



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

JOÃO VÍCTOR DE ALMEIDA SANTOS

BIOMARCADORES RELACIONADOS À INJÚRIA RENAL AGUDA (IRA)
INDUZIDA PELO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM MODELO
EXPERIMENTAL *IN VIVO*

FORTALEZA

2019

JOÃO VICTOR DE ALMEIDA SANTOS

BIOMARCADORES RELACIONADOS À INJÚRIA RENAL AGUDA (IRA)
INDUZIDA PELO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM MODELO
EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- S235b Santos, João Victor de Almeida.
Biomarcadores relacionados à Injúria Renal Aguda (IRA) induzida pelo veneno de
Lachesis acrochorda em modelo experimental in vivo / João Victor de Almeida Santos. –
2019.
103 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
1. Picada de serpente. 2. Lesão Renal Aguda. 3. Marcadores Biológicos. I. Título.

CDD 615.1

JOÃO VICTOR DE ALMEIDA SANTOS

BIOMARCADORES RELACIONADOS À INJÚRIA RENAL AGUDA (IRA)
INDUZIDA PELO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM MODELO
EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

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

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

RESUMO

O envenenamento por picada de serpente é considerado uma doença tropical negligenciada e pode causar efeitos lesivos no local da picada, como também efeitos sistêmicos, incluindo injúria renal aguda (IRA). A eficácia das terapias disponíveis para IRA é frustrada pelo atraso no diagnóstico e tratamento e há uma urgente necessidade de novos marcadores que permitam o diagnóstico da IRA a tempo apreciável. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de analisar alterações em marcadores convencionais e novos de função renal desencadeadas pelo veneno de *Lachesis acrochorda* em camundongos C57BL/6 fêmeas. Após o experimento de determinação da melhor dose subletal intramuscular (IM) do veneno, os animais receberam uma administração IM do veneno (38,25 mg/kg) e foram acondicionados em gaiolas metabólicas. Transcorridos os tempos de 6, 12, 24 e 72 horas, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e tecido renal. A urina dos animais nos diferentes tempos experimentais foi obtida por meio dos tubos coletores das gaiolas metabólicas. As análises bioquímicas evidenciaram aumento dos níveis séricos de creatinina em 12 e em 24 horas e de ureia em 6, 12 e 24 horas. O veneno não teve influência sobre o volume de urina, nem sobre o *clearance* de creatinina. Os valores de proteína urinária elevaram-se em 72 horas. A inoculação do veneno desencadeou aumento da creatina-quinase sérica em 6 e em 12 horas. Na avaliação do envolvimento do estresse oxidativo no tecido renal, o veneno não alterou os níveis de MDA, porém aumentou a transcrição gênica de GSR em 6 e em 24 horas, e diminuiu a transcrição de SOD1s em 12 e em 24 horas. O veneno alterou parâmetros associados a lesão de células tubulares, como elevação da fração de excreção de Na⁺ e Cl⁻ em 72 horas; aumento da transcrição gênica de KIM-1 (12, 24 e 72 horas) e de NGAL (6, 12, 24 e 72 horas); e diminuição da transcrição de TIMP-2 (12 e 12 horas). Além disso, houve alteração da transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias, com aumento de IL-1 β (6 horas) e diminuição de IL-18 (12 e 24 horas). A análise dos componentes principais da urina através de RMN de H⁺ revelou alteração do padrão fenotípico do perfil metabólico em 24 horas, com a presença dos compostos creatina, creatinina, taurina, betaína, α -glicose, β -glicose e alantoína. A análise histológica qualitativa mostrou que o veneno

desencadeou alterações nos tempos de 24 e 72 horas, tais como perda de arquitetura cortical, tumefação e vacuolização do epitélio tubular, ductos dilatados (por vezes com acúmulos eosinofílicos ou amorfos luminiais), degeneração de células epiteliais tubulares e focos de necrose tubular, ectasia e hemorragia intersticial. O presente estudo sugere que o veneno de *L. acrochorda* causa injúria renal aguda associada a lesão muscular, que não se traduz em alterações no *clearance* da creatinina e no volume de urina, mas é evidenciada por marcadores de transcrição gênica e alterações no perfil metabólico da urina.

Palavras-chave: Picada de serpente; Lesão Renal Aguda; Marcadores Biológicos

ABSTRACT

BIOMARKERS RELATED TO ACUTE KIDNEY INJURY (AKI) INDUCED BY *Lachesis acrochorda* VENOM IN AN *IN VIVO* EXPERIMENTAL MODEL

Snakebite envenomation is considered a neglected tropical disease and can cause both local damage at the bite site as well as systemic effects, including acute kidney injury (AKI). The effectiveness of available therapies for AKI is hindered by delays in diagnosis and treatment, highlighting the urgent need for new biomarkers that allow for timely diagnosis of AKI. Therefore, the present study aimed to analyze changes in conventional and novel renal function markers triggered by the venom of *Lachesis acrochorda* in female C57BL/6 mice. After the experiment to determine the optimal intramuscular (IM) sublethal dose of venom, the animals received an IM administration of the selected sublethal dose (38.25 mg/kg) and were placed in metabolic cages. At 6, 12, 24, and 72 hours post-administration, the animals were anesthetized for blood and kidney tissue collection. Urine from the animals at each experimental time point was collected using the metabolic cage collection tubes. Biochemical analyses showed an increase in serum creatinine levels at 12 and 24 hours, and in urea levels at 6, 12, and 24 hours. The venom did not affect urine volume or creatinine clearance. Urinary protein levels increased at 72 hours. Venom exposure also caused an increase in serum creatine kinase at 6 and 12 hours. In assessing the involvement of oxidative stress in kidney tissue, the venom did not alter MDA levels but increased GSR gene transcription at 6 and 24 hours and decreased SOD1s transcription at 12 and 24 hours. The venom also altered parameters associated with tubular cell injury, such as increased fractional excretion of Na⁺ and Cl⁻ at 72 hours, increased KIM-1 (12, 24, and 72 hours) and NGAL gene transcription (6, 12, 24, and 72 hours), and decreased TIMP-2 transcription (12 and 24 hours). Furthermore, there were changes in the transcription of pro-inflammatory cytokines, with increased IL-1 β (6 hours) and decreased IL-18 (12 and 24 hours). Principal component analysis of urine via ¹H NMR revealed alterations in the phenotypic metabolic profile at 24 hours, including the presence of creatine, creatinine, taurine, betaine, α -glucose, β -glucose, and allantoin. Qualitative histological analysis showed that the venom caused alterations at 24 and 72 hours, such as cortical architecture loss, swelling and vacuolization of tubular epithelium, dilated ducts (sometimes with

eosinophilic or amorphous luminal accumulations), degeneration of tubular epithelial cells, focal tubular necrosis, ectasia, and interstitial hemorrhage. This study suggests that *L. acrochorda* venom induces acute kidney injury associated with muscle damage, which is not reflected in changes in creatinine clearance or urine volume, but is evidenced by gene transcription markers and alterations in the urine metabolic profile.

Keywords: Snakebite; Acute Kidney Injury (AKI); Biomarkers

À minha mãe, aos meus amigos, a todos que creem na ciência e que o mundo só é um lugar possível quando diverso e inclusivo.

AGRADECIMENTOS

À sociedade brasileira pelo financiamento do meu doutorado e, por intermédio da CAPES e do CNPq, pela manutenção da bolsa de auxílio;

Aos camundongos que perderam suas vidas no desenvolvimento desta pesquisa;

À minha mãe Fernanda Maria Camelo de Almeida Santos por todo o apoio, aceitação e por sempre ter estimulado meus estudos;

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá pela orientação integral, por estar sempre presente e que não mede esforços em atender, no que for possível, às demandas de seus alunos;

Aos Profs. Drs. José Toribio Beltrán Vidal e Jimmy Alexander Guerrero Vargas pela obtenção e fornecimento do veneno;

Aos alunos de iniciação científica e aos pós-graduandos do Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM) e do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) não só pela ajuda, mas também pela amizade e pelo amigável convívio. Fomos time e família;

À Ívila dos Santos Cabral pela ótima parceria nos experimentos;

A todos os funcionários do Instituto de Biomedicina/Unidade de Pesquisas Clínicas (IBIMED/UPC);

À veterinária Gabriela Mariângela Farias de Oliveira pela solicitude e pelo conhecimento compartilhado, e também a todos os funcionários do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

À Prof.^a Dr.^a Alice Maria Costa Martins e à Prof.^a Dr.^a Helena Serra Azul Monteiro por oferecem insumos, equipamentos e a infraestrutura de seus laboratórios para a realização das análises bioquímicas e aos seus respectivos pós-graduandos pelo auxílio;

Ao Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota pelas análises histológicas;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, à coordenação do programa e às funcionárias da secretaria Célia Araújo de Carvalho e Laura Alves de Souza;

À Prof.^a Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge e a Natacha Teresa Queiroz Alves pela amizade e bons momentos juntos;

A Ricardo Azevedo de Alcântara e Silva pelo amor, companheirismo e apoio na etapa derradeira deste ciclo que agora finalizo;

Aos meus queridos amigos Lizi, Gabrieli, Victor, Jean, Anderson, Emanuel, Mariana, Diego, AP, Jameson, Israu, Ribamar, Carol, Marcos, Camila, Thaty, Natália, Milena, Thiago e Felipe, a família que escolhi e minha rede de proteção.

*“Sólo le pido a Dios
Que el engaño no me sea indiferente
Si un traidor puede más que unos
cuantos
Que estos cuantos no olviden
fácilmente”*

(León Gieco, Sólo le pido a Dios)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Microlitro
ATP	Adenosina trifosfato
C57BL/6	cepa endogâmica comum de camundongo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCr	<i>Clearance</i> de creatinina
cDNA	DNA complementar
CE	Ceará
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CK	Creatina quinase
Cl ⁻	Cloreto
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação com Animal
Cq	Ciclo quantitativo
CRISP	Proteínas secretoras ricas em cisteína
C _s	Concentração de creatinina no soro
CTL	Lectinas símile do tipo C
Cu	Concentração de creatinina na urina
dL	Decilitro
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr.(a)	Doutor(a)
DRC	Doença renal crônica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERO	Espécie reativa de oxigênio
<i>et al.</i>	E colaboradores
Fe	Fração de excreção
G	Unidade de aceleração
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSR	Glutathiona redutase
h	Hora
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IBIMED	Instituto de Biomedicina
ID	Identificação
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IM	Intramuscular
INF- γ	Interferon gama
IP	Intraperitoneal
IRA	Injúria Renal Aguda

K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KIM-1	Molécula de injúria renal-1
LAO	L-amino oxidase
LTM	Laboratório de Toxinologia Molecular
m	Metro
min	Minuto
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinases de matriz tecidual
mRNA	RNA mensageiro
N	Número de amostras
Na ⁺	Sódio
ng	Nanograma
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
p	Probabilidade de significância
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PIII-SVMP	Metaloproteinases de veneno de serpente de classe III
PI-SVMP	Metaloproteinase de veneno de serpente de classe I
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PN	Peptídeo natriurético
PNA	Peptídeo natriurético do tipo A
PNB	Peptídeo natriurético do tipo B
PNC	Peptídeo natriurético do tipo C
PPBs	Peptídeos potenciadores de bradicinina
Prof.(a)	Professor(a)
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
RT-qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
s	Segundo
SOD1s	Superóxido Dismutase 1 solúvel
SP	Serinoprotease
SVMP	Metaloproteinase de veneno de serpente

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Números globais de envenenamentos e mortes por picada de serpente	22
FIGURA 2	A serpente <i>Lachesis acrochorda</i> .	27
FIGURA 3	Proteoma do veneno de <i>L. acrochorda</i> .	33
FIGURA 4	Espectros representativos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio da urina dos animais envenenados e gráfico de escores e loadings da análise de componentes principais.	74
FIGURA 5	Estudo de imagem qualitativo das alterações histológicas induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> em tecido renal.	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Acidentes ofídicos na Colômbia no ano de 2017	25
TABELA 2	Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados (gene de referência: GAPDH).	50
TABELA 3	Assinalamento dos compostos presentes na urina de camundongos que foram responsáveis pela tendência observada.	75
TABELA 4	Parâmetros bioquímicos no envenenamento induzido por peçonha de <i>L. acrochorda</i> via intramuscular em camundongos, para determinação de dose subletal e para indução de IRA nos tempos de 06h, 12h, 24h, e 72h.	102
TABELA 5	Parâmetros moleculares no envenenamento induzido por peçonha de <i>L. acrochorda</i> via intramuscular em camundongos para indução de IRA nos tempos de 06h, 12h, 24h, e 72h.	103

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatinina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> .	55
GRÁFICO 2	Avaliação das alterações dos níveis séricos de ureia induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> .	56
GRÁFICO 3	Avaliação das alterações dos valores de volume de urina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> .	57
GRÁFICO 4	Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatinina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> em diferentes tempos experimentais.	58
GRÁFICO 5	Avaliação das alterações dos níveis séricos de ureia induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> em diferentes tempos experimentais.	59
GRÁFICO 6	Avaliação das alterações dos valores de volume de urina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	60
GRÁFICO 7	Avaliação das alterações dos níveis urinários de creatinina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	61
GRÁFICO 8	Avaliação das alterações de proteína urinária induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	62
GRÁFICO 9	Avaliação das alterações do <i>clearance</i> de creatinina induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	63
GRÁFICO 10	Avaliação das alterações da fração de excreção de sódio (FeNa^+) induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	64
GRÁFICO 11	Avaliação das alterações da fração de excreção de potássio (FeK^+) induzidas pelo veneno de <i>L. acrochorda</i> nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.	64
GRÁFICO 12	Avaliação das alterações da fração de excreção de	65

cloreto (FeCl₃) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.

