



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SANDRA MARA BRASILEIRO MOTA**

**BIOMARCADORES ENDOTELIAIS E RENAIIS E O DIAGNÓSTICO  
PRECOCE DA INJÚRIA RENAL AGUDA NO ENVENENAMENTO  
HUMANO POR SERPENTES *Bothrops erythromelas***

**FORTALEZA**

**2022**

SANDRA MARA BRASILEIRO MOTA

**BIOMARCADORES ENDOTELIAIS E RENAIIS E O DIAGNÓSTICO  
PRECOCE DA INJÚRIA RENAL AGUDA NO ENVENENAMENTO  
HUMANO POR SERPENTES *Bothrops erythromelas***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.  
Área de concentração: Medicina I

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher

Co-orientadora: Profa. Dra. Polianna Lemos Moura Moreira Albuquerque

FORTALEZA

2022

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

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

---

M871b Mota, Sandra Mara Brasileiro.

Biomarcadores endoteliais e renais e o diagnóstico precoce da injúria renal aguda no envenenamento humano por serpentes *Bothrops erythromelas* / Sandra Mara Brasileiro Mota. – 2022.

118 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher.

Coorientação: Profa. Dra. Polianna Lemos Moura Moreira Albuquerque.

1. Injúria renal aguda. 2. *Bothrops erythromelas*. 3. Biomarcadores endoteliais. I. Título.

CDD 610

---

SANDRA MARA BRASILEIRO MOTA

**BIOMARCADORES ENDOTELIAIS E RENAIIS E O DIAGNÓSTICO  
PRECOCE DA INJÚRIA RENAL AGUDA NO ENVENENAMENTO  
HUMANO POR SERPENTES *Bothrops erythromelas***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.  
Área de concentração: Medicina I

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Elizabeth De Francesco Daher (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Polianna Lemos Moura Moreira Albuquerque  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A minha mãe Iraídes Brasileiro (*in memoriam*)  
que em vida, sonhou comigo todos os meus  
sonhos, e com muito amor e apoio, nunca mediu  
esforços para que eu chegasse até essa etapa da  
minha vida. Conseguimos Mamãe!!!

## AGRADECIMENTOS

Gratidão eterna a Aquele que me criou! “De quem tudo, por quem tudo, em quem todas as coisas existem”. Eu que não existiria se tu, Ó Deus, não existisses em mim.

Aos meus pais João (*in memoriam*) e Iraídes (*in memoriam*) por terem me proporcionado vida, amor, carinho, amizade, respeito, admiração, apoio e educação. Por me ensinarem a valorizar as vitórias e aprender com as derrotas e me motivarem a perseguir os meus sonhos. No céu, comemoraremos mais esta vitória. Saudades eternas!

Ao meu amado esposo Paulinho, pelo constante apoio e presença em minha vida. Pela paciência (e que paciência!) nas minhas ansiedades, por sempre acreditar em mim e por me dedicar tanto amor!

Aos meus filhos Paulo Victor e João Eduardo (Dado) por darem sentido a minha vida e as minhas lutas. Por serem conforto e alívio, alegria e paz nessa jornada. Se eu nunca desisti ou olhei para trás foi porque sempre tive vocês me impulsionando.

Ao meu sobrinho João Pedro, não nasceu de mim, mas vive em mim. Por acreditar sempre no meu potencial e me amar como mãe. Que nunca me falte o seu sorriso!

Às minhas irmãs Sônia e Samara, torcedoras incansáveis das minhas conquistas, por todos os momentos felizes, pelo amor que nos une, e por me incentivarem sempre. Ao meu cunhado Hernani por toda gentileza e carinho, por ser suporte e incentivo. Você multiplicou ao entrar em nossas vidas.

À minha Orientadora Prof<sup>ª</sup> Dra Elizabeth Daher, por me aceitar como orientanda, pelas suas ricas considerações e por me ensinar, com seu exemplo a amar a pesquisa clínica.

À Prof<sup>ª</sup> Dra Polianna Albuquerque, por tudo e por tanto! Pela amizade, carinho, dedicação, por tudo o que me ensinou e continua me ensinando, por ser exemplo de humildade, ternura, foco e fé. Por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Pela presença e gratuidade na minha vida. Nenhuma palavra expressaria a gratidão que tenho por você. Esse trabalho é tão seu quanto meu. Sem você eu não teria conseguido!

Às amigas-irmãs Patricia Cavalcante e Rita de Cásia por serem porto seguro nas minhas inseguranças e sustento nos momentos difíceis. Por fazerem o impossível por mim, por acreditarem nos meus sonhos, pela cumplicidade e por me amarem verdadeiramente. Obrigada!

Aos amigos Nilton Araripe e Yuri Pifano por toda disponibilidade na confecção das figuras e formatação desta tese, e ao amigo Atanildo Júnior e Márcio Holanda por todo incentivo e apoio emocional.

Aos professores e amigos Prof. Geraldo Bezerra, Prof Alice Martins, Prof Gdayllon, pela amizade, vibração, disponibilidade e sábios ensinamentos, durante todo o tempo do Doutorado.

A todos os amigos do Centro de informação e Assistência Toxicológica do Ceará (CIATOX/CE), farmacêuticos e estagiários, e aos amigos do laboratório: Fládia e Célio, por todo auxílio na coleta das amostras, pelo apoio, pela troca de ensinamentos, pelas vidas compartilhadas com leveza e amor no esforço diário de um atendimento humanizado e eficiente ao paciente intoxicado.

E por fim, agradeço aos pacientes que participaram deste estudo e seus familiares, por fazer possível e dar sentido a esta pesquisa.

“Senhor, tu és o meu Rei e o meu Deus! Que para o teu serviço se consagre tudo o que de útil eu aprendi!”

(Santo Agostinho)



## RESUMO

A Injúria renal aguda (IRA) relacionada ao envenenamento botrópico é uma complicação freqüente e potencialmente fatal, e o diagnóstico tardio desta patologia agrava ainda mais o prognóstico. O presente trabalho teve como objetivo investigar o papel de biomarcadores renais e endoteliais não convencionais na fisiopatologia da IRA, bem como no diagnóstico precoce e prognóstico em pacientes com envenenamento por serpentes *Bothrops erythromelas*. **Métodos:** Estudo prospectivo com 26 pacientes vítimas de envenenamento confirmado por *Bothrops erythromelas* atendidos na emergência de um hospital terciário no município de Fortaleza, no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020. Amostras de sangue e urina foram coletadas concomitantemente em 3 diferentes tempos: na admissão (até 8 horas), 12 a 16hs e 24 a 28hs pós-mordedura. IRA foi definida de acordo com os critérios do KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) e os pacientes divididos em 2 grupos: IRA e Não-IRA. Foram avaliados parâmetros clínicos e renais associados à evolução e gravidade da IRA. Os biomarcadores para dano renal (NGAL sérico, NGAL urinário e KIM-1 urinário) bem como os endoteliais (Angiopietina 1 (Ang-1), Angiopietina 2 (Ang-2), VCAM-1 e Syndecan-1) foram quantificados. Curvas ROC e fatores de risco para IRA foram investigados. **Resultados:** A maioria dos 26 pacientes pertencia ao gênero masculino (88,4%), com idade de 46,6 ( $\pm 14,0$ ) anos, e média de tempo decorrido desde a mordedura da serpente até a admissão hospitalar de 6h e 28 minutos. 54% dos pacientes desenvolveram IRA leve. O grupo IRA apresentou maior freqüência de exames de sangue incoaguláveis (85,71%). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas 12 a 16 horas pós-mordedura nos grupos IRA e Não-IRA com os biomarcadores VCAM-1 ( $1235,63 \pm 519$  ng/mL *versus*  $818,34 \pm 239,56$  ng/mL,  $p=0,027$ ) e Ang-1 ( $20,48$  ng/mL ( $13,13 - 21,76$ ) *versus*  $1,06$  ng/mL ( $0,52 - 2,56$ ),  $p= 0,016$ ). Angiopietina-1 (AUC-ROC= 0,82 (CI 95%: 0,62-1,0)) e VCAM-1 (AUC-ROC= 0,76 (CI 95%: 0,55-0,98)) mostraram-se bons preditores de IRA 12 a 16 horas após o envenenamento por *Bothrops erythromelas*. **Conclusão:** O uso dos biomarcadores endoteliais VCAM-1 e Ang-1 no intervalo de 12 a 16 hs pós-mordedura, podem ser úteis no diagnóstico precoce da IRA leve relacionada ao envenenamento por *Bothrops erythromelas*, podendo direcionar o manejo de intervenções clínicas para a proteção renal nestes tipos de envenenamentos.

**Palavras Chave:** Injúria renal aguda. *Bothrops erythromelas*. Biomarcadores endoteliais.

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a frequent and potentially fatal complication due to Bothrops snakebite, its late diagnosis of this pathology further worsens the prognosis. The present study aimed to investigate the role of unconventional renal and endothelial biomarkers in AKI pathophysiology, as well as in the early diagnosis and prognosis in patients with envenoming by *Bothrops erythromelas* snakes. **Methods:** It is a prospective study with 26 patients victims of confirmed *Bothrops erythromelas* envenomation attended in the emergency department of a tertiary hospital in the city of Fortaleza, from January 2019 to February 2020. Blood and urine samples were collected concomitantly at 3 different points: on admission (up to 8 h), 12-16 h and 24-28 h post-bite. AKI was defined using the KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) criteria and the patients were divided in 2 groups: AKI and No-AKI. Clinical and renal parameters associated with the evolution and severity of AKI were evaluated. Biomarkers for renal damage (serum NGAL, urinary NGAL and urinary KIM-1) and endothelial biomarkers (Angiotensin 1 (Ang-1), Angiotensin 2 (Ang-2), VCAM-1 and Syndecan-1) were quantified. ROC curves and risk factors for AKI were investigated. **Result:** Most of the 26 patients were male (88,4%), aged 46,6 ( $\pm 14,0$ ) years, and the mean time from the snakebite to hospital admission was 6 h 28 min. 54% of patients developed mild AKI. AKI group had a higher number of patients with incoagulable blood tests (85,71%). Statistically significant differences were observed 12-16 h post-bite in the AKI and No-AKI groups with VCAM-1 ( $1235,63 \pm 519$  ng/mL versus  $818,34 \pm 239,56$  ng/mL,  $p=0,027$ ) and Ang-1 ( $20,48$  ng/mL ( $13,13 - 21,76$ ) versus  $1,06$  ng/mL ( $0,52 - 2,56$ ),  $p=0,016$ ) biomarkers. Angiotensin-1 (AUC-ROC= 0,82 (CI 95%: 0,62-1,0)) and VCAM-1 (AUC-ROC= 0,76 (CI 95%: 0,55-0,98)) were good predictors of AKI 12-16 h after *Bothrops erythromelas* envenomation. **Conclusions:** The use of endothelial biomarkers VCAM-1 and Ang-1 within 12-16 h post-bite may be useful in the early stage of mild AKI related to *Bothrops erythromelas* envenoming, and might direct the management of clinical interventions for renal protection in these envenomations.

**Keywords:** Acute kidney injury. *Bothrops erythromelas*. Endothelial biomarkers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Abundância relativa de espécies de serpentes de importância clínica em todo o mundo.....	23
<b>Figura 2.</b> Serpente da espécie <i>B. erythromelas</i> (A) e sua distribuição geográfica no território brasileiro.....	25
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático das estruturas de domínio de SVMP P-I, P-II e P-III...	28
<b>Figura 4.</b> Fluxograma de atendimento ao paciente vítima de acidente botrópico.....	37
<b>Figura 5.</b> Especificidade dos biomarcadores NGAL e KIM-1 no néfron.....	42
<b>Figura 6.</b> Estrutura do Kidney injury molecule-1.....	45
<b>Figura 7.</b> Modelo esquemático do sistema ligante-receptor de Angiopietina-Tie2.....	48
<b>Figura 8.</b> Fluxograma de seguimento do paciente após soroterapia antitotrópica.....	56
<b>Figura 9.</b> Coleta e processamento de amostras de urina e soro para o estudo dos novos biomarcadores .....	56
<b>Figura 10.</b> Método ELISA sanduíche para determinação dos biomarcadores renais e endoteliais .....	59
<b>Figura 11.</b> Fluxograma de inclusão de pacientes e Classificação IRA vs Não-IRA .....	64
<b>Figura 12.</b> Comparação entre os grupos Não-IRA (Azul) e IRA (Vermelho) quanto aos testes de coagulação (TP e TTPa) na admissão hospitalar.....	68
<b>Figura 13.</b> Níveis mínimos de plaquetas em até 24 horas pós-mordedura para cada um dos dois grupos de pacientes.....	68
<b>Figura 14.</b> Níveis de biomarcadores urinários admissionais nos grupos controles ou voluntários saudios .....	69
<b>Figura 15.</b> Níveis de biomarcadores endoteliais admissionais nos grupos controles ou voluntários saudios.....	70
<b>Figura 16.</b> Curso de tempo das concentrações médias dos biomarcadores renais Kim-1, NGAL sérico e NGAL urinário, para cada um dos dois grupos de pacientes .....	72
<b>Figura 17.</b> Curso de tempo das concentrações medias dos biomarcadores endoteliais VCAM-1, Ang-1, Ang-2 e Syndecan-1 para cada um dos dois grupos de pacientes....	73
<b>Figura 18.</b> Curva ROC do desempenho dos biomarcadores VCAM-1 e Ang-1 no diagnostico precoce de IRA, em pacientes com envenenamento botrópico, nos 2 primeiros momentos da internação hospitalar.....	75
<b>Figura 19.</b> Modelo proposto para explicar o papel dos biomarcadores de endotélio na IRA decorrente do envenenamento botrópico.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Variabilidade na composição protéica dos venenos em diferentes espécies botrópicas.....	30
<b>Tabela 2.</b> Classificação da Injúria Renal aguda segundo os critérios da KDIGO.....	58
<b>Tabela 3.</b> Características demográficas e clínicas de pacientes admitidos após envenenamento botrópico de acordo com o desenvolvimento de IRA.....	66
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros laboratoriais de pacientes admitidos após envenenamento botrópico de acordo com o desenvolvimento de IRA.....	67
<b>Tabela 5.</b> Comportamento dos níveis de biomarcadores nas primeiras horas de permanência hospitalar de acordo com o desenvolvimento de IRA.....	71
<b>Tabela 6.</b> Performance diagnóstica de biomarcadores renais e endoteliais como preditor de IRA em pacientes com envenenamento botrópico.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABRACIT</b>	Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica
<b>AHMA</b>	Anemia Hemolítica Microangiopática
<b>AKI</b>	Acute kidney injury
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>ANG-1</b>	Angiopietina-1
<b>ANG-2</b>	Angiopietina-2
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>AUC-ROC</b>	Área sobre a Curva ROC
<b>B. ERYTHROMELAS</b>	<i>Bothrops erythromelas</i>
<b>CCIV</b>	Coagulopatia de consumo induzida pelo veneno
<b>CEP</b>	Comitê de Ética e Pesquisa
<b>CEs</b>	Células Endoteliais
<b>CIATOX/CE</b>	Centro de Informação e Assistência Toxicológica do Ceará
<b>CKD-EPI</b>	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
<b>CPK</b>	Creatinofosfoquinase
<b>CRISPs</b>	Proteínas secretoras ricas em cisteínas
<b>D</b>	Domínio Desintegrina
<b>DRC</b>	Doença renal crônica
<b>DTNs</b>	Doenças Tropicais Negligenciadas
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMEA</b>	<i>European Medicine Agency</i>
<b>FAB'2</b>	<i>Fragment antigen-binding</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF-23</b>	Fator de crescimento de fibroblastos 23
<b>FH3</b>	Fator hemorrágico 3
<b>FT</b>	Fator Tecidual
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>FVW</b>	Fator de Von Willebrand
<b>HD</b>	Hemodiálise
<b>HUVEC</b>	Células endoteliais da veia umbilical humana
<b>I/R</b>	Isquemia/reperfusão
<b>ICAMs</b>	Moléculas de adesão intracelular
<b>IJF</b>	Instituto Dr. José Frota
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IRA</b>	Injúria renal aguda
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KDIGO</b>	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
<b>KIM-1</b>	<i>Kidney injury molecule-1</i>
<b>LAAO</b>	L-amino ácido oxidase
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase

<b>M</b>	Domínio Catalítico
<b>MAT</b>	Microangiopatia Trombótica
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>NF- κB</b>	Factor Nuclear kappa B
<b>NGAL</b>	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTA</b>	Necrose Tubular Aguda
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDEs</b>	Fosfodiesterases
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PI3K/Akt</b>	Fosfoinosítídeo 3-quinase/ proteína quinase B
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLBs</b>	Fosfolipases B
<b>PPBs</b>	Peptídios potencializadores de bradicinina
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<b>ROK</b>	Rho quinase
<b>SAB</b>	Soro Antibotrópico
<b>SABC</b>	Soro Antibotrópico-crotálico
<b>SABL</b>	Soro antibotrópico-laquéutico
<b>sCr</b>	Creatinina sérica
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

<b>SNALEC</b>	Lectinas tipo C
<b>SVMP</b>	Metaloproteinase
<b>SVSP</b>	Serinoproteinase
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TFG</b>	Taxa de Filtração Glomerular
<b>TFGe</b>	Taxa de Filtração Glomerular estimada
<b>TGO</b>	Transaminase oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase Pirúvica
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TP</b>	Tempo de Protrombina
<b>TTPa</b>	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão celular vascular -1
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>Zn<sup>++</sup></b>	Íon zinco



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	22
2.1. Acidentes ofídicos: Aspectos epidemiológicos globais.....	22
2.2. O Gênero <i>Bothrops</i> .....	24
2.2.1. <i>Bothrops erythromelas</i> .....	25
2.3. Veneno botrópico: Constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas.....	25
2.4. Manifestações Clínicas e tratamento no envenenamento botrópico.....	30
2.4.1. Efeitos locais do envenenamento botrópico.....	30
2.4.2. Efeitos sistêmicos do envenenamento botrópico.....	31
2.5. Envolvimento renal no envenenamento botrópico.....	34
2.6. Tratamento.....	36
2.7. Disfunção endotelial na IRA relacionada ao envenenamento botrópico.....	39
2.8. Biomarcadores de injúria renal e endotelial.....	41
2.8.1 Biomarcadores de injúria renal.....	41
2.8.1.1. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL).....	43
2.8.1.2. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1).....	44
2.8.2 Biomarcadores de injúria endotelial.....	45
2.8.2.1. Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1).....	46
2.8.2.2. Angiopietina-1 (Ang -1) e Angiopietina-2 (Ang-2).....	47
2.8.2.3. Syndecan-1.....	49
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	51
3.1. Objetivo Geral.....	51
3.2. Objetivos Específicos.....	51
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
4.1. Tipo do Estudo.....	53
4.2. Local e período do estudo.....	53
4.3. Critérios de inclusão.....	53
4.4. Critérios de exclusão.....	54
4.5. População do estudo.....	54
4.6. Coleta dos dados demográficos e clínicos.....	54
4.7. Coleta e processamento de amostras biológicas.....	55
4.8. Análises dos parâmetros laboratoriais.....	56
4.9. Avaliação da função renal.....	57
4.10. Determinação dos biomarcadores renais e endoteliais não convencionais.....	59
4.11. Protocolos de tratamento.....	60
4.12. Desfechos.....	61
4.13. Análise estatística.....	61
4.14. Aspectos éticos.....	62
<b>5. RESULTADOS</b> .....	64
5.1. Características demográficas e Clínicas.....	64
5.2. Parâmetros Laboratoriais.....	66
5.3. Níveis de biomarcadores renais e endoteliais durante o período de hospitalização de acordo com o desenvolvimento de IRA.....	69
5.4. Capacidade de diagnóstico precoce de IRA dos biomarcadores renais e endoteliais não convencionais no acidente botrópico.....	74
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	77
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	84
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>APÊNDICES</b> .....	111

## **Introdução**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O Ofidismo é considerado um importante problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como a África, Ásia, Oceania e América latina, sendo incluído desde 2009 na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) do século XXI (GUTIÉRREZ et al., 2013). O envenenamento por mordeduras de serpentes resulta da injeção de venenos, que são misturas complexas de toxinas altamente especializadas, em humanos, sob circunstâncias acidentais, como estratégias de defesa da serpente (GUTIERREZ et al., 2017).

O envenenamento ofídico acomete milhares de pessoas no mundo, sendo responsáveis por mais de 100.000 mortes e resultando em seqüelas físicas permanentes em mais de 400.000 pessoas todos os anos (GUTIERREZ et al., 2017). Afeta principalmente trabalhadores agrícolas em países em desenvolvimento, sendo considerada uma doença ocupacional (WARRELL, 2019), acarretando grande perda de produtividade dos trabalhadores acidentados, contribuindo para o empobrecimento e aumentando a desigualdade social nessas comunidades. O acesso precário aos serviços de saúde, a ausência e escassez do soro antiofídico em algumas localidades, bem como a demora na sua administração, são apontados como os principais fatores na elevação da relação acidente/mortalidade nestes tipos de envenenamentos (KASTURIRATNE et al., 2008). Assim, o investimento em ações de cunho preventivo e curativo nestes tipos de acidente tem importância de caráter social, principalmente em países subdesenvolvidos onde esse problema é subestimado e negligenciado (GUTIÉRREZ et al., 2013; HARRISON et al., 2009).

Na América do Sul o gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas, é a principal serpente de interesse clínico e está associada a taxas significativas de morbimortalidade (SOUSA et al., 2018). O Brasil é o país da América do Sul com maior número de casos de acidentes ofídicos. Embora os dados sobre a prevalência dos envenenamentos ofídicos sejam escassos ou imprecisos, devido à falha no processo de notificação e/ou do entendimento de que muitos pacientes não procuram os serviços de saúde após o acidente (KASTURIRATNE et al., 2008), cerca de 20.000 casos são notificados por ano, sendo a taxa de letalidade anual de 0,45% (LEITE et al., 2013). *Bothrops erythromelas* é a espécie responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região Nordeste (NERY et al., 2016).

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* (toxina botrópica) compreende uma mistura complexa de várias substâncias farmacologicamente ativas com diferentes mecanismos de ação e atividades fisiopatológicas que culminam em efeitos tóxicos locais e sistêmicos. O veneno botrópico é predominantemente hemotóxico e proteolítico (ALBUQUERQUE et al., 2020). De acordo com outros autores, o envolvimento multifatorial incluindo a toxicidade direta do veneno da serpente, a disfunção endotelial causada por enzimas proteolíticas presentes no veneno, anormalidades na coagulação e reações imunológicas estão relacionadas ao mecanismo patogênico de injúria renal aguda (IRA) induzida pelo veneno de serpentes *Viperídes* (AYE et al., 2017).

A IRA no envenenamento por mordedura de serpentes é uma doença importante, freqüente e potencialmente fatal (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012). A incidência de IRA no envenenamento botrópico ainda é subestimada, porém acredita-se que varia entre 1,4 a 38,5% dependendo das distintas espécies de *Bothrops* (PACHECO; ZORTÉA, 2008; EVANGELISTA et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014).

As alterações das células endoteliais e da vasculatura desempenham um papel central na patogênese de várias doenças humanas (RAJENDRAN et al., 2013). Alguns estudos têm sugerido um papel fundamental da disfunção endotelial como um mecanismo de dano patogênico para alguns órgãos (BOISRAMÉ-HELMS et al., 2013), bem como demonstraram uma importante influência da lesão endotelial microvascular durante a IRA isquêmica (POWELL et al., 2014), sugerindo a hipótese, baseado em mecanismos patofisiológicos, que a disfunção microcirculatória leva a IRA (OKUSA et al., 2013). Assim, biomarcadores de injúria endotelial podem ser úteis para apontar a natureza, a magnitude e o sítio da injúria renal baseado em suas especificidades (MURRAY et al., 2014).

Estudos prévios investigaram os mecanismos de IRA em serpentes do gênero *Bothrops* (AYE et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2020), já que estas são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos nas Américas e que o entendimento desta síndrome é essencial para o início imediato de medidas de manejo específicas para diminuir desfechos adversos como doença renal crônica (DRC) e óbito. Além disso, não há até o presente momento, estudos investigando o potencial de biomarcadores de injúria endotelial na detecção precoce do dano renal no envenenamento humano por serpentes do gênero *Bothrops*, dentre elas enfatizamos a espécie *Bothrops erythromelas*, serpente de relevância epidemiológica na região Nordeste do Brasil que, a despeito de sua importância médica, ainda

carece de estudos mais aprofundados. Em vista disso, é relevante compreender os mecanismos envolvidos neste tipo de injúria, considerando que a detecção precoce de IRA no envenenamento botrópico é essencial para um prognóstico mais efetivo, através da investigação de biomarcadores não convencionais de injúria endotelial e renal envolvidos no seguimento da IRA nestes tipos de envenenamentos.

## **Fundamentação teórica**

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

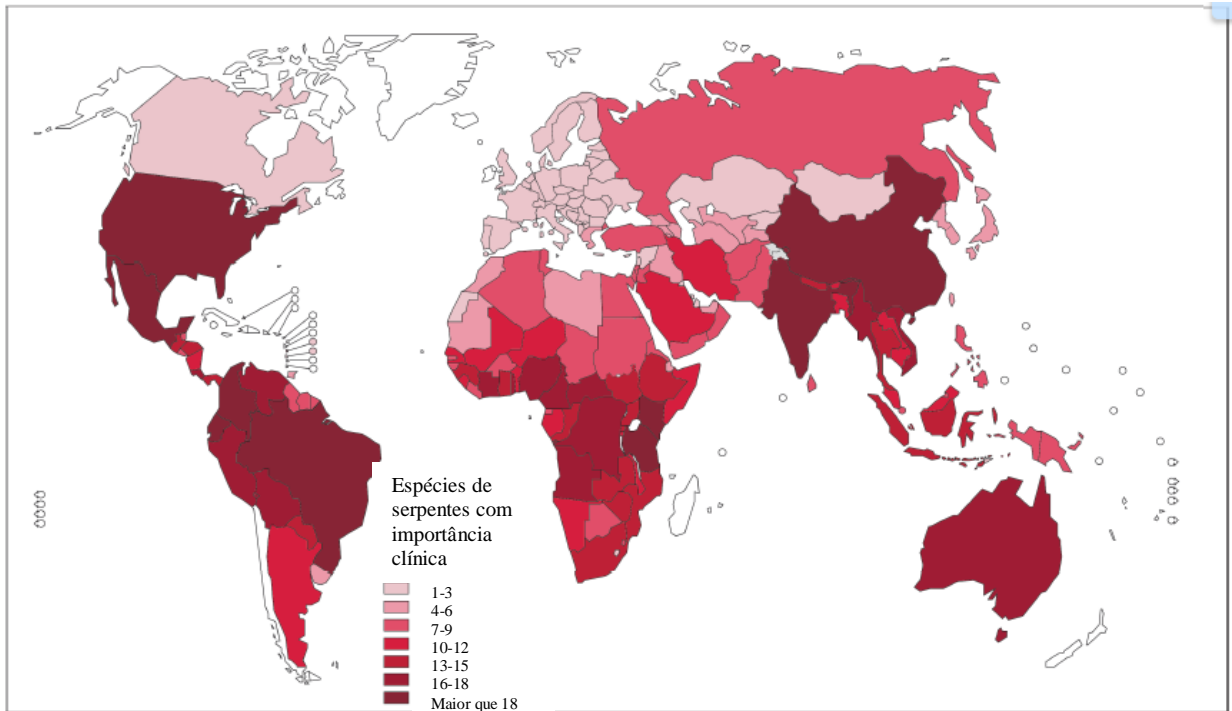
### **2.1. Acidentes ofídicos: Aspectos epidemiológicos globais**

Homem e serpente sempre se relacionaram, embora um não faça parte da cadeia alimentar do outro, o encontro entre essas duas espécies, algumas vezes, pode trazer prejuízos para um dos lados: ou o homem fere ou mata a serpente ou vice-versa (MATOS, 2020).

