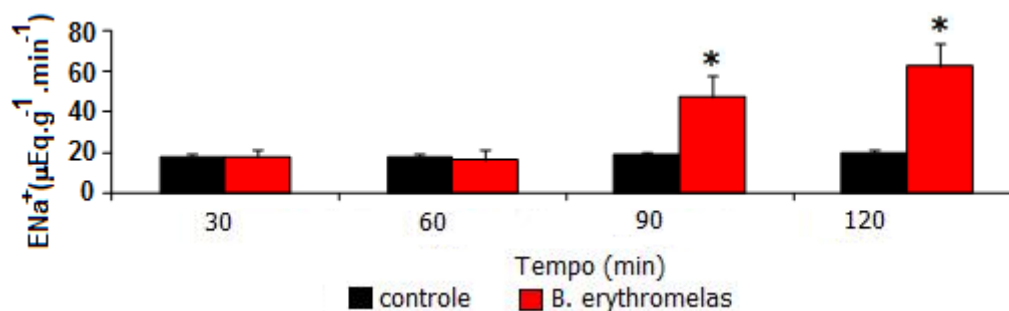
Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 10.1 - Efeitos no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



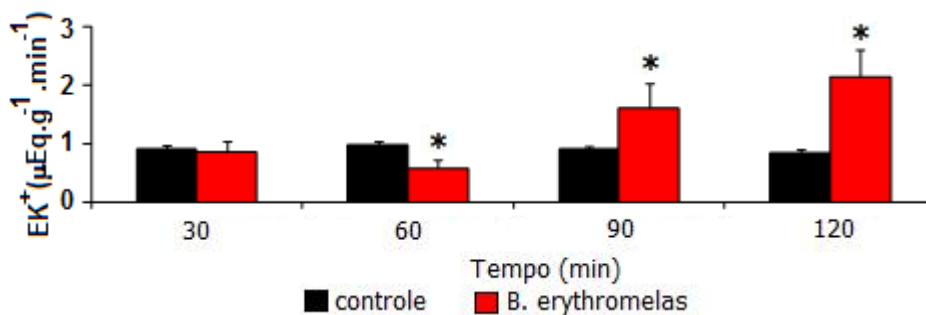
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 11.1 - Efeitos na excreção de sódio (ENa^+) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



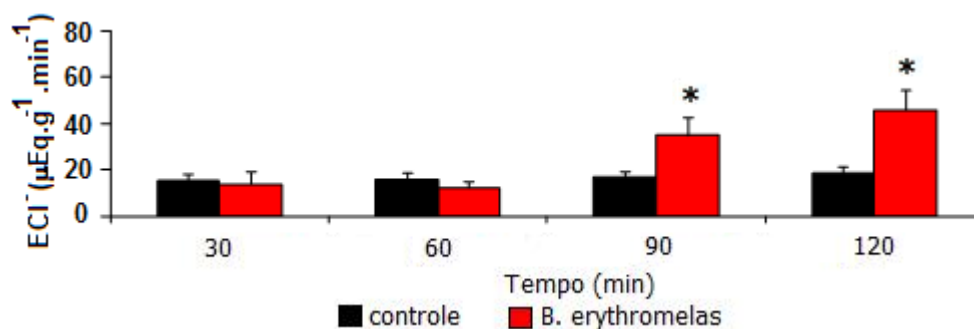
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 12.1 - Efeitos na excreção de potássio (EK^+) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (B.E=10µg/mL).



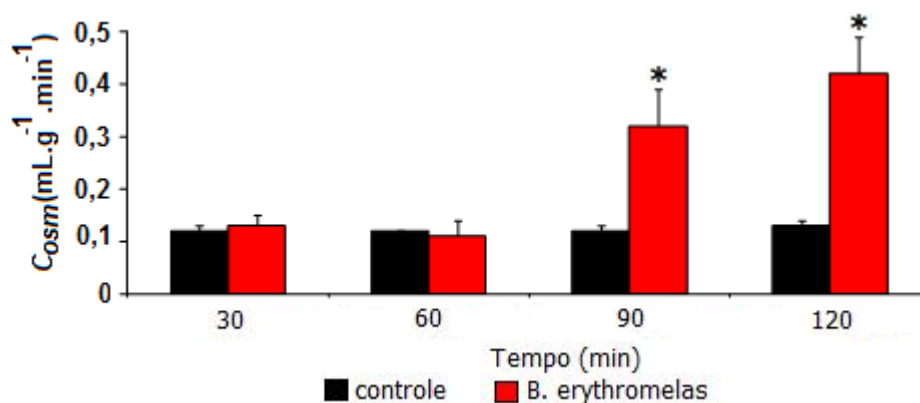
Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 13.1 - Efeitos na excreção de cloreto (ECI^-) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (**B.E**=10 $\mu\text{g/mL}$).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

GRÁFICO 14.1 - Efeitos no *clearance* osmótico (C_{osm}) na ausência (controle) e presença do veneno de *Bothropoides erythromelas* (**B.E**=10 $\mu\text{g/mL}$).



Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELAS DOS RESULTADOS

TABELA 1: Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis (mmHg)	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	110,11 ± 3,70	108,27 ± 4,90	108,70 ± 5,10	110,28 ± 3,70
Lys 49	108,8 ± 2,71	129,2 ± 2,67*	139,2 ± 3,96*	139,6 ± 2,47*
Asp 49	104,7 ± 1,29	103,2 ± 0,94	103,4 ± 1,72	104,3 ± 2,23
B.E	112,30 ± 4,20	83,70 ± 9,50*	65,20 ± 5,60*	68,80 ± 11,6*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 2: Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis (mm.Hg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	5,39 ± 0,57	5,57 ± 0,54	5,76 ± 0,65	5,49 ± 0,54
Lys 49	4,71 ± 0,18	5,58 ± 0,14	5,98 ± 0,10	6,04 ± 0,19
Asp 49	5,09 ± 0,11	5,02 ± 0,10	5,02 ± 0,09	5,06 ± 0,11
B.E	5,30 ± 0,61	3,95 ± 0,58*	3,10 ± 0,45*	3,25 ± 0,63*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 3: Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Lys 49	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,03*
Asp 49	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02
B.E	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,36 ± 0,08*	0,47 ± 0,08*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 4: Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,72 ± 0,12	0,76 ± 0,07	0,70 ± 0,09	0,72 ± 0,10
Lys 49	0,64 ± 0,05	0,51 ± 0,07*	0,92 ± 0,10	0,92 ± 0,13
Asp 49	0,64 ± 0,04	0,71 ± 0,07	0,61 ± 0,04	0,71 ± 0,09
B.E	0,66 ± 0,12	0,42 ± 0,12*	0,95 ± 0,26*	1,24 ± 0,26*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 5: Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	80,17 ± 1,40	80,04 ± 1,61	79,18 ± 0,88	80,58 ± 0,45
Lys 49	78,73 ± 2,74	74,14 ± 3,67	73,22 ± 4,01	70,93 ± 2,52*
Asp 49	83,22 ± 1,46	81,01 ± 1,88	79,61 ± 2,37	75,90 ± 2,24
B.E	79,08 ± 1,67	68,36 ± 4,12*	58,35 ± 4,86*	59,24 ± 3,15*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 6: Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	65,36 ± 2,47	66,38 ± 3,31	67,20 ± 4,04	64,28 ± 5,93
Lys 49	60,47 ± 4,95	59,53 ± 4,76	60,61 ± 5,81	63,28 ± 2,74
Asp 49	62,29 ± 3,20	57,15 ± 3,51	58,45 ± 3,12	51,62 ± 5,48
B.E	68,89 ± 3,79	64,80 ± 4,02	57,32 ± 5,28*	58,07 ± 3,78*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 7: Efeitos no percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
%				
Controle	79,90 ± 1,03	81,25 ± 2,44	77,32 ± 2,22	78,53 ± 2,33
Lys 49	78,89 ± 2,31	73,95 ± 3,91	69,21 ± 4,25	69,68 ± 2,83
Asp 49	79,74 ± 1,98	78,80 ± 2,01	78,33 ± 2,59	75,20 ± 2,68
B.E	78,40 ± 1,98	66,37 ± 4,48*	55,97 ± 5,52*	57,10 ± 4,13*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 8: Efeitos no percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
%				
Controle	75,65 ± 1,42	74,69 ± 0,99	73,84 ± 2,64	74,94 ± 3,02
Lys 49	77,66 ± 2,66	72,22 ± 3,69	71,81 ± 4,41	70,79 ± 2,61
Asp 49	81,05 ± 1,92	78,08 ± 1,98	77,08 ± 2,68	73,41 ± 2,37
B.E	74,97 ± 2,07	63,13 ± 5,14*	52,89 ± 5,79*	54,91 ± 3,36*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 9: Efeitos no percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
%				
Controle	69,92 ± 4,09	70,13 ± 3,69	70,18 ± 4,86	69,17 ± 5,64
Lys 49	67,97 ± 2,99	71,26 ± 2,41	75,67 ± 2,06	66,36 ± 2,41
Asp 49	65,59 ± 3,15	58,73 ± 2,45*	61,83 ± 2,06	58,87 ± 5,38
B.E	69,78 ± 4,56	64,57 ± 4,88	56,86 ± 6,29*	58,74 ± 4,0*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 10: Efeitos no percentual de transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
%				
Controle	76,81 ± 1,25	78,49 ± 2,90	76,58 ± 1,20	76,36 ± 2,47
Lys 49	77,82 ± 2,31	72,02 ± 4,01	67,80 ± 4,87	69,54 ± 2,77
Asp 49	77,56 ± 2,39	75,86 ± 2,20	75,80 ± 2,84	72,70 ± 2,79
Controle (B.E)	69,92 ± 4,09	70,13 ± 3,69	70,18 ± 4,86	69,17 ± 5,64
B.E	70,29 ± 2,85	57,14 ± 5,69*	46,51 ± 6,59*	48,77 ± 4,22*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 11: Efeitos na excreção de sódio (ENa⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
(µEq.g ⁻¹ . min ⁻¹)				
Controle	17,81 ± 1,43	17,74 ± 1,51	18,76 ± 1,31	19,74 ± 1,48
Lys 49	16,85 ± 1,82	19,13 ± 1,98	26,29 ± 3,37*	32,44 ± 5,58*
Asp 49	17,89 ± 1,64	19,98 ± 2,50	19,30 ± 2,69	21,19 ± 3,36
B.E	17,85 ± 3,62	16,37 ± 4,76	47,3 ± 10,36*	62,40 ± 10,86*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 12: Efeitos na excreção de potássio (EK⁺) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 (5µg/mL) e Asp 49 (5µg/mL) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (BE = 10µg/mL).