- GRÁFICO 13** Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatina-quinase (CK) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 66
- GRÁFICO 14** Avaliação das alterações dos valores de malondialdeído (MDA) tecidual induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 67
- GRÁFICO 15** Avaliação das alterações da transcrição gênica de KIM-1 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 68
- GRÁFICO 16** Avaliação das alterações da transcrição gênica de NGAL induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 69
- GRÁFICO 17** Avaliação das alterações da transcrição gênica de TIMP-2 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 70
- GRÁFICO 18** Avaliação das alterações da transcrição gênica de SOD2m induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 71
- GRÁFICO 19** Avaliação das alterações da transcrição gênica de SOD1s induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 71
- GRÁFICO 20** Avaliação das alterações da transcrição gênica de GSR induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 72
- GRÁFICO 21** Avaliação das alterações da transcrição gênica de IL-18 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 73
- GRÁFICO 22** Avaliação das alterações da transcrição gênica de IL-1 β induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais. 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Envenenamento por Picada de Serpente: Definição e Aspectos Epidemiológicos Globais	21
1.2 Serpentes Venenosas e Acidentes Ofídicos na Colômbia	23
1.3 O Gênero <i>Lachesis</i> (DAUDIN, 1803)	25
1.3.1 <i>Lachesis acrochorda</i>	27
1.4 Aspectos Clínicos dos Envenenamentos	29
1.4.1 A Síndrome Laquética	29
1.5 Composição do Veneno e Mecanismo de Ação das Toxinas.....	32
1.6 Rbdomiólise Associada à Picada de Serpente	35
1.7 Injúria Renal Aguda Associada a Picada de Serpente	37
1.8 Fisiopatologia e biomarcadores de Injúria Renal Aguda	38
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 METODOLOGIA.....	46
4.1 Animais.....	46
4.2 Veneno	46
4.3 Grupos experimentais	46
4.3.1 Determinação da dose intramuscular subletal do veneno	46
4.3.2 Avaliação do tempo de indução da IRA induzida pelo veneno.....	47
4.4 Delineamento Experimental	47
4.5 Análise Bioquímica da Função Renal	48
4.6 Análise da Função Glomerular.....	48
4.7 Análise da Função Tubular	48
4.8 Dosagem de Creatina-Quinase (CK)	49
4.9 Dosagem de Malondialdeído (MDA)	49
4.10 Avaliação da Expressão Gênica (RT-qPCR)	50
4.10.1 Extração do RNA Total.....	50
4.10.2 Síntese de cDNA.....	51
4.10.3 PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	51
4.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Identificação de Metabólitos Urinários	52
4.11.1 Aquisição dos espectros de RMN e identificação dos metabólitos.....	52
4.11.2 Análise de componentes principais (PCA).....	53
4.12 Análise Histopatológica	53
4.13 Análise Estatística	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Determinação da Dose Subletal Intramuscular.....	55
5.2 Experimento de indução de IRA.....	57
5.2.1 Análise Bioquímica da Função Renal	57
5.2.2 Função Glomerular.....	62

5.2.3 Função Tubular	63
5.3 Dosagem de Creatina-Quinase (CK)	65
5.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)	66
5.5 Avaliação da Expressão Gênica (RT-qPCR)	67
5.6 Perfil Metabolômico Urinário	74
5.7 Avaliação Histopatológica	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento por Picada de Serpente: Definição e Aspectos Epidemiológicos Globais

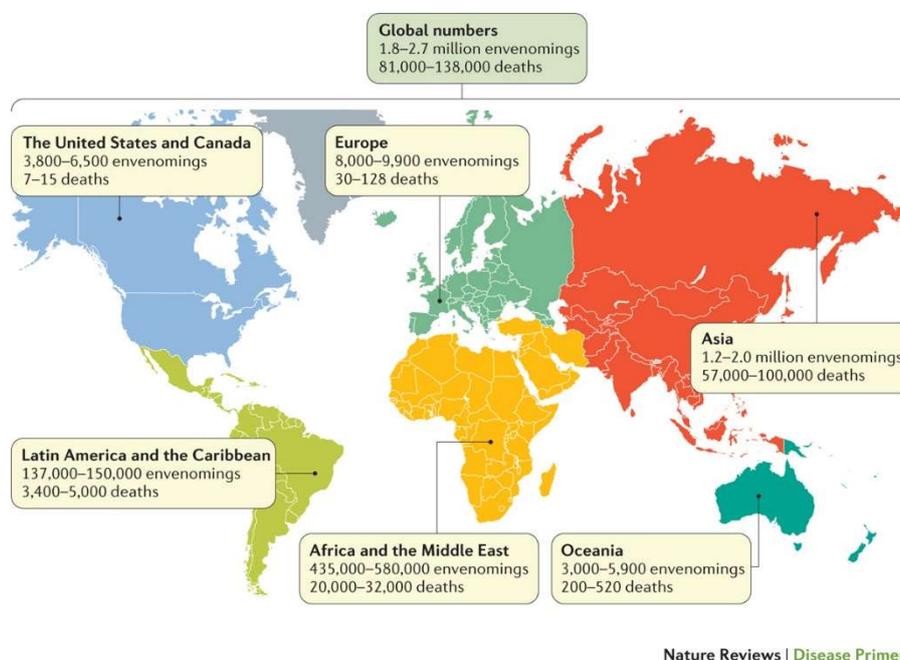
Existem mais de 3000 espécies de serpentes distribuídas por todo o mundo e um sexto destas são venenosas, algumas sendo terrestres e outras aquáticas. Encontram-se geralmente em altitudes de até 2500 metros acima do nível do mar, embora possam ser encontradas em altitudes superiores a 4000 metros nos Andes e nos Himalaias, e em profundidades de até 100 metros nos oceanos. Pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Serpentes, com 20 famílias distribuídas em 3 superfamílias. As espécies mais perigosas estão na superfamília Xenophidia, classificadas entre as famílias Viperidae (víboras verdadeiras e víboras de covinha) e Elapidae (corais, cobras, mambas e serpentes marinhas, por exemplo) (PYRON, BURBRINK, WIENS, 2013; HSIANG *et al.*, 2015; COLOMBIA, 2018).

O envenenamento por picada de serpente é considerado uma doença tropical negligenciada, resultante da inoculação de uma secreção tóxica altamente especializada – o veneno – por uma serpente venenosa em humanos, geralmente em circunstâncias acidentais. O veneno é injetado através das presas da serpente, que são dentes modificados conectados por ductos a uma glândula de veneno (CALVETE, 2011).

Por se tratar de seres ectodérmicos, as serpentes são abundantes em climas mais quentes, restringindo as regiões endêmicas para esse tipo de acidente majoritariamente a países tropicais em desenvolvimento, especialmente alguns países africanos, asiáticos, latino-americanos e da Oceania (CHIPPAUX, 1998, 2011; MOHAPATRA *et al.*, 2011). Nestes países, o contato entre homens e serpentes é relativamente comum, particularmente nas estações chuvosas quando a atividade agrícola humana coincide com a época de reprodução das serpentes. As evidências epidemiológicas coletadas em registros hospitalares reforçam o alto impacto dos envenenamentos, que é considerável em termos de mortalidade e sequelas (CHIPPAUX, 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2010).

Os números globais deste tipo de acidente são de 1,8 – 2,7 milhões de pessoas envenenadas por ano ao redor do mundo, com estimativas de mortalidade variando de 81.410 a 137.880 mortes (**Figura 1**). O maior impacto ocorre na Ásia, onde pelo menos 46 mil dessas mortes ocorrem só na Índia. Na África subsaariana, onde os dados são fragmentados, estimativas de mortalidade variam de 7 a 32 mil mortes por ano. Na América Latina e no Caribe, os números são de 137 a 150 mil envenenamentos, com mortes variando de 3,4 a 5 mil (KASTURIRATNE *et al.*, 2008; CHIPPAUX, 2011; MOHAPATRA *et al.*, 2011). Estes dados são uma rude aproximação do verdadeiro alcance de envenenamentos e mortes, dado que, em muitos países, há falta de informações confiáveis de morbimortalidade. Pesquisas realizadas em comunidades de alguns países sugerem que os números reais são ainda maiores que os estimados por estatísticas hospitalares (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Figura 1: Números globais de envenenamentos e mortes por picada de serpente



Fonte: GUTIÉRREZ *et al.*, 2017

Os envenenamentos por picada de serpentes afetam os segmentos socioeconômicos mais baixos da população, aquelas pessoas em condições

precárias de construção habitacional e com acesso limitado à educação e assistência médica (HARRISON *et al.*, 2009; HABIB *et al.*, 2015;). Países com baixo Produto Interno Bruto, baixo Índice de Desenvolvimento Humano e baixas despesas com cuidados de saúde são os mais afetados. A enfermidade agrava ainda mais a situação de pobreza, em virtude dos altos custos do tratamento, de empréstimos forçados e da perda de renda (HARRISON *et al.*, 2009).

Os acidentes são mais comuns em pessoas de 10 a 40 anos de idade, faixa etária que abrange a maior parte dos membros produtivos de comunidades rurais (ALIROL *et al.*, 2010). Portanto, o envenenamento por picada de serpente pode ser considerado uma enfermidade ocupacional e ambiental que acomete jovens agricultores. Ademais, também consiste em um risco ambiental para comunidades indígenas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Uma proporção dos indivíduos acidentados desenvolve morbidade crônica, alguma incapacidade ou sequelas psicológicas, incluindo amputações, estresse pós-traumático, perda fetal, contraturas, infecções crônicas e úlceras malignas (SMITH *et al.*, 2001; HABIB *et al.*, 2008; CHIPPAUX, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2011).

Em contraste, habitantes de países de maior renda da América do Norte e, principalmente, da Europa estão muito menos expostos ao contato com serpentes venenosas e são, em geral, inconscientes da escala do problema de saúde pública representado por picadas de serpentes. Consequentemente, este tipo de acidente tem, historicamente, recebido pouca atenção de órgãos de financiamento, de autoridades de saúde pública, da indústria farmacêutica e de grupos de defesa da saúde, dessa forma prejudicando o desenvolvimento de intervenções efetivas para reduzir o impacto social dos envenenamentos por picada de serpentes (GUTIÉRREZ, THEAKSTON, WARREL, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2010).

1.2 Serpentes Venenosas e Acidentes Ofídicos na Colômbia

Na Colômbia, por sua diversidade de fauna, foi alcançada a identificação aproximada de 8 famílias, 71 gêneros e 272 espécies de serpentes, das quais 49 são venenosas e pertencem a 9 gêneros, com representantes tanto da

família Viperidae, como também da família Elapidae. Há uma única espécie marinha venenosa – *Hydrophis platurus* – a qual se encontra exclusivamente no Oceano Pacífico (CASTRILLÓN-ESTRADA *et al.*, 2007; COLOMBIA, 2018).

O acidente ofídico não era um evento de notificação obrigatória até outubro de 2004, data a partir da qual se estabeleceu como evento de interesse em saúde pública (COLOMBIA, 2010).

A incidência mais alta de acidentes ofídicos é observada em territórios da Orinoquia, região de intensa atividade pecuária, e da Amazônia colombiana, os quais coincidem com as condições para a ocorrência de casos e maior população exposta ao risco de contato com serpentes. Isto é similar ao verificado em países como o Brasil, México e países da África, que reportam o maior número de casos procedentes de lugares geográficos com condições similares (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

De acordo com os registros da base de dados do Sistema de Vigilância em Saúde Pública da Colômbia, no ano de 2017 foram notificados 4978 casos de acidentes ofídicos (uma incidência de 10,1 casos por 100.000 habitantes) e 34 mortes, uma tendência crescente em relação ao ano anterior de 2016, com 4636 casos e 36 mortes (GARCÍA *et al.*, 2017). A idade média das vítimas foi de 33 anos. Em relação ao gênero da serpente agressora, no ano de 2017 a maior proporção de acidentes correspondeu a serpentes do gênero *Bothrops* (62,8%), seguido de *Crotalus* (2,8%) e *Colubridos* (1,4%). O gênero *Lachesis*, o qual correspondeu a apenas 0,3% dos casos, foi onde se observou a maior proporção de casos severos (23,1%) (**Tabela 1**). Contudo, em uma revisão anterior de 2004, Castrillón-Estrada e colaboradores (2007) colocaram o gênero *Bothrops* como responsável por 90 – 95% dos casos, seguido pelo gênero *Lachesis*, com 2%.