Apesar de mais de 70% dos casos serem subnotificados, principalmente nas áreas rurais onde a infraestrutura é deficiente, os acidentes causados por mordeduras de serpentes constituem um importante problema de saúde pública devido à frequência com que ocorrem e a morbidade que ocasionam. Estima-se que 4,5 a 5,4 milhões de pessoas por ano no mundo sofrem acidentes ofídicos, destas 1,8 a 2,7 milhões desenvolvem doença clínica, resultando em aproximadamente 81.000 a 138.000 mortes anuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

O envenenamento por mordedura de serpentes ocorre principalmente em áreas rurais de países tropicais e subtropicais da África, Oriente Médio, Ásia, Oceania e América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Atualmente listam-se mais de 3.000 espécies de serpentes no mundo, porém apenas aproximadamente 250 delas são consideradas pela OMS como de importância clínica, devido aos prejuízos que seus venenos podem causar na espécie humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A abundância relativa de espécies de serpentes de importância clínica no panorama mundial está resumida na Figura 1.



**Figura 1.** Abundância relativa de espécies de serpentes de importância clínica em todo o mundo. \*Fonte: modificado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

O Brasil é o terceiro país, junto ao Vietnã, em número de acidentes com serpentes peçonhentas no mundo, atrás apenas de Índia e Sri Lanka (KASTURIRATNE et al., 2008). Em 2020, o Brasil registrou mais de 235 mil acidentes ofídicos. A região Sudeste apresentou o maior número de casos notificados seguidos da região Nordeste com pouco mais de 80 mil casos notificados, onde as serpentes do gênero *Bothrops* foram a espécie predominante (BRASIL, 2021).

Os acidentes ofídicos são mais frequentes durante as estações chuvosas e os membros inferiores são as partes do corpo humano mais acometido (ALBUQUERQUE et al., 2014). Dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) referentes aos anos de 2017 a 2020 revelam uma maior prevalência desses tipos de envenenamentos em grupos etários economicamente ativos (20 a 59 anos) (BRASIL, 2021), o que traz maiores prejuízos financeiros para as vítimas e suas famílias devido à redução ou até mesmo falta da renda familiar, que em alguns casos, podem afetar na probabilidade de se procurar atendimento médico, culminando em problemas de longo prazo associados à elevação da morbidade e mortalidade desses tipos de envenenamentos.



No Brasil, os gêneros de serpentes com importância clínica são *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, sendo o gênero *Bothrops* (*lancehead pitvipers*) o responsável pela maioria dos acidentes (90%) (PUCCA et al, 2020; BÉRNILS, 2009).

## 2.2. O Gênero *Bothrops*

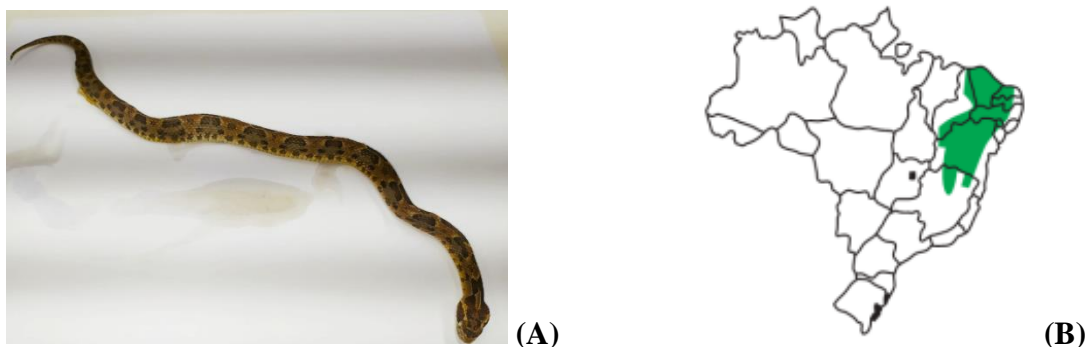
Na fauna brasileira existem 10 famílias de serpentes, constituindo um total de 371 espécies (BÉRNILS, 2009). Entretanto, apenas as famílias *Viperidae* e *Elapidae*, são consideradas peçonhentas, ou seja, apresentam um aparato especializado capaz de produzir venenos e dispõem de aparelhos apropriados para inoculá-los (BRODIE III, 2009).

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família *Viperidae* (Filo *Chordata*, Classe *Reptilia*, subfamília: *Crotalinae*). Compreende cerca de 50 espécies e são popularmente conhecidas no Brasil como “jararacas”, caracterizam-se por apresentarem uma fossa profunda na região loreal (entre os olhos e as narinas) conhecida como fosseta loreal, dentição solenóglifa, além de uma cauda lisa, com cores bastante variadas, dependendo da espécie e região geográfica (PINHO; PEREIRA, 2001). Possuem hábitos noturnos ou crepusculares e habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos (SGRIGNOLLI et al., 2011).

O gênero *Bothrops* abrange as serpentes de maior importância clínica e epidemiológica nas Américas e são responsáveis por mais morbidade humana do que qualquer outro gênero de serpentes na América Latina (CARRASCO et al., 2012; MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015). *Bothrops atrox*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops lutzi*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* são as principais espécies de serpentes botrópicas brasileiras e suas distribuições geográficas variam ao redor das regiões do país (BRASIL, 2001), além da *Bothrops insularis* que habita exclusivamente à Ilha da Queimada Grande a 35 km do litoral paulista, entre os municípios de Itanhaém e Peruíbe, no estado de São Paulo (AMARAL, 1924).

### 2.2.1. *Bothrops erythromelas*:

*Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) (Figura 2), é uma serpente de pequeno porte (40 – 50 cm), comumente conhecida como “jararaca-da-seca”, “jararaca malha de cascavel”, “jararaca do sertão” ou “Caatinga lancehead”. É a espécie responsável pela maior parte dos acidentes ocorridos na região Nordeste do Brasil, habitando regiões quentes, áridas e áreas rochosas abertas dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, extremo oeste do Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (JORGE et al, 2015).



**Figura 2.** Serpente da espécie *B. erythromelas* (A) e sua distribuição geográfica no território brasileiro (B).  
\*Fonte: MOTA et al, 2020 (A); FUNASA, 2001(B).

O nome científico *erythromelas* deriva do grego antigo ἐρυθρός (*érythrós*), que significa "vermelho", e μέλας (*mélas*), que significa "preto", referindo-se a coloração da serpente: a cabeça varia entre o marrom e o marrom-avermelhado e o dorso é marrom-avermelhado com manchas pretas triangulares, dispostas alternadamente ou opostas (JORGE et al, 2015). Embora seja de pequeno porte, esta espécie é responsável pela maior parte dos envenenamentos ofídicos no Nordeste brasileiro (JORGE et al, 2015).

### 2.3. Veneno botrópico: Constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas

Venenos de serpentes constituem um fluido complexo de enzimas, polipeptídeos bioativos, glicoproteínas e componentes não protéicos armazenados em pares de glândulas especializadas que se localizam junto às presas, com funções de imobilizar (reduzindo a

mobilidade ou paralisando), matar ou digerir (degradar tecidos) sua presa, além de ser um mecanismo de defesa contra predadores (CALVETE *et al.*, 2009; JORGE *et al.*, 2015).

As toxinas do veneno ofídico apresentam sua atividade biológica agindo sozinhas ou formando complexos covalentes ou não-covalentes com outras proteínas, elevando assim, seu potencial letal (DOLEY; KINI, 2009). Exibem também uma grande variabilidade de atividades biológicas, tais como, ação coagulante, hemorrágica, hemostática, miotóxicas, cardiovascular, neurotóxica, nefrotóxica e possivelmente hepatotóxica (CALVETE *et al.*, 2009; JORGE *et al.*, 2015; CHIPPAUX, 1991). No gênero *Bothrops* esta ação é predominantemente hemotóxica e proteolítica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020).

A variabilidade na composição dos venenos botrópicos é uma característica importante para a adaptação destas serpentes a diferentes ambientes. Esta variação faz com que a eficácia dos antivenenos seja também afetada, devido à utilização de diferentes venenos para a sua produção (SOUSA *et al.*, 2018). O conhecimento da composição destes venenos apresenta importantes implicações, não apenas em termos de um melhor entendimento deste tipo de envenenamento, o que reflete em tomadas de decisões mais precisas e na eficácia do tratamento, mas também no ramo da toxilogia ou como ferramentas biológicas (CALVETE *et al.*, 2010; SILVA, 2002).

A fração protéica nestes venenos é a fração mais abundante (cerca de 90 a 95% do peso seco) e são responsáveis por quase todas as ações biológicas dos venenos ofídicos (BJARNASON; FOX, 1994; KOH, 2006), sendo compostas pelas proteínas enzimáticas: Fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteinases, metaloproteinases, L-amino ácido oxidase, hialuronidase, nucleotidase e fosfodiesterase, e pelas proteínas não enzimáticas: Lectinas tipo C, desintegrinas, fatores de crescimento e proteínas secretoras ricas em cisteínas (CRISP) (KANG *et al.*, 2011; JORGE (TESE), 2015). A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* possui como componentes protéicos de maior importância três classes: as fosfolipases A<sub>2</sub>, as serinoproteinases e as metaloproteinases (LOMONTE *et al.*, 2014).

As Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) representam uma superfamília de enzimas lipolíticas de 14 a 18 kDa, que hidrolisam fosfolipídios de membrana especificamente na ligação éster *sn*-2-acyl, de forma cálcio-dependente, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). Além de sua ação catalítica, uma grande variedade de atividades farmacológicas tem sido relacionada à ação

dessas enzimas, tais como, miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão, atividade pró e anticoagulante, edematogênica, hemolítica, hemorrágica, antiplaquetária e inflamatória (ARN; WARD, 1996; KINI, 2006).

Serinoproteinases (SVSP) são enzimas abundantes nos venenos de serpentes da família *Viperidae* (chegando até 20% do conteúdo total de proteínas) (KANG et al., 2011), apresentam atividade tipo trombina e agem sobre os componentes da cascata da coagulação sanguínea afetando os sistemas fibrinolítico (degradação do fibrinogênio e o consumo de fibrina) e calicreína-cinina, causando um desequilíbrio do sistema hemostático (SERRANO, 2013). A atividade de liberação das cininas pode ocasionar dor local, vasodilatação e hipotensão sistêmica (CARDOSO *et al.*, 2010).

Metaloproteinases (SVMP) compreendem pelo menos 30% do conteúdo total de proteínas do veneno de serpentes *Viperides* (KANG et al., 2011). Essas enzimas endoproteolíticas dependem do zinco ( $Zn^{++}$ ) para clivar seletivamente as pontes de peptídeos dos componentes da membrana basal, afetando conseqüentemente as interações com as células endoteliais (ESCALANTE et al., 2004; GOMES et al., 2011). São consideradas as principais enzimas responsáveis pelos efeitos hemorrágicos das serpentes do gênero *Bothrops* (BJARNASON; FOX, 1994).

As SVMPs são classificadas em três grupos, conforme representado na Figura 3, de acordo com a organização de seus domínios (OYAMA; TAKAHASHI, 2017):

- SVMPs classe P-I são as menores estruturalmente e as mais simples, com apenas o domínio catalítico(M);
- SVMPs classe P-II contém um domínio catalítico (M) seguido de um domínio desintegrina (D). Sofrem proteólise formando desintegrinas livres com forte ação antiagregante plaquetária;
- SVMPs classe P-III além dos domínios M e D, essas toxinas contém um domínio C (rico em cisteína) que está localizado no lado carboxílico do domínio D.



(NAUMANN *et al.*, 2011). Vários estudos citam as ações biológicas dessas enzimas no envenenamento ofídico, tais como a indução da apoptose (SUHR; KIM, 1999), inibição e indução da agregação plaquetária (STÁBELI *et al.*, 2004) distúrbios da coagulação (SAKURAI *et al.*, 2003), atividade anti-viral, anti-parasitária e hemolítica (TEMPONE *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003).

As desintegrinas são polipeptídeos pequenos, antagonistas de receptores de integrinas que agem inibindo a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, causando hemorragia (TAKEDA *et al.*, 2012).

Lectinas tipo C (SNALEC) são proteínas com capacidade de inibir ou ativar plaquetas, ligando-se a receptores de superfície, como colágeno ou o fator de von Willebrand (FVW), induzindo agregação plaquetária e coagulopatias (MOTA *et al.*, 2020; CLEMETSON, 2010).

Hialuronidases são enzimas que também estão presentes nas peçonhas ofídicas e exercem sua ação hidrolisando o ácido hialurônico, um polissacarídeo longo e linear que está abundantemente presente na matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo frouxo (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017; FOX, 2013). Essa degradação do ácido hialurônico facilita a difusão das toxinas do local da mordedura para a circulação, espalhando o veneno, comportando-se como toxinas auxiliares para que outras toxinas como SVSPs, SVMPs, PLA<sub>2</sub>s, exerçam seus efeitos tóxicos (KEMPARAJU; GIRISH, 2006).

Outras proteínas como as fosfodiesterases (PDEs), capazes de agir sobre ácidos nucleicos (MAMILLAPALLI *et al.*, 1998), as fosfolipases B (PLBs), que atuam lisando eritrócitos e causando citotoxicidade em células musculares (BERNHEIMER *et al.*, 1987), e as proteínas secretoras ricas em cisteínas (CRISPs) que podem bloquear canais iônicos, aumentar a permeabilidade vascular, além de sua ação pró-inflamatória (SILVA, 2017), também são encontradas nos venenos de serpentes e contribuem com os sintomas do envenenamento.

A variabilidade de todas estas toxinas (Tabela 1) faz com que o veneno botrópico tenha grande potencial deletério. Entretanto a semelhança entre as proteínas presentes em diferentes venenos botrópicos constitui a base do tratamento com antiveneno específicos para a peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*.

**Tabela 1** - Variabilidade na composição protéica dos venenos em diferentes espécies botrópicas

Toxina	<i>B.atrox</i>	<i>B. asper</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. lanceolatus</i>
SVMPs (%)	25,8-85,0	30,7-47,4	10,0-64,0	32,5-59,9	42,4-74,2
SVSPs (%)	0,5-21,5	4,4-18,2	3,0-36,0	4,0-9,7	14,4-27,4
PLA <sub>2</sub> s (%)	4,2-48,0	0,4-45,5	<0,1-20,2	8,1-15,1	4,5-8,6
LAAOs (%)	0,5-16,9	1,1-9,2	<0,1-9,7	*	2,8-14,0
Desintegrinas (%)	<0,1-3,2	<0,1-7,5	0,2-7,0	3,4-8,9	*
Lectinas tipo C (%)	0,4-13,1	0,3-16,9	9,0-36,0	8,4-21,6	<0,1-4,5
<b>Referência</b>	(a; b)	(b;c)	(b;d)	(b; e)	(b;f)

Fonte: Adaptado de Larréché et al.. (2021)

(a): HATAKEYAMA *et al.*, 2020; (b): LARRÉCHÉ *et al.*,2021; (c): MORA-OBANDO *et a.l.*, 2020; (d): GALIZIO *et al.*, 2020; (e): JORGE *et al.*, 2015; (f): GUTIÉRREZ *et al.*,2008.

\* Dados não encontrados na literatura.

## 2.4. Manifestações Clínicas no envenenamento botrópico

As toxinas dos venenos botrópicos são responsáveis por várias síndromes clínicas e biológicas, causando efeitos locais e sistêmicos importantes. A severidade do envenenamento causado pela maioria das serpentes *Viperideas* depende de muitos fatores que podem estar relacionados com a serpente (espécie, idade, quantidade de veneno injetada, procedência geográfica), com a vítima (idade, peso, região anatômica onde incidiu a mordedura, uso de torniquete, venenemia, presença de patologias ou comorbidades, entre outros fatores), com o tempo decorrido entre a mordedura e o início da soroterapia e com a qualidade da assistência prestada (CALVETE *et al*, 2011; WEN; MALAQUE, 2013).

### 2.4.1 Efeitos locais do envenenamento botrópico

Logo após o acidente é comum o aparecimento de dor e um discreto sangramento no local da mordedura, sendo que o edema se inicia alguns minutos após. Durante as primeiras 24 horas, a extensão do edema pode aumentar chegando até mesmo a atingir todo o membro do paciente (MALAQUE, GUTIÉRREZ, 2015). Além disso, outros sintomas locais como hemorragia, inflamação, mionecrose, dermonecrose e formação de bolhas também são observados (GUTIÉRREZ *et al*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

A hemorragia local é um sintoma característico do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. Este efeito é causado principalmente pela ação de SVMPs hemorrágicas, ou

hemorraginas. As SVMPs provocam proteólise de componentes da camada basal dos microvasos, causando a ruptura da integridade das células endoteliais e da parede vascular, com conseqüente extravasamento (GUTIÉRREZ *et al*, 2016). Esta ação pode ocorrer em conjunto com a ação de outras hidrolases do veneno, como a hialuronidase, que atua como um fator de espalhamento, aumentando a ação das SVMPs hemorrágicas e SVMPs não hemorrágicas, que potencializa a ação das SVMPs hemorrágicas ao degradar vários componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ *et al*, 2016).

A dor e o edema podem ocorrer como resultado da ativação de várias vias inflamatórias com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), leucotrienos, cininas e citocinas (GUTIÉRREZ *et al*, 2016; JORGE, 2015) ocasionando edema grave, que pode evoluir para uma síndrome compartimental, trazendo graves prejuízos aos pacientes tais como perdas permanentes de tecidos ou amputações devido à presença de necrose (GUTIÉRREZ *et al*, 2009; TEIXEIRA, *et al*, 2009). Estes efeitos são causados principalmente pela ação das SVMPs e PLA<sub>2</sub>s, porém outras toxinas, tais como SVSPs, hialuronidases e outros componentes do veneno, podem ter participação nessas manifestações clínicas ao agir em cascatas inflamatórias plasmáticas ou induzir a degranulação dos mastócitos (TEIXEIRA, *et al*, 2009).

A miotoxicidade devido a uma ação direta ou indireta de toxinas da peçonha botrópica é outro importante e grave evento local. A miotoxicidade direta é resultado da ação das PLA<sub>2</sub>s sobre a membrana plasmática de células musculares esqueléticas causando danos irreversíveis a estas células, culminando em morte celular ou necrose (GUTIÉRREZ *et al*, 2016). Já a miotoxicidade indireta ocorre devido à ação das SVMPs hemorrágicas, causando perturbações na microvasculatura e isquemia, resultando em necrose muscular (GUTIÉRREZ *et al*, 2009b).

#### **2.4.2 Efeitos sistêmicos do envenenamento botrópico**

Os efeitos sistêmicos do envenenamento botrópico incluem hipotensão arterial, coagulopatias, alterações hemodinâmicas, hemólise intravascular, cardiotoxicidade, edema pulmonar, injúria renal aguda, hemorragias em locais distantes da mordedura (gengivorragias, hemoptise, hemorragias gastrointestinais, genito-urinárias, intracerebral, na conjuntiva ocular e nos pulmões) e falência de múltiplos órgãos. Dentre esses, os efeito hemostáticos são os



mais comuns e característicos no envenenamento botrópico (WARREL, 2005; MADUWAGE & ISBISTER, 2014; SLAGBOOM *et al.*, 2017).

Hemorragias nas mucosas são as primeiras manifestações de sangramento sistêmico. O sangramento gengival e a hematúria são os mais frequentes, embora também possam ocorrer epistaxe, sangramento conjuntival, otorragia e metrorragia (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019; OTERO-PATINÕ *et al.*, 2012; BUCARETCHI *et al.*, 2001). A hemorragia do sistema nervoso central é uma complicação gravíssima podendo ser intracerebral, intraventricular, subaracnóide, subdural, extradural, cerebelar ou medular (OTERO-PATINÕ, 2009; PÉREZ-GÓMEZ *et al.*, 2019; DELGADO *et al.*, 2017). Em um estudo sobre a prevalência de complicações cérebro-vasculares nos acidentes botrópicos, verificou-se 2,6% das vítimas desenvolveram este tipo de evento, dos quais 60% tiveram óbito e 40% permaneceram com seqüelas (MOSQUERA *et al.*, 2003). Os sangramentos sistêmicos estão significativamente associados à maior letalidade (SOUZA *et al.*, 2018) nos acidentes ofídicos.

No acidente botrópico, a hemorragia sistêmica pode ocorrer mesmo com a contagem normal de plaquetas e com testes incoaguláveis, sugerindo dano vascular (OLIVEIRA *et al.*, 2019). As SVMPs hemorrágicas agem hidrolisando as proteínas capilares da membrana basal, então a pressão hidrostática e a tensão de cisalhamento tangencial promovem a distensão da parede dos capilares, resultando no rompimento da integridade das células endoteliais causando hemorragia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Um estudo experimental revelou que quando o fluxo de sangue foi interrompido, nenhum distúrbio patológico foi observado nas células endoteliais, sugerindo que o fluxo sanguíneo é essencial para a ocorrência de uma endoteliopatia rápida associada ao envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006).

As SVMPs contribuem indiretamente para a ocorrência de hipotensão, aumentando a permeabilidade vascular através da deteriorização das membranas basais capilares, causando extravasamento e redução na pressão arterial (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). A peçonha das serpentes botrópicas ainda pode induzir hipotensão por efeitos vasodilatadores diretos atribuídos à liberação de bradicinina pelas SVSPs e peptídios potencializadores de bradicinina (PPBs) presentes no veneno (PHILLIPS *et al.*, 2010; CAMARGO *et al.*, 2012). Essas várias toxinas presentes no veneno podem agir isoladamente ou em combinação, causando choque devido à hipotensão sistêmica (SLAGBOOM *et al.*, 2017).

A peçonha botrópica age em várias etapas da hemostasia, o que leva a distúrbios de coagulação tais como coagulopatia de consumo induzida pelo veneno (CCIV), trombocitopenia, hipofibrinogenemia, microangiopatia trombótica (MAT) e macrotrombose (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021). SVMPs e SVSPs presentes no veneno exercem seu efeito agindo como enzimas semelhantes à trombina ou como enzimas fibrinogenolíticas, além de ativarem fatores da coagulação ou atuando diretamente sobre as plaquetas (KORNALÍK, 1985; SAJEVIC *et al.*, 2011). A redução do número de plaquetas foi explicada devido a sua ativação, agregação e seqüestro em resposta ao extenso dano vascular e também à geração de trombina intravascular observada devido à ação das SVMPs (RUCAVADO *et al.*, 2005).

Nielsen e colaboradores (2019) realizaram um estudo em plasma humano o qual evidenciou uma atividade predominantemente pró-coagulante com elevação da velocidade de coagulação e da velocidade de crescimento do coágulo em pacientes que sofreram envenenamento botrópico. Essa ativação patológica da coagulação sanguínea culmina na incoagulabilidade, hipofibrinogenização e consumo de fatores de coagulação após sua ativação e/ou degradação (RUCAVADO *et al.*, 2005). Pacientes com envenenamento botrópico geralmente apresentam elevação do tempo de protrombina (TP) e tempo de trombolastina parcial ativada (TTPa), com baixos níveis de fibrinogênio (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021; S OLIVEIRA *et al.*, 2020). A ativação dos fatores de coagulação pelo veneno leva à geração de trombina endógena, mesmo sem a adição de fator tecidual (FT) como gatilho (DUARTE *et al.*, 2019). Assim, a coagulopatia relacionada à mordedura de serpentes botrópicas deve ser distinta da coagulopatia intravascular disseminada usual devido à geração de trombina mediada pela via FT/VIIa (ISBISTER, 2010).

A microangiopatia trombótica (MAT) foi recentemente descrita em casos de envenenamento por *B. jararaca* (BUCARETCHI *et al.*, 2019; MALAQUE *et al.*, 2019), *B. venezuelensis* (FUCHS, *et al.*, 2020) e *B. erythromelas* (MOTA *et al.*, 2020). É caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática (AHMA), e injúria renal aguda (IRA) (NOUTSOS *et al.*, 2022). As características associadas à MAT tendem a começar 1 a 3 dias após a mordedura, apesar do antiveneno, e podem persistir por mais de duas semanas pós-mordedura (FUCHS *et al.*, 2020). O mecanismo exato de MAT em mordeduras de serpentes ainda permanece desconhecido. No entanto, acredita-se que as toxinas do veneno podem ser a causa do dano endotelial e da deposição de microtrombos de fibrina que resultam em MAT. (MOTA *et al.*, 2020).

A IRA é uma complicação que traz bastante preocupação nos acidentes botrópicos e está relacionada com casos de letalidade (SITPRIJA, 2008). A lesão endotelial e ativação da coagulação induzida por toxinas principalmente proteases (SVMPs e SVSPs) e fosfolipase A2, pode resultar em microangiopatia trombótica, que contribui para a diminuição do fluxo sanguíneo renal. Alterações hemodinâmicas, mediadores vasoativos e inflamatórios e nefrotoxicidade direta causada pelas toxinas do veneno estão diretamente relacionados com as causas de dano renal (SITPRIJA, 2008).

## **2.5. Envolvimento renal no envenenamento botrópico**

A injúria renal aguda (IRA) relacionada ao envenenamento botrópico é uma doença freqüente e potencialmente fatal (ALBUQUERQUE *et al*, 2014; MOHAMED *et al*, 2015). Sua real incidência é variável e subestimada, não somente devido às imprecisões das definições, como também devido à falha nas notificações em algumas áreas rurais (SGRIGNOLLI *et al*, 2011). Entretanto a prevalência de IRA induzida por peçonhas botrópicas varia entre 1,4 a 44,4% (ALBUQUERQUE *et al*, 2020; ALVES *et al*, 2018). Estudos recentes revelaram uma significativa incidência de IRA em pacientes considerados graves e seu impacto nos desfechos clínicos (HOLMES *et al*, 2018). O aparecimento de manifestações renais se dá poucas horas após o acidente botrópico, podendo ser grave, necessitando de diálise (SGRIGNOLLI *et al*, 2011). Otero e colaboradores (2002) realizaram um estudo na Colômbia relatando que o atraso na administração do soro antibotrópico em mais de 2 horas do acidente constitui um importante fator de risco para IRA.

A injúria renal no envenenamento botrópico é comumente oligúrica, parecendo ser de origem multifatorial (MORAIS *et al*, 2013) e pode ser produzida pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos causados pela ação das toxinas botrópicas, tais como (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; SGRIGNOLLI *et al*, 2011; SITPRIJA, 2008):

- Ação direta da peçonha sobre as células tubulares renais;
- Alterações hemodinâmicas induzidas por citocinas pró-inflamatórias e mediadores vasoativos, diminuindo a resistência vascular sistêmica, aumentando a resistência vascular renal, causando diminuição do fluxo sanguíneo renal;

- Efeito de depósitos de fibrina nos capilares glomerulares, devido a anormalidades na coagulação;
- Hemoglobinúria e mioglobinúria;
- Mecanismos imunológicos;
- Estresse oxidativo.

A necrose tubular aguda (NTA) é o achado histológico mais freqüente na IRA após um acidente botrópico. Porém outras lesões anatomopatológicas, tais como, necrose cortical, nefrite intersticial aguda e alterações glomerulares, foram descritas (SGRIGNOLLI *et al.*, 2011; BURDMANN *et al.*, 1993).