Variáveis	30	60	90	120
(µEq.g ⁻¹ . min ⁻¹)				
Controle	0,90 ± 0,07	0,98 ± 0,06	0,90 ± 0,05	0,84 ± 0,06
Lys 49	0,84 ± 0,03	0,83 ± 0,03	1,10 ± 0,10*	1,29 ± 0,20*
Asp 49	1,16 ± 0,04	1,54 ± 0,05*	1,44 ± 0,04*	1,24 ± 0,10*
B.E	0,85 ± 0,19	0,58 ± 0,15*	1,61 ± 0,41*	2,15 ± 0,45*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com p < 0,05*.

TABELA 13: Efeitos na excreção de cloreto (ECI^-) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* ($\text{BE} = 10\mu\text{g/mL}$).

Variáveis ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	30	60	90	120
Controle	$15,38 \pm 2,87$	$15,62 \pm 2,87$	$16,71 \pm 2,70$	$18,17 \pm 3,42$
Lys 49	$14,59 \pm 1,50$	$16,47 \pm 1,62$	$22,62 \pm 2,21$	$25,31 \pm 3,92$
Asp 49	$17,72 \pm 1,48$	$18,27 \pm 1,99$	$17,52 \pm 2,31$	$18,39 \pm 2,85$
B.E	$13,63 \pm 2,85$	$12,04 \pm 2,78$	$34,77 \pm 7,96^*$	$45,77 \pm 8,53^*$

Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 14: Efeitos no *clearance* osmótico (C_{osm}) na ausência (controle) e presença das frações Lys 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e Asp 49 ($5\mu\text{g/mL}$) e do veneno total de *Bothropoides erythromelas* ($\text{BE} = 10\mu\text{g/mL}$).

Variáveis ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	30	60	90	120
Controle	$0,12 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$
Lys 49	$0,13 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,04^*$
Asp 49	$0,15 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
Controle (B.E)	$0,12 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
B.E	$0,13 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,07^*$	$0,42 \pm 0,07^*$

Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 15: Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e $3,125\mu\text{g/mL}$).

Variáveis	Viabilidade celular (%)
Controle	$99,95 \pm 1,92$
<i>B. erythromelas</i> ($3,125\mu\text{g/mL}$)	$108,2 \pm 6,83$
<i>B. erythromelas</i> ($6,25\mu\text{g/mL}$)	$115,3 \pm 6,92$
<i>B. erythromelas</i> ($12,5\mu\text{g/mL}$)	$111,5 \pm 8,31$
<i>B.erythromelas</i> ($25\mu\text{g/mL}$)	$109,6 \pm 7,63$
<i>B. erythromelas</i> ($50\mu\text{g/mL}$)	$83,64 \pm 5,31^*$
<i>B. erythromelas</i> ($100\mu\text{g/mL}$)	$72,72 \pm 8,41^*$

Dados expressos como média \pm EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 16: Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).

Variáveis	Viabilidade celular (%)
Controle	100,0 ± 1,31
Lys 49 (3,125µg/mL)	93,70 ± 2,44
Lys 49 (6,25µg/mL)	76,84 ± 0,98*
Lys 49 (12,5µg/mL)	67,99 ± 1,20*
Lys 49 (25µg/mL)	61,21 ± 1,19*
Lys 49 (50µg/mL)	51,04 ± 4,02*
Lys 49 (100µg/mL)	29,35 ± 5,80*

Dados expressos como média ± EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 17: Efeitos no percentual de viabilidade celular em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).