Tabela 1: Acidentes ofídicos na Colômbia no ano de 2017

Gênero	Casos	Porcentagem
<i>Bothrops</i>	3124	62,8
Sem ID	1275	25,6
Outro	285	5,7
<i>Crotalus</i>	140	2,8
<i>Colubrido</i>	68	1,4
<i>Micrurus</i>	66	1,3
<i>Lachesis</i>	13	0,3
<i>Pelamis</i>	4	0,1
Sem dado	2	0,04
Total	4978	100,0

Fonte: COLÔMBIA, 2017

O gênero *Lachesis* está representado na Colômbia por duas espécies: *L. muta muta* e *L. acrochorda*. A primeira se distribui pela Amazônia e pela Orinoquia colombiana desde o pé do monte da Cordilheira Oriental até os 1000 metros de altitude sobre o nível do mar. A segunda habita os vales dos rios Magdalena, Cauca, San Jorge e seus afluentes, e toda a região pacífica colombiana (CASTRILLÓN-ESTRADA *et al.*, 2007).

1.3 O Gênero *Lachesis* (DAUDIN, 1803)

O gênero *Lachesis*, pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae, como atualmente se reconhece, inclui 4 espécies: *Lachesis muta*, com duas subespécies: *L. m. muta* (LINNAEUS, 1766) e *L. m. rhombeata* (WIED-NEUWIED, 1824); *Lachesis stenophrys* (COPE, 1876); *Lachesis melanocephala* (SOLÓRZANO; CERDAS, 1986); e *Lachesis acrochorda* (GARCÍA, 1803).

O nome do gênero deriva de uma das três Moiras (*Cloto*, *Láquesis* e *Átropos*), que, na Mitologia Grega, eram as deusas irmãs que determinavam o destino de todos os indivíduos tecendo o fio da vida de cada um (CAMPBELL; LAMAR, 2004), provavelmente fazendo alusão à potencialidade fatal de seu veneno.

Já se presumiu que o gênero *Lachesis* compreendia uma única espécie, *L. muta*, que se distribuía pela América Central e pela América do Sul,

possuindo três subespécies que habitavam diferentes regiões geográficas: *L. m. stenophrys*, presente na Nicarágua, Costa Rica e Panamá; *L. m. muta*, de ocorrência nas florestas equatoriais do Brasil, Guianas, Venezuela, Trindade e Tobago, Bolívia, Peru, e na costa pacífica da Colômbia e do Equador; e *L. m. rhombeata*, encontrada na Floresta Atlântica brasileira (PETERS; OREJAS-MIRANDA, 1970). Em 1986, Solórzano e Cerdas propuseram que as populações de *Lachesis* restritas ao sudoeste da Costa Rica deveriam ser designadas como uma nova subespécie: *L. m. melanocephala*. Em 1997, baseados na análise de sequências de DNA mitocondrial, Zamudio e Greene reclassificaram estas quatro subespécies em três espécies distintas: *L. stenophrys*, *L. melanocephala* e *L. muta*, esta última espécie abrangendo as subespécies *L. m. muta* e *L. m. rhombeata*. Contudo, neste mesmo estudo, os autores apontaram que as populações de *Lachesis* encontradas do sudeste do Panamá, passando pela costa pacífica e pelos vales interandinos da Colômbia, até o noroeste do Equador, eram de classificação problemática, pois possuíam características distintivas suficientes para serem consideradas uma espécie separada. Até que, em 1999, Ripa propôs classificar estas populações como uma nova espécie: *L. acrochoda*. Ainda em 2006, o mesmo autor sugeriu que a classificação da *L. m. rhombeata* fosse ampliada para as populações florestais de *L. muta* ao sul do Rio Amazonas. Assim, formou-se o entendimento que prevalece até hoje de quatro espécies e duas subespécies.

As serpentes deste gênero são conhecidas popularmente no Brasil como surucucus, destacando-se por possuírem um alto número de escamas nas regiões dorsal, ventral e cefálica, o que lhes confere o nome de “serpiente verrugosa” na América Hispânica. Destacam-se também pelo seu grande comprimento, sendo as mais longas serpentes venenosas das Américas, podendo alcançar, no geral, um tamanho máximo de aproximadamente 3,5 metros (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Outra peculiaridade é que são as únicas serpentes da família Viperidae a pôr ovos (SANZ *et al*, 2008).

As serpentes do gênero *Lachesis* não são particularmente agressivas, exceto talvez no período noturno, mas uma das 4 espécies conhecidas, a *L. melanocephala*, tem uma má reputação de irritabilidade. Portanto, humanos, mesmo os indígenas ameríndios que caçam em seu *habitat*, são raramente mordidos por surucucus (JORGE *et al.*, 1997).

1.3.1 *Lachesis acrochorda*

A espécie *L. acrochorda* (**Figura 2**), objeto de estudo deste trabalho, é conhecida por diversos nomes populares que variam de acordo com a região de ocorrência: *verrugosa* (Panamá); *diamante*, *mapaná rayo*, *martiguaja*, *montuno*, *pudrigora* ou *verrugosa del Chocó* (Colômbia); *guacama* ou *verrugosa* (Equador) (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Figura 2: A serpente *Lachesis acrochorda*.



Fonte: DUQUE; CORRALES, 2015

O epíteto específico *acrochorda* deriva do grego *akrochordon*, que significa verruga, uma referência às escamas protuberantes presentes no corpo da serpente (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Esta espécie de serpente ocorre de regiões próximas ao nível do mar até regiões de aproximadamente 1.600 metros de altitude. Contudo, a maioria dos registros são de regiões de pés de montanhas, entre 500 e 1.000 metros de altitude (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

É uma espécie pouquíssimo estudada, com apenas 4 trabalhos publicados (MADRIGAL *et al.*, 2012; RANGEL *et al.*, 2012; PLA *et al.*, 2013; DUQUE, CORRALES, 2015).

O estudo de Rangel e colaboradores (2012) desenvolve um ensaio imunoenzimático (ELISA) eficiente para a detecção do veneno de *L. acrochorda* em uma faixa de concentração de 3,9 a 1000 ng/mL, que não exibiu reação cruzada com venenos de *Bothrops*, *Portidium*, *Bothriechis* e *Crotalus* (gêneros cujo envenenamento causam sintomas similares aos induzidos por *Lachesis*), importante para o diagnóstico diferencial do envenenamento e a escolha da terapia antiveneno antilaquéica. Ademais, uma fração do veneno de *L. acrochorda* foi isolada utilizando os mesmos anticorpos de ELISA; algumas de suas proteínas sendo identificadas, tais como uma lectina e uma metaloproteinase. Este teste pode ser útil para o rastreamento da cinética de distribuição de antígenos em pacientes ou animais experimentalmente envenenados.

Madrigal e colaboradores (2012) realizaram a análise proteômica de mudanças ontogenéticas na composição do veneno de *L. stenophrys*, e a caracterização do proteoma do veneno de *L. melanocephala* e de *L. acrochorda*. Dessa forma, junto com a prévia caracterização do proteoma do veneno de *L. muta muta* (SANZ *et al.*, 2008), permitindo uma comparação sob uma óptica ampla da composição e distribuição das proteínas tóxicas pelo gênero. Já o trabalho de Pla e colaboradores (2013) reporta a análise proteômica de *L. m. rhombeata*, que, juntamente com os resultados do trabalho anterior, fornece a primeira visão geral da composição e distribuição das proteínas do veneno por todo o gênero. O trabalho ressalta a alta conservação interespecífica na composição do veneno das 5 serpentes representantes do gênero, além de confirmar também a paraespecificidade do antiveneno antilaquéico produzido nos Instituto Vital Brazil e no Instituto Clodomiro Picado, na Costa Rica.

Finalmente, a publicação mais recente, de 2015, trata-se do primeiro relato de reprodução em cativeiro da espécie *L. acrochorda*, a qual se deu no serpentário da Universidade de Antioquia, Colômbia.

1.4 Aspectos Clínicos dos Envenenamentos

A síndrome clássica associada a picadas da família Viperidae (incluindo as subfamílias Viperinae e Crotalinae) consiste em efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos locais no membro picado incluem: dor imediata que irradia; inchaço de rápida expansão com eritema, que usualmente torna-se evidente dentro das duas primeiras horas após a picada; inflamação dos vasos linfáticos; sangramento persistente das incisões das presas; bolhas; equimoses; aumento dos nódulos linfáticos próximos ao local da picada; e necrose do tecido superficial e muscular com infecção secundária. Os efeitos sistêmicos incluem: síncope precoce e desmaio com perda de visão e consciência transitória; hipotensão e choque; arritmias cardíacas; e hemorragias espontâneas (WARREL, 2010; WHO, 2010, 2016).

As síndromes variantes consistem em sintomas adicionais aos descritos acima e estão associadas a envenenamentos por tipos particulares de serpentes. Estes sintomas incluem: efeitos autonômicos precoces; injúria renal aguda; aumento generalizado da permeabilidade capilar; insuficiência pituitária aguda ou crônica; neuromiotoxicidade; e trombose arterial *in situ* (causando infartos isquêmicos em diversos órgãos) (WARREL, 2010; WHO, 2010, 2016).

O conjunto de sinais e sintomas clínicos que caracteriza o envenenamento pelo gênero *Lachesis*, denominado de Síndrome Laquéica, será descrito a seguir.

1.4.1 A Síndrome Laquéica

Vários autores reportaram acidentes por serpentes do gênero *Lachesis* em detalhes. A Síndrome Laquéica foi primeiramente descrita por Silva-Haad (1981) com base em 2 acidentes por *L. m. muta* ocorridos em Letícia, Colômbia. O autor estruturou a síndrome em 4 componentes clínicos: dor, distúrbios cardiovasculares, distúrbios abdominais e distúrbios hematológicos. A dor, acompanhada de edema, acomete o local de incisão das presas de maneira imediata à picada e se estende por todo o membro com o decorrer do tempo. Podem surgir bolhas e vesículas de conteúdo seroso ou soro-hemático nas primeiras cinco horas após o acidente. Os distúrbios cardiovasculares

caracterizam-se por hipotensão arterial severa que surge rapidamente após a picada (nos primeiros 15 minutos), acompanhada de lipotimias e perturbação da acuidade visual devido ao baixo fornecimento sanguíneo ao cérebro. Bradicardia acentuada com bulhas cardíacas hipofonéticas também ocorre. Já os distúrbios abdominais são caracterizados por diarreia súbita, acompanhada de cólica intensa e peristaltismo intestinal aumentado e audível. A diarreia pode tornar-se sanguinolenta à medida que surgem os distúrbios hematológicos, estes causados pela diminuição ou consumo da protrombina e do fibrinogênio resultando em incoagulabilidade sanguínea e suas consequências hemorrágicas.

Em um estudo publicado por Bolaños e seus colaboradores (1982), três de quatro casos de picada por *L. stenophrys* ocorridos na Costa Rica foram fatais, apesar de todos terem sido tratados com antiveneno. As mortes ocorreram entre o terceiro e o quinto dia após o envenenamento, como resultado de choque secundário a um edema maciço, extensa mionecrose e grave quadro de infecção que culminou em sepse.

Em 1997, foi publicada uma revisão de literatura de 20 casos de picadas por serpentes do gênero *Lachesis* ocorridos na Costa Rica, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia e Venezuela. Os autores observaram que os sintomas locais, tais como dor, edema e surgimento de bolhas, eram similares àqueles causados por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* e de outros gêneros de serpentes latino-americanas. Contudo, os sintomas de náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia e sudorese, foram sintomas distintivos, não reportados em vítimas de outras serpentes da subfamília Crotalinae que ocorrem nas Américas, mas reminiscentes a envenenamentos por serpentes da subfamília Viperinae que ocorrem no chamado Velho Mundo, como as víboras da Europa e do Oriente Médio. Estes sintomas distintivos não necessariamente se manifestam em todas as vítimas de acidente laquético, mas são indicativos da severidade do envenenamento (JORGE *et al.*, 1997).

Nessa mesma revisão há, nos relatos de complicações sistêmicas, menção a insuficiência renal aguda (HULIN; OCH; DESBORDES, 1982; OTERO-PATIÑO *et al.*, 1993) e de necessidade de tratamento auxiliar com diálise (OTERO-PATIÑO *et al.*, 1993).

Em um dos casos abordados na revisão citada acima, um paciente na Venezuela, além dos sintomas locais, cardiovasculares e abdominais já descritos, apresentou também estrabismo divergente, disfagia e disartria, sintomas caracteristicamente neurotóxicos.