A mordedura de serpentes *Bothrops erythromelas* pode ocasionar microangiopatia trombótica (MAT) (MOTA *et al.*, 2020), que pode levar a necrose cortical renal (GN *et al.*, 2017; BUCARETCHI *et al.*, 2019). Outros dois possíveis fatores agravantes que podem contribuir para a necrose cortical renal são: a hipoperfusão renal e a lesão endotelial vascular através de mecanismos direto ou indireto, e liberação de substâncias circulantes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; PRAKASH & SINGH, 2015). A formação de microtrombos e a migração de leucócitos através das células endoteliais para o compartimento intersticial renal pode contribuir para a disfunção vascular. Essa disfunção é um fator precoce e proeminente na IRA, levando a processos de ischemia /reperfusão (I/R), comprometendo o fluxo sanguíneo e sua regulação, pois ocorre um intumescimento das células endoteliais, além da ruptura da monocamada endotelial, do glicocálix e regulação positiva de moléculas de adesão, tais como ICAMs (moléculas de adesão intracelular), VCAMs-1 (moléculas de adesão celular vascular -1) e selectinas, o que leva a um aumento das interações endotélio-leucócitos e o aparecimento de edema no compartimento intersticial (EDELSTEIN, 2018; ALBUQUERQUE *et al.*, 2020).

As toxinas presente na peçonha botrópica induzem a formação de microtrombos glomerulares devido à geração de trombina, seguidas pela formação de fibrina e deposição no leito vascular. Microtrombos glomerulares, lesão endotelial e hemólise intravascular representam as principais vias para o desenvolvimento de IRA relacionada ao envenenamento botrópico (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021; ALBUQUERQUE *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2018). Vale ressaltar que as toxinas envolvidas na formação de trombos podem levar à inflamação sistêmica e amplificar esse processo (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

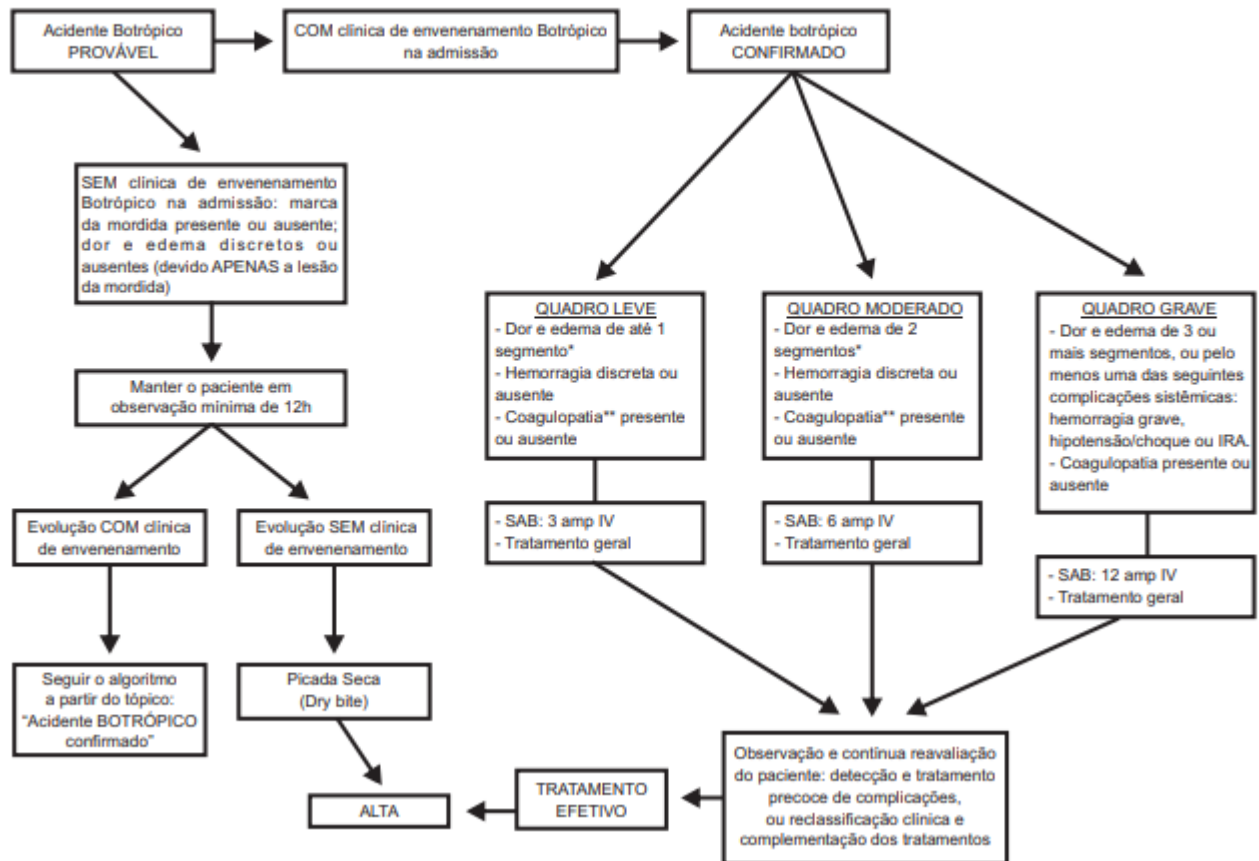
A maioria dos pacientes com envolvimento renal secundário ao envenenamento botrópico e pós-soroterapia, recuperam a função renal após tratamento com fluidoterapia. Entretanto, a IRA após acidente ofídico tem sido apontada como um provável fator de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC), que pode acometer tanto o paciente adulto quanto criança (BURDMANN & JHA, 2017).

## 2.6. Tratamento

As estratégias terapêuticas no que diz respeito aos envenenamentos ofídicos, devem começar o mais breve possível. Manter a calma, evitar esforços físicos, manter elevado o membro atingido pela serpente, hidratar bem a vítima, não fazer torniquetes ou garrotes, não fazer sucção oral, perfurações ou cortes no local da mordedura (BERNARDE, 2014), são medidas prévias não farmacológicas que devem ser consideradas visando reduzir o agravamento do quadro clínico das vítimas de acidentes ofídicos.

A soroterapia antibotrópica é o único tratamento eficaz disponível para combater os efeitos do envenenamento botrópico sistêmico. O tratamento específico consiste na administração intravenosa, em ambiente hospitalar, de soro antibotrópico (SAB) e, na ausência deste, soro antibotrópico-crotálico (SABC) ou antibotrópico-laquético (SABL) (SILVA *et al.*, 2013). A classificação do acidente é dinâmica e ocasionalmente pode ser necessária uma nova reclassificação e utilização de dose complementar de soro antibotrópico, a depender da evolução clínica e laboratorial do paciente (ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2017). A Figura 4 mostra o fluxograma de atendimento ao paciente vítima de acidente botrópico adotados nos Centros de informação e Assistência Toxicológica (CIATOXs) do Brasil.

## ACIDENTE BOTRÓPICO (jararaca)



\* O membro picado é dividido em 3 segmentos: Membro superior: 1- Mão e punho; 2- Antebraço e cotovelo; 3- Braço. Membro inferior: 1- Pé e tornozelo; 2- Perna e joelho; 3- Coxa. \*\* Coagulopatia: Pode ser detectada através do Tempo de Coagulação (TC), do Coagulograma ou da dosagem do Fibrinogênio. \*\*\* Tratamento geral: abordagem da dor, hidratação adequada, drenagem postural, analgesia e profilaxia do tétano. **IMPORTANTE:** Todo paciente submetido a tratamento soroterápico deve ficar em observação por, no mínimo, 24h. Legenda: SAB: Soro antibotrópico (pentavalente); IV: Intravenoso; EPA: Edema Agudo de Pulmão. OBS: Na falta do SAB, utilizar SABC [Soro antibotrópico (pentavalente e anticrotático)] ou SABL [Soro antibotrópico (pentavalente e antilaquetico)].

**Figura 4-** Fluxograma de atendimento ao paciente vítima de acidente botrópico.

\*Adaptado de <https://www.saude.gov.br/files/vigilancia/CIATox/material-tecnico>

Os antivenenos são produzidos através de hiperimunização de animais, principalmente cavalos e ovelhas, com a peçonha de uma ou várias espécies de um mesmo gênero (ESPINO-SOLIS *et al*, 2009). A soroterapia específica confere ao paciente anticorpos de alta afinidade que irão neutralizar as toxinas responsáveis pelos efeitos tóxicos sistêmicos do envenenamento (SULLIVAN JR, 1987), evitando muitas vezes, desfechos fatais.

A produção e o uso de antivenenos são dificultados pela ampla variabilidade bioquímica e imunogênica dos venenos de serpentes, relacionados a padrões complexos de variação regional e ontogenética entre espécies e dentro de uma mesma espécie (PIDDE-QUEIROZ *et al*, 2008). Por este motivo, *pools* representativos de venenos são utilizados na confecção das misturas de imunização, de forma a cobrir o largo espectro de diversidade dos venenos (SEGURA *et al*, 2012). No Brasil, a produção do soro antiofídico é realizada a partir de uma formulação pentavalente contendo Fab'2 (*Fragment antigen-binding*) IgG contra: *Bothrops jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%) (ARAUJO *et al*, 2008). A espécie *B. erythromelas*, que é a principal responsável pelos acidentes ofídicos na região Nordeste, não faz parte do *pool* utilizado para a fabricação do soro antiofídico brasileiro. Vale ressaltar que os efeitos do envenenamento ofídico por serpentes do gênero *Bothrops*, em sua maioria, apresentam ação ativadora direta sobre protrombina, atividade trombina-like e/ou ativação do fator X da cascata de coagulação. Entretanto, a espécie *B. erythromelas* difere de outras espécies botrópicas por apresentar alta atividade coagulante (ZAPPELLINI, 1991) e por não possuir ação similar a trombina (SVSPs que atuam diretamente sobre o fibrinogênio transformando-o em fibrina) causando distúrbios hemostáticos graves (MARUYAMA *et al*, 1992). Assim, alguns estudos sugerem que os soros antiofídicos utilizados no Brasil podem não neutralizar completamente as atividades tóxicas de todas as espécies botrópicas, apontando para a necessidade de preparação de um soro antiofídico universal (FÉLIX-SILVA *et al*, 2017a; QUEIROZ *et al*, 2008), pois a presença de componentes particulares em cada peçonha pode resultar em soros com baixa cobertura de neutralização. A existência de componentes com alto poder imunogênico e com baixa ação tóxica pode esclarecer a presença do reconhecimento imunológico, entretanto com baixo potencial neutralizante (FÉLIX-SILVA *et al*, 2017a).

Os antivenenos apresentam algumas limitações que podem interferir com a eficácia clínica do tratamento (CUPO, 2015) tais como: ineficácia na neutralização do dano tecidual local (GUTIÉRREZ *et al*, 2009c) e induzir reações adversas que podem variar de leves (urticária, rubor facial, tremores, náuseas e vômitos) a graves (angioedema, broncoespasmo, taquicardia e hipotensão) (CARDOSO *et al*, 1993; CARON *et al*, 2009). As reações podem ser precoces, quando ocorrem durante a infusão do soro e nas duas horas subseqüentes ou, tardias também conhecidas como “Doença do Soro”, quando ocorrem de 5 a 24 dias após o uso do soro antiofídico (BRASIL, 2001).

Outros problemas relacionados à soroterapia incluem a baixa disponibilidade do tratamento em áreas distantes do local onde ocorreu o acidente, os atrasos na administração, necessidade de refrigeração, e o alto custo do tratamento (CRUZ *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009c).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos na busca por alternativas complementares a soroterapia antiofídica tradicional (FÉLIX-SILVA *et al.*, 2017b; GUIMARAES *et al.*, 2014; MORS *et al.*, 2000; SANTHOSH *et al.*, 2013). Nesse sentido, algumas plantas medicinais como a *Jatropha gossypifolia* com atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana são apontadas, especialmente, no tratamento dos efeitos locais induzidos pelo envenenamento de serpentes (FÉLIX-SILVA *et al.*, 2018). Intervenções adicionais também podem fazer parte do tratamento nos envenenamentos ofídicos. São elas: hidratação e equilíbrio de eletrólitos, diálise, antibióticos nas infecções secundárias ao envenenamento, intervenções cirúrgicas no debridamento de tecidos necrosados e administração do toxóide tetânico, como profilaxia anti-tetânica (CRUZ *et al.*, 2009).

## **2.7. Disfunção endotelial na IRA relacionada ao envenenamento botrópico**

O endotélio vascular corresponde a uma monocamada de células endoteliais (CEs), que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos, formando assim uma interface entre os tecidos e o sangue (GONCHAROV *et al.*, 2017). Devido possuir essa localização estratégica, faz ao mesmo tempo uma barreira e uma ponte entre o sangue e os tecidos circundantes, controlando assim a troca de nutrientes, mensageiros e biomoléculas entre eles (LEITE *et al.*, 2020; DAIBER *et al.*, 2017). A integridade funcional e estrutural do endotélio é fundamental para regular funções hemostáticas essenciais, como tônus vascular, circulação de células sanguíneas, inflamação e atividade plaquetária (DAIBER *et al.*, 2017). A maioria dos estímulos que levam a uma resposta inflamatória sistêmica tais como, trauma, infecção grave, destruição excessiva de tecidos, tumores sólidos, leucemia, complicações associadas à gravidez, anomalias vasculares, insuficiência hepática, respostas toxicológicas ou imunológicas e ativação do sistema de coagulação podem estar associados a dano endotelial (PAULUS *et al.*, 2011).



Os venenos de cobras *Viperides* podem causar danos ao endotélio e a membrana basal dos capilares (AYE *et al.*, 2017). Em um estudo realizado com a peçonha de *Bothrops asper*, Moreira e colaboradores (1992) evidenciaram por meio da microscopia eletrônica, o padrão morfológico do dano vascular associado a uma redução na espessura de células endoteliais com presença de bolhas e saliências citoplasmáticas, adentrando-se para o lúmen vascular, além de uma diminuição no número de vesículas pinocitóticas e descolamento de algumas células endoteliais de sua membrana basal circundante, favorecendo o aparecimento de lacunas nas células endoteliais, com conseqüente extravasamento, causando hemorragias (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021). Vale também citar que o Fator hemorrágico 3 (FH3), uma SVMP da classe P-III do veneno de *Bothrops jararaca*, cliva in vivo proteoglicanos presentes no glicocálix endotelial, como o Syndecan-1, promovendo a ruptura da integridade dos microvasos, resultando em hemorragia (ASEGA *et al.*, 2020).

As SVMPs presentes nas peçonhas botrópicas são capazes de degradar diversos componentes como colágeno (tipo I e IV), fibronectina e laminina (RUCAVADO *et al.*, 1995; FRANCESCHI *et al.*, 2000), induzir apoptose celular e liberação de diversas moléculas endoteliais que podem ser responsáveis por suas diferentes atividades hemorrágicas (SCHATTNER *et al.*, 2005). A SVMP hemorrágica hidrolisa as proteínas da membrana basal dos capilares, ocorrendo então à distensão da parede capilar resultando na ruptura da integridade da célula endotelial, com conseqüente hemorragia. (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006).

Alterações agudas nas células endoteliais podem levar à alterações na permeabilidade e reatividade vascular, na aderência de leucócitos, coagulação e autorregulação vasomotora microvascular, perpetuando a IRA. (ROBINSON-COHEN *et al.*, 2016). Boissramé-Helms e colaboradores (2013) relataram um papel fundamental da disfunção endotelial como mecanismo patogênico de injúria em alguns órgãos. No ano seguinte, Powell e seu grupo (2014) demonstraram uma potencial influência da injúria endotelial microvascular na IRA isquêmica, o que sugere que biomarcadores endoteliais podem ser utilizados para delinear a natureza, magnitude e local da injúria renal baseado em sua especificidade (MURRAY *et al.*, 2014). A injúria endotelial pode prejudicar a função renal por vários meios: influenciando a reatividade vascular, alterando a função da barreira capilar, promovendo a inflamação e a atividade pró-coagulante. Isto tudo podem prolongar o estado de hipoperfusão renal e culminar em IRA (BASILE, 2007). A investigação e elucidação dos mecanismos envolvidos na injúria endotelial relacionada ao envenenamento botrópico surge então, como uma

ferramenta promissora para a detecção precoce de danos agudos, como a injúria renal aguda, uma entidade comum, grave e potencialmente fatal nos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*.

## **2.8. Biomarcadores de injúria renal e endotelial**

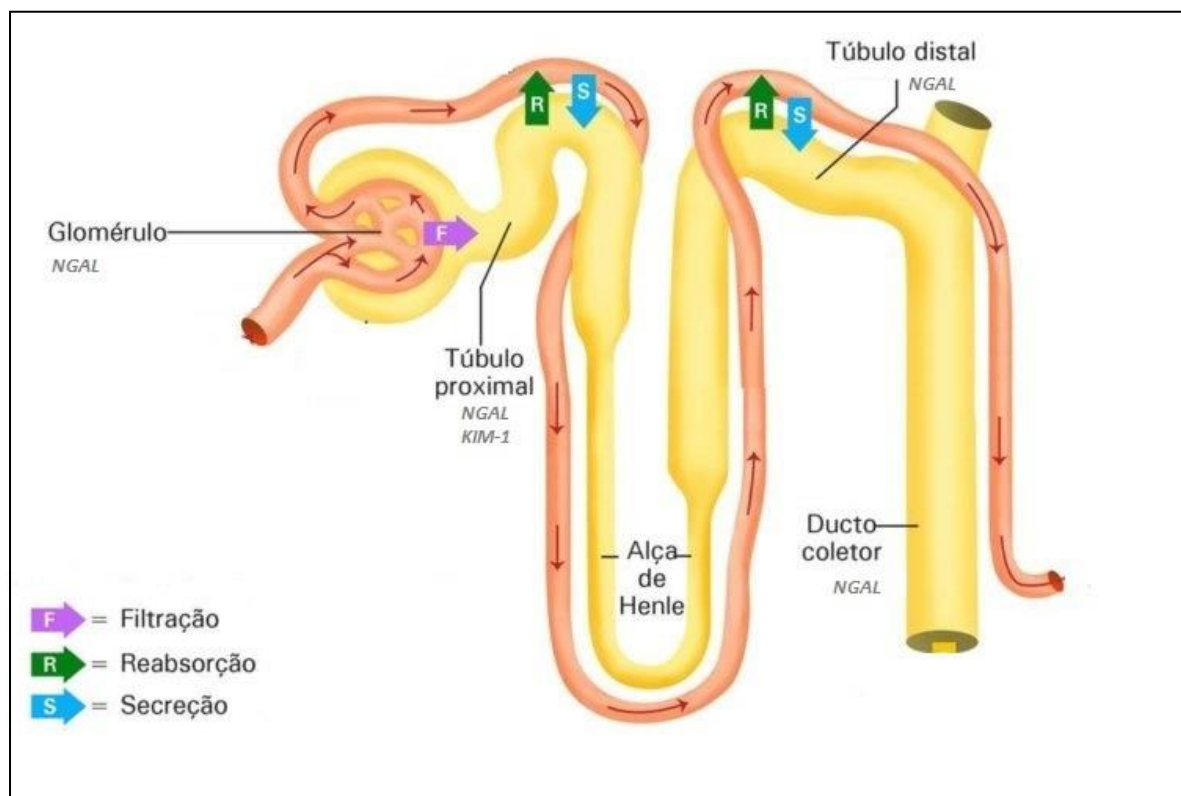
### **2.8.1 Biomarcadores de injúria renal**

O termo “biomarcador” ou marcador biológico inclui qualquer entidade que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (KATZ, 2004; MURRAY *et al.*, 2014). Assim, ao longo dos últimos anos, o campo de biomarcadores para IRA expandiu-se rapidamente com a identificação de diferentes moléculas oriundas de danos renais (KATZ, 2004; VAIDYA & BONVENTRE, 2006; VAIDYA *et al.*, 2008; CHAWLA & KELLUM, 2012; MURRAY *et al.*, 2014). Essas moléculas variam de proteínas constitutivas liberadas pelo rim lesionado a moléculas reguladas positivamente em resposta a injúria ou produtos teciduais não renais que são filtrados, reabsorvidos ou secretados pelos rins (BONVENTRE *et al.*, 2014), além de proteínas ou moléculas encapsuladas em exossomos (pequenas vesículas que transportam material de uma célula para outra promovendo a comunicação e sinalização intercelular) e, mais recentemente microRNAs (CHAWLA & KELLUM, 2012).

O diagnóstico precoce da IRA ainda se apresenta como um desafio nos dias atuais, uma vez que o diagnóstico desta entidade está baseado apenas nas alterações séricas da creatinina e na redução da diurese (HAASE *et al.*, 2009; MURRAY *et al.*, 2014). No entanto, os níveis de creatinina sérica só se elevam quando a taxa de filtração glomerular (TFG) já está gravemente comprometida (URBSCHAT *et al.*, 2011). Além disso, esse marcador sérico pode sofrer influência de diversos outros fatores como peso, raça, idade, sexo, graus de hidratação, volume corporal total, metabolismo e ingestão de proteínas. Portanto, elevações nos níveis séricos de creatinina podem ocorrer em até 72 horas, o que torna o diagnóstico da doença renal muito tardio, contribuindo para um maior número de pacientes com IRA já estabelecida

(COCA *et al.*, 2008; MÅRTENSSON; MARTLING; BELL, 2012; PARIKH; MANSOUR, 2017).

O desconhecimento de um biomarcador precoce que sinalize a injúria renal motivou o interesse de vários pesquisadores em apresentar e validar novos biomarcadores de IRA que fossem mais sensíveis, específicos e precoces na identificação do dano renal em relação aos marcadores renais clínicos clássicos (MCCULLOUGH *et al.*, 2013; KASHANI; CHEUNGASITPORN; RONCO *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2019). Assim, cada novo biomarcador renal tem uma maior especificidade para determinada porção do néfron, o que contribui na detecção do local da injúria renal e na elucidação dos mecanismos nefrotóxicos (PARIKH; MANSOUR, 2017). Para a IRA destacam-se o *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) que é um biomarcador de lesão celular e estrutural do rim e o *Kidney injury molecule-1* (KIM-1), um biomarcador específico para injúrias no túbulo proximal renal (SABBISSETTI & BONVENTRE, 2012) (Figura 5).



**Figura 5-** Especificidade dos biomarcadores NGAL e KIM-1 no néfron

\*Adaptado de <https://anatomia-papel-e-caneta.com/sistema-urinario/>

### 2.8.1.1. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) é uma proteína de 25-kDa, composta por 178 aminoácidos, pertencente a família das lipocalinas que estão envolvidas no processo de manutenção da homeostase celular (SONI *et al*, 2010; FLOWER, 1996). Sendo uma proteína transportadora de ferro que é reabsorvida, principalmente, pelos túbulos renais em condições normais, apresenta a função de regeneração das células renais (MISHRA *et al*, 2003; MISHRA *et al*, 2005). NGAL é sintetizada na medula óssea durante a mielopoiese, de onde é direcionada e armazenada nos grânulos dos neutrófilos até que a célula seja ativada (BORREGAARD; COWLAND, 1997; LASKOSKI *et al*, 2012 ). Encontra-se também presente em vários tecidos não hematopoiéticos como cólon, traquéia, pulmão e o epitélio renal (BORREGAARD; COWLAND, 1997; MÅRTENSSON; BELLOMO, 2014). Neste último, exibe expressão aumentada nas células epiteliais tubulares em estágios iniciais da injúria (YUEN *et al*, 2006), sendo filtrado no glomérulo renal e excretado facilmente na urina devido ao seu pequeno tamanho molecular (MISHRA *et al*, 2005). Os níveis de NGAL urinário se encontram elevados nas nefropatias isquêmicas e injúrias nefrotóxicas, indicando problemas na reabsorção tubular proximal e no néfron distal (MISHRA *et al*, 2003).

Nos últimos anos, NGAL deixou de ser um marcador de inflamação sistêmica indiferenciada para se tornar um possível marcador para detecção precoce de IRA. Análises genômicas revelaram que NGAL foi um dos genes mais rapidamente regulados após IRA isquêmica em animais e que a concentração urinária aumentou significativamente dentro de poucas horas do insulto (MISHRA *et al*, 2003; SUPAVEKIN *et al*, 2003). O primeiro estudo que avaliou esse biomarcador como preditor de evolução de IRA foi realizado em crianças submetidas à cirurgia cardíaca. NGAL urinária aumentou quase 100 vezes e a NGAL sérica 20 vezes em até 48 horas antes da elevação da creatinina (MISHRA *et al*, 2005). Recentemente, Albuquerque e colaboradores (2019) demonstraram bons resultados de NGAL urinário (uNGAL) como preditor de IRA, no momento da admissão hospitalar, em pacientes com envenenamento botrópico. Porém este estudo teve como limitação a falta de amostras seriadas mais precoces de cada paciente, com tempos pós-mordedura estabelecidos, o que pode ter subestimado o desempenho preditivo deste biomarcador.

Na inflamação sistêmica grave, como a sepse, ocorre ativação de neutrófilos circulantes que liberam seu conteúdo granular, incluindo NGAL. Além disso, a síntese de

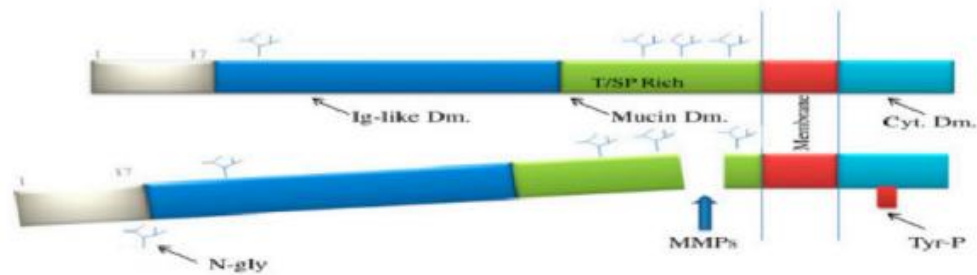
NGAL aumenta em células não hematopoiéticas em vários tecidos como pulmão (GRIGORYEV *et al.*, 2008), e o fígado (FLO *et al.*, 2004) como parte da resposta inflamatória, o que aumenta a carga de NGAL filtrada pelos rins, e consequentemente os níveis urinários deste biomarcador independentemente de qualquer dano renal potencial. Baseado nestes fatos, NGAL pode ser considerado um marcador de IRA mais específico em pacientes que não se encontrem em condições inflamatórias crônicas e agudas, frequentemente presentes em pacientes que necessitam de cuidados intensivos (UTI), pacientes com necessidades de procedimentos extracorpóreos, exacerbações agudas de doenças pulmonares obstrutivas, DRC e infecções do trato urinário. Dosagens de NGAL como preditor de IRA serão mais promissoras e fiéis em pacientes admitidos no serviço de emergência e sem processos inflamatórios crônicos graves (MÅRTENSSON; BELLOMO, 2014).

#### **2.8.1.2. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)**

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) é uma proteína transmembranar apical do túbulo proximal. Apresenta uma porção citoplasmática e outra extracelular que é formada por um ectodomínio composto por um domínio tipo imunoglobulina com 6 cisteínas ligadas em sítio de N-glicosilação, além de um domínio mucina, formado por proteínas glicosiladas em sítios de O-glicosilação (BONVENTRE, 2014; ICHIMURA; MOU, 2008). É um dos sete biomarcadores aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e pelo European Medicine Agency (EMA) que podem ser usados para detecção de nefrotoxicidade, influenciando a tomada de decisões clínicas (FDA, 2008; DIETERLE *et al.*, 2010).

Na injúria renal isquêmica/tóxica, o domínio extracelular do KIM-1 é separado da membrana por metaloproteínases e liberado na urina, aumentando os níveis urinários dessa molécula em até 100 vezes em pacientes com IRA (Figura 6) (VAIDYA *et al.*, 2010). Bonventre (2009) demonstrou que KIM-1 pode ser identificado nas células epiteliais

indiferenciadas do túbulo proximal 48 horas após a injúria de isquemia-reperfusão.