Variáveis	Viabilidade celular (%)
Controle	100,0 ± 1,31
Asp 49 (3,125µg/mL)	106,5 ± 1,40
Asp 49 (6,25µg/mL)	106,6 ± 2,59
Asp 49 (12,5µg/mL)	105,8 ± 2,98
Asp 49 (25µg/mL)	103,0 ± 2,75
Asp 49 (50µg/mL)	86,32 ± 1,47*
Asp 49 (100µg/mL)	69,41 ± 1,23*

Dados expressos como média ± EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 18: Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença do veneno total de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).

Variáveis	Liberação de LDH
Controle	74,01 ± 6,70
<i>B. erythromelas</i> (3,125µg/mL)	77,25 ± 5,83
<i>B. erythromelas</i> (6,25µg/mL)	79,56 ± 5,74
<i>B. erythromelas</i> (12,5µg/mL)	76,32 ± 5,76
<i>B. erythromelas</i> (25µg/mL)	73,55 ± 2,58
<i>B. erythromelas</i> (50µg/mL)	73,09 ± 6,81
<i>B. erythromelas</i> (100µg/mL)	75,40 ± 6,36

Dados expressos como média ± EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 19: Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Lys 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).

Variáveis	Liberação de LDH
Controle	90,49 ± 5,27
Lys 49 (3,125µg/mL)	97,14 ± 0,0
Lys 49 (6,25µg/mL)	92,91 ± 1,91
Lys 49 (12,5µg/mL)	63,60 ± 10,41
Lys 49 (25µg/mL)	85,44 ± 2,45
Lys 49 (50µg/mL)	86,50 ± 1,50
Lys 49 (100µg/mL)	136,5 ± 9,25*

Dados expressos como média ± EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 20: Efeitos sobre a integridade da membrana (liberação de Lactato Desidrogenase - LDH) em células MDCK na ausência (controle) e presença da fração Asp 49 do veneno de *Bothropoides erythromelas* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL).

Variáveis	Liberação de LDH
Controle	90,49 ± 5,27
Asp 49 (3,125µg/mL)	93,67 ± 1,16
Asp 49 (6,25µg/mL)	98,00 ± 1,45
Asp 49 (12,5µg/mL)	95,91 ± 3,40
Asp 49 (25µg/mL)	93,69 ± 1,13
Asp 49 (50µg/mL)	94,89 ± 4,56
Asp 49 (100µg/mL)	96,70 ± 2,40

Dados expressos como média ± EPM (n=5) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$.

TABELA 21: Expressão gênica de caspase-3 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).

Variáveis	Expressão gênica de caspase-3
Controle	1,01 ± 0,04
DOXO (3,12µg/mL)	1,95 ± 0,17*
VBE (23,32µg/mL)	1,94 ± 0,28*
VBE (46,65µg/mL)	1,35 ± 0,12

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

TABELA 22: Expressão gênica de caspase-8 em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).

Variáveis	Expressão gênica de caspase-8
Controle	1,07 ± 0,10
DOXO (3,12µg/mL)	2,10 ± 0,24*
VBE (23,32µg/mL)	2,39 ± 0,17*
VBE (46,65µg/mL)	2,07 ± 0,18*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

TABELA 23: Expressão gênica de *Bax* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).

Variáveis	Expressão gênica de <i>Bax</i>
Controle	1,01 ± 0,03
DOXO (3,12µg/mL)	2,12 ± 0,15*
VBE (23,32µg/mL)	0,56 ± 0,02*#
VBE (46,65µg/mL)	0,42 ± 0,03*#

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

TABELA 24: Expressão gênica de *Bcl-X_L* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).

Variáveis	Expressão gênica de <i>Bcl-X_L</i>
Controle	1,02 ± 0,06
DOXO (3,12µg/mL)	2,02 ± 0,17*
VBE (23,32µg/mL)	1,34 ± 0,11#
VBE (46,65µg/mL)	1,21 ± 0,07#

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.

TABELA 25: Expressão gênica de *Mcl-1* em células MDCK tratadas com veneno total da serpente *Bothropoides erythromelas* (DOXO = Doxorubicina; VBE = veneno de *Bothropoides erythromelas*).

Variáveis	Expressão gênica de <i>Mcl-1</i>
Controle	1,01 ± 0,04
DOXO (3,12µg/mL)	1,27 ± 0,12
VBE (23,32µg/mL)	1,19 ± 0,06
VBE (46,65µg/mL)	1,46 ± 0,11*

Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisados por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student com $p < 0,05^*$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle negativo (células + PBS) e $p < 0,05^\#$ = diferença estatística entre os grupos tratados com VBE e o controle positivo DOXO.