Em 2001, Dean Ripa, proprietário do Cape Fear Serpentarium, localizado na cidade de Wilmington, Carolina do Norte, Estados Unidos, onde mantinha em cativeiro espécies de *L. stenophrys* e *L. melanocephala*, descreveu picadas que o próprio experienciou, todas na mão. Uma delas, ocasionada por uma *L. melanocephala*, produziu sintomas severos e quase imediatos. Dentro de 40 minutos após a picada, Ripa sentiu tontura, perda de consciência, náusea, sudorese, pulsação aumentada, vômito, diarreia intensa, dor aguda por todo o tronco, câimbras musculares, queda de pressão arterial, desconforto respiratório, dificuldade para levantar-se ou permanecer de pé e torpor generalizado pelo corpo. O tratamento incluiu 14 ampolas de antiveneno administradas logo após a picada, mas a mão e o braço continuaram a inchar, atingindo a parte superior do tronco em 60 horas de envenenamento. O edema persistiu por aproximadamente um mês e ele apresentou uma linfadenite axilar que durou 6 semanas. A mão e o pulso só recuperaram mobilidade total após aproximadamente 4 meses (JORGE *et al.*, 1997).

Um caso incomum ocorreu na Suíça e foi descrito em 2002 por Rosenthal e colaboradores, quando um senhor de 64 anos, que mantinha uma espécie de *L. stenophrys* originária da Costa Rica em cativeiro, foi picado na região da barriga enquanto tentava realocar o animal de uma gaiola para outra. A picada levou a um quadro de isquemia intestinal e necrose, muito provavelmente causado por coagulação intravascular disseminada (JORGE *et al.*, 1997).

Apesar de os envenenamentos por espécies deste gênero serem infreqüentes, o grande tamanho do animal e, portanto, a potencial grande quantidade de veneno inoculado faz de qualquer picada um evento que ameaça a vida. Em um estudo remoto de 1948, Vellard afirmou que exemplares adultos de *L. muta* (sic) produzem de 200 a 300 mg de veneno seco, alguns podendo produzir até 500 mg em uma única liberação. Ele sugeriu que a quantidade de veneno liberado, mais que sua própria ação, faz de *Lachesis* uma serpente perigosa.

1.5 Composição do Veneno e Mecanismo de Ação das Toxinas

A composição dos venenos de serpentes exibe uma alta complexidade e diversidade, resultando em um perfil bioquímico e toxicológico diversificado que determina uma ampla variedade de manifestações (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Os venenos são utilizados com propósitos predatórios e defensivos e se desenvolveram de modo independente em uma ampla variedade filogenética de organismos, incluindo serpentes, aranhas, escorpiões e águas-vivas, por exemplo (FRY *et al.*, 2009). Compreendem uma mistura de proteínas de complexidade variada que agem individualmente ou como um fenótipo integrado para ferir ou matar a presa ou a vítima acidental. Apesar de serem traços de moderada complexidade genética em termos de número de genes que codificam as toxinas, a variabilidade intra e interespecífica parece ser uma característica comum em todos os níveis taxonômicos (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991).

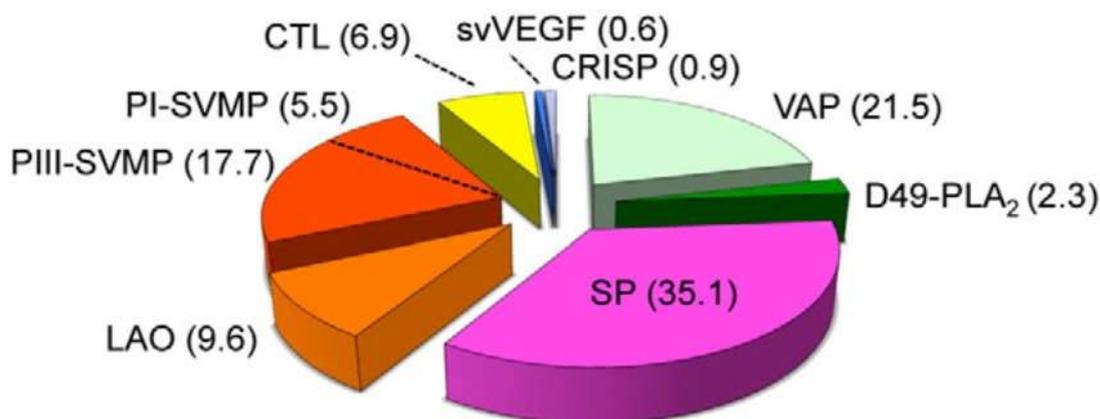
As toxinas que possuem a maior potencial de incapacitar são também, com frequência, as moléculas de maior importância clínica no contexto do envenenamento humano (CALVETE *et al.*, 2013). O crescente interesse em diferentes aspectos da biologia dos venenos vem catalisando o desenvolvimento de metodologias “ômicas” que almejam a caracterização qualitativa e quantitativa das toxinas de venenos, incluindo a Proteômica de Venenos (Venômica). Em particular, a combinação dos fluxos de trabalho da Transcriptômica e da Proteômica tem demonstrado capacidade inigualável de caracterização de venenos em detalhes sem precedentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Dependendo do tamanho das presas, o veneno pode ser injetado de forma subcutânea ou intramuscular. Uma vez injetadas, algumas toxinas presentes no veneno exercem efeitos patológicos nos tecidos vizinhos ao local da picada, enquanto outras são distribuídas sistemicamente através do sistema linfático e dos vasos sanguíneos, possibilitando que tenham ação em vários órgãos (WARREL, 2010).

Em 2012, Madrigal e colaboradores traçaram o perfil proteômico do veneno de *L. acrochorda*. Ele é composto majoritariamente de: serinoproteases (35,1%), peptídeos vasoativos (21,5%), metaloproteinases de veneno de

serpente (SVMP) de classe I (5,5%) e de classe III (17,7%), L-amino oxidases (9,6%), lectinas tipo C-símiles (6,9%), fosfolipases A₂ (PLA₂) (2,3%), dentre outros constituintes (**Figura 3**).

Figura 3: Proteoma do veneno de *L. acrochorda*.



O gráfico em pizza exibe a ocorrência relativa de proteínas de diferentes famílias de toxinas em uma espécie adulta de *L. acrochorda*. SP, serinoproteases; PI- e PIII-SVMP, metaloproteinasas de veneno de serpente de classe I e classe III; VAP, peptídeos vasoativos; LAO, L-amino oxidases; CTL, lectinas do tipo C-símiles; D49-PLA₂, fosfolipases A₂; CRISP, proteínas secretoras ricas em cisteína; svVEGF, fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente. As porcentagens das diferentes famílias de toxinas estão indicadas entre parênteses. Fonte: MADRIGAL *et al.*, 2012

Peptídeos vasoativos correspondem a peptídeos potenciadores de bradicinina (PPBs) e peptídeos natriuréticos do tipo C (PNCs). PPBs são moléculas que foram descobertas no veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA *et al.*, 1965) e possuem um efeito fisiológico global de diminuição da pressão sanguínea após administração no organismo. Peptídeos natriuréticos (PNs) são moduladores do fluido corporal, denominados assim devido a sua ação na natriurese, na diurese e vasorrelaxante (DE BOLD *et al.*, 1981). Têm sido identificados em uma variedade de espécies de vertebrados, incluindo mamíferos e répteis. Foram caracterizados 3 tipos de PNs nos mamíferos: do tipo A (PNA), do tipo B (PNB) e do tipo C (PNC). Todos compartilham em sua estrutura um anel de 17 resíduos de aminoácidos com alta homologia e exercem suas ações ligando-se a receptores de membrana com atividade de

guanilil ciclase (VINK *et al.*, 2012). Uma análise filogenética de toxinas natriuréticas de venenos de serpentes demonstrou que as presentes em venenos viperídeos estão relacionadas com o PNC (HO *et al.*, 1997).

As SVMPs promovem a hidrólise de componentes chaves da membrana basal dos capilares, particularmente de colágeno do tipo IV, causando enfraquecimento da estabilidade mecânica dos microvasos. Como consequência, as forças biofísicas hemodinâmicas que operam na circulação causam distensão e, eventualmente, ruptura da parede capilar, resultando em extravasamento (ESCALANTE *et al.*, 2011). O dano microvascular induzido por SVMPs pode também ser consequência da ruptura das adesões entre as células endoteliais (SEO *et al.*, 2017). As SVMPs também hidrolisam outros componentes da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanas, afetando a estrutura e a função não apenas de microvasos, mas também de outros componentes teciduais, desse modo cumprindo um papel no dano tecidual local induzido pelo veneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Ainda, as SVMPs induzem dano na pele através da degradação da interface epiderme-derme, com a consequente formação de bolhas (JIMENEZ *et al.*, 2008).

As SVMPs são as principais responsáveis pela hemorragia sistêmica, especialmente aquelas de classe III. Estas toxinas possuem uma estrutura multidomínio contendo exossítios (sítios moleculares distintos do sítio catalítico que servem como sítios de ligação secundários) que as permitem agir na microvasculatura (ESCALANTE *et al.*, 2011; FOX, SERRANO, 2005). Podem ocorrer sangramentos em diferentes órgãos com várias consequências fisiopatológicas. É provável que o mecanismo de ação das SVMPs hemorrágicas de ação sistêmica seja similar ao descrito para hemorragia local (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

As SVMPs e as serinoproteases afetam a hemostasia de diversas maneiras, agindo na cascata de coagulação como enzimas trombina-símiles, ou como ativadores de fator V e fator X, ou ainda como protrombina (KINI, 2005; KINI; KOH, 2016). Algumas enzimas do veneno também hidrolisam fibrinogênio e fibrina (KINI; KOH, 2016). Além do mais, as SVMPs liberam fator tecidual e afetam a função endotelial de diversas maneiras (YAMASHITA *et al.*, 2014). Apesar destes componentes pró-coagulantes poderem causar

coagulação intravascular, na maioria dos casos, eles induzem uma coagulopatia de consumo, resultando em defibrinogenação e incoagulabilidade que se refletem nos testes de coagulação (WHITE, 2005).

A função das plaquetas também é afetada. O dano microvascular mediado por SVMPs e por lectinas tipo C-símiles contribui para a diminuição do número de plaquetas (RUCAVADO *et al.*, 2005). Ademais, desintegrinas, lectinas do tipo C-símiles, serinoproteases e algumas SVMPs prejudicam a agregação plaquetária pelo bloqueio de receptores de plaquetas e por interação com o fator de von Willebrand (CALVETE, 2005; DU, CLEMETSON, 2010; KINI, KOH, 2016). Trombocitopenia tem sido associada a um risco aumentado de sangramento sistêmico em acidentes causados por venenos hemorrágicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

As PLA₂s com ação miotóxica presentes nesses venenos podem provocar mionecrose, ligando-se à membrana plasmática das fibras musculares e promovendo ruptura (DIXON *et al.*, 1996; MONTECUCCO, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2008). Para algumas PLA₂s, a ruptura da membrana plasmática é secundária à hidrólise dos fosfolípidos de membrana, enquanto no caso de proteínas homólogas de PLA₂ cataliticamente inativas, ocorre dano no sarcolema através de interações hidrofóbicas eletrostáticas (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Seguidamente à perturbação da membrana, ocorre influxo de cálcio no citosol, ocasionando hipercontração dos miofilamentos, disfunção mitocondrial e outros eventos degenerativos que resultam em dano irreversível da célula muscular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; MONTECUCCO, GUTIÉRREZ, LOMONTE, 2008). As proteínas homólogas de PLA₂ cataliticamente inativas também possuem a capacidade de excitar neurônios sensoriais relacionados à dor via liberação de ATP e ativação de receptores purinérgicos (ZHANG *et al.*, 2017).

1.6 Rabdomiólise Associada à Picada de Serpente

Envenenamentos causados por algumas espécies de Elapidae e Viperidae, especialmente serpentes marinhas, estão associados a rabdomiólise generalizada, a qual frequentemente se complica em injúria renal aguda (IRA) (WARREL, 2010). Este efeito é devido à ação de PLA₂s e homólogas de PLA₂s

miotóxicas a nível sistêmico, como resultado da ligação dessas toxinas a receptores em fibras musculares e de outros tipos de interação. As miotoxinas promovem a ruptura da integridade da membrana plasmática das células musculares, causando influxo de cálcio e degeneração celular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Desta forma, há a liberação de grandes quantidades de proteínas citosólicas musculares, como creatina quinase e mioglobina. A deposição de mioglobina nos túbulos renais pode contribuir para a IRA (SITPRIJA; SITPRIJA, 2016).