**Figura 6.** Estrutura do Kidney injury molecule-1. Domínio tipo imunoglobulina (Ig-like Dm), sítios de N-glicosilação (N-gly), domínio mucina (Mucin Dm), metaloproteinase (MMPs), domínio citoplasmático (Cys Dm) e sítio P-tirosina (Tyr-P). Fonte: TANASE *et al.*, 2019.

KIM-1 não é detectável em pacientes com função renal normal, e sim nas injúrias do túbulo proximal (URBSCHAT *et al.*, 2011). Um estudo realizado com 4750 pacientes observados por mais de 10 anos, níveis elevados de KIM-1 correlacionaram-se com um declínio na taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), sugerindo que este biomarcador pode ser usado para prever a função renal (SCHULZ *et al.*, 2019). Um estudo realizado com tecido renal e urina de ratos envenenados com a peçonha de *Bothrops insularis*, este biomarcador apresentou bom desempenho no diagnóstico precoce da IRA (DANTAS *et al.*, 2018).

### 2.8.2 Biomarcadores de injúria endotelial

Indivíduos com insuficiência renal manifestam disfunção endotelial e aumento do risco de morbimortalidade cardiovascular (VLAHU *et al.*, 2012). Estudos clínicos mostraram que o glicocálice é danificado na doença renal, e esta injúria está intimamente associada à microalbuminúria e disfunção endotelial (SINGH *et al.*, 2007; PADBERG *et al.*, 2014; LIEW *et al.*, 2021). A ativação endotelial geralmente precede a disfunção endotelial, por isso biomarcadores endoteliais presentes no soro e/ou plasma de pacientes podem ser detectáveis antes mesmos que marcadores de doença classicamente reconhecidos e, portanto, podem ser

clínicamente úteis como biomarcadores de gravidade ou prognóstico de doenças (PAGE *et al*, 2013).

Um biomarcador endotelial válido deve ser específico para ativação/disfunção endotelial, indicativo da fisiopatologia subjacente da doença, reproduzível em pacientes e populações, útil em uma única medida, correlacionado com a atividade da doença ao longo do tempo, e deve adicionar informações orientando as decisões clínicas (PAGE *et al*, 2013). Quatro biomarcadores de endotélio, molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), Angiopietina-1, Angiopietina-2 e Syndecan-1; se destacam como promissores na detecção precoce de processos patológicos, podendo apresentar novos modelos explicativos para uma melhor compreensão da fisiopatologia de algumas doenças e sugerindo estratégias de tratamento.

#### **2.8.2.1. Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1)**

VCAM-1 (Molécula de Adesão Vascular-1) também conhecida como CD106, é uma glicoproteína de 90 kDa que participa da adesão de leucócitos ao endotélio na presença de inflamação (KONG *et al*, 2018; PAULUS *et al.*, 2011). Encontra-se expressa na superfície de células endoteliais como também na superfície de outras células, incluindo macrófagos teciduais, células dendríticas, fibroblastos da medula óssea, mioblastos, células de Kupffer, células de Sertoli e células neoplásicas (KONG *et al*, 2018); porém no endotélio quiescente possui baixíssima expressão, apresentando altas concentrações apenas após estímulo das células endoteliais por citocinas (MULLER *et al*, 2002; REITSMA *et al*, 2007).

O dano renal está associado ao aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios (DANOFF, 1998), ocorrendo então regulação positiva de moléculas de adesão como o VCAM-1 nas células endoteliais principalmente por citocinas como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1)(KASPRZAK *et al*, 2013; PAULUS *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre o valor do biomarcador de injúria endotelial VCAM-1 como preditor de danos renais. Em 2017, Hepokoski e colaboradores, num estudo experimental com ratos, constatou níveis aumentados de VCAM-1 e de fatores de crescimento associado ao maior dano renal. Um estudo conjunto com os biomarcadores: fator de crescimento de

fibroblastos 23 (FGF-23), VCAM-1, syndecan-1 e angiopoietina 2 (Ang-2), mostrou que a associação entre FGF-23 e IRA grave é mediada principalmente por VCAM-1 e Syndecan-1 (NEVES et al., 2019). Chang et al., (2013) avaliaram 86 pacientes submetidos à hemodiálise (HD), num segmento de aproximadamente 7 anos e observaram que maiores taxas de mortalidade, principalmente cardiovascular, estavam associadas a altas concentrações de VCAM-1, sugerindo este biomarcador como bom preditor de mortalidade cardiovascular em pacientes em HD.

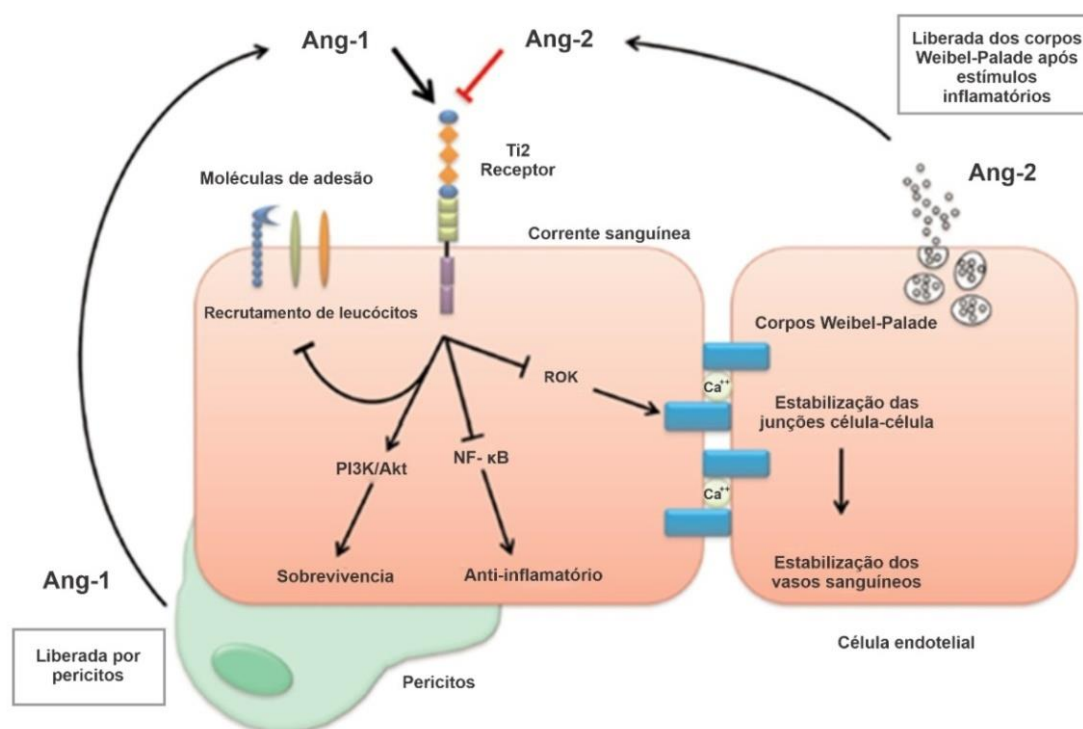
### **2.8.2.2. Angiopoietina-1 (Ang -1) e Angiopoietina-2 (Ang-2)**

As angiopoetinas 1 (Ang-1) e 2 (Ang-2) são fatores de crescimento endoteliais essenciais para o desenvolvimento e remodelação vascular durante a angiogênese e no processo inflamatório (TSIGKOS *et al.*, 2003). Ligam-se ao domínio extracelular do receptor de tirosina quinase Tie2 predominantemente expresso em células endoteliais.

As células endoteliais quiescentes estão ligadas a pericitos que produzem Ang-1. Esta ao se ligar ao domínio extracelular de Tie2 ativa a via de sinalização de sobrevivência de células PI3K/Akt (Fosfoinosítídeo 3-quinase/ proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt)), estabilizando o vaso. A ativação de Tie2, devido a sua ligação com Ang-1, também age inibindo a expressão dependente de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) de células inflamatórias. Já a Ang-2, liberada dos corpos Weibel-Palade após estimulação por agentes inflamatórios, atua como um antagonista da Ang-1, interrompendo a sinalização de Tie2 e sensibilizando o endotélio a mediadores inflamatórios, decompondo as junções célula-célula através da via da ROK (Rho quinase), levando ao extravasamento capilar e facilitando a transmigração de leucócitos (Figura 7) (MEURS *et al.*, 2009).

Assim, Angiotensina-1 tem ação protetora, estabilizando a estrutura endotelial e vascular, enquanto que a Angiotensina-2 possui propriedades fisiológicas e expressões opostas a Ang-1, interrompendo a sinalização da Ang-1-Tie-2 e contribuindo para alterações estruturais e funcionais dos vasos (PAPAPETROPOULOS *et al.*, 1999; FIEDLER; AUGUSTIN, 2006).





**Figura 7.** Modelo esquemático do sistema ligante-receptor de Angiopoietina-Tie2.

\*Adaptado de <https://www.researchgate.net/publication/24420918>

O papel das angiopoietinas na disfunção endotelial em pacientes renais ainda não é muito claro. Em um estudo que avaliou a expressão das angiopoietinas em ratos com doença renal glomerular, a expressão glomerular de Ang-1 foi reduzida e Ang-2 aumentada, correlacionando-se com apoptose endotelial glomerular com regulação negativa de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (YUAN *et al.*, 2002). Yamamoto *et al.*, (2004) relataram aumento de Ang-2 em um modelo de nefropatia diabética induzida por estreptozotocina em camundongos. Esse fato é consistente com a afirmação de que pode ocorrer uma diminuição na relação Ang-1/Ang-2 na nefropatia diabética (WOOLF; GNUDI; LONG, 2009). Long e colaboradores (2008), em um modelo de camundongo com nefropatia induzida por ácido fólico, verificaram um aumento ao invés de uma diminuição na expressão renal de Ang-1. Da mesma forma, na injúria renal isquêmica, a expressão renal de Ang-1 também é aumentada (HÖRBEIT *et al.*, 2007). Assim, esses achados sugerem que o efeito anti-inflamatório da Ang1 pode ser diferente de acordo com o modelo de doença renal (KIM *et al.*, 2009).

A detecção precoce de doenças e sua progressão para estados patológicos mais graves são fatores extremamente importantes para o manejo precoce da terapia. Logo, os níveis de

Ang-1 e Ang-2 podem representar uma valiosa ferramenta para auxílio na tomada de decisões clínicas.

### 2.8.2.3. Syndecan-1

O Syndecan-1 é um dos quatro proteoglicanos de sulfato de heparano da família dos syndecan (KOCH *et al.*, 2019). Apresenta uma proteína central transmembrana que se liga, em domínios extracelulares, às cadeias laterais dos glicosaminoglicanos (BERNFELD *et al.*, 1992). É um dos principais constituintes do glicocálix que cobre o endotélio, logo níveis séricos aumentados deste biomarcador, apontam para injúria do glicocálix endotelial (REITSMA *et al.*, 2007).

Alguns estudos revelaram níveis elevados de syndecan-1 séricos e urinários em pacientes com IRA após cirurgia cardíaca, sugerindo-o como um bom biomarcador precoce de disfunção renal e mortalidade nesses tipos de pacientes (DE MELO BEZERRA CAVALCANTE *et al.*, 2016; FERRER *et al.*, 2018). Outro estudo propôs o Syndecan-1 como um potencial biomarcador para identificar o risco de progressão da IRA após cirurgia cardíaca, ao encontrar elevadas concentrações deste biomarcador endotelial no plasma de pacientes com estas condições (XU *et al.*, 2021). O Syndecan-1 também limita o dano renal após injúria de isquemia-reperfusão e estimula a recuperação de danos ocorridos nos túbulos renais (ADEPU *et al.*, 2015).

Desse modo, ainda necessitam de esclarecimentos as condições que resultam em IRA no envenenamento botrópico. Além disso, o diagnóstico desta condição clínica nos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente *B. erythromelas*, quase sempre é tardio, o que leva o paciente a complicações graves ou até fatais.

Apesar da carência de estudos, evidências clínicas apontam para a influência da disfunção endotelial na IRA relacionada ao envenenamento botrópico. Por isso, conhecer os mecanismos que culminam em IRA nesses tipos de acidentes, bem como identificar precocemente o dano renal, pode direcionar o manejo de intervenções clínicas evitando assim, a progressão da IRA. Daí a importância do estudo de biomarcadores não convencionais de injúria endotelial no diagnóstico precoce e evolução da IRA nos pacientes vítimas de envenenamento botrópico.

## **Objetivos**

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel dos biomarcadores não convencionais de danos renais e endoteliais no diagnóstico da injúria renal aguda induzida por veneno de serpentes *Bothrops erythromelas*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil sociodemográfico, clínico e epidemiológico dos pacientes acompanhados no decorrer do seguimento;
- Estudar os mecanismos de toxicidade do veneno da serpente *B. erythromelas* no desenvolvimento da IRA;
- Identificar biomarcadores de evolução da IRA após acidentes com serpentes *Bothrops erythromelas* e avaliar se apresentam correlação com os biomarcadores tradicionais da função renal;
- Investigar os níveis dos biomarcadores não convencionais renais e endoteliais em pacientes vítimas de envenenamento por serpentes *B. erythromelas* e investigar seu papel na identificação precoce de IRA;
- Verificar o comportamento ao longo do tempo dos biomarcadores renais e endoteliais não convencionais, por meio da dosagem dos mesmos em amostras seriadas e tempos pós-mordeduras estabelecidos.

## **Materials e métodos**

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Tipo do estudo

Estudo observacional prospectivo com pacientes admitidos em um serviço de emergência, vítimas de acidente por mordeduras confirmadas de serpentes *Bothrops erythromelas*, que necessitavam de tratamento específico com soroterapia antiofídica.

### 4.2. Local e período do estudo

O estudo foi realizado em Fortaleza-CE, com pacientes admitidos no Instituto Dr. José Frota (IJF), hospital de nível terciário, referência regional no atendimento de urgência e emergência às vítimas de traumas de alta complexidade, queimaduras e intoxicações. Nesta unidade hospitalar encontra-se o CIATOX/CE (Centro de Informação e Assistência Toxicológica do Ceará), considerado um centro toxicológico de referência no país, com atendimento 24 horas. O período de realização do estudo foi de Janeiro de 2019 a Fevereiro de 2020.

### 4.3. Critérios de inclusão

- Pacientes de ambos os gêneros, com idade acima de 18 anos;
- Diagnóstico confirmado de acidentes por serpentes *B. erythromelas*. A confirmação do envenenamento botrópico baseou-se na presença da serpente causadora do acidente apresentada no ato da admissão do paciente, ou por fotos do animal enviadas ao CIATOX/CE pela unidade de saúde de origem ou pelo próprio paciente.
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após explicações pertinentes ao estudo. Em caso de impossibilidade física ou mental, o TCLE foi assinado por um representante legal ou acompanhante do paciente, este último com consentimento do participante.

#### 4.4. Critérios de exclusão

- Pacientes admitidos com tempo superior à 8h do acidente botrópico;
- Gestantes;
- Pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 ou 2, hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica  $\geq$  140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq$  90 mmHg) ou em uso de diuréticos;
- Pacientes com história de doença renal prévia (aguda ou crônica), litíase renal e uso de drogas nefrotóxicas.
- Pacientes que receberam soro antiofídico antes da admissão no hospital onde o estudo foi realizado.

#### 4.5. População do estudo

Foram estudados 26 pacientes com diagnóstico confirmado de acidente ofídico por serpentes *Bothrops erythromelas*.

#### 4.6. Coleta dos dados demográficos e clínicos

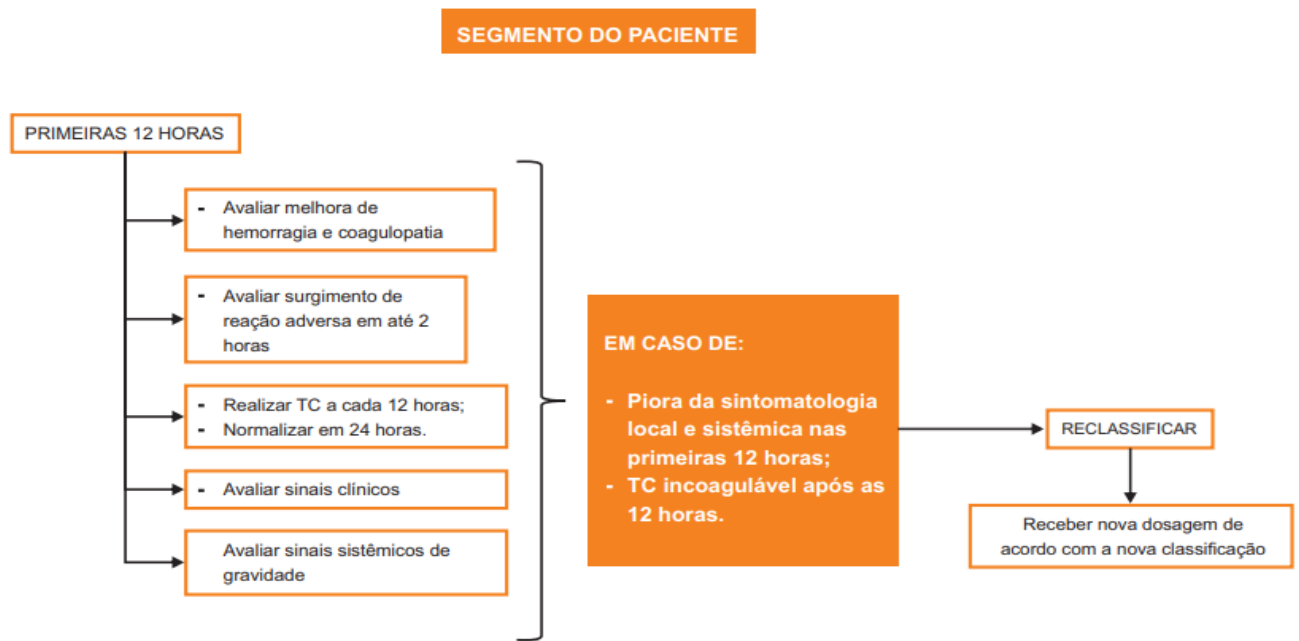
Na admissão e durante todo o tempo de internação hospitalar foram coletados dados clínicos e demográficos dos pacientes por meio do preenchimento de fichas do Sistema Brasileiro de Registro de intoxicações dos Centros de informação e Assistência Toxicológica (DATATOX), que é um sistema de registro, acompanhamento e recuperação de dados em toxicologia clínica mantido pela Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (ABRACIT), o qual possui acesso restrito aos profissionais dos CIATOXs do Brasil, dando suporte aos mesmos e, possibilitando tanto estudos clínico-epidemiológicos regionais como a avaliação nacional do impacto dos toxicantes sobre a saúde da população.

O DATATOX pode ser acessado eletronicamente através da sua nova versão: [datatox2.abracit.org.br/datatox-2](http://datatox2.abracit.org.br/datatox-2), e contempla dados como: gênero, idade, município da exposição e, se áreas rurais ou urbanas, ocupação da vítima, tempo decorrido entre a mordedura da serpente e a admissão hospitalar, tempo entre exposição e administração do soro antiofídico, Número de frascos de soro antiofídico administrados bem como seu lote, data de validade e fabricante, tempo de hospitalização, principais sintomas apresentados pelo paciente, presença ou ausência de comorbidades, e locais para inserção dos exames laboratoriais da admissão até a alta hospitalar.

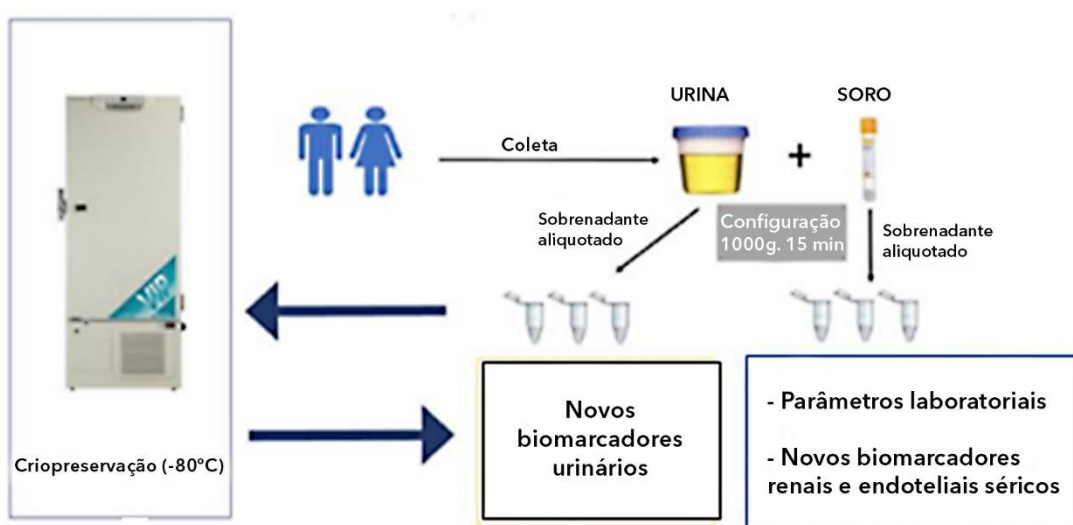
#### **4.7. Coleta e processamento de amostras biológicas**

Após assinatura do TCLE, amostras de sangue total, soro, plasma e urina foram coletadas concomitantemente na admissão hospitalar (até 8 horas pós-mordedura), seguidas de novas coletas com 12 a 16hs e 24 a 28hs pós- mordedura. A escolha dos tempos de coleta baseou-se no fluxograma de segmento do paciente após soroterapia antiofídica, que sugere coletas além da admissão, nas primeiras 12 e 24 horas após administração do SAB, com o intuito de um melhor acompanhamento clínico e soroterápico do paciente vítima de envenenamento botrópico (Figura 8). As amostras foram colocadas em recipientes adequados para obtenção de sangue total (tubos com EDTA), soro (tubos com ativador de coágulo e gel separador), plasma (tubos com citrato de sódio tamponado 3,8%) e urina (pote coletor de urina estéril), onde sangue total, plasma e uma parte do soro e urina foram utilizados para a realização dos parâmetros bioquímicos e, outra parte das amostras de urina e soro foram imediatamente aliquotadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo em seguida transferidas para o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Ceará, para armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia das análises dos biomarcadores renais e endoteliais (Figura 9). Um grupo controle composto por 13 voluntários saudáveis foi pareado de acordo com o gênero e idade.





**Figura 8:** Fluxograma de segmento do paciente após soroterapia antibiótica.  
\* Adaptado de SACHETT; WEN; MONTEIRO (2022)



**Figura 9:** Coleta e processamento de amostras de urina e soro para o estudo dos novos biomarcadores

#### 4.8. Análises dos parâmetros laboratoriais

Parâmetros hematológicos tais como hemoglobina, hematócrito e plaquetas foram analisados e quantificados em analisador hematológico automático de alto volume, Sistema

ADVIA® 2120i (Siemens Healthineers). Os testes de coagulação: Tempo de Protrombina (TP ou TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa) foram coletados até a alta do paciente e processados em analisador automático de coagulação sanguínea Sysmex® CA-1500 (Sysmex Corporation, Chou-Ku, Kobe, Japão) utilizando métodos coagulométricos ou imunoturbidimétricos padronizados de acordo com os protocolos do fabricante. O TP foi definido de acordo com os valores de referência como normais (10-14 segundos), alargados ou anormais (15-120 segundos) e incoaguláveis (> 120 segundos). Para o TTPa os valores considerados normais foram 22 a 28 segundos, alargados ou anormais 29 a 180 segundos e incoaguláveis maior que 180 segundos. A recuperação total dos parâmetros de coagulação sanguínea (TP e TTPa) em até 24 horas após a administração da soroterapia antiofídica foi considerado um critério de eficiência da dose da soroterapia antiofídica. Uma dose complementar de soro antiofídico foi administrado para os casos em que não foi possível a recuperação dos parâmetros de coagulação, conforme protocolo atualizado no Guia para o tratamento de acidentes ofídicos (SACHETT; WEN; MONTEIRO, 2022).

A dosagem sérica dos parâmetros bioquímicos uréia, creatinina, foram mensurados no equipamento de análises para química clínica CMD 800i (Wiener Lab). Os níveis séricos de sódio e potássio foram determinados em um analisador de eletrólitos seletivo de íons (9180, Electrolyte Analyzer, Roche®) sendo os resultados expressos em mEq/L.

Para a realização das análises urinárias, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, em seguida foi desprezado o sobrenadante e analisado no sedimento urinário características como densidade, presença de hematuria, proteinúria, cilindros e seus tipos.

#### **4.9. Avaliação da função renal**

Para a análise da função renal a creatinina sérica (sCr) foi medida diariamente durante todo o tempo da internação hospitalar até a alta do paciente. O método utilizado para sua determinação foi o ensaio colorimétrico cinético baseado no método de Jaffe (Jaffe modificado). A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada usando a equação de 2021 da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) para pessoas  $\geq 18$  anos, a qual se baseia na dosagem de creatinina sérica (sCr) (MILLER et al., 2022):

$$\text{TFG} = 142 \times \min(\text{sCr}/k, 1)^\alpha \times \max(\text{sCr}/k, 1)^{-1.209} \times 0,9938^{\text{Idade}} \times 1,012 \text{ (se mulher)}$$

Onde: TGF: Taxa de filtração glomerular

sCr: Creatinina sérica

k: 0,7 (para mulheres) ou 0,9 (para homens)

$\alpha$ : -0,241 (para mulheres) ou -0,302 (para homens)

min: Indica o mínimo de Cr/k ou 1

max: Indica o máximo de Cr/k ou 1

Clinicamente, a IRA foi definida e classificada conforme critérios do *Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO)* que se baseia nas mudanças da creatinina sérica (KDIGO, 2012). O estágio 1 da IRA foi definido por uma elevação de 0,3 mg/dL ou superior na creatinina de base (ocorrida em até 48 horas), ou uma elevação de 1,5 vezes no valor basal de creatinina sérica, ou um volume urinário inferior a 0,5 mL/kg/h por 6 a 12 horas. O estágio 2 da IRA foi determinado por uma elevação de 2,0 a 2,9 vezes a creatinina basal, sendo o estágio 3 definido como um aumento de 3 vezes o valor da creatinina de base, ou ainda um valor de creatinina  $\geq 4,0$  mg/dL (Tabela 2). Como a maioria dos pacientes não possuía informações prévias sobre a sCr, o menor valor obtido da admissão até a alta hospitalar foi considerado como creatinina basal.