PLA₂s e homólogas de PLA₂s encontradas em venenos de espécies do gênero *Bothrops* são miotoxinas de ação principalmente local, de modo que a injeção intramuscular (IM) dessas toxinas resulta em necrose dos músculos localizados próximos ao local da picada, com pouca ação nos músculos mais distantes. Além do mais, a injeção intravenosa dessas miotoxinas resultam em pouco incremento da atividade de creatina quinase (CK) plasmática (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Tal situação contrasta com o que tem sido descrito para outras PLA₂s miotóxicas, como a crotoxina (presente no veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*) e uma série de outras fosfolipases isoladas de venenos elapídeos. Essas PLA₂s induzem tanto miotoxicidade local quanto sistêmica, devido à maior seletividade dessas toxinas pelas fibras musculares e à sua habilidade de atuar em músculos distantes do local de injeção. Tais miotoxinas de ação sistêmica provocam um aumento proeminente na atividade plasmática de CK e na mioglobina, resultando em mioglobinúria (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

A dicotomia entre miotoxinas de ação local e sistêmica possui uma correlação clínica bem definida, uma vez que envenenamentos por espécies do gênero *Bothrops* resultam em acentuada mionecrose local, mas não em miotoxicidade sistêmica. Em contraposição, envenenamentos por espécies como *C. d. terrificus* e várias serpentes elapídeas resultam em rabdomiólise, aumento plasmático de CK e de mioglobina, com consequente mioglobinúria e IRA (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

1.7 Injúria Renal Aguda Associada a Picada de Serpente

A injúria renal aguda (IRA) é uma das mais importantes causas de morte em pacientes picados por serpentes da família Viperidae. Os venenos concentram-se no tecido renal em questão de minutos, e aparecem na urina poucas horas após a inoculação. A menos que medidas preventivas sejam implementadas prontamente, uma disfunção renal precoce ocorre frequentemente. A injúria pode ser severa, oligúrica e requerer diálise. Apesar de a maioria dos pacientes recuperarem a função renal, a IRA após picada por serpente tem sido associada com o desenvolvimento de doença renal crônica tanto em adultos quanto em crianças, e pode agravar a disfunção renal na nefropatia por agroquímicos (BURDMANN; JHA, 2017).

Dependendo do tipo de veneno, o seguinte mecanismo tem sido associado à patogênese do dano renal: isquemia secundária à diminuição do fluxo sanguíneo renal resultante de alterações hemodinâmicas causadas por sangramento sistêmico e extravasamento vascular; degradação proteolítica da membrana basal glomerular; deposição de microtrombos na microvasculatura renal; ação citotóxica direta de componentes do veneno em células tubulares renais; e, no caso de venenos que induzem miotoxicidade, acúmulo de grandes quantidades de mioglobina nos túbulos renais, com consequente toxicidade (PINHO; ZANETTA; BURDMANN, 2005; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

A anomalia histopatológica renal mais comum encontrada nos casos de IRA associada a veneno de serpente é a necrose tubular aguda. Uma pequena, mas significativa, minoria desenvolve necrose cortical aguda ou nefrite intersticial aguda. A injúria glomerular também tem sido descrita, e se manifesta histologicamente como vacuolização dos capilares glomerulares, descolamento da membrana basal glomerular, entumescimento das células endoteliais e proliferação celular mesangial focal (MERCHANT *et al.*, 1989).

Outros fatores patogênicos que contribuem para a IRA incluem inflamação sistêmica, ativação da cascata de coagulação resultando no depósito glomerular de microtrombos, estresse oxidativo e hiperuricemia (BURDMANN; JHA, 2017).

A maioria dos casos de IRA induzida por picada de serpente na América Latina é causada por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Publicações

na literatura associando diretamente picada por serpentes do gênero *Lachesis* a danos renais são escassas, como os dois estudos já mencionados na revisão de 1997 de Jorge e colaboradores, citada no tópico 1.4.1: o primeiro estudo de 1982 (HULIN; OCH; DESBORDES) e o segundo de 1993 (OTERO-PATIÑO *et al.*).

De acordo com Rodrigo Souza, do Núcleo Serra Grande de reprodução em cativeiro de *L. muta rhombeata*, localizado no sul do estado da Bahia, este tipo de envenenamento é inequivocamente nefrotóxico, com base nas muitas entrevistas que conduziu com pessoas picadas por surucucu (NÚCLEO SERRA GRANDE, 2013).

Em 2010, Alves avaliou, em sua dissertação de mestrado, os efeitos renais diretos do veneno de *L. muta muta* em um modelo experimental de sistema de perfusão de rim de rato isolado. Ele observou que o veneno da surucucu induziu queda da pressão de perfusão renal transitória, intensa diurese e morte de células epiteliais tubulares, evidenciando que o veneno teve ação direta sobre a função renal.

1.8 Fisiopatologia e biomarcadores de Injúria Renal Aguda

A Injúria Renal Aguda (IRA) é atualmente reconhecida como a nomenclatura de preferência para o distúrbio clínico anteriormente chamado de Insuficiência Renal Aguda. Essa transição de terminologia serviu para enfatizar que o espectro da doença é mais amplo que a necessidade de suporte de diálise (WARNOCK, 2015). Ela está associada à retenção de creatinina, ureia e outros resíduos metabólicos que são excretados normalmente pelos rins (MEHTA *et al.*, 2007).

A IRA pode ser resultado de uma redução da perfusão renal; de uma lesão tóxica ou obstrutiva nos túbulos renais; de inflamação e edema intersticial; ou de uma redução primária da capacidade de filtração glomerular (PINHO; ZANETTA; BURDMANN, 2008).

Uma série de mecanismos fisiopatológicos pode contribuir para a IRA após uma lesão isquêmica ou tóxica, tais como: perda de autorregulação e vasoconstrição renal; disfunção tubular e morte celular por apoptose e necrose; descamação de células viáveis e não viáveis contribuindo para a obstrução do

túbulo; disfunção do transporte tubular; e produção local de mediadores inflamatórios que causam inflamação intersticial e congestão vascular (BONVENTRE, WEINBERG, 2003; SCHRIER *et al.*, 2004).

A nível celular, a injúria resulta em rápida perda da integridade do citoesqueleto e da polaridade celular, com a desorganização de moléculas de adesão e de proteínas de membrana como a Na⁺ K⁺ ATPase e β-integrinas, perda da borda em escova do túbulo proximal, assim como necrose e apoptose (GEERING, 2006).

Na injúria severa, tanto células viáveis como não viáveis são descamadas, deixando regiões onde a membrana basal é a única barreira entre o interstício peritubular e o filtrado, permitindo seu extravasamento, principalmente em circunstâncias em que a pressão dentro do túbulo está aumentada devido à obstrução por detritos celulares e de proteínas (ZUK; BONVENTRE; MATLIN, 2001). Este dano ao epitélio acaba gerando um processo inflamatório e liberando mediadores vasoativos, que podem causar vasoconstrição e intensificam a inflamação. Assim, a inflamação contribui de maneira crítica para a fisiopatologia da IRA (BONVENTRE; ZUK, 2004).

Em contraste com o coração e o cérebro, o rim eficientemente restaura as células que foram perdidas em um dano isquêmico ou tóxico, apesar de cada vez maior reconhecimento de que mesmo breves períodos de IRA produzem efeitos prejudiciais de longo prazo (PARK *et al.*, 2017).

Embora tenha havido progresso no entendimento da fisiopatologia da doença e no cuidado clínico do paciente com IRA, isso não tem produzido melhorias no desfecho clínico que possam evitar complicações, como dependência de diálise persistente e morte (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008).

Historicamente, os autores têm utilizado diversas medidas como guia para avaliar a função renal e diagnosticar anormalidades. Estima-se que existem mais de 30 definições diferentes de Insuficiência Renal Aguda (agora referida como Injúria Renal Aguda - IRA) publicadas na literatura (KELLUM *et al.*, 2002), variando de severa (necessidade de diálise) a moderada (elevações na creatinina sérica) (MEHTA; CHERTOW, 2003). Infelizmente, a creatinina não tem se mostrado um marcador ideal, pois seus níveis séricos sofrem uma série de influências tanto renais como não renais, geralmente não refletindo a

taxa de filtração glomerular (TFG). No cenário da IRA, a diferença de tempo entre o início das alterações da creatinina e da TFG diminui a capacidade de estimar com precisão o momento e a gravidade da lesão (MORAN; MYERS, 1985). Grandes mudanças na TFG podem estar associadas a relativamente pequenas mudanças na creatinina sérica nas primeiras 24 a 48 horas após a lesão, resultando não somente em diagnóstico e intervenção atrasados, mas também na subestimação da gravidade do quadro clínico (BELLOMO *et al.*, 2004).

Resultados de ensaios de intervenção sugerem que a eficácia das terapias disponíveis para IRA é frustrada pelo atraso no diagnóstico e tratamento (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008). Há, portanto, uma urgente necessidade de melhores marcadores que permitam o diagnóstico da IRA em tempo apreciável, a predição da severidade da injúria e a avaliação segura durante o desenvolvimento de drogas. Melhores marcadores irão auxiliar os desenvolvedores de drogas a tomarem decisões mais embasadas sobre quais substâncias devem seguir em teste, quais doses testar e como desenhar ensaios clínicos que fornecerão informações claras de benefícios e de segurança (VAIDYA; BONVENTRE, 2006).

Recentemente alguns biomarcadores têm se mostrado promissores quanto a sua sensibilidade, praticidade e acurácia em predizer a IRA, tais como a molécula de injúria renal-1 (KIM-1), a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-18 (IL-18) e o inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2).

A KIM-1 é uma glicoproteína expressa principalmente na membrana apical das células do túbulo proximal que tem sido indicada como um biomarcador precoce de dano renal. Possui um ectodomínio que é eliminado na urina num processo dependente de metaloproteinase, juntamente com um aumento da síntese de mRNA, após um episódio de IRA (BAILLY *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2002).

A NGAL é uma glicoproteína ligada a uma enzima expressa em grânulos específicos de neutrófilos, que depois descobriu-se também ser secretada por células epiteliais em processos inflamatórios (VAIDYA; BONVENTRE, 2006). Em situações normais a NGAL é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida pelo

túbulo proximal, porém sua concentração urinária pode estar aumentada após a IRA (HVIDBERG *et al.*, 2005).

A IL-1 β e IL-18 são membros da superfamília de citocinas pró-inflamatórias IL-1, considerada como uma família de citocinas de resposta precoce, o que significa que elas são liberadas no estágio inicial de uma resposta imune (KRISHNAN *et al* 2014). A IL-1 β é produzida principalmente por monócitos e macrófagos. Outras fontes de IL-1 β incluem neutrófilos, fibroblastos, células do músculo liso, células endoteliais e células renais intrínsecas, como células endoteliais glomerulares, células mesangiais e células epiteliais tubulares (TIMOSHANKO *et al* 2004). Ao interagir com seu receptor, IL-1 β induz mediadores pró-fibróticos e pró-inflamatórios de alta relevância para uma variedade de doenças renais, como IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandinas, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e metaloproteinases de matriz tecidual (MMP) (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2014). Além disso, já foi demonstrado que IL-1 β tem efeitos prejudiciais diretos sobre células renais (TIMOSHANKO *et al* 2004).

A IL-18 é uma citocina de 14 K-Da secretada por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno que tem a capacidade de induzir a produção de interferon gama (INF- γ) em linfócitos auxiliares T do tipo 1 (HERGET-ROSENTHAL *et al.*, 2012), sendo reconhecida como um importante regulador da resposta imune inata e adquirida. É um mediador de lesão por isquemia em vários órgãos, como o coração e os rins. Está constitutivamente expressa nas células do túbulo contorcido distal e nos túbulos e ductos coletores, onde sua expressão é aumentada após lesão isquêmica (FINN; PORTER, 2003).

O TIMP-2 tem sido identificado como um biomarcador precoce associado à IRA. Durante o estresse celular causado por condições como sepse ou isquemia, as células epiteliais renais sofrem uma parada do ciclo celular na fase G1 para prevenir dano ao DNA durante a replicação. A TIMP-2 é uma proteína expressa durante a parada do ciclo celular (CUMMINGS *et al.*, 2018).

Do mesmo modo que estes biomarcadores estão associados à lesão renal, as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas no estresse celular e na degeneração de tecidos. O estresse oxidativo é regulado por um

balanço entre a geração de EROs e sistemas antioxidantes, incluindo a enzima superóxido dismutase (SOD). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra EROs por catalisar a dismutação de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio, um produto menos reativo. A superóxido dismutase (SOD) consiste em 3 isoenzimas, duas das quais são: a cobre/zinco SOD (SOD1s), presente no citosol, núcleo e espaço intermembrana da mitocôndria; e a manganês SOD (SOD2m), de ocorrência na matriz mitocondrial (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001).

A elevação da produção de EROs ou um sistema antioxidante ineficiente leva a um dano oxidativo de proteínas, lipídios e DNA. Não há um marcador ideal de estresse oxidativo; contudo, em se tratando de peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) é um dos marcadores mais comumente utilizados para a determinação de estresse oxidativo. Estratégias de aumento da atividade de SOD, como moléculas de SOD recombinante e transferência gênica, têm levado a uma redução da inflamação e do estresse oxidativo em modelos experimentais de IRA induzida por isquemia e reperfusão. Dessa forma, a avaliação dos níveis de MDA e da atividade de SOD podem ser preditoras de lesão renal (COSTA *et al.*, 2016).