**Tabela 2.** Classificação da Injúria Renal Aguda segundo os critérios da KDIGO, 2012.

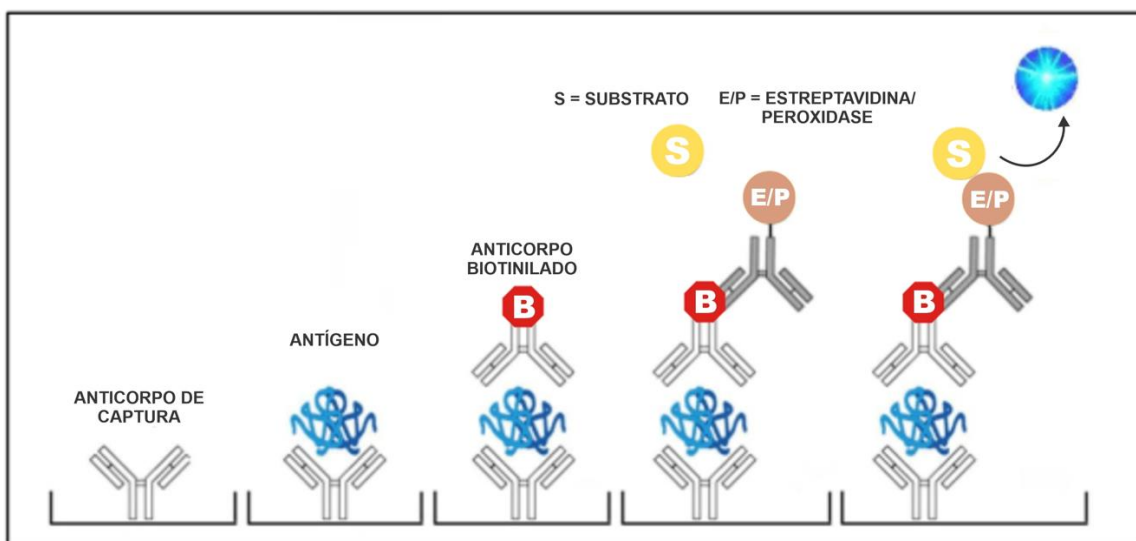
Estágios (KDIGO)	Creatinina Sérica	Débito urinário
1	Elevação de 1,5 - 1,9 vezes a creatinina basal OU $\geq 0,3\text{mg/dL}$ ( $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$ ) em até 48h	$< 0,5$ mL/kg/h por 6 a 12 horas.
2	Elevação de 2,0 - 2,9 vezes a creatinina basal	$< 0,5$ mL/kg/h por $\geq 12$ horas.
3	Elevação de 3,0 vezes a creatinina basal OU aumento $\geq 4,0$ mg/dL ( $353,6 \mu\text{mol/L}$ ) OU início da terapia de substituição renal OU, em pacientes $< 18$ anos, diminuição da taxa de filtração glomerular $< 35\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$	$< 0,3$ mL/kg/h por $\geq 24$ horas OU anúria por $\geq 12$ horas

Fonte: Adaptado de KELLUM et al ( 2012)

#### 4.10. Determinação dos biomarcadores renais e endoteliais não convencionais

Os biomarcadores renais e endoteliais não convencionais foram quantificados utilizando a técnica do ELISA do tipo sanduíche, que é um ensaio imunoenzimático de alta sensibilidade e especificidade que permite a evidência do biomarcador através de anticorpo específico (Figura 10).

Resumidamente, nesta técnica, anticorpos específicos (anticorpos de captura) são ligados ao fundo da placa de teste. A amostra contendo o antígeno (biomarcador investigado) é aplicada à placa de teste, onde haverá a ligação antígeno+anticorpo de captura. Após lavagem para a retirada de antígenos que não se ligaram aos anticorpos de captura, é adicionado à placa um anticorpo de detecção biotilado (conjugado a biotina) que irá se ligar ao biomarcador capturado pelo anticorpo de captura, e uma nova lavagem é realizada. Então, é adicionada a estreptavidina (a qual tem afinidade a biotina) conjugada a enzima peroxidase na placa e realizada uma nova lavagem para a retirada dos anticorpos conjugados que não se ligaram à amostra. Por fim, é adicionado o substrato, que reage com a enzima, ocorrendo o desenvolvimento de uma reação enzimática colorimétrica. A intensidade da cor gerada foi medida por espectrofotometria a 450nm, com filtro de 570nm e realizado o cálculo por interpolação dos dados em uma curva padrão previamente construída. O aumento da absorbância é diretamente proporcional à concentração do biomarcador analisado na amostra (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).



**Figura 10.** Método ELISA sanduíche para determinação dos biomarcadores renais e endoteliais  
 Fonte: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle> (modificado)

Os níveis de biomarcadores renais foram quantificados utilizando kits do ELISA (R&D System, Minneapolis, MN, EUA). Níveis de KIM-1 urinário (R&D System, Inc – Cat. RKM 100), um biomarcador de lesão tubular proximal renal, e NGAL sérico e urinário (DY1757- DuoSet, R&D System), marcadores de danos nos túbulos proximais e distais, foram quantificados e expressos em pg/mg-Cr, ng/mL e ng/mg-Cr respectivamente.

Os níveis de biomarcadores endoteliais Angiopietina-1 (R&D System - DuoSet DY623), Angiopietina-2 (R&D System - DuoSet DY623, VCAM-1 (Abcam- ab47355), e Syndecan-1 (Abcam, Cambridge, MA), um biomarcador de lesão do glicocálix endotelial, também foram medidos por ELISA e os resultados expressos em ng/mL para todos os biomarcadores.

Para controlar as diferenças na concentração urinária, os resultados das dosagens dos biomarcadores urinários foram corrigidos e expressos de acordo com o conteúdo de creatinina na urina. Cada uma das amostras e padrões foi testada em duplicata. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.11. Protocolos de tratamento**

Na admissão, os pacientes foram classificados quanto à gravidade do acidente botrópico em leve, moderado e grave, de acordo com as características clínicas locais e sistêmicas apresentadas, sendo o tratamento realizado com soroterapia específica (antibotrópica) realizada logo após a admissão hospitalar, conforme as recomendações do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O acidente é considerado leve quando cursa com manifestações clínicas locais (dor, edema e equimoses) discretas, podendo ocorrer sangramentos em pele ou mucosas, testes de coagulação sanguínea do paciente podem estar normais ou alterados. Nos casos moderados as manifestações locais são evidentes, podem ocorrer hemorragias sem comprometimento do estado geral do paciente, com testes de coagulação sanguínea normais ou alterados. Os acidentes são considerados graves quando apresentam alterações locais intensas, hemorragias graves, anúria, testes de coagulação sanguínea do paciente podem estar normais ou alterados.

A divisão do membro afetado em seguimentos também foi considerada na classificação do envenenamento botrópico, sendo leve se apenas 1 segmento foi afetado, moderado se 2, e grave se 3 segmentos ou o membro todo foi afetado.

O tratamento do paciente foi feito com soro antibotrópico (SAB) de acordo com a gravidade do acidente: Acidente leve, 03 ampolas de SAB; moderado de 06 ampolas e grave, 12 ampolas. Anti-histamínicos e/ou corticóides foram utilizados previamente a soroterapia anti-botrópica em todos os pacientes incluídos no estudo. A recuperação dos testes de coagulação sangüínea até 24hs da administração do soro antiofídico foi considerada como critério de dose eficiente. Casos em que não houve curva de melhora da coagulação sangüínea foram reclassificados, e uma dose complementar de soro anti-botrópico foi administrada dependendo da nova classificação (SACHETT; WEN; MONTEIRO, 2022).

#### **4.12. Desfechos**

O principal desfecho clínico avaliado foi a ocorrência de IRA. O diagnóstico e classificação da IRA foram baseados conforme os critérios do KDIGO (KDIGO, 2012).

#### **4.13. Análise estatística**

As características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais foram comparadas entre os pacientes que desenvolveram IRA e os que não desenvolveram IRA. Os dados categóricos foram expressos como contagem absoluta e freqüências relativas representadas por porcentagens e comparadas usando o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Os níveis de TP e TTPa anormais ou incoaguláveis foram analisados como variáveis categóricas e comparados com testes normais. Todas as variáveis quantitativas foram testadas para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis distribuídas normalmente foram relatadas como a média  $\pm$  desvio padrão, e dados não normais como mediana e amplitude interquartil. O teste t de Student ou teste de Mann-Whitney foram aplicados para

comparar parâmetros entre os grupos que desenvolveram IRA dos que não desenvolveram IRA de acordo com a normalidade dos dados. Os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis foram usados para comparações entre 3 ou mais grupos, quando apropriado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%.

A área sobre a curva ROC (AUC-ROC) foi utilizada para avaliar o desempenho diagnóstico dos biomarcadores renais e endoteliais para IRA. As análises foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 9 (San Diego, CA, USA) e IBM SPSS Statistics para Macintosh, versão 23 (Armonk, NY: IBM CorpReleased 2015).

#### **4.14. Aspectos éticos**

Conduzido em concordância aos critérios estabelecidos pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza (CAAE: 41664214.5.0000.5052) (APÊNDICE A).

Todos os participantes receberam amplos esclarecimentos pertinentes ao estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B) antes do início da pesquisa. O anonimato, a confidencialidade, privacidade e proteção da imagem foram asseguradas e garantidas o uso das informações apenas no âmbito desta pesquisa.

## **Resultados**

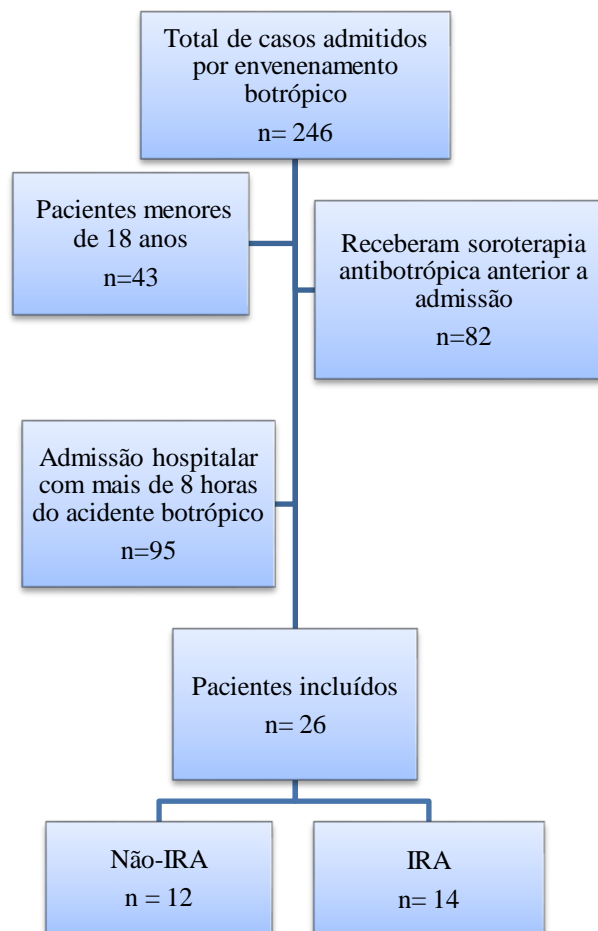
---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características demográficas e Clínicas

Dos 246 pacientes com diagnóstico confirmado por acidente botrópico durante o período do estudo, 220 foram excluídos pelas seguintes razões: menores de 18 anos (n= 43), pacientes que receberam soroterapia antibotrópica anteriormente à admissão hospitalar (n=82) e admissão hospitalar com mais de 8 horas do acidente ofídico (n=95). Assim, foram incluídos e acompanhados um total de 26 pacientes e em 14 (54%) deles foi observado o desenvolvimento de IRA (Figura 11). A identificação da serpente foi possível em todos os acidentes sofridos pelos pacientes incluídos no estudo e pertenciam a espécie *B. erythromelas*.



**Figure 11.** Fluxograma de inclusão de pacientes e Classificação IRA vs Não-IRA.

Entre os pacientes incluídos, 23 (88,4%) eram do gênero masculino. A média de tempo decorrido desde a mordedura da serpente até a admissão hospitalar foi de 6h e 28 minutos. Os sinais e sintomas mais comuns foram dor, edema local, discreto sangramento e anormalidades na coagulação sangüínea. Hipotensão não foi relatada neste estudo. Dois pacientes necessitaram de terapia dialítica e apenas um evoluiu com microangiopatia trombótica devido ao envenenamento botrópico.

Em relação ao desenvolvimento de IRA durante a permanência hospitalar, de acordo com os critérios da KDIGO, os pacientes com envenenamento botrópico foram divididos em dois subgrupos, grupo "IRA" (que desenvolveu IRA) e "Não-IRA" (não desenvolveu IRA). A maioria dos pacientes do estudo apresentou IRA do tipo leve. Idade, gênero, tempo entre a mordedura da serpente e a admissão hospitalar, bem como o número total de frascos de soro anti-botrópico administrados ao paciente foram similares entre os grupos IRA e Não-IRA (Tabela 3). Soroterapia antibotrópica foi administrada em todos os pacientes recrutados, uma vez que a decisão de administrar ou não soro antiofídico foi baseada nos parâmetros de coagulação (incoagulabilidade sangüínea ou INR aumentado) e/ou no desenvolvimento de características clínicas específicas do envenenamento botrópico como edema (em um ou mais de um segmento) e sangramentos.

**Tabela 3.** Características demográficas e clínicas de pacientes admitidos após envenenamento botrópico de acordo com o desenvolvimento de IRA.

	<b>Não-IRA</b>	<b>IRA</b>	<b>p</b>
	<b>(n=12)</b>	<b>(n=14)</b>	
<b>Dados Demográficos</b>			
Idade (anos)	47,31 (± 14,94)	45,93 (± 13,06)	0,80 <sup>a</sup>
Gênero Masculino (%)	10 (83,33)	13 (92,86)	0,44 <sup>a</sup>
Tempo entre a mordedura e a admissão hospitalar (horas)	6,411 (± 1,71)	5,698 (± 1,212)	0,22 <sup>b</sup>
Número de frascos de soro anti-botrópico administrados	5,714 (± 3.19)	6,5 (± 3.18)	0,84 <sup>b</sup>
<b>Dados Clínicos</b>			
Sangramento (%)	5 (41,67)	6 (42,86)	0,82 <sup>a</sup>
Sinais e sintomas locais (dor e/ou edema) (%)	10 (83,33)	13 (92,86)	0,44 <sup>a</sup>
Incoagulabilidade sangüínea	7 (58,33)	12 (85,71)	<b>0,04<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> Teste Qui-Quadrado; <sup>b</sup> Teste Exato de Fisher.

Dados quantitativos expressos como média ± desvio padrão. Correlações significantes:  $p < 0,05$ .

## 5.2. Parâmetros Laboratoriais

Na admissão hospitalar, o grupo que desenvolveu IRA apresentou significativamente níveis séricos mais elevados de creatinina (1,24 vs 0,97 mg/dL,  $p = 0,03$ ) e uréia (44,93 vs 34,75 mg/dL,  $p = 0,01$ ). As taxas estimadas de filtração glomerular foram menores no grupo IRA (86,05 vs 102,9 mL/min/1.73m<sup>2</sup>,  $p = 0,12$ ), porém sem significância estatística (Tabela 4). Em relação aos parâmetros de coagulação, o grupo IRA apresentou um maior número de pacientes com testes incoaguláveis quando comparado ao grupo Não-IRA (85,71% vs 58,33%,  $p = 0,04$ ) (Tabela 3 e Figura 12). Outros parâmetros laboratoriais incluindo sódio e potássio séricos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas foram similares nos grupos IRA e Não-IRA na admissão (Tabela 4).

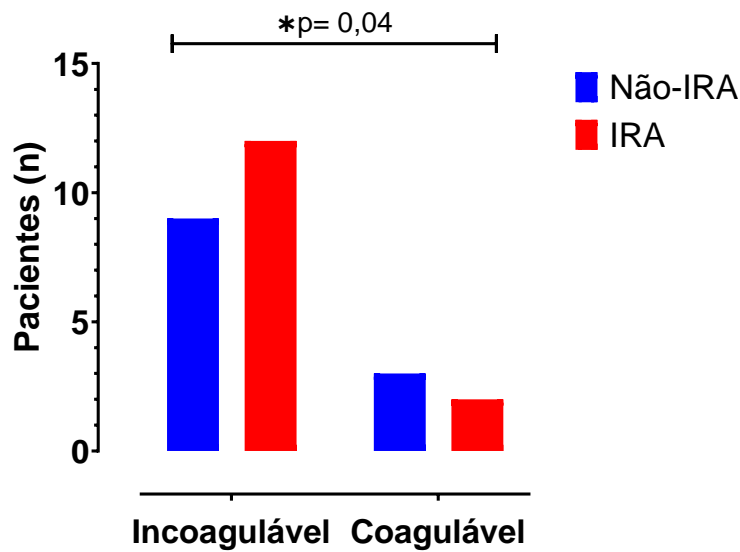
**Tabela 4.** Parâmetros laboratoriais de pacientes admitidos após envenenamento botrópico de acordo com o desenvolvimento de IRA.

	<b>Não-IRA</b> (n=12)	<b>IRA</b> (n=14)	<b>p</b>
<b>Parâmetros Renais na Admissão</b>			
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,97 (± 0,160)	1,24 (± 0,371)	<b>0,03<sup>b</sup></b>
Uréia Sérica (mg/dL)	34,75 (± 6,86)	44,93 (± 11,24)	<b>0,01<sup>b</sup></b>
TFGe (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	102,9 (± 17,42)	86,05 (± 33,08)	0,12 <sup>b</sup>
Sódio Sérico (mmol/L)	139,5 (138-144)	140,5 (137-145)	0,69 <sup>a</sup>
Potássio Sérico (mEq/L)	4,0 (3,4-4,5)	4,0 (3,3-5,7)	0,97 <sup>a</sup>
<b>Parâmetros Hematológicos na Admissão</b>			
Hemoglobina (g/dL)	13,86 (± 0,6215)	14,19 (± 0,9797)	0,32 <sup>b</sup>
Hematócrito (%)	41,03 (± 2,682)	42,06 (± 2,367)	0,75 <sup>b</sup>
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	216.417 (±133.187)	148.286 (±63.519)	0,10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Pontuações de Wilcoxon. Não-normalidade de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Variáveis expressas em valores medianos, mínimos e máximos. Correlações significantes: p < 0,05.

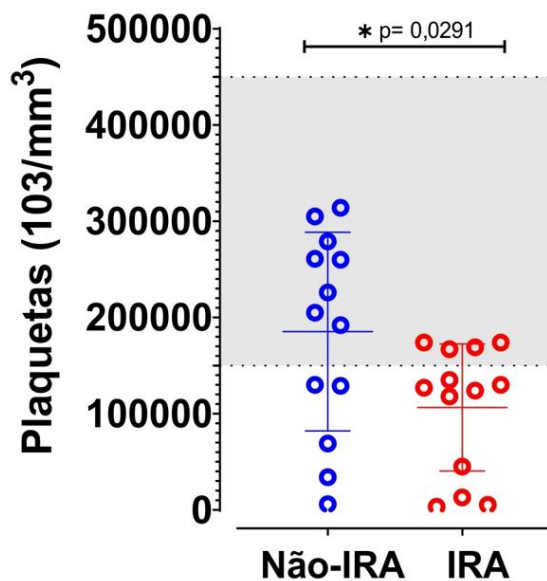
<sup>b</sup> Teste Exato de Fisher.

<sup>c</sup> Teste Qui-Quadrado.



**Figure 12.** Comparação entre os grupos Não-IRA (Azul) e IRA (Vermelho) quanto aos testes de coagulação (TP e TTPa) na admissão hospitalar. Teste exato de Fisher foi utilizado para as comparações.

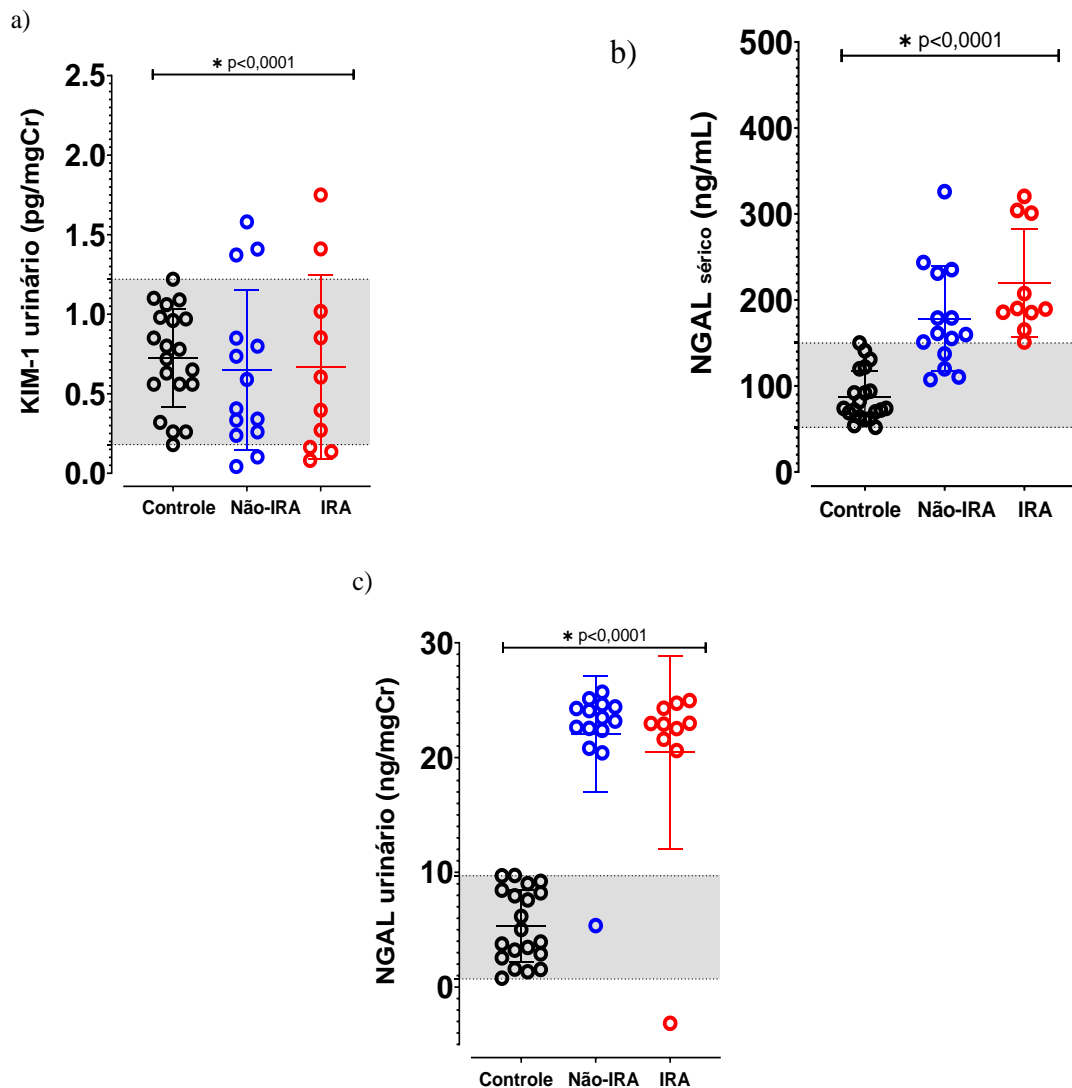
Na admissão, o grupo que desenvolveu IRA apresentou menor número médio de plaquetas em comparação ao grupo Não-IRA, porém não foram significativos ( $p= 0,10$ ) (Tabela 4). Entretanto, outras novas coletas de sangue foram realizadas com 12 a 16 hs e 24 a 28hs pós-mordedura e o grupo IRA apresentou plaquetopenia significativa quando comparado ao grupo Não-IRA ( $p= 0,0291$ ), conforme evidenciado na Figura 13.



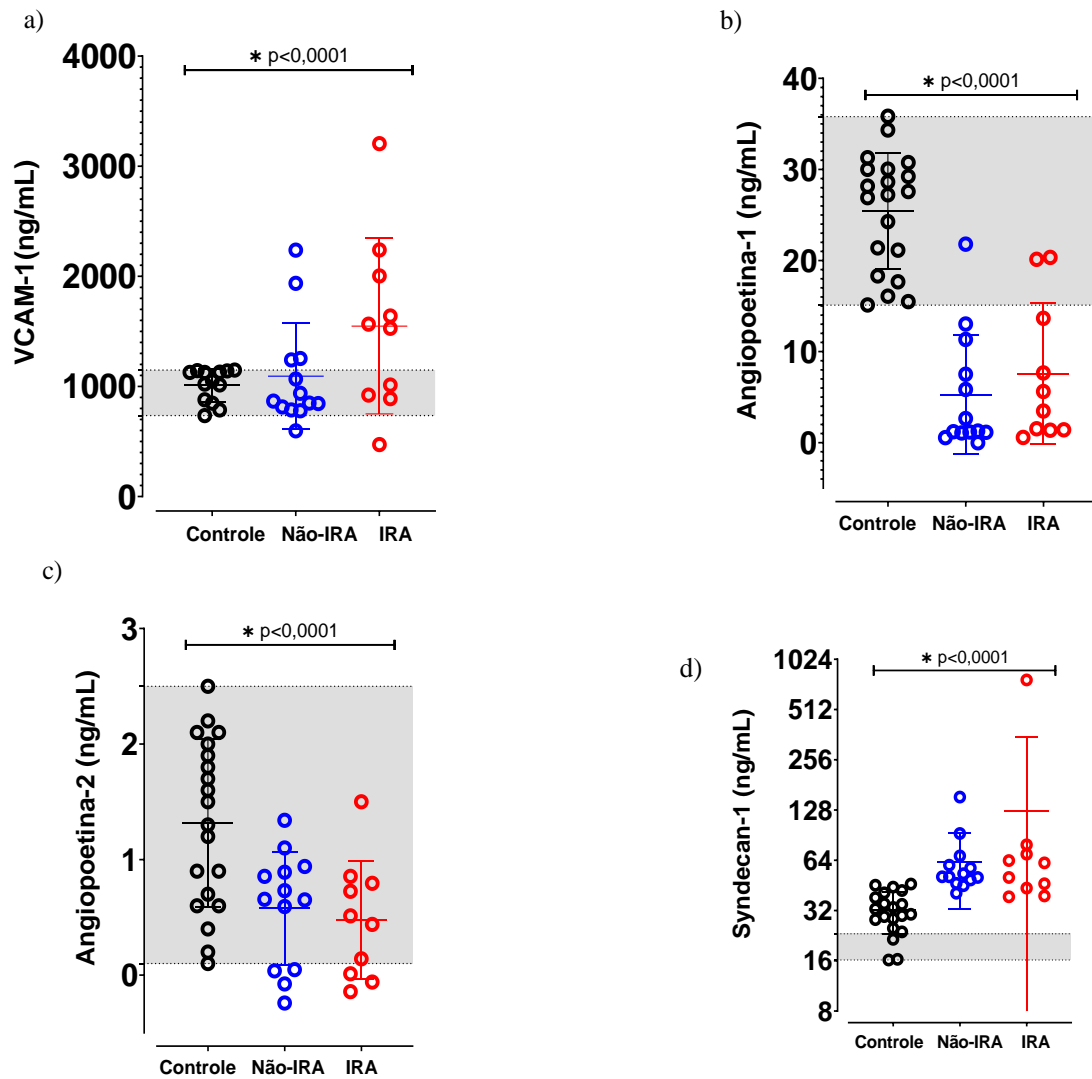
**Figura 13.** Níveis mínimos de plaquetas em até 24 horas pós-mordedura para cada um dos dois grupos de pacientes (Não-IRA [azul], IRA [vermelho], sombra cinza= interval normal no grupo controle). Teste ANOVA-1-way foi utilizado para a comparação entre os grupos.

### 5.3. Níveis de biomarcadores renais e endoteliais durante o período de hospitalização de acordo com o desenvolvimento de IRA

As Figuras 14 e 15 mostram as concentrações dos biomarcadores renais e endoteliais, respectivamente, comparados ao grupo controle (voluntários saudáveis), na admissão hospitalar de pacientes vítimas de envenenamento por serpentes *B. erythromelas* que desenvolveram ou não IRA. Os níveis dos biomarcadores não convencionais analisados estiveram significativamente elevados nos pacientes de ambos os grupos avaliados, quando comparados os grupos controle, evidenciando alterações no endotélio e na função renal já nas primeiras horas, mesmos em pacientes que não desenvolveram IRA.



**Figura 14.** Níveis admissionais de biomarcadores renais nos grupos controles ou voluntários sadios (preto) vs Não-IRA (Azul) vs IRA (Vermelho). Teste ANOVA-1-way foi utilizado para a comparação entre os grupos.



**Figura 15.** Níveis de biomarcadores endoteliais admissionais nos grupos controles ou voluntários saudios (preto) vs Não-IRA (Azul) vs IRA (Vermelho). Teste ANOVA-1-way foi utilizado para a comparação entre os grupos.

Os biomarcadores de injúria renal e endotelial foram dosados em três momentos distintos: 0 a 8hs pós-mordedura, 12 a 16hs e 24 a 28hs pós-mordedura. A Tabela 5 mostra o comportamento entre os diferentes níveis dos biomarcadores renais e endoteliais, dentro das primeiras horas de permanência hospitalar, entre os pacientes que desenvolveram IRA e os que não desenvolveram este tipo de injúria.