Outro alvo para a identificação de novos biomarcadores são os metabólitos. A metabolômica é o estudo de perfis metabólicos em um sistema biológico e representa a etapa final da cascata ômica que se inicia com a genômica, juntamente com a proteômica e a transcriptômica (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; JAIN, 2010; DUNN *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2012). Alterações nos níveis de metabólitos são desfechos naturais no início e no prognóstico de diversas doenças e tais alterações com frequência aparecem nos fluídos biológicos antes do surgimento de sintomas clínicos (VAN; VEENSTRA; ISAAQ, 2011). Dentre os vários fluídos corporais, a urina é uma atraente opção para a descoberta de novos biomarcadores metabólicos. A urina pode ser prontamente obtida de maneira não invasiva e, dessa forma, com um esperado elevado consentimento de pacientes. Além disso, a urina oferece baixo risco de infecção aos pesquisadores (MILLER *et al.*, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Os rins são órgãos particularmente suscetíveis a agentes potencialmente tóxicos, tais como medicamentos, pigmentos (mioglobina, por exemplo) e venenos. Há três razões básicas para essa vulnerabilidade. Em primeiro lugar, os rins recebem cerca de 25% do débito cardíaco, estando assim expostos de maneira rápida e direta a qualquer toxina circulante. Em segundo lugar, os rins concentram o filtrado glomerular, aumentando em várias vezes o potencial tóxico de qualquer agente. Em terceiro lugar, as células de *pars recta* do túbulo proximal possuem um sistema de transporte de solutos orgânicos, o que conseqüentemente as deixa mais diretamente exposta a agentes tóxicos (YU *et al.*, 2011).

Apesar de avanços significativos na compreensão do mecanismo bioquímico e molecular da injúria renal aguda (IRA) e na identificação de inúmeros agentes protetores em modelos animais, traduzir esses achados em abordagens terapêuticas efetivas permanece sendo um desafio. Não há, no momento presente, marcadores sensíveis e específicos para a injúria renal na prática clínica. Vários grupos de pesquisa estão trabalhando no desenvolvimento e na validação de biomarcadores de injúria renal e de taxa de filtração glomerular (TFG) que possam ser utilizados no futuro próximo para fins de diagnóstico e prognóstico (MEHTA *et al.*, 2007).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob a liderança do Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, vem implementando modelos de experimentação animal *in vivo* de avaliação de efeitos lesivos de substâncias nefrotóxicas, na busca por biomarcadores que auxiliem na elucidação do mecanismo toxicológico de tais agentes e que sejam capazes de predizer o curso da enfermidade logo nos primeiros estágios. O primeiro fruto deste esforço foi a dissertação de mestrado da aluna Mayra Alejandra Velasco Reyes, intitulado “Biomarcadores precoces de injúria renal no envenenamento experimental induzido pela serpente colombiana *Bothrops ayerbeii* em ratos” (2017). O trabalho também é fruto de uma colaboração firmada em 2013 entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade de Cauca (Colômbia). Através desta colaboração, nos foi

fornecido o veneno de *Lachesis acrochorda*, substância em estudo neste trabalho.

Poucos estudos têm tentado investigar o envenenamento por espécies do gênero *Lachesis*, o que pode ser justificado pela dificuldade de captura e manutenção desses animais em cativeiro (TURNER; CARMICHAEL; DE SOUZA, 2008). Mais escassas ainda são publicações científicas associando o envenenamento por espécies deste gênero a efeitos lesivos renais. Este é o primeiro estudo de avaliação dos efeitos renais induzidos pelo veneno de *L. acrochorda* em um modelo de envenenamento experimental *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar biomarcadores relacionados à Injúria Renal Aguda (IRA) induzida pelo veneno da serpente *Lachesis acrochorda* em camundongos em modelo experimental *in vivo*, comparando marcadores convencionais de função renal com novos marcadores associados à IRA.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar as alterações nos níveis séricos e urinários de creatinina, nos níveis séricos de ureia, no volume de urina, na proteína urinária, no *clearance* de creatinina e na fração de excreção de eletrólitos induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Avaliar as alterações nos níveis séricos de creatina-quinase induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Avaliar as alterações nos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido renal induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Avaliar as alterações de expressão relativa de mRNA de genes associados à IRA, dano oxidativo e processo inflamatório no tecido renal induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Avaliar as alterações no perfil metabolômico da urina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Avaliar as principais alterações histopatológicas renais induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 adultos, fêmeas, com um peso entre 20 - 25g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, aclimatados em temperatura em torno de $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), com umidade e circulação de ar controladas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*. A pesquisa foi conduzida de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação com Animal (CONCEA). Este estudo foi analisado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, tendo recebido o número do protocolo de aprovação 92/16.

4.2 Veneno

A peçonha da serpente *Lachesis acrochorda*, liofilizada e conservada a -80°C , foi gentilmente cedida pelos Profs. Drs. José Toribio Beltrán Vidal e Jimmy Alexander Guerrero Vargas do Grupo de Investigações Herpetológicas e Toxinológicas e Centro de Investigações Biomédicas da Universidade de Cauca, Colômbia.

4.3 Grupos experimentais

4.3.1 Determinação da dose intramuscular subletal do veneno

Foram realizados experimentos para determinar qual a melhor dose intramuscular subletal do veneno de *Lachesis acrochorda*, e que seria utilizada para o experimento de indução da IRA. Utilizamos como referência a DL_{50} intramuscular (IM) da espécie congênere *L. muta rhombeata* (51 mg/kg) (CREMONEZ *et al*, 2016), optando-se testar valores iguais aos de doses subletais (25%, 50% e 75%) da DL_{50} IM de *L. m. rhombeata*.

Grupo Controle: Os animais receberam uma injeção de solução tampão fosfato-salino (PBS) em um volume de 50 µL na face ventral da coxa direita (via IM) e foram sacrificados após 24 horas (N de cada grupo = 6; N total = 18).

Grupo Veneno: Os animais receberam uma injeção do veneno de *L. acrochorda* nas doses 12,75 mg/kg, 25,5 mg/kg e 38,25 mg/Kg diluído em PBS em um volume de 50 µL na face ventral da coxa direita (via IM) e foram sacrificados após 24 horas (N de cada grupo = 8; N total = 24).

4.3.2 Avaliação do tempo de indução da IRA induzida pelo veneno

Grupo Controle: Os animais receberam uma injeção de PBS em um volume de 50 µL na face ventral da coxa direita (via IM) e foram sacrificados após 6, 12, 24 ou 72 horas (N de cada grupo = 6; N total = 24).

Grupo Veneno: Os animais receberam uma injeção de veneno de *L. acrochorda* na dose determinada pelo experimento anterior (38,25 mg/kg) diluído em PBS em um volume de 50 µL na face ventral da coxa direita (via IM) e foram sacrificados após 6, 12, 24 ou 72 horas (N de cada grupo = 8; N total = 32).

4.4 Delineamento Experimental

Para a avaliação da função renal *in vivo*, os animais foram aclimatados e mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o experimento. Tiveram um período de 48 horas de adaptação e, ao término desse período, receberam uma injeção do veneno da serpente *L. acrochorda* ou PBS por via IM. Após o período experimental (6, 12, 24 ou 72 horas) os animais foram anestesiados com anestesia dissociativa (xilazina dose: 10mg/kg; cetamina dose: 100mg/kg) via intraperitoneal (IP). Seguidamente a uma laparotomia, ocorreu a coleta de sangue por punção cardíaca e retirada dos rins para a avaliação histopatológica e demais análises. A urina acumulada nos tubos coletores das gaiolas metabólicas foi coletada e mensurada. No caso do grupo de 72 horas, a urina foi coletada a cada 24 horas após a injeção e também se coletou a urina

acumulada 24 horas antes da injeção. O sangue e a urina coletados foram centrifugados, seus sobrenadantes transferidos para outros tubos e armazenados a -80°C para posteriores dosagens. Os rins coletados foram pesados e processados para as análises subsequentes.

4.5 Análise Bioquímica da Função Renal

Para a avaliação bioquímica da função renal, foram analisados os níveis de creatinina sérica e urinária e os níveis de ureia sérica utilizando os kits comerciais CREATININA JAFFÉ cobas c 111 e UREIA cobas c 111 para o aparelho Cobas® c 111 (Roche). Além disso, foram avaliados os valores de proteína urinária através do kit SensiProt (Labtest Diagnóstica). Os valores foram dados em mg/dL.

4.6 Análise da Função Glomerular

Realizou-se a quantificação da Taxa de Filtração Glomerular (TGF) através do *Clearance* de creatinina, parâmetro convencional utilizado para avaliar a função renal de animais. Foi utilizada a fórmula-padrão abaixo. Os valores foram expressos em mL/min.

$$\text{Clearance} = (C_U \times V / C_S)$$

Onde:

C_U = Concentração de creatinina na urina (mg/dL)

V = Volume de urina por minuto (mL/min)

C_S = Concentração de creatinina no soro (mg/dL)

4.7 Análise da Função Tubular

Para a avaliação da fração tubular de excreção de eletrólitos, foi feita a mensuração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , em soro e em urina, por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche), através do método eletrodo íon seletivo. Foi

utilizado como diluente o SnapPak® (Roche) para o preparo da solução padrão e da solução para a mensuração dos eletrólitos urinários. O aparelho foi calibrado usando padrão contendo 140 mEq/L de Na⁺ e 5 mEq/L de K⁺. O controle para a mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche)

A fração de excreção de sódio (FeNa⁺), potássio (FeK⁺) e cloreto (FeCl⁻) foram calculadas através da fórmula-padrão abaixo:

$$Fe = \text{Clearance eletrólito} \times 100 / \text{Clearance creatinina}$$

O *clearance* dos eletrólitos foi calculado utilizando a mesma fórmula do *clearance* da creatinina. Os valores foram expressos em porcentagem.

4.8 Dosagem de Creatina-Quinase (CK)

Para avaliar a relação entre IRA e a lesão do tecido muscular esquelético induzida pela inoculação da peçonha de *L. acrochorda*, foi realizada a medição dos níveis séricos de CK, utilizando-se o kit comercial CK cobas c 111 para o aparelho Cobas® c 111 (Roche). Os valores foram expressos em U/L.

4.9 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Para confirmar o dano oxidativo direto no tecido renal, o grau de lipoperoxidação nos tecidos foi mensurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, conforme o método de Ohkawa e colaboradores (1979). Para tanto, foi feito um homogenato dos tecidos a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Foram coletados 250 µL do homogenato e, em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Estes seguiram para banho fervente (95 - 100 °C) por 45 minutos. A mistura foi então resfriada em água corrente e, em seguida, foi adicionado 2 mL de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por um minuto e centrifugado a 1200 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, foi retirada a fase orgânica

para realização da leitura em espectrofotômetro (520 - 535 nm). Os resultados foram expressos em micromols de MDA por mg de tecido.

4.10 Avaliação da Expressão Gênica (RT-qPCR)

Avaliou-se a expressão relativa do RNA mensageiro (mRNA) de genes relacionados a lesão renal, processos pró-inflamatórios e estresse oxidativo celular, através da variação de transcrição gênica de KIM-1, NGAL, TIMP-2, SOD1s, SOD2m, GSR, IL-18 e IL-1 β , utilizando a técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR; **Tabela 2**).

Tabela 2: Sequência de iniciadores de PCR para os genes avaliados (gene de referência: GAPDH).

Gene	Sequência dos iniciadores		Nº NCBI
	Senso 5'-3'	Antisenso 5'-3'	
KIM-1	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA	NM_134248.2
NGAL	AATGTCACCTCCATCCTGGT	ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC	NM_008491.1
TIMP-2	TGGGACACGCTTAGCATCAC	CGGGGAGGAGATGTAGCAAG	NM_011594.3
SOD1s	GGACAATACACAAGGCTGTACC	CAGTCACATTGCCAGGTCTC	NM_011434.2
SOD2m	TGGACAAACCTGAGCCCTAAG	CCCAAAGTCACGCTTGATAGC	NM_013671.3
IL-18	GACAACTTTGGCCGACTTCA	CTGGGGTTCACCTGGCACTTT	NM_008360.2
IL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG	NM_008361.4
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCTTCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	NM_008084.3

Fonte: autor; KIM-1: molécula de injúria renal-1; NGAL: lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; TIMP-2: inibidor tecidual de metaloproteinase-2; SOD1s: superóxido dismutase 1; SOD2m: superóxido dismutase 2 mitocondrial; IL-18: Interleucina 18; il-1 β : Interleucina 1-beta; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

4.10.1 Extração do RNA Total

A extração de RNA foi realizada com o kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (LIFE, technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente 30 mg de tecido renal foi inicialmente homogeneizado em tampão de lise (0,6 mL), provido pelo kit, acrescido 2- β -mercaptoetanol numa concentração final de 1%. A lise foi realizada no equipamento TissueLyser LT (Qiagen) por 4 minutos à oscilação máxima permitida pelo equipamento. O material lisado foi centrifugado a 12.000 g por dois minutos. O sobrenadante obtido foi acrescido de 0,6 mL de etanol 70% e, então, o volume total foi

aplicado à coluna de filtração fornecida pelo kit. A filtração do material lisado foi feita por centrifugação a 12.000 g por 15 segundos (s). O material filtrado foi descartado e o filtro, contendo o RNA, foi lavado com dois tampões providos pelo Kit. O tampão de lavagem 1 foi aplicado ao filtro num volume de 0,7 mL e centrifugado a 12.000 g por 15 s. O tampão de lavagem 2 foi aplicado ao filtro por duas vezes num volume de 0,5 mL e, a cada aplicação, foi centrifugado a 12.000 g por 15 s. Por fim, o RNA foi eluído do filtro com acréscimo de 30 μ L de tampão de eluição provido pelo Kit. Após a finalização do processo de extração, 1 μ L de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) a fim de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em cDNA.

4.10.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação continha 2 μ L da enzima transcriptase reversa, 4 μ L do tampão de reação GoScript™, um volume da amostra de RNA uniformizado para todas as amostras de 700 ng e água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20 μ L. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) foi de 25 °C por 5 minutos (min), 42 °C por 60 min, e 70 °C por 15 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20 °C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.10.3 PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

Analizamos a transcrição do mRNA dos genes com o aparelho CFX96 Touch qPCR System (Bio-Rad Laboratories). Utilizamos genes de referência relacionados ao tecido renal que melhor se adequaram à quantificação. Para a reação foi utilizado 5 μ L da PCR Master Mix contendo SYBR Green, 1 μ L de cada iniciador (0,2 μ M) e 1 μ L de cDNA das amostras completando com água

livre de nucleases para um volume final de 10 μL . Todas as condições da qPCR seguiram as ciclagens de 95 °C por 2 min, 45 ciclos de 95 °C por 15 s, seguidos de 1 min em temperatura de anelamento e extensão de 60 °C. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de fusão, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft) e os níveis relativo de mRNA foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os valores foram expressos em mediana, mínimo e máximo.

4.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Identificação de Metabólitos Urinários

4.11.1 Aquisição dos espectros de RMN e identificação dos metabólitos

Os espectros de RMN uni e bidimensionais (RMN 1D/2D) foram adquiridos a 300 K em um espectrômetro Bruker Avance III-600 operando a 14,1 Tesla (observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 600 MHz e 150 MHz, respectivamente) equipado com uma sonda TXI de 5 mm com detecção inversa e gradiente no eixo z.

Para a aquisição dos espectros de RMN de ^1H , 200 μL de urina foram misturados com 400 μL de tampão fosfato D_2O (pH = 7,4) contendo 1 mM de 2,2,3,3- D_4 -trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado (TMSP- d_4) e 2 mM de azida de sódio (NaN_3). Posteriormente uma alíquota de 550 μL da solução foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm.

A pré-saturação do sinal residual da água (HDO) foi realizada utilizando a sequência de pulso noesypr1d (biblioteca Bruker), utilizando 128 transientes, número de pontos no domínio do tempo igual a 64 K, janela espectral de 25 ppm, tempo de relaxamento igual a 12 s e tempo de mistura igual a 100 milissegundos (ms). Todos os experimentos de RMN de ^1H foram realizados após a calibração do pulso de 90° (p1). Todos os FIDs adquiridos (Free Induction Decay) sofreram uma multiplicação exponencial para alisamento dos

sinais (LB) por um fator igual a 0,3 Hz e 64 K pontos na parte real (SI) e posteriormente foram convertidos do domínio de tempo para o domínio de frequências através da aplicação da transformada de Fourier. Foi realizada a correção manual da fase dos espectros, seguida do ajuste automático da linha de base espectral. Os espectros foram também referenciados em relação ao sinal de referência TMSP-d4 (δ 0,00).

A atribuição dos compostos presentes nas amostras de urina foi realizada com auxílio de experimentos bidimensionais de correlação homo e heteronuclear, bem como através da comparação com os espectros de RMN em bancos de dados (Human Metabolome Database, HMDB, <http://www.hmdb.ca>) e relatos da literatura (PRAŽIENKOVÁ *et al.* 2017; SERRANO-CONTRERAS *et al.* 2016; PELANTOVÁ *et al.*, 2015).

4.11.2 Análise de componentes principais (PCA)

Para análise de componentes principais (PCA) dos dados utilizou-se o AMIX® (versão 3.9.12, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Alemanha). A região do espectro utilizada foi de δ 0,3 - 10,0 divididas em intervalos (denominados buckets) de δ 0,02. As áreas referentes aos sinais residuais da água (δ 4,72-4,82) e da ureia (δ 5,58 - 6,00) foram excluídas, gerando uma matriz de dados composta de 20 amostras (linhas) e 485 variáveis (colunas). A área de cada bucket foi integrada usando o modo de buckets retangular simples (simple rectangular bucket). Em seguida, os espectros foram escalados em relação a uma região específica referente a creatinina (4,0736 – 4,0465) e as variáveis não foram escaladas. Foram gerados gráficos de escores para comparar as mudanças químicas nos espectros. A identificação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos foi realizada através dos gráficos de influências *loadings*, que mostram o peso relativo de cada *bucket*.

4.12 Análise Histopatológica

O tecido renal coletado no procedimento cirúrgico do item 4.4 foi mantido imerso em formol tamponado 10% por 48 horas. Após esse período, foi colocado em álcool 70%, onde permaneceu até ser processado. Para o

processamento das amostras, foi utilizado o processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), onde as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após este procedimento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando-se o equipamento para banho histológico modelo BH05. Ao fim deste processo, o material nos blocos de parafina foi cortado em 5 μ m de espessura e colocado em lâminas histológicas para o processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos através do micrótomo de impacto Poycut S® (Leica), equipado com navalha de tungstênio de 16 cm tipo D (Leica). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e posteriormente registradas através de fotografias. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica convencional e a avaliação foi realizada por histopatologista habilitado.

4.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados foram submetidos previamente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os valores foram então submetidos ao teste de Mann-Whitney para dados que não passaram no teste de normalidade e foram considerados não paramétricos; e teste t para dados que passaram no teste de normalidade e foram considerados paramétricos. O nível de significância para os testes foi estabelecido em $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 7.0®.

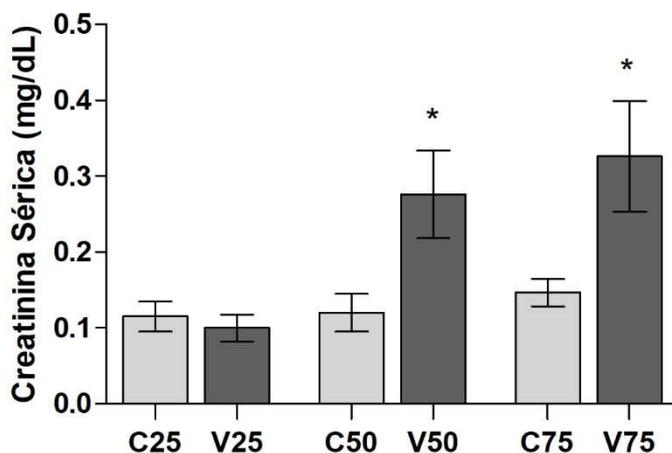
5 RESULTADOS

5.1 Determinação da dose intramuscular subletal do veneno

Para selecionar a dose subletal do veneno a ser utilizada no experimento de indução de IRA, foram analisadas as alterações nas concentrações séricas de creatinina e ureia, além de alterações do volume de urina de 24 horas, induzidas pelo veneno de *Lachesis acrochorda*.

Conforme o **Gráfico 1**, houve aumento significativo da creatinina sérica no grupo veneno na dose 50% em relação ao seu grupo controle (C50: $0,12 \pm 0,02$ mg/dL; V50: $0,28 \pm 0,06$ mg/dL) e também na dose 75% (C75: $0,15 \pm 0,02$ mg/dL; V75: $0,33 \pm 0,07$ mg/dL). Não houve diferença entre o grupo veneno na dose 25% e seu controle (C25: $0,12 \pm 0,02$ mg/dL; V25: $0,10 \pm 0,02$ mg/dL).

Gráfico 1: Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatinina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*.

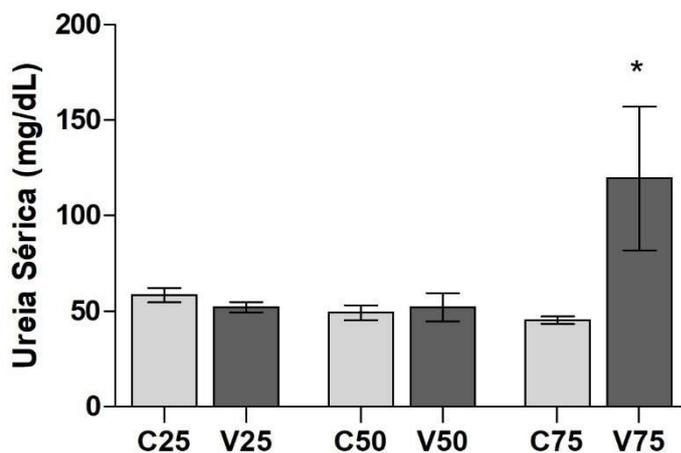


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis séricos de creatinina em animais envenenados com 25%, 50% e 75% da dose de 51 mg/kg de veneno de *L. acrochorda*. Para a análise estatística, foi utilizado o teste *t* de Student, com $p < 0,05$.

O **Gráfico 2** mostra que houve alteração significativa dos níveis séricos de ureia apenas no grupo veneno na dose 75%, que apresentou aumento de valor em relação ao seu grupo controle (C75: $45,3 \pm 1,9$ mg/dL; V75: $119,5 \pm 37,6$ mg/dL). Os grupos venenos 25% e 50% não apresentaram diferença entre

seus respectivos grupos controles (C25: $58,3 \pm 3,8$ mg/dL; V25: $52,0 \pm 2,7$ mg/dL; C50: $49,2 \pm 4,0$ mg/dL; V50: $52,0 \pm 7,5$ mg/dL).

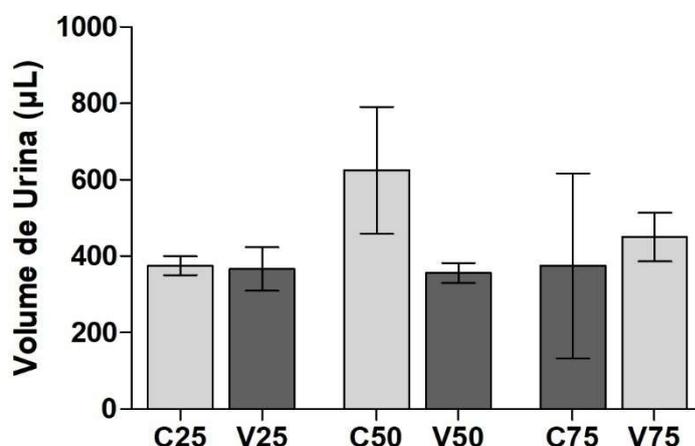
Gráfico 2: Avaliação das alterações dos níveis séricos de ureia induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis séricos de ureia em animais envenenados com 25%, 50% e 75% da dose de 51 mg/kg de veneno de *L. acrochorda*. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, seguido de pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Por fim, o **Gráfico 3** mostra que não houve alterações significativas dos valores de volume de urina nos grupos 25%, 50% e 75% em relação aos seus respectivos grupos controles, além de haver considerável erro padrão em todos os grupos (C25: $375,0 \pm 25,0$ μ L; V25: $366,7 \pm 57,3$ μ L; C50: $625,0 \pm 166,5$ μ L; V50: $356,3 \pm 25,8$ μ L; C75: $375,0 \pm 242,0$ μ L; V75: $450,00 \pm 63,6$ μ L).

Gráfico 3: Avaliação das alterações dos valores de volume de urina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda*.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão da urina de 24 horas em animais envenenados com 25%, 50% e 75% da dose de 51 mg/kg de veneno de *L. acrochorda*. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

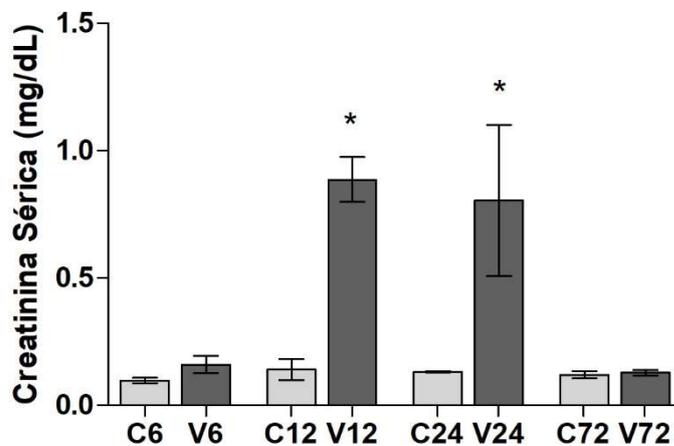
5.2 Avaliação do tempo de indução da IRA induzida pelo veneno

A seguir são apresentados os resultados da avaliação das alterações de parâmetros bioquímicos, de função glomerular e de função tubular induzidos pela dose de 38,25 mg/kg (75% de 51 mg/kg) do veneno de *Lachesis acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas de envenenamento.