**Tabela 5.** Comportamento dos níveis de biomarcadores nas primeiras 24 horas de permanência hospitalar de acordo com o desenvolvimento de IRA.

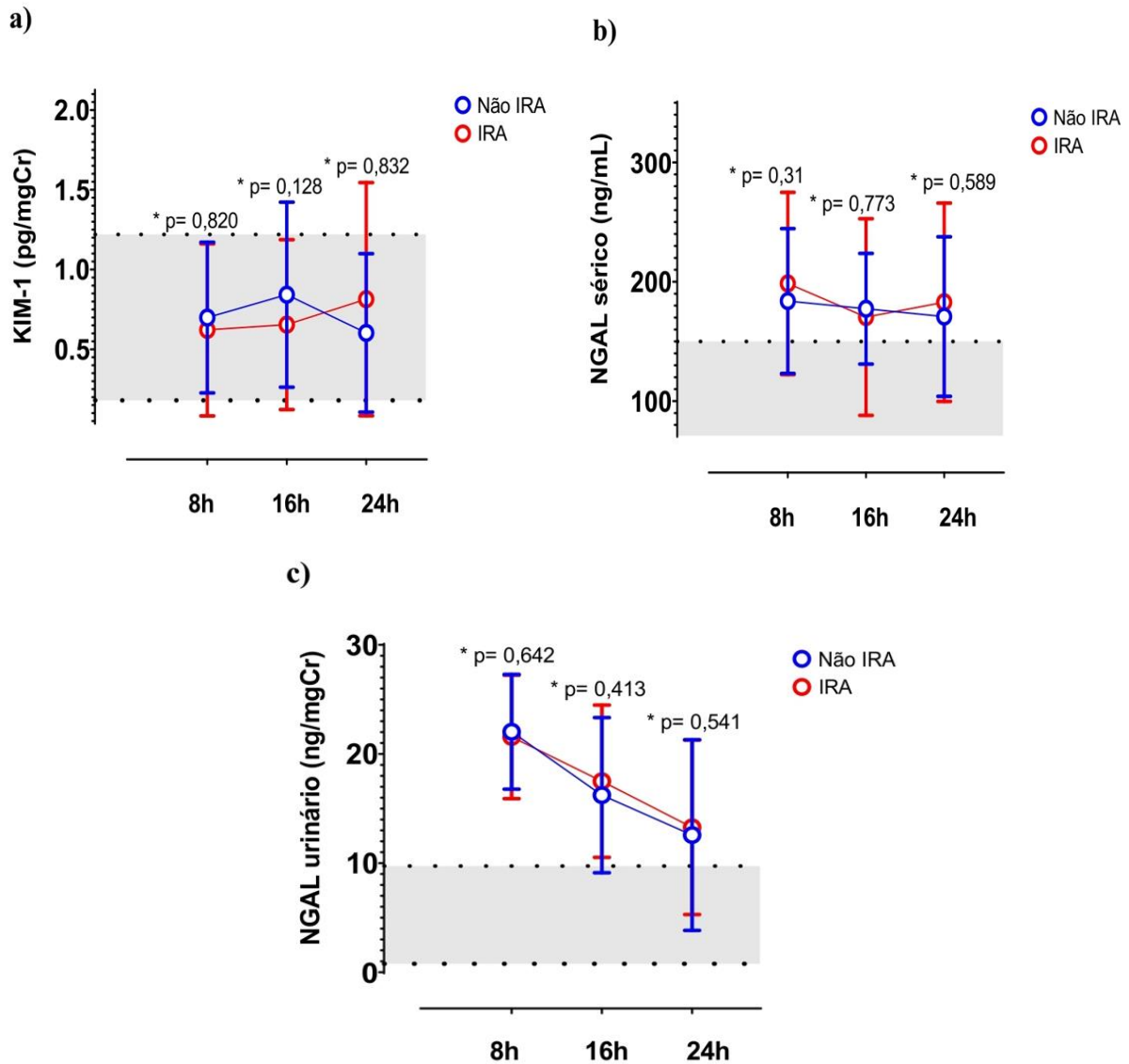
	<b>IRA</b> (n=12)	<b>Não-IRA</b> (n=14)	<b>p</b>
<b>Até 8hs pós-mordedura</b>			
VCAM-1 (ng/mL)	1149,82 ± 667,47	1043,32 ± 498,07	0,665 <sup>a</sup>
Syndecan-1 (ng/mL)	56,16 (43,6 – 69,7)	50,99 (48,77 – 59,85)	0,879 <sup>b</sup>
Angiopietina1 (ng/mL)	4,55 (1,41 – 13,65)	1,96 (1,15 – 9,42)	0,346 <sup>b</sup>
Angiopietina 2 (ng/mL)	0,73 (0,44 – 0,86)	0,73 (0,59 – 0,94)	0,791 <sup>b</sup>
KIM-1 Urinário (pg/mgCr)	0,52 (0,22 - 1)	0,5 (0,26 – 0,85)	0,820 <sup>b</sup>
NGAL Sérico (ng/mL)	206,58 ± 74,62	178,4 ± 61,25	0,31 <sup>a</sup>
NGAL Urinário (ng/mgCr)	20,89 ± 7,67	22,07 ± 5,04	0,642 <sup>a</sup>
<b>12 a 16 horas pós-mordedura</b>			
VCAM-1 (ng/mL)	1235,63 ± 519,52	818,34 ± 239,56	<b>0,027<sup>a</sup></b>
Syndecan-1 (ng/mL)	67,12 (44,71 – 80,53)	54,43 (47,29 – 57,39)	0,545 <sup>b</sup>
Angiopietina1 (ng/mL)	20,48 (13,13 – 21,76)	1,06 (0,52 – 2,56)	<b>0,016<sup>b</sup></b>
Angiopietina 2 (ng/mL)	0,77 (0,5 – 1,23)	0,68 (0,25 – 1,13)	0,604 <sup>b</sup>
KIM-1 Urinário (pg/mgCr)	0,32 (0,25 – 0,9)	0,95 (0,38 – 1,31)	0,128 <sup>b</sup>
NGAL Sérico (ng/mL)	177,78 ± 82,24	169,35 ± 54,34	0,773 <sup>a</sup>
NGAL Urinário (ng/mgCr)	18,37 ± 6,54	16,06 ± 7,01	0,413 <sup>a</sup>
<b>A partir de 24 horas pós-mordedura</b>			
VCAM-1 (ng/mL)	1482,95 ± 852,25	852,95 ± 370,65	<b>0,033<sup>a</sup></b>
Syndecan-1 (ng/mL)	55,3 (45,45 – 74,25)	48,03 (44,09 – 56,16)	0,351 <sup>b</sup>
Angiopietina1 (ng/mL)	10,5 (1,15 – 18,51)	2,28 (0,96 – 21,47)	0,633 <sup>b</sup>
Angiopietina 2 (ng/mL)	0,69 (0,3 – 1,67)	0,24 (0,19 – 0,52)	0,145 <sup>b</sup>
KIM-1 Urinário (pg/mgCr)	0,54 (0,22 – 1,13)	0,58 (0,2 – 0,69)	0,832 <sup>b</sup>
NGAL Sérico (ng/mL)	186,91 ± 86,38	170,31 ± 58,78	0,589 <sup>a</sup>
NGAL Urinário (ng/mgCr)	13,1 ± 8,3	10,82 ± 8,97	0,541 <sup>a</sup>

Dados quantitativos expressos como média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil entre parênteses.

<sup>a</sup>Teste t de Student. <sup>b</sup>Teste de Mann-Whitney.



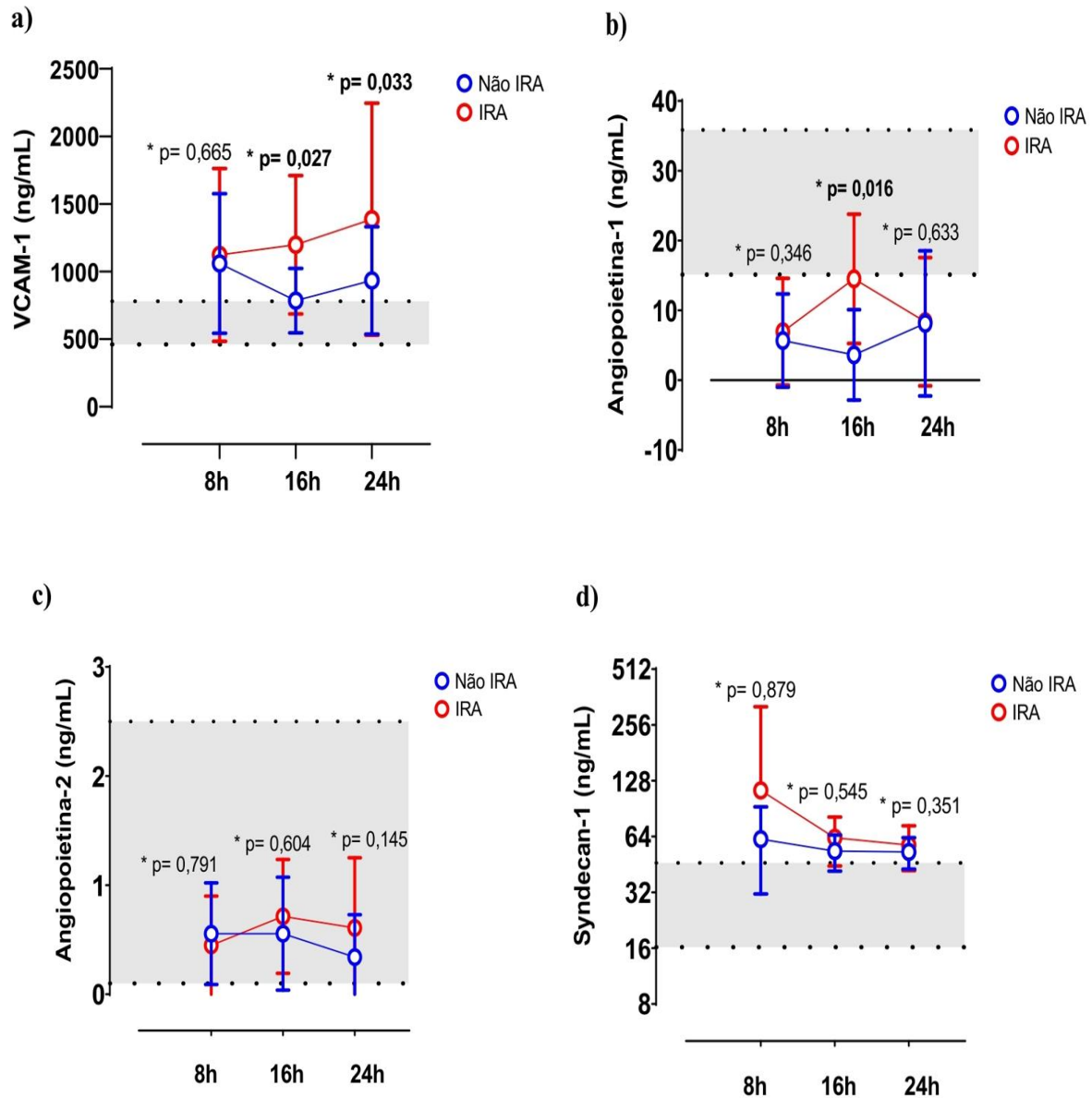
Os biomarcadores renais Kim-1, NGAL sérico e NGAL urinário não apresentaram diferenças significativas entre os grupos IRA e não-IRA em nenhum intervalo de tempo analisado (Tabela 5 e Figura 16)



**Figura 16.** Curso de tempo das concentrações médias dos biomarcadores renais Kim-1, NGAL sérico e NGAL urinário, para cada um dos dois grupos de pacientes (Não-IRA [azul], IRA [vermelho], sombra cinza= intervalo normal no grupo controle).

Em relação aos biomarcadores de injúria endotelial analisados, VCAM-1 revelou diferenças estatisticamente significativas 12 a 16hs pós-mordedura ( $1235,63 \pm 519$  ng/mL *versus*  $818,34 \pm 239,56$  ng/mL,  $p=0,027$ ) e 24 a 28hs pós-mordedura ( $1482,95 \pm 852,25$  ng/mL *versus*  $852,95 \pm 370,65$  ng/mL,  $p= 0,033$ ) no grupo que desenvolveu IRA quando comparados com o grupo que não desenvolveu. Da mesma forma, os níveis de Angiopietina-1 (Ang-1) foram significativamente maiores no momento de 12 a 16hs pós-mordedura no

grupo com IRA (20,48 ng/mL (13,13 – 21,76) *versus* 1,06 ng/mL (0,52 – 2,56),  $p= 0,016$ ). As concentrações dos demais biomarcadores endoteliais avaliados no presente estudo (Angiopietina-2 e Syndecan-1) não apresentaram diferenças significativas em nenhum intervalo de tempo analisado (Tabela 5 e Figura 17).



**Figure 17.** Curso de tempo das concentrações medias dos biomarcadores endoteliais VCAM-1, Ang-1, Ang-2 e Syndecan-1 para cada um dos dois grupos de pacientes (Não IRA [azul], IRA [vermelho], sombra cinza= interval normal no grupo controle).

#### **5.4. Capacidade de diagnóstico precoce de IRA dos biomarcadores renais e endoteliais não convencionais no acidente botrópico**

Curvas ROC foram construídas para exibir a taxa de verdadeiros positivos e falsos positivos nos três momentos estudados, relacionados aos biomarcadores renais e endoteliais, no intuito de prever o desenvolvimento de IRA nos pacientes admitidos com envenenamento botrópico. O desempenho de cada biomarcador em discriminar quem desenvolveria ou Não-IRA, também foi avaliado usando os resultados de área sob a curva ROC (AUC-ROC), onde uma maior área indica melhor desempenho diagnóstico. Todos esses dados referentes à capacidade de diagnóstico dos biomarcadores estudados estão representados na Tabela 6.

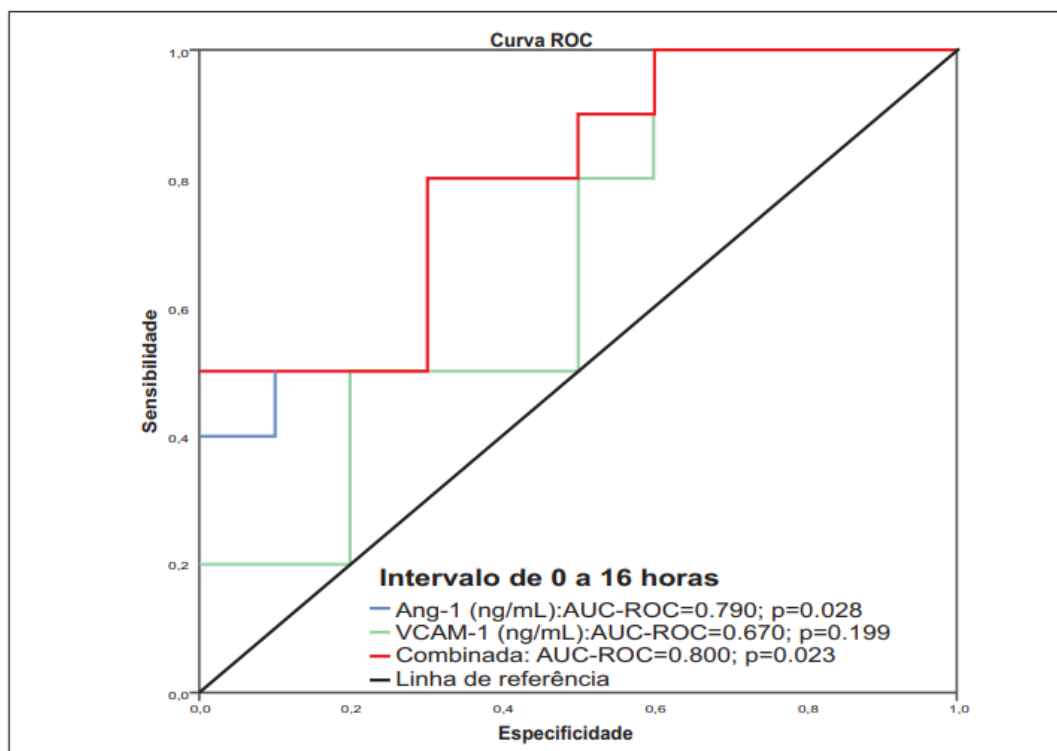
Os níveis de creatinina sérica, que é considerado o biomarcador renal padrão ouro, mostraram bom desempenho em prever IRA após envenenamento botrópico nas primeiras 16 horas (AUC-ROC= 0,88 (CI 95%: 0,74-1,0)). Em relação aos biomarcadores não convencionais estudados, somente o VCAM-1 com (AUC-ROC= 0,76 (CI 95%: 0,55-0,98)) e a Angiopietina-1 com (AUC-ROC= 0,82 (CI 95%: 0,62-1,0)) discriminaram os pacientes que desenvolveriam IRA com significância estatística 12 a 16 horas após o acidente botrópico (Tabela 6).

VCAM-1 com (AUC-ROC= 0,71 (CI 95%: 0,46-0,95)) foi tão bom preditor quanto a creatinina com (AUC-ROC= 0,71 (CI 95%: 0,49-0,93)) após 24 horas pós-mordedura. Ainda em relação a creatinina, o biomarcador NGAL sérico (sNGAL) mostrou uma tendência em prever o desenvolvimento de IRA após envenenamento botrópico nas primeiras 8 horas (AUC-ROC= 0,72 (CI 95%: 0,51-0,93)) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Performance diagnóstica de biomarcadores renais e endoteliais como preditor de IRA em pacientes com envenenamento botrópico

Biomarcadores	CurvaROC ( CI95%, valor de P)		
	≤8 horas	12 a 16 horas	≥24 horas
Creatinina	0,83 (0,63-1,0, P=0,006)	0,88 (0,74-1,0, P=0,001)	0,71 (0,49-0,93, P=0,08)
Angiopietina-1	0,65 (0,42-0,88, P=0,21)	0,82 (0,62-1,0, <b>P=0,009</b> )	0,55 (0,28-0,82, P=0,68)
Angiopietina-2	0,58 (0,34-0,83, P=0,47)	0,61 (0,38-0,85, P=0,35)	0,55 (0,27-0,83, P=0,68)
VCAM-1	0,55 (0,30-0,80, P=0,66)	0,76 (0,55-0,98, <b>P=0,03</b> )	0,71 (0,46-0,95, P=0,12)
Syndecan-1	0,51 (0,25-0,78, P=0,87)	0,61 (0,32-0,90, P=0,39)	0,60 (0,30-0,89, P=0,47)
NGAL sérico	0,72 (0,51-0,93, P=0,06)	0,52 (0,27-0,77, P=0,82)	0,56 (0,30-0,82, P=0,62)
NGAL urinário	0,56 (0,32-0,80, P=0,59)	0,62 (0,40-0,84, P=0,26)	0,62 (0,36-0,88, P=0,36)
KIM-1 urinário	0,51 (0,26-0,76, P=0,90)	0,66 (0,44-0,87, P=0,16)	0,55 (0,28-0,82, P=0,68)

A Figura 18 apresenta a curva combinada dos dois biomarcadores, VCAM-1 e Angiopietina-1. Esta associação apresentou melhor desempenho na discriminação dos pacientes que desenvolveriam IRA, com significância estatística (AUC-ROC= 0,80, P=0,023) nas primeiras 16 horas do acidente botrópico. A combinação destes dois biomarcadores pode aumentar a sensibilidade para o diagnóstico da IRA.



**Figura 18.** Curva ROC do desempenho dos biomarcadores VCAM-1 e Ang-1 no diagnóstico precoce de IRA, em pacientes com envenenamento botrópico, nos 2 primeiros momentos da internação hospitalar.

## **Discussão**

---

## 6. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que investigou a associação precoce entre biomarcadores endoteliais e o desenvolvimento de injúria renal aguda (IRA) no envenenamento botrópico, essencialmente por *B. erythromelas*, espécie responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil. Além disso, avaliamos também o desempenho diagnóstico de biomarcadores renais e endoteliais não convencionais em relação ao desenvolvimento de IRA nas primeiras horas que se seguem ao acidente por serpentes *Bothrops erythromelas*. Murray e colaboradores (2014) sugeriram que o uso combinado de biomarcadores não convencionais de injúria e disfunção renal, avaliados ao longo do tempo por meio de medições sequenciais, facilitaria o diagnóstico precoce e preciso de IRA, uma vez que permitiria uma melhor compreensão dos mecanismos e da fisiopatologia desta entidade, oportunizando a adoção de novas abordagens terapêuticas e identificando o melhor momento para intervenções.

A fisiopatologia do envenenamento humano por serpentes do gênero *Bothrops* está relacionada com uma série de eventos complexos derivados de uma ação combinada das toxinas presentes na peçonha. O envenenamento botrópico é marcado por um rápido desenvolvimento de um processo inflamatório no local da injeção do veneno, causando um edema local, que pode ser resultado de uma ação direta dos componentes da peçonha na microvasculatura, elevando a permeabilidade dos capilares e veias, e da ação de mediadores como prostaglandinas, cininas, histaminas e substâncias ativadas pelo sistema complemento, contidas na peçonha botrópica (GUTIÉRREZ et al., 2009b). Além do edema outros efeitos locais incluindo dor, equimoses, hemorragias, mionecroses, dermonecroses e manifestações sistêmicas como hemorragias, distúrbios de coagulação, choque hipotensivo e IRA são observados (QUEIROZ et al., 2008; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; JORGE et al., 2015). Neste estudo as manifestações clínicas mais comuns na admissão hospitalar foram dor, edema local, discreto sangramento e incoagulabilidade sangüínea. O desenvolvimento de IRA foi observado em 54% dos casos estudados. Este número foi superior a estudos anteriores realizados no Brasil, onde a prevalência de IRA nos acidentes botrópicos variou de 1,4 a 44,4% (ALBUQUERQUE et al., 2020; ALVES et al., 2018; FEITOSA et al., 2015).

Distúrbios na coagulação como coagulopatia de consumo e baixos níveis de fibrinogênio podem ocorrer após 1 hora do acidente botrópico (OTERO-PATIÑO, 2009). Portanto, a demora entre a mordedura da serpente e a prestação de assistência médica, com conseqüente administração do soro antiofídico, representam um exemplo de um sistema de

saúde deficiente, com recursos médicos escassos em áreas inóspitas (GUTIÉRREZ et al., 2017), podendo resultar em agravamento do quadro clínico do paciente. Neste estudo, o grupo que desenvolveu IRA e o grupo que não desenvolveu, receberam um número semelhante de frascos de soro antibotrópico, indicando um predomínio de acidentes com grau de severidade considerado moderado de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2005). O tempo entre a mordedura e a admissão em ambos os grupos não apresentou diferença significativa.

Lectinas tipo C (Snalec) são proteínas presentes no veneno de serpentes *B. erythromelas* com capacidade de induzir a agregação plaquetária e promover coagulopatias (MOTA et al, 2020; CLEMETSON, 2010). A redução do número de plaquetas também pode ser explicada devido à ativação, agregação e seqüestro de plaquetas em resposta ao extenso dano vascular e à geração de trombina intravascular observada devido à ação das SVMPs presentes nos venenos botrópicos (RUCAVADO et al, 2005; LARRÉCHÉ et al., 2021). No presente estudo, nas primeiras 8hs pós-mordedura nenhum dos grupos apresentou plaquetopenia. Porém, no decorrer das primeiras 24 horas, o grupo que desenvolveu IRA apresentou uma plaquetopenia significativa quando comparado ao grupo Não-IRA. Este resultado reafirma um estudo anterior que relata a associação entre IRA e trombocitopenia após mordedura botrópica na Amazônia brasileira (TORREZ et al., 2014).

A microangiopatia trombótica (MAT) foi recentemente descrita no envenenamento por *B. erythromelas* (MOTA et al., 2020). É caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e injúria renal aguda (IRA) (BERLING & ISBISTER, 2015), e está associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (BROCKLEBANK et al., 2018). O mecanismo exato da ocorrência de microangiopatia trombótica em mordeduras de serpentes ainda permanece desconhecido. No entanto, acredita-se que as toxinas do veneno e a deposição de microtrombos de fibrina podem ser a causa do dano endotelial (GN et al., 2017) que resultam em MAT. A peçonha de *B. erythromelas* contém toxinas que atuam nos microvasos, nos mecanismos de coagulação e fibrinólise, e afetam a agregação plaquetária, desencadeando respostas endoteliais pró-inflamatórias e pró-coagulantes (JORGE et al., 2015; MOTA et al., 2020). No estudo atual, um paciente desenvolveu MAT apresentando trombocitopenia progressiva do segundo ao quinto dia pós-mordedura, IRA rápida e progressiva nas primeiras 12 horas após o acidente (aumento dos níveis de creatinina sérica e diminuição das taxas estimadas de filtração glomerular) e distúrbios de coagulação (TP e

TTPa incoaguláveis) com recuperação após 24 horas da soroterapia anti-botrópica, confirmando a coagulação de consumo induzida pelo veneno.

A principal causa de letalidade entre os pacientes que sobrevivem aos primeiros efeitos da peçonha botrópica é a IRA (SGRIGNOLLI et al., 2011). A fisiopatologia da IRA enfatiza a complexa interação entre inflamação e isquemia-reperusão levando à disfunção da microcirculação, hipoperfusão localizada e isquemia renal (BONVENTRE & YANG, 2011; MOLITORIS, 2014; RUBIG et al., 2016). Estudos anteriores apoiaram a hipótese de que antes de ocorrer à lesão renal, provavelmente ocorrem alterações na microcirculação que leva a injúria renal (OKUSA et al., 2013). A peçonha de serpentes Viperídes contém enzimas proteolíticas que podem destruir o endotélio e a membrana dos capilares, aumentando a permeabilidade capilar e conseqüentemente, levando a um extravasamento de fluidos do espaço intravascular para o intersticial, comprometendo a circulação e contribuindo para a isquemia renal após mordeduras destas serpentes (AYE et al., 2017). No presente estudo, a injúria endotelial no seguimento do envenenamento por *B. erythromelas* foi associada a um risco aumentado de desenvolvimento de IRA. Resultados semelhantes ocorreram em um estudo anterior que demonstra uma associação significativa entre marcadores de endotélio e de inflamação e a ocorrência de IRA em pacientes submetidos a cuidados intensivos (ROBINSON-COHEN et al., 2016).

As células endoteliais têm um papel importante na regulação da coagulação. Em condições normais, o endotélio ajuda a regular não só a coagulação sanguínea, mas também a euvolemia, o controle dos eletrólitos, previne doenças microcirculatórias, como microangiopatia trombótica e coagulação intravascular disseminada (RAJENDRAN et al., 2013). Pacientes com envenenamento botrópico geralmente apresentam elevação no tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), com baixos níveis de fibrinogênio. Os fatores da coagulação II, V, VII, X, XIII também estão diminuídos (S OLIVEIRA et al., 2020; RESIERE et al., 2020; DEMPFLÉ et al., 1990). Albuquerque et al., (2020) sugeriram que a coagulopatia provavelmente é uma via importante nos casos agudos de lesão renal associado a peçonha botrópica. No presente estudo, o grupo com IRA apresentou um maior número de pacientes com exames de sangue incoaguláveis em relação ao grupo Não-IRA. Este fato sugere que a correlação entre o dano renal e distúrbios na coagulação constituem fenômenos microcirculatórios.



Alguns biomarcadores de endotélio podem ser utilizados como indicadores de injúria endotelial, uma vez que podem ser detectados antes mesmo de biomarcadores classicamente reconhecidos (PAGE & LILES, 2013). Em nosso estudo, dos quatro biomarcadores endoteliais avaliados (Angiopietina-1, Angiopietina-2, VCAM-1 e Syndecan-1) apenas dois deles, VCAM-1 e Angiopietina-1, foram capazes de prever a IRA. Esses dois biomarcadores de endotélio conseguiram apontar a IRA no estágio leve, compatível com os níveis de creatinina sérica dentro de uma janela de 12 a 16hs pós-mordedura. Levando-se em conta que a maioria dos pacientes deste estudo foram admitidos na unidade hospitalar após um intervalo de 5,5hs após o acidente botrópico, o uso destes dois biomarcadores endoteliais no intervalo de 12 a 16hs pós-mordedura, pode direcionar uma intervenção precoce para proteção renal em acidentes leves por serpentes *Bothrops erythromelas*.

VCAM-1 é detectado apenas após estimulação de células endoteliais por citocinas (REITSMA et al., 2007) e tem sido estudado como um agente diagnóstico e prognóstico de várias doenças (PAGE & LILES, 2013). O dano renal está associado ao aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, promovendo assim uma regulação positiva de moléculas de adesão como o VCAM-1 nas células endoteliais. No estudo atual, os níveis séricos de VCAM-1 foram significativamente maiores no grupo que desenvolveu IRA quando comparados com os grupos controle e Não-IRA, sugerindo uma maior ativação e dano às células endoteliais no grupo com IRA. VCAM-1 mostrou-se bom preditor de IRA no intervalo de 12 a 16hs que sucedem ao envenenamento botrópico. Além disso, este mesmo biomarcador apresentou boa acurácia e performance diagnóstica em detectar IRA, em estágios leves, dentro de 24hs pós-mordedura.

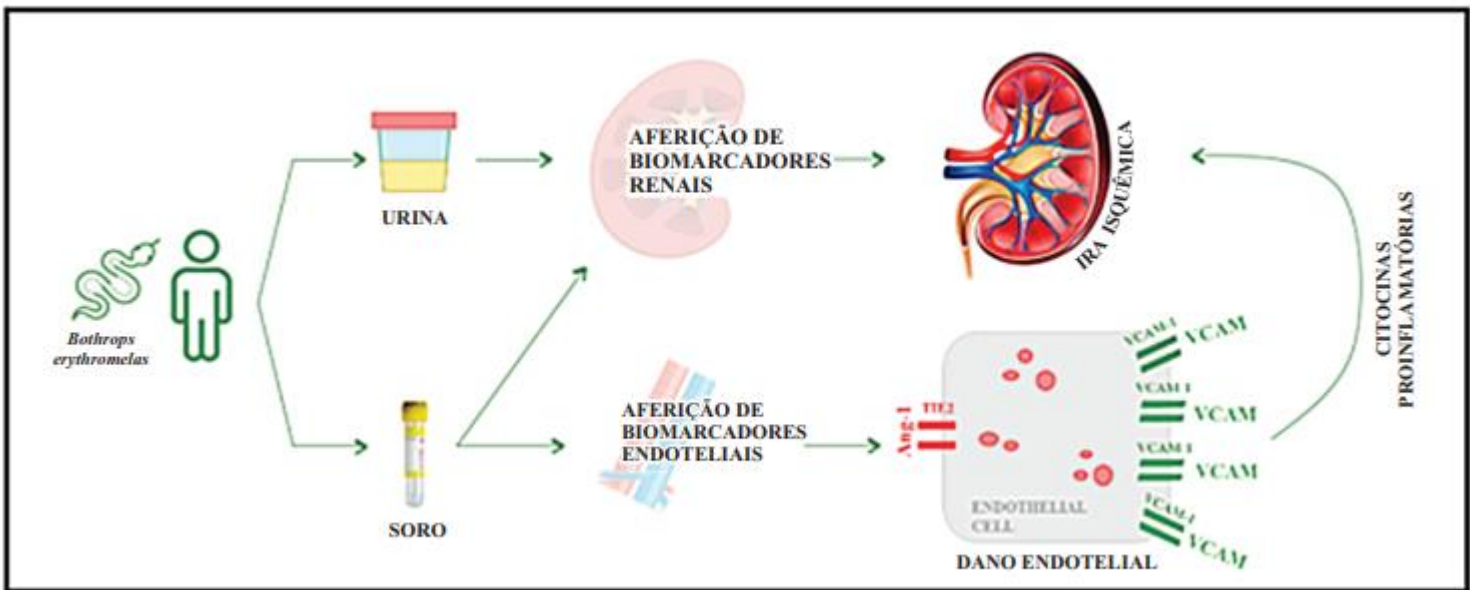
A Angiopietina-1 (Ang-1), que é produzida principalmente por pericitos, induz a remodelação dos vasos, a angiogênese, a diminuição da inflamação e a permeabilidade vascular (BRINDLE et al., 2006). Assim, sua aplicabilidade pode minimizar a possibilidade de potenciais efeitos deletérios, enquanto otimiza os efeitos de proteção dos vasos (BRINDLE et al., 2006). Estudos realizados em modelos animais demonstraram que Ang-1 pode aumentar a capacidade protetora em células de crescimento endotelial precoce em modelo murino na IRA (ROBINSON-COHEN et al., 2016). Um dos mecanismos patogênicos no seguimento do envenenamento botrópico é a injúria renal isquêmica resultante da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* (ALBUQUERQUE et al., 2013). Lesões renais isquêmicas regulam positivamente a expressão renal de Ang-1 (WOOLF et al., 2009). Nossos resultados

evidenciaram uma expressão aumentada de Ang-1 nos pacientes que apresentaram IRA quando comparados aos que não apresentaram IRA nos 3 intervalos de tempo estudados. Além disso, Angiopietina-1 apresentou bom desempenho em predizer o desenvolvimento de IRA após envenenamento por serpentes *B. erythromelas*, uma vez que este biomarcador mostrou-se significativamente aumentado dentro de um intervalo de 12 a 16 horas pós-mordedura.

Recentemente um estudo demonstrou que a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), é um bom biomarcador em predizer IRA no envenenamento botrópico (ALBUQUERQUE et al., 2020). Nosso estudo comparou NGAL urinário (uNGAL) e NGAL sérico (sNGAL) com outros biomarcadores nos mesmos intervalos de tempo. NGAL sérico apresentou uma maior tendência em predizer IRA (AUC = 0,72 (0,51-0,93)) nas primeiras 8 horas pós-mordedura quando comparado aos outros biomarcadores estudados, inclusive em comparação com o NGAL urinário. Embora NGAL sérico seja considerado um marcador de processos inflamatórios, uma hipótese que pode explicar níveis sistêmicos deste biomarcador tendendo a apontar a IRA nas primeiras horas após o acidente botrópico é que o próprio processo inflamatório constitui o gatilho da lesão endotelial, que leva a injúria renal isquêmica nesses tipos de envenenamento.

Uma hipótese que pode explicar um aumento dos níveis sistêmicos dos biomarcadores de endotélio VCAM-1 e Angiopietina-1 observados no envenenamento por *B.erythromelas* é que estes biomarcadores aparecem como resposta aos estímulos pró-inflamatórios sofridos pelas células endoteliais quando essas são ativadas por toxinas. Ang-1 aparece como uma tentativa para mediar o extravasamento de fluidos capilares, regulando a integridade e estabilidade da barreira endotelial (RICCIUTO et al., 2011; MOFARRAHI et al., 2007). VCAM-1 permitem a adesão firme de leucócitos ao endotélio e subsequente transmigração através da barreira endotelial para um local de lesão ou inflamação (AIRD W.C, 2007). Após o acidente botrópico começam a ocorrer alterações na microcirculação e na oxigenação dos tecidos. Alterações agudas sofridas pelas células endoteliais podem levar a alterações da reatividade e permeabilidade vascular, aderência de leucócitos, alterações da coagulação e condições isquêmicas (ROBINSON-COHEN et al., 2016). Alguns trabalhos sugerem um papel importante da injúria endotelial microvascular na IRA isquêmica, especialmente durante a fase de reperfusão (DEVARAJAN P.,2006 ; BONVENTRE & YANG, 2011). Assim, esses biomarcadores de endotélio podem ser clinicamente úteis como biomarcadores da gravidade

ou prognóstico da IRA, pois abordagens terapêuticas que preservam a função endotelial têm o potencial de melhorar e prevenir a IRA. A Figura 19 representa um modelo proposto pelo autor, com o objetivo de explicar o papel dos biomarcadores de endotélio na IRA decorrente do envenenamento botrópico.



**Figura 19.** Modelo proposto para explicar o papel dos biomarcadores de endotélio na IRA decorrente do envenenamento botrópico. \*Fonte: próprio autor.

Este estudo apresentou algumas limitações. A principal foi o tamanho da amostra. O pequeno tamanho da amostra se deveu à exclusão de pacientes com idade inferior a 18 anos de idade, pacientes que tinham recebido soroterapia anti-botrópica anterior à admissão hospitalar, pacientes admitidos com tempo superior a 8 horas pós-mordedura, ou que tinham história prévia de doença renal, diabetes e/ou hipertensão. Outra limitação importante é que a maioria dos pacientes não tinha informações disponíveis sobre o valor da sua creatinina sérica antes da admissão hospitalar. Assim, usamos a medição da creatinina sérica admissional como parâmetro inicial, como na maioria dos estudos anteriores. Devido ao tamanho limitado da amostra, não avaliamos outros potenciais confundidores, como o uso de medicamentos.

## **Perspectivas futuras**

---

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo apresentamos um modelo ideal para se estudar a IRA tóxica, onde se pode determinar o momento exato da exposição e avaliá-la ao longo do tempo por meio de dosagens seqüenciais de biomarcadores. Também ficou claramente evidenciado a alta toxicidade deste veneno envolvendo vasos, plaquetas e a coagulação sanguínea como um todo, o que sugere uma maior participação de distúrbios da hemostasia do que se acreditava inicialmente.

O estudo dos biomarcadores de endotélio deve ser continuado, principalmente Angiopietina-1, que surge não só como um biomarcador para detecção precoce da IRA após envenenamento botrópico, mas também como uma proposta terapêutica para proteção da microcirculação contra a disfunção endotelial na injúria renal nos envenenamentos botrópicos como também em outras patologias. Acrescento também a realização de estudos relacionados à atividade plaquetária (marcadores de ativação e agregação plaquetária) que podem ajudar a compreender melhor os distúrbios da hemostasia e seu envolvimento na IRA induzidos pelo veneno desta espécie botrópica, otimizando as estratégias de gestão atuais e desenvolvendo novas abordagens terapêuticas.

## **Conclusão**

---

## 8. CONCLUSÃO

- Pacientes vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* com e sem IRA apresentaram características epidemiológicas de base semelhantes;
- O dano endotelial microvascular leva a IRA isquêmica no envenenamento por serpentes *B. erythromelas* e pode estar envolvido nos distúrbios de coagulação sangüínea;
- Os biomarcadores endoteliais VCAM-1 e Angiopietina-1 mostraram bom desempenho em apontar a IRA, compatíveis com os níveis de creatinina sérica, no período de 12 a 16 horas pós-mordedura no envenenamento por serpentes *Bothrops erythromelas*;
- VCAM-1 apresentou melhor performance diagnóstica em detectar IRA leve tardiamente no envenenamento botrópico, uma vez que este biomarcador mostrou-se em concentrações elevadas por mais de 24 horas pós-mordedura;
- NGAL sérico apresentou uma tendência em prever IRA após envenenamento botrópico nas primeiras 8 horas pós-mordedura;
- O uso de biomarcadores endoteliais dentro de um período de 12 a 16 horas pós-mordedura por serpentes *B. erythromelas* podem direcionar mecanismos de intervenção precoce para proteção renal, mesmo em casos leves;
- O conhecimento preciso do tempo de detecção dos biomarcadores de endotélio é uma importante ferramenta para a implantação de intervenções precoces, reduzindo assim a morbi-mortalidade da IRA isquêmica relacionada à peçonha de serpentes *Bothrops erythromelas*.

## **Referências**

---



## REFERÊNCIAS

- ADEPU, Saritha *et al.* Incipient renal transplant dysfunction associates with tubular syndecan-1 expression and shedding. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 309, n. 2, p. 137-145, 2015.
- AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res.**, v. 100, p. 158-73, 2007.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 55, p. 295–301, 2013.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute kidney injury after snakebite accident treated in a Brazilian tertiary care centre. **Nephrology (Carlton)**, v. 19, n. 12, p. 764-70, 2014.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** [online], v. 26, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0076>>. Acesso em 10 de Abril de 2022.
- ALVES, E. C. *et al.* Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, e0202361, 2018.
- AMARAL, A. Contribuição à biologia dos ofídios brasileiros (habitat, hábitos e alimentação). Primeira nota prévia. **Coletânea dos trabalhos do Instituto Butantan II**, p. 177-181, 1924.
- ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. Ofidismo. In:\_\_\_\_\_. **Toxicologia na prática Clínica**. 2ª edição. Belo Horizonte: Folium, 2017. p. 491-510.
- ARAÚJO, H. P. *et al.* Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502–514, 2008.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2 - a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

ASEGA A. F. *et al.* Cleavage of proteoglycans, plasma proteins and the platelet-derived growth factor receptor in the hemorrhagic process induced by snake venom metalloproteinases. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 12912, 2020.

ASSAKURA, M. T. *et al.* Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 217–227, 2003.

AYE, K. P. *et al.* Clinical and laboratory parameters associated with acute kidney injury in patients with snakebite envenomation: a prospective observational study from Myanmar. **BMC Nephrol.**, v. 18, n. 92, 2017.

BASILE, D. P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. **Kidney Int.**, v. 72, n. 2, p.151-156, 2007.

BERLING, I; ISBISTER GK. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfus Med Rev.**, v. 29, p. 82-89, 2015.

BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Anolisbooks, 224p., ISBN: 978-85-65622-04-2, 2014.

BERNFIELD, M. *et al.* Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. **Annu Rev Cell Biol.**, v. 8, p.365–393, 1992.

BÉRNILS, R.S.(org). **Brazilian reptiles**. V List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2009. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em 10 de Abril de 2021.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-72, 1994.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 217-222, 2002.

BOISRAMÉ-HELMS, J. *et al.* Endothelial dysfunction in sepsis. **Curr Vasc Pharmacol.**, v. 11, n. 2, p. 150-160, 2013.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Minor snake venom proteins: structure, function and potential applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824-838, 2017.

BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**, v. 241, p. 78–83, 2008.

BONVENTRE, J. V. *et al.* Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. **Nat Biotechnol.**, v. 28, p. 436-440, 2010.

BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), “A urinary biomarker and much more”. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 24, p. 3265–3268, 2009.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 4210–4221, 2011.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3503-3521, 1997.

BOURKE, L. A. *et al.* Pan-American lancehead Pit-vipers: Coagulotoxic venom effects and antivenom neutralisation of Bothrops Asper and B. atrox geographical variants. **Toxins**, v. 13, n. 2: 78, 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6a. Ed., Brasília, DF, Brazil: 2005. ISBN 85-334-1047-6. Disponível em: < [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) >.

BRASIL, Epidemio- Ministério da Saúde, SVS – **Sistema De Informação De Agravos De Notificação – SINAN Net**. 2021. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em 13/05/2021.

BRINDLE, N. P.; SAHARINEN, P.; ALITALO, K. Signaling and functions of angiopoietin1 in vascular protection. **Circ. Res.**, v. 98, p.1014–1023, 2006.

BRODIE III, E. D. Toxins and venoms. **Current Biology**, v. 19, n. 20, p. R931-R935, 2009.

BROCKLEBANK, V.; WOOD, K.M.; KAVANAGH, D. Thrombotic microangiopathy and the kidney. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v.13, p. 300-17, 2018.

BUCARETCHI, F. *et al.* Snakebites by bothrops Spp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 43, p. 329–333, 2001.

BUCARETCHI, F. *et al.* Thrombotic microangiopathy following Bothrops jararaca snakebite: case report. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 57, n. 4, p. 294-299, 2019

BURDMANN, E. A.; JHA, V. Acute kidney injury due to tropical infectious diseases and animal venoms: a tale of 2 continents. **Kidney international**, v. 91, n. 5, p. 1033-1046, 2017.

CALVETE, J. J. *et al.* Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett**, v. 583, n.11, p. 1736-43, 2009..

CALVETE, J. J. Snake Venomics, Antivenomics, and Venom Phenotyping: The Ménage à Trois of Proteomic Tools Aimed at Understanding the Biodiversity of Venoms. In R. M. Kini, K. J. Clemetson, F. S. Markland, M. A. **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside.** McLane & T. Morita (Eds.), 2010, p. 45-72. Springer Science & Business Media.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake population venomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510-527, 2011.

CAMARGO, A. C. M.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M. T. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, p. 516– 523, 2012.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S. *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, K.C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G.G. *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2010.

CARON, E. J. *et al.* Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: was it prophylaxis or method of administration? **Toxicon**, v. 54, n. 6, p.779-83. Nov. 2009.

CARRASCO, P. A. *et al.* Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109-124, 2012.

CAVALCANTE, Candice Torres de Melo Bezerra *et al.* Syndecan-1 improves severe acute kidney injury prediction after pediatric cardiac surgery. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 152, n. 1, p. 178-186, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022522316301027>>.

CHANG, J. F. *et al.* High soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations predict long-term mortality in hemodialysis patients. **International Urology and Nephrology**, v. 45, n. 6, p. 1693–1701, dez. 2013.

CHAWLA, L. S.; KELLUM, J. A. Acute kidney injury in 2011: Biomarkers are transforming our understanding of AKI. **Nat Rev Nephrol.**, v. 8, p. 68-70, 2012.

CHIANG, W. C. *et al.* Angiopoietin 1 influences ischemic reperfusion renal injury via modulating endothelium survival and regeneration. **Mol Med.**, v.25, n.5, 2019.

CHIPPAUX, J. P., WILLIAMS, V.; WHITE, G. Review Article: Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CLEMETSON, K. J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1236-1246, 2010.

COCA, S. G.; YALAVARTHY, R.; CONCATO, J.; PARIKH, C. R. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. **Kidney International**, v. 73, n. 9, p. 1008–1016, May. 2008.

CRUZ, L. S. *et al.* Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, n. 1, p. 42, 2009.

CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 639-641, 2015.

DAIBER, A, STEVEN, S, WEBER, A. *et al.* Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **Br J Pharmacol.**, v. 174, p. 1591–619, 2017.

DANOFF, T. M. Chemokines in interstitial injury. **Kidney Int.**, v. 53, p. 1807–1808, 1998.

DANTAS, R. T. *et al.* Evaluation of KIM-1 as an early biomarker of snakebite-induced AKI in mice. **Toxicon**, v. 151, p. 24-28, 2018.

DELGADO, A. B. T., *et al.* Hemorrhagic stroke secondary to bothrops Spp. venom: A case report. **Toxicon**, v. 132, p. 6–8, 2017.

DEMPFLE, C.E. *et al.* Coagulopathy after snake bite by Bothrops Neuwiedi: Case report and results of in vitro experiments. **Blut.**, v. 61, p. 369–374, 1990.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 17, n. 6, p. 1503–20, 2006

DIETERLE, F. *et al.* Renal biomarker qualification submission: A dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 455–462, 2010.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2851–2871, 2009.

DUARTE, R. C. F. *et al.* Thrombin generation test for evaluating hemostatic effects of Brazilian snake venoms. **Toxicon**. v. 163, p. 36–43, 2019.

EDELSTEIN, C. L. Acute Kidney Injury: Pathogenesis, Diagnosis and Management. In: Schrier RW. Renal and Electrolyte Disorders. 8 ed. China: Wolters Kluwer, 2018. p. 325-400.

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

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B., POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **J Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-99, 2009.

EVANGELISTA, I. L. *et al.* Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-70, Jun. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036276> >.

FEITOSA, E.L. *et al.* Older Age and Time to Medical Assistance Are Associated with Severity and Mortality of Snakebites in the Brazilian Amazon: A Case-Control Study. **PLoS One**, v. 10, 2015.

FÉLIX-SILVA, J. *et al.* Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, 2017a.

FÉLIX-SILVA, J. *et al.* Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: an overview from traditional use to pharmacological evidence. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 52, 2017b.

FÉLIX-SILVA, J. *et al.* Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 12-20, 2018.

FERRER, N. M. B. *et al.* Sindecán-1 urinário e lesão renal aguda após cirurgia cardíaca pediátrica. **Clin Chim Acta.**, v. 485, p. 205-9, 2018.

FIEDLER, U.; AUGUSTIN, H. G. Angiopietinas: uma ligação entre angiogênese e inflamação. **Tendências Immunol.**, v. 27, n. 12, p. 552–8, 2006.

FLO, T. H. *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature**, v. 432, p. 917-921, 2004.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochem J.**, v. 318, p. 1-14, Aug. 1996.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75-82, 2013.

FRANCA, F. O. S.; MALAQUE, C. M. S. Acidente botropico. In: Cardoso JLC, Franca FOS, Wen FH, Malaque CMS, Haddad Jr. V (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier/FAPESP, São Paulo. 2003. p.72-86.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, 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, p. 63–77, 2000.

FUCHS, J. *et al.* Bite by a Juvenile *Bothrops venezuelensis* (Venezuelan Lancehead) resulting in severe envenomation: A case report. **Toxicon**, v. 180, p. 39–42, 2020.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: 2001. ISBN: 85-7346-014-8.

GALIZIO, N. D. C. *et al.* Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **J Proteomics.**, v. 30, n. 186, p. 56-70, 2018.

GN, Y. M.; PONNUSAMY, A.; THIMMA, V. Snakebite induced thrombotic microangiopathy leading to renal cortical necrosis. **Case Rep Nephrol.**, v. 2017, n. 1348749, 2017.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology** (4th ed.). W. H. Freeman and Company. 2000.

GOMES, M. S. R. *et al.* Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290-300, 2011.

GONCHAROV, N. V.; NADEEV, A. D.; JENKINS, R. O.; AVDONIN, P. V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2017, n. 9759735, 2017.

GRIGORYEV, D. N. *et al.* The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 19, p. 547-558, 2008.



GUIMARAES, C. L. *et al.* Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 25, p. 2952-2979, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 1405-1474, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M., NÚÑEZ J., ESCALANTE T., RUCAVADO A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **Microvasc. Res.**, v. 71, p. 55–63, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snake venomics of the lesser antillean pit vipers *bothrops caribbaeus* and *bothrops lanceolatus*: Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 4396–4408, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976-987, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009b

GUTIÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVEIRA, C. L. M.; ÂNGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625-630, 2009c.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2162, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. **Toxins**, v. 8, n. 10, 2016.

GUTIERREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, n. 17063, 2017.

HAASE, M. *et al.* Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 6, p. 1012–1024, Dec. 2009.

HARRISON, R. A. *et al.* Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, n. 12, p. 569, Dez. 2009.

HATAKEYAMA, D.M. *et al.* Venom complexity of Bothrops Atrox (Common lancehead) siblings. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 26, n. e20200018. 2020.

HEPOKOSKI, M. *et al.* Ventilator-induced lung injury increases expression of endothelial inflammatory mediators in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 312, n. 4, p. F654-F660, 2017.

HOLMES, J. *et al.* Utility of electronic AKI alerts in intensive care: A national multicentre cohort study. **J Crit Care**, v. 44, p. 185-190, 2018.

HÖRBELT, M. *et al.* Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 293, p. F688– F695, 2007.

ICHIMURA, T.; MOU, S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. **Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine**, v. 6, n. 5, p. 533–8, maio 2008.

ISBISTER, G. K. Snakebite doesn't cause disseminated intravascular coagulation: Coagulopathy and thrombotic microangiopathy in snake envenoming. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 36, p. 444–451, 2010.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; O'CONNELL, J. L. Prognostic factors for amputation in the Case of envenoming by snakes of the bothrops genus (Viperidae). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 93, p. 401–408, 1999.

JORGE, R. J. *et al.* Venomics and antivenomics of Bothrops erythromelas from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **J Proteomics.**, v. 114, p. 93-114, 2015.

JORGE, R. J. B. **Venômica e antivenômica de *Bothrops erythromelas*: estudo da variação intraespecífica**. 2015. 130f. Tese (doutorado), Universidade Federal do Ceará, Faculdade de

Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Doutorado em farmacologia. Fortaleza, 2015.

JORGE, R. J. B. *et al.* Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. *Journal of Proteomics*, v. 114, p. 93-114, 2015.

KAMIGUTI, A. S. *et al.* Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops Jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon**, v. 29, p. 961–972, 1991.

KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.**, v. 278, n. 23, p. 4544-76, Dez. 2011.

KASHANI, K.; CHEUNG PASITPORN, W.; RONCO, C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 55, n. 8, p. 1074–1089, 2017.

KASPRZAK, A.; SURDACKA, A.; TOMCZAK, M.; KONKOL, M. Role of high endothelial postcapillary venules and selected adhesion molecules in periodontal diseases: a review. **J Periodontal Res.**, v. 48, p. 1–21, 2013.

KASTURIRATNE, A. *et al.* The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 11, p.e218, 2008.

KATZ, R. Biomarkers and Surrogate Markers: An FDA Perspective. **NeuroRX**, v. 1, n. 2, p. 189-195, 2004.

KDIGO: Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Kidney International**, v. 2, n. 1, p. 1-138, Mar. 2012.

KELLUM, J. A. *et al.* kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. **KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury**, v. 2, n. 1, p. 1- 138, 2012.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2006.

KIM, D. H. *et al.* COMP-angiopoietin-1 decreases lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. **Kidney Int.**, v. 76, n. 11, p. 1180-91, dez. 2009.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, ago. 2006.

KOCH, J. *et al.* Plasma syndecan-1 in hemodialysis patients associates with survival and lower markers of volume status. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 316, n. 1, p. F121-F127, Jan. 2019.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci.**, v. 63, n. 24, p. 030-41, dez. 2006.

KONG, D. H. *et al.* Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 4, p. 1057, 2018.

KORNALÍK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 3, p. 353-405, 1985.

LARRÉCHÉ, S. *et al.* Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of *Bothrops* Venom-Related Hemostasis Disorders. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n.17, p.9643, set. 2021.

LASKOSKI, Luciane M. *et al.* Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e calprotectina no tecido laminar de equinos após obstrução jejunal, tratados ou não com hidrocortisona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 817-823, set. 2012.

LEITE, A. R. *et al.* Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. **Angiology**, v. 71, n. 5, p. 397-410, 2020.

LEITE, R. S. *et al.* Epidemiology of snakebite accidents in the municipalities of the State of Paraíba, Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, vol. 18, n. ° 5, p. 1463-1471, 2013.

LIEW, H.; ROBERTS, M. A.; POPE, A. *et al.* Endothelial glycocalyx damage in kidney disease correlates with uraemic toxins and endothelial dysfunction. **BMC Nephrol.**, v.22, n. 21, 2021.

LONG, D.A. *et al.* Angiopoietin-1 therapy maintains kidney peritubular capillaries but enhances fibrosis and inflammation after folic acid-induced acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 74, p. 300–309, 2008.

MADUWAGE, K.; ISBISTER, G. K. Current treatment for venom-induced consumption coagulopathy resulting from snakebite. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3220, 2014.

MALAUQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite Envenomation in Central and South America. In: J. Brent *et al.* **Critical Care Toxicology**. Suíça: Springer International Publishing, 2015, p. 1-22.

MALAUQUE, C. M. S.; DUAYER, I. F.; SANTORO, M. L. Acute kidney injury induced by thrombotic microangiopathy in two cases of bothrops envenomation. **Clin. Toxicol.**, v. 57, p. 213–216, 2019.

MÅRTENSSON, J.; MARTLING, C. R.; BELL, M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability. **British Journal of Anaesthesia**, v. 109, n. 6, p. 843–50, dez. 2012.

MÅRTENSSON, J.; BELLOMO, R. J. B. P. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. **Blood Purif.**, v. 37, n. 4, p. 304-310, 2014.

MARUYAMA, M. *et al.* Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 549-556, 1992.

MATOS, R. R., & IGNOTTI, E. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 2837-2846, 2020.

MCCULLOUGH, P. A *et al.* Implementation of novel biomarkers in the diagnosis, prognosis, and management of acute kidney injury: executive summary from the tenth consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). **Contributions to nephrology**, v. 182, p. 5–12, 2013.

MEURS, M. V *et al.* Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target? **Crit Care**, v.13, n.2, p. 207-219, 2009.

MILLER, W. G *et al.* National Kidney Foundation Laboratory Engagement Working Group Recommendations for Implementing the CKD-EPI 2021 Race-Free Equations for Estimated Glomerular Filtration Rate: Practical Guidance for Clinical Laboratories. **Clinical Chemistry**, v.68, n.4, p. 511-520, 2022.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 569-573, 2007.

MISHRA, J. *et al.* Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. **J Am Soc Nephrol.**, n. 8, p. 2534–2543, 2003.

MISHRA, J. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin ( NGAL ) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. **Lancet**, n. 365, p. 1231–1238, 2005.

MOFARRAHI, M. *et al.* Regulation of angiotensin expression by bacterial lipopolysaccharide. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 294, p. L955–L963, 2008.

MOHAMED, F.; ENDRE, Z. H.; BUCKLEY, N. A. Role of biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury in deliberate poisoning and envenomation in less developed countries. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 80, n. 1, p. 3-19, 2015.

MOLITORIS, B. A. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/ endothelial axis. **J. Clin. Invest.**, v. 124, p. 2355–2363, 2014.

MORA-OBANDO, D. *et al.* Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America. **J Proteomics**. V. 229, p. 103945, out. 2020.

MORAIS, I. C. *et al.* *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, jan. 2013.

MOREIRA, L.; GUTIÉRREZ, J. M.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops Asper* (Terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, v. 57, p. 124–133, 1992.

MORS, W. B. *et al.* Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOTA, S. M B. *et al.* Thrombotic microangiopathy due to Bothrops erythromelas: a case report in Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020, e53. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062053>>. (Acesso 10 de janeiro de 2022).

MOURA-DA-SILVA, A. M; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des.**, v. 13, n. 28, p. 2893-905, 2007.

MULLER, A. M.; HERMANNNS, M. I.; CRONEN, C.; KIRKPATRICK, C. J. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. **Exp Mol Pathol.**, v. 73, p. 171–180, 2002.

MURRAY, P. T. *et al.* Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis quality initiative consensus conference. **Kidney Int.**, v. 85, p. 513–521, 2014.

NAUMANN, G. B. *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NERY, Neriane Monteiro *et al.* An overview of Bothrops erythromelas venom. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 49, n. 6, p. 680-686, dez. 2016.

NEVES, F. M. *et al.* Fibroblast growth factor 23, endothelium biomarkers and acute kidney injury in critically-ill patients. **J Transl Med**, v. 17, n. 1, p. 121, Abr. 2019.

NIELSEN, V. G.; FRANK N.; AFSHAR, S. De novo assessment and review of pan-american pit viper anticoagulant and procoagulant venom activities via kinetomic analyses. **Toxins**, v. 11, p. 94, 2019.

NOOTSOS, T. *et al.* Snakebite-associated thrombotic microangiopathy: an Australian prospective cohort study [ASP30]. **Clinical Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 205-213, 2022.

OKUSA, M. D. Physiological biomarkers of acute kidney injury: a conceptual approach to improving outcomes. **Contrib. Nephrol.**, v. 182, p. 65–81, 2013.

OLIVEIRA, S. S. *et al.* Factors associated with systemic bleeding in bothrops envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon. **Toxins**, v. 11, p. 22, 2019.

OLIVEIRA, S. S. *et al.* Bothrops snakebites in the Amazon: Recovery from hemostatic disorders after brazilian antivenom therapy. **Clin. Toxicol.**, v. 58, p. 266–274, 2020.

S OLIVEIRA, S. *et al.* Bleeding Disorders in *Bothrops atrox* Envenomations in the Brazilian Amazon: Participation of Hemostatic Factors and the Impact of Tissue Factor. **Toxins (Basel)**, v. 12, n. 9, p. 554, ago. 2020.

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

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

OTERO-PATIÑO, R. *et al.* Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(Ab')<sub>2</sub>] antivenoms, in bothrops asper bites in Colombia. **Toxicon**, v. 59, p. 344–355, 2012.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1305, 2017.

PACHECO, U. P.; ZORTÉA, M. Snakebites in southwestern Goiás State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 141-151, 2008.

PADBERG, J. S. *et al.* Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 335–43, 2014.

PAGE, A. V.; LILES, W. C. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. **Virulence**, v. 4, p. 507–516, 2013.

PAPAPETROPOULOS, A. *et al.* Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival and interaction with other angiogenic growth factors. **Lab Invest.**, v. 79, p. 213–223, 1999.



PARIKH, C. R.; MANSOUR, S. G. Perspective on Clinical Application of Biomarkers in AKI. **J Am Soc Nephrol.**, v. 28, n. 6, p. 1677-1685, 2017.

PAULUS, P.; JENNEWEIN, C.; ZACHAROWSKI, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? **Biomarkers**, v. 1, p. S11-21, 2011.

PRAKASH, J.; SINGH, V. P. Changing picture of renal cortical necrosis in acute kidney injury in developing country. **World J Nephrol.**, v. 4, n. 5, p. 480-6, nov. 2015.

PEREIRA, A. L. M. *et al.* Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by Berythraactivase and Jararhagin (SVMPs). **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 788-796, 2006.

PÉREZ-GÓMEZ A.S. *et al.* Hemorrhagic Stroke Following Viper Bites and Delayed Antivenom Administration: Three Case Reports from the Western Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 52, p. e20190115, 2019.

PHILLIPS, D.; SWENSON, S. & MARKLAND, F. J. R. Thrombin-like snake venom serine proteases. In: **Handbook of Venom and Toxins of Reptiles** (ed. by S.P. Mackessy), CRC Press, Boca Raton. 2010, p. 139–154.

PIDDE-QUEIROZ, G. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

POWELL, T. C. *et al.* Association of inflammatory and endothelial cell activation biomarkers with acute kidney injury after sepsis. **Springerplus**, v. 3, p. 207. Abril 2014.

PUCCA, Manuela B. *et al.* Chronic kidney failure following lancehead bite envenoming: a clinical report from the Amazon region. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, Botucatu, v. 26, e20200083, 2020.

QUEIROZ, G. P. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RAJENDRAN, P. *et al.* The vascular endothelium and human diseases. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 9, p. 1057–1069, 2013.

REITSMA, Sietze *et al.* The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 454, n. 3, p. 345-359, 2007.

RESIERE, D. Clinical features and management of snakebite envenoming in French Guiana. **Toxins**, v. 12, p. 662, 2020.

RICCIUTO, D.R. *et al.*, Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 39, p.702–710, 2011.

ROBINSON-COHEN C, *et al.* Association of markers of endothelial dysregulation Ang1 and Ang2 with acute kidney injury in critically ill patients. **Crit Care**, v. 20, n. 1, p. 207, 2016.

RODRIGUES, C. F. B. *et al.* Clinical implications of ontogenetic differences in the coagulotoxic activity of Bothrops Jararacussu venoms. **Toxicol. Lett.**, v. 348, p. 59–72, 2021.

RUBIG, E. *et a.*. The synthetic Tie2 agonist peptide vasculotide protects renal vascular barrier function in experimental acute kidney injury. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 22111, 2016.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from Bothrops Asper (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 63, p. 186–199, 1995.

RUCAVADO, A. *et al.* Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by Bothrops Asper snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thromb. Haemost.**, v. 94, p. 123–131, 2005.

SABBISSETTI, V.; BONVENTRE, J. V. Brenner and Rector's The Kidney. **Elsevier**, v.1, p.1016-1042, 2012.

SACHETT, J.A.G.; WEN, F.H.; MONTEIRO, W.M. **Guia para o tratamento dos acidentes ofídicos** (livro eletrônico). Manaus. Ed. do Autor, 2022. ISBN 978-65-00-44339-4.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.

SAKURAI, Y. *et al.* Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1649, n. 1, p. 51–57, jun. 2003.

SANTHOSH, M. S. *et al.* Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 106-123, 2013.

SCHATTNER, M. *et al.* The snake venom metalloproteases berythrin and jararhagin activate endothelial cells. **Biol Chem.**, v. 386, n. 4, p. 369-74, 2005.

SCHULZ, C. A. *et al.* Plasma kidney injury molecule-1 (p-KIM-1) levels and deterioration of kidney function over 16 years. **Nephrol. Dial. Transplant.**, p. 1-9, 2019.

SEGURA, A. *et al.* Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, 2012.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, n. 0, p. 19-26, 2013.

SGRIGNOLLI, L. *et al.* Acute kidney injury caused by bothrops snake venom. **Nephron Clin Pract**, v. 119, n. 2, p. c131-6; discussion c137, 2011.

SILVA, M. **Estudo da Variabilidade Intraespecífica da Peçonha de Bothrops erythromelas Amaral, 1926 (Jararaca Malha de Cascavel)**. 2002. (Masters Thesis), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. B. *et al.* A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J.**, v. 369, n.1, p. 129-139, 2003.

SILVA, A. S. T.; MARCELINO, J. R.; TENÓRIO, E. C. N.; SAKAUCHI, M. A.; GATTÁS, V. **Soros e vacinas**. 2ª Edição. São Paulo: Instituto Butantan, 2013. ISBN: 978-85-65411-01-1

SILVA, Igor Rapp Ferreira da. **Purificação e caracterização parcial das atividades de uma proteína rica em cisteína (CRISP) isolada da peçonha de Bothrops jararaca**. 2017. 1 recurso online (79 p.). Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/330448>>. Acesso em: 2 set. 2018.

SINGH, A. *et al.* Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. **J Am Soc Nephrol.**, v. 18, n. 11, p. 2885–9, 2007.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 943-53, Oct 2012.

SLAGBOOM, J. *et al.* Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, p. 1-13, 2017.

SONI, S. S. *et al.* NGAL: A biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. **International Urology and Nephrology**, v. 42, n. 1, p. 141–150, 2010.

SOUSA, L. F. *et al.* Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of bothrops complex. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 7, n. 9, p. e2442, set. 2013.

SOUSA, L. F. *et al.* Coagulotoxicity of Bothrops (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins (Basel)**, v. 10, p.411, 2018.

SOUSA, L. F. *et al.* Differential coagulotoxicity of metalloprotease isoforms from Bothrops Neuwiedi snake venom and consequent variations in antivenom efficacy. **Toxicol. Lett.**, v. 333, p. 211-221, 2020.

SOUZA, A. S. *et al.* Snakebites as cause of deaths in the western Brazilian Amazon: Why and who dies? deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, p. 15–24, 2018.

STÁBELI, R. G. *et al.* Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **Journal of biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 305–309, fev. 1999.

SULLIVAN, JR, J. B. Past, present, and future immunotherapy of snake venom poisoning. **Annals of Emergency Medicine**, v. 16, n. 9, p. 938-944, 1987.

SUPAVEKIN, S. *et al.* Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. **Kidney Int.**, v. 63, p. 1714-1724, 2003.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.

TEIXEIRA, C. *et al.* Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 988-997, 2009.

TEMPONE, A. G. *et al.* *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 3, p. 620–624, jan. 2001.

TORREZ, P. P. *et al.* Forest pit viper (*Bothriopsis bilineata bilineata*) bite in the Brazilian Amazon with acute kidney injury and persistent thrombocytopenia. **Toxicon**, v. 85, p. 27-30, Jul 2014.

TSIGKOS, S., KOUTSILIERIS, M. & PAPAPETROPOULOS, A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 12, p. 933–941, 2003.

URBSCHAT, A.; OBERMULLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16 Suppl 1, p. S22-30, Jul 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707441>. Acesso em: 12 fev. 2022.

VAIDYA, V. S., BONVENTRE, J. V. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 2, p. 697-713, 2006.

VAIDYA, V. S. *et al.* Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. **Clin Transl Sci.**, v. 1, p. 200-208, 2008.

VAIDYA, V. S. *et al.* Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 478–485, 2010.

VALENTA, J. Envenoming and Snakebite Treatment in Specific Snake Groups. In J. Valenta (Ed.), **Venomous Snakes: Envenoming, Therapy** (2 ed., pp. 85-234). (2010a). New York: Nova Science Publishers.

VLAHU, Carmen A. *et al.* Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 11, p. 1900-1908, 2012. Disponível em: <https://jasn.asnjournals.org/content/23/11/1900.long>. Acesso em: 09 mar. 2022.

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

WARRELL, D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 33, p. 17-38, 2019.

WASUNG, M. E.; CHAWLA, L. S.; MADERO, M. Biomarkers of renal function , which and when ? **Clinica Chimica Acta**, v. 438, n. 1, p. 350–357, 2015.

WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S. **Acidentes por animais peçonhentos no Brasil**. 1a Edição. São Paulo: Instituto Butantan, 2013.

WHO. (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Snakebite under spotlight in Oxford** [página na Internet]. 2021 [acessado 2022-03-13]. Disponível em: [» http://www.who.int/snakebites/news/Snakebite\\_under\\_spotlight\\_in\\_Oxford/en](http://www.who.int/snakebites/news/Snakebite_under_spotlight_in_Oxford/en)

WOOLF, A. S., GNUDI, L., LONG, D. A. Roles of angiopoietins in kidney development and disease. **J. Am. Soc. Nephrol.** 20, 239–244, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W., 2020. Snakebite Envenoming. Snakebite: Overview, Intergovernmental Organization pp. [https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1).

XU, J. *et al.* Association Between Syndecan-1, Fluid Overload, and Progressive Acute Kidney Injury After Adult Cardiac Surgery. **Front Med (Lausanne)**, v. 30, n. 8, p. 648397, jul. 2021.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Tumstatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.53, p. 1831– 1840, 2004.

YUAN, H. T. *et al.* Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Kidney Int.**, v. 61, p. 2078– 2089, 2002.

YUEN, P. S. T. *et al.* Ischemic and nephrotoxic acute renal failure are distinguished by their broad transcriptomic responses. **Physiol Genomics**, v. 25, p. 375–386, 2006.

ZAPPELLINI, A. **Estudos bioquímico e farmacológico da peçonha de *Bothrops erythromelas***. 1991. 57 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

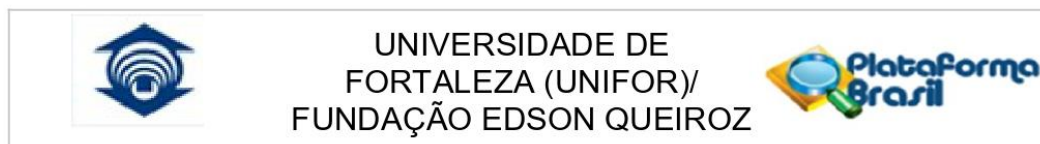
ZHANG, Y.J. *et al.* Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 3, p. 598–604, set. 2003.

## **Apêndices**

---



## APÊNDICE A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** ¿INVESTIGAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL E INFLAMAÇÃO EM PACIENTES VÍTIMAS DE INTOXICAÇÕES EXÓGENAS E ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO NORDESTE DO BRASIL¿

**Pesquisador:** Geraldo Bezerra da Silva Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 41664214.5.0000.5052

**Instituição Proponente:** Fundação Edson Queiroz

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

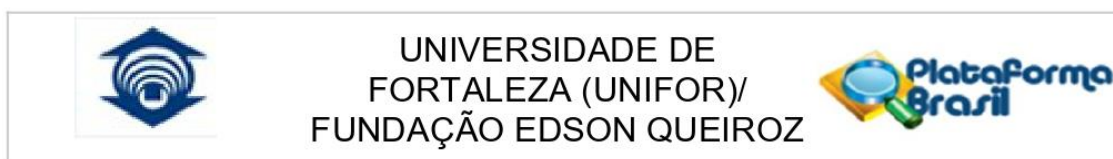
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.570.155

#### Apresentação do Projeto:

Lesão Renal Aguda (LRA) é uma complicação grave associada a acidentes com animais peçonhentos e representa grande ônus para países em desenvolvimento, pois estes possuem característica principalmente agrícola. Atualmente, o diagnóstico da LRA é considerado tardio e inespecífico, devido à falta de especificidade dos marcadores clínicos. Entender melhor o mecanismo da lesão renal em pacientes que sofreram acidentes por animais peçonhentos e sugerir novos biomarcadores renais precoces e específicos, poderá contribuir para reduzir o número de pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva e reduzir os gastos de saúde do SUS. O objetivo deste estudo é investigar mecanismos fisiopatológicos da LRA causada por envenenamentos com animais peçonhentos, em amostras seriadas utilizando biomarcadores clássicos, acompanhando sua evolução e buscando biomarcadores precoces. Trata-se de um estudo prospectivo no qual serão analisadas amostras seriadas de sangue e urina de pacientes hospitalizados após acidentes por animais peçonhentos no Instituto Dr José Frota. Os tempos que serão coletados são de 0 a 8; 12; 24 e

**Endereço:** Av. Washington Soares 1321, Bloco M Sala-30, Diretoria de Pesquisa e Inovação Tecnológica  
**Bairro:** Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br



Continuação do Parecer: 3.570.155

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1000091_É2.pdf	06/09/2019 09:48:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	06/09/2019 09:24:30	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores.pdf	06/09/2019 09:15:16	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Fiel_depositario.pdf	06/09/2019 09:13:48	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_instituicao.pdf	06/09/2019 09:11:37	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Carta_IJF.pdf	06/09/2019 09:05:38	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Carta_UNIFOR.pdf	06/09/2019 09:00:38	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Carta_ufc.pdf	06/09/2019 08:56:23	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	06/09/2019 08:44:02	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura.docx	31/08/2019 20:08:24	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Traducao Juramentada Carta Sidney.pdf	11/04/2015 15:29:37		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_mar2015.doc	11/04/2015 15:28:47		Aceito
Outros	Carta de Anuência - Sydney.pdf	07/11/2014 15:28:37		Aceito
Outros	Instrumento da Pesquisa.doc	07/11/2014 15:27:58		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 12 de Setembro de 2019

Assinado por:  
**ALDO ANGELIM DIAS**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Washington Soares 1321, Bloco M Sala-30, Diretoria de Pesquisa e Inovação Tecnológica  
**Bairro:** Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br

## APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ  
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

**TÍTULO DA PESQUISA: “ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS NA EVOLUÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA ASSOCIADOS À ENVENAMENTO POR ANIMAIS PEÇONHENTOS ATRAVÉS DE BIOMARCADORES”.**

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: **Sandra Mara Brasileiro Mota**

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que irá investigar a ocorrência de problemas nos rins de pessoas que sofreram intoxicação por cobra ou aranha peçonhenta.

**1. Participação na Pesquisa:** Ao participar desta pesquisa você irá realizar alguns exames laboratoriais, por meio da coleta de sangue e urina, para a pesquisa de alterações no funcionamento de seus rins. A coleta de sangue e urina será realizada pelos funcionários do laboratório do hospital no qual você é atendido, da mesma maneira em que são realizados seus exames de rotina.

Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado o(a) os(as) (ENTREVISTA, AVALIAÇÕES, EXAMES ETC.) sem nenhum prejuízo para você.

**2.Riscos e Desconfortos:** Os procedimentos utilizados (coleta de sangue e urina) para exame trarão um mínimo de desconforto, como num exame de sangue qualquer.

**3. Benefícios:** Os benefícios esperados com o estudo são no sentido de detectar alguma doença nos rins, o que proporcionará um tratamento adequado para este problema. Se você for diagnosticado com algum problema nos rins será encaminhado para acompanhamento e tratamento especializado (com médico Nefrologista).

**4.Formas de Assistência:** Se você precisar de algum tratamento, orientação ou encaminhamento por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou se o pesquisador descobrir que você tem alguma coisa que precise de tratamento, você será encaminhado(a)

pelamédica nefrologista assistente desta pesquisa para o ambulatório de Nefrologia deste hospital para acompanhamento.

**5. Confidencialidade:** Todas as informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer ou que sejam conseguidas por exames serão utilizadas somente para esta pesquisa.

**6. Esclarecimentos:** Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: **Sandra Mara Brasileiro Mota**  
Endereço: Rua Barão do Rio Branco, 1816 - Instituto Dr José Frota (IJF).  
Fortaleza, Ceará. Telefone para contato: (85) 98811 3115  
Horário de atendimento: horário comercial.

Se desejar obter informações sobre os seus direitos e os aspectos éticos envolvidos na pesquisa poderá consultar o Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza, Ce.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – COÉTICA  
Universidade de Fortaleza.  
Av. Washington Soares, 1321, Bloco da Reitoria, Sala da Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 1º andar.  
Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-341.  
Telefone (85) 3477-3122, Fortaleza, Ceará.

**7. Ressarcimento das Despesas:** Caso o(a) Sr.(a) aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira.

**8. Concordância na Participação:** Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, e receberá uma cópia deste Termo.

**O sujeito de pesquisa** ou seu representante legal, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O **pesquisador responsável** deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

**CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) \_\_\_\_\_, portador(a) da cédula de identidade \_\_\_\_\_, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Fortaleza-Ce., \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante ou Representante Legal



Impressão dactiloscópica

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

### Thrombotic microangiopathy due to *Bothrops erythromelas*: a case report in Northeast Brazil

Sandra Mara Brasileiro Mota<sup>1</sup>, Polianna Lemos Moura Moreira  
Albuquerque<sup>2</sup>, Geraldo Bezerra da Silva Júnior<sup>2</sup>, Elizabeth De Francesco  
Daher<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

*Bothrops erythromelas* are serpents that belong to the Viperidae family, which are the main species responsible for human snakebites in Ceara State, Northeast Brazil. Thrombotic microangiopathy (TMA) is an uncommon group of disorders characterized by microangiopathic hemolytic anemia (MAHA), thrombocytopenia and acute kidney injury (AKI), and occurrence after snakebites have been rarely reported. In this report, we described the case of a 57 year-old-man without comorbidities who was bitten by a *Bothrops erythromelas* on his right ankle. He presented with pain, edema and local bleeding. Symptomatology and laboratory tests were compatible with the diagnosis of TMA. He received specific antivenom and fluids replacement without any anaphylactic reaction. The conservative treatment was effective and there was no need for red blood cells transfusion or plasmapheresis. The aim of this report was to describe the first case of thrombotic microangiopathy following *Bothrops erythromelas* envenoming in the Northeast Brazil, providing insights about important mechanistic pathways of *Bothrops* snakebite-associated TMA and how to change the prognosis of the disease.

**KEYWORDS:** Thrombotic microangiopathy. Snakebite. *Bothrops erythromelas*. Acute kidney injury.

#### INTRODUCTION

Snakebite-related Thrombotic Microangiopathy (TMA) is characterized by thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia and acute kidney injury (AKI)<sup>1</sup>. Studies described TMA due to Viperidae bites by *Daboia russelli* (Russell's vipers) in India and in Sri Lanka, *Cerastes cerastes* in Europe, *Proatheris superciliares* in the United States of America, *Bothrops lanceolatus* in Martinique<sup>2</sup>, and only three cases following *Bothrops jararaca* envenomation in Southeastern Brazil<sup>2,3</sup>. AKI associated with TMA has not been described in *Bothrops* envenomation in Northeast Brazil.

Thrombotic microangiopathy is associated with significant morbidity and mortality<sup>4</sup>. The knowledge on the prevalence of TMA in *Bothrops* envenomation, as well as the early diagnosis of this syndrome is essential for the prompt initiation of supportive and specific management to decrease adverse outcomes such as AKI, chronic kidney disease, hemorrhage and death<sup>5,6</sup>.

The aim of this study was to report the first case of thrombotic microangiopathy and AKI following *Bothrops erythromelas* snakebite envenomation (Viperidae family) in the Northeast of Brazil, highlighting current studies under a perspective

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>2</sup>Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil

**Correspondence to:** Sandra Mara Brasileiro Mota  
Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Rua Costa Mendes, 1608, CEP 60020-181, Fortaleza, CE, Brazil  
Tel: +55 85 33668208

**E-mail:** sandramarabrasileiro@gmail.com

**Received:** 21 May 2020

**Accepted:** 4 July 2020

## APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO QUALIS A2 (MEDICINA I)

Toxicology Letters 345 (2021) 61–66



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxlet](http://www.elsevier.com/locate/toxlet)

## Role of endothelial biomarkers in predicting acute kidney injury in *Bothrops* envenoming

Sandra Mara Brasileiro Mota<sup>a,\*</sup>, Polianna Lemos Moura Moreira Albuquerque<sup>b</sup>,  
Gdayllon Cavalcante Meneses<sup>a</sup>, Geraldo Bezerra da Silva Junior<sup>b</sup>,  
Alice Maria Costa Martins<sup>c</sup>, Elizabeth De Francesco Daher<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Medical Sciences Graduate Program, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

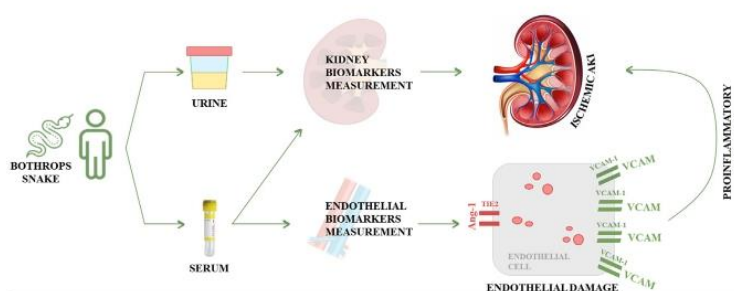
<sup>b</sup> University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>c</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Endothelial biomarkers may be clinically useful as predictors of *Bothrops* venom-related AKI.
- VCAM-1 and Angiopoietin-1 showed good capacity to predict mild AKI in the period of 12–16 h post *Bothrops* snakebite.
- Point-of-care endothelial biomarker detection is important for accelerating early intervention in *Bothrops* venom-related AKI.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 February 2021

Received in revised form 6 April 2021

Accepted 13 April 2021

Available online 16 April 2021

#### Keywords:

Acute kidney injury  
*Bothrops* envenomation  
Endothelial biomarkers

### ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a frequent and potentially fatal complication of snakebites. In the setting of snakebites, endothelial biomarkers may be used to predict disease severity and can play a major role in AKI pathophysiology. The aim of this study was to investigate the potential role of endothelial biomarkers in predicting AKI in *Bothrops* envenoming. Therefore, blood and urine samples were collected from 26 patients admitted to the emergency department after *Bothrops* envenoming at 3 different post-bite points in time: on admission (up to 8 h post-bite), 12–16 h, and 24–28 h post-bite, to investigate the time course of endothelial biomarkers in AKI following *Bothrops* snakebites. The diagnostic performance of injury biomarkers in *Bothrops* envenomation was evaluated. AKI was diagnosed using the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) criteria. There was an association between endothelial injury and increased risk for AKI in bothropic envenoming. Angiopoietin-1 (Ang-1) and Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) were useful biomarkers to predict mild AKI [AUC-ROC: Ang-1 0.82, VCAM-1 0.76] within the interval of 8–16 h post *Bothrops* snakebites. The use of endothelial biomarkers VCAM-1 e Ang-1 within 12–16 h post-bite may be useful in the early stage of mild AKI related to *Bothrops* envenoming and might have an effect on the early intervention for renal protection in less severe *Bothrops*-related AKI.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Snakebite envenoming is a medical emergency recognized by the World Health Organization (WHO) as a neglected

\* Corresponding author at: Rua Des José Gil de Carvalho, 384, CEP: 60822-270, Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail address: [sandramarabrazilero@gmail.com](mailto:sandramarabrazilero@gmail.com) (S.M.B. Mota).