5.2.1 Análise Bioquímica da Função Renal

O **Gráfico 4** mostra que houve aumento significativo dos níveis de creatinina sérica nos grupos venenosos dos tempos 12 e 24 horas em relação aos seus respectivos controles (C12: $0,14 \pm 0,04$ mg/dL; V12: $0,89 \pm 0,09$ mg/dL; C24: $0,13 \pm 0,003$ mg/dL; V24: $0,80 \pm 0,30$ mg/dL). Não houve alterações entre grupos veneno e controle nos tempos 6 e 72 horas (C6: $0,10 \pm 0,01$ mg/dL; V6: $0,16 \pm 0,03$ mg/dL; C72: $0,12 \pm 0,01$ mg/dL; V72: $0,13 \pm 0,01$ mg/dL).

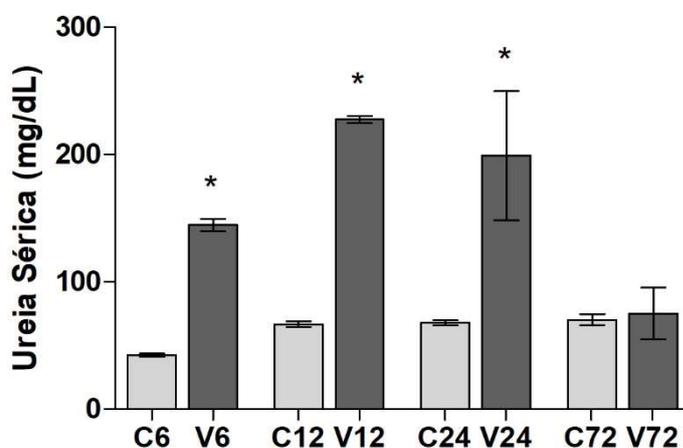
Gráfico 4: Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatinina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis séricos de creatinina em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 6, 12, 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Já de acordo com o **Gráfico 5**, a ureia sérica alterou-se nos grupos venenos dos tempos de 6, 12 e 24 horas, apresentando aumento significativo em relação aos seus respectivos grupos controles (C6: 42,4 \pm 1,3 mg/dL; V6: 144,7 \pm 4,6 mg/dL; C12: 66,7 \pm 2,3 mg/dL; V12: 227,3 \pm 2,9 mg/dL; C24: 67,8 \pm 2,0 mg/dL; V24: 199,0 \pm 50,5 mg/dL). Não foi observada diferença entre os valores do grupo veneno de 72 horas e seu controle (C72: 70,2 \pm 4,3 mg/dL; V72: 75,2 \pm 20,3 mg/dL).

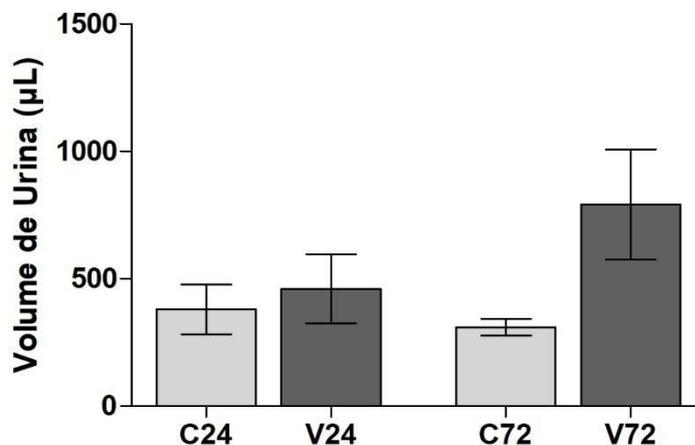
Gráfico 5: Avaliação das alterações dos níveis séricos de ureia induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis séricos de ureia em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 6, 12, 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Os valores de volume de urina são apresentados no **Gráfico 6**. Não foram observadas diferenças significativas nos grupos venenosos em relação a seus controles (C24: $380,0 \pm 98,2 \mu\text{L}$; V24: $460,0 \pm 135,5 \mu\text{L}$; C72: $310,0 \pm 33,2 \mu\text{L}$; V72: $791,7 \pm 216,2 \mu\text{L}$).

Gráfico 6: Avaliação das alterações dos valores de volume de urina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.

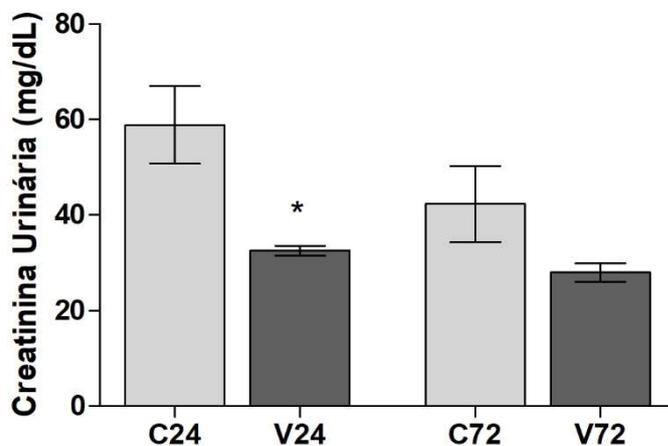


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos valores de urina de 24 horas em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi feita utilizando o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Vale ressaltar que tentou-se coletar as urinas nos tempos experimentais de 6 e 12 horas (que não poderiam ser comparados com os valores de urina de 24 horas nos tempos de 24 e 72 horas). O tempo de 6 horas foi insuficiente para haver material de coleta, enquanto no tempo de 12 horas apenas os animais do grupo controle urinaram, apresentando uma média de $100 \pm 339,6$ µL de urina coletada.

Realizou-se a mensuração dos níveis de creatinina e proteína urinária nos grupos em que conseguiu-se coletar urina em ambos os grupos controle e veneno. Conforme o **Gráfico 7**, houve diminuição significativa da creatinina urinária no grupo veneno do tempo de 24 horas, enquanto não houve diferença no grupo de 72 horas (C24: $58,86 \pm 8,11$ mg/mL; V24: $32,54 \pm 1,04$ mg/mL; C72: $42,29 \pm 7,94$ mg/mL; V72: $27,95 \pm 1,94$ mg/mL).

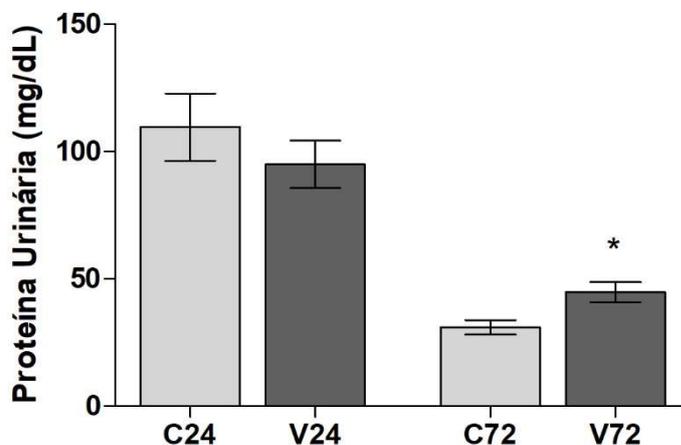
Gráfico 7: Avaliação das alterações dos níveis urinários de creatinina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis urinários de creatinina em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste *t* de Student, com $p < 0,05$.

O Gráfico 8 mostra que houve aumento significativo nos valores de proteína urinária no tempo de 72 horas (C72: 30,94 \pm 2,88 mg/dL; V72: 44,69 \pm 4,00 mg/dL), enquanto não houve diferença no tempo de 24 horas (C24: 109,50 \pm 13,19 mg/dL; V24: 94,92 \pm 9,31 mg/dL).

Gráfico 8: Avaliação das alterações de proteína urinária induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.

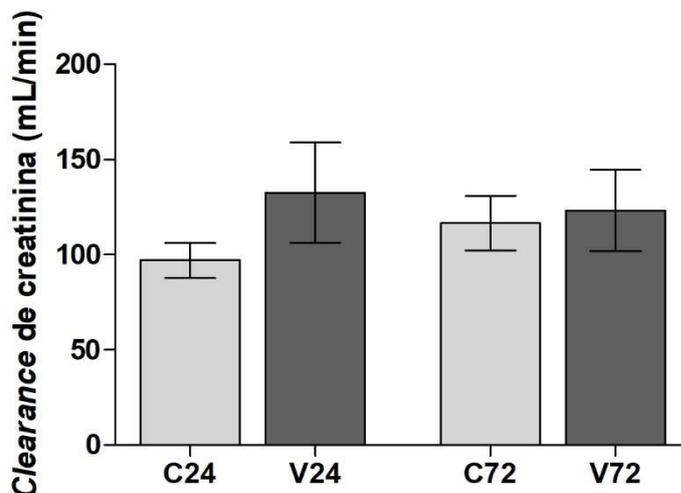


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis urinários de creatinina em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

5.2.2 Função Glomerular

Para análise da função glomerular foi realizada a mensuração do *clearance* de creatinina por meio dos valores de creatinina sérica e urinária. De acordo com o **Gráfico 9**, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e veneno em nenhum dos tempos experimentais analisados (C24: $97,04 \pm 9,2$ mL/min; V24: $132,6 \pm 26,25$ mL/min; C72: $116,6 \pm 14,31$ mL/min; V72: $123,3 \pm 21,30$ mL/min).

Gráfico 9: Avaliação das alterações do *clearance* de creatinina induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.

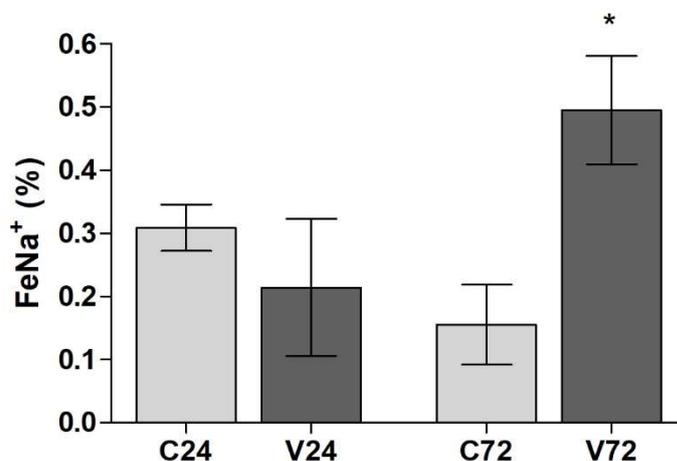


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão do *clearance* de creatinina em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.2.3 Função Tubular

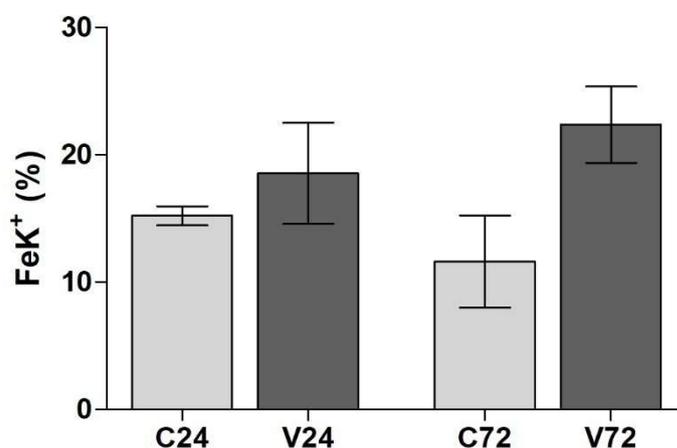
Os efeitos do veneno de *L. acrochorda* sobre a fração de excreção de eletrólitos estão representados nos **Gráficos 10, 11 e 12**. Houve alterações significativas na fração de excreção de Na^+ e de Cl^- apenas no tempo de 72 horas, onde foi observado aumento em ambos. Nenhuma alteração foi verificada na fração de excreção de K^+ . Os valores da fração de excreção de sódio (FeNa^+) foram: C24: $0,308 \pm 0,04$ %; V24: $0,214 \pm 0,11$ %; C72: $0,155 \pm 0,06$ %; V72: $0,495 \pm 0,08$ %). Seguem os valores da fração de excreção de potássio (FeK^+): C24: $15,21 \pm 0,74$ %; V24: $18,54 \pm 3,96$ %; C72: $11,60 \pm 3,60$ %; V72: $22,37 \pm 3,00$ %). Por fim, os valores da fração de excreção de cloreto foram (FeCl^-) foram: C24: $0,422 \pm 0,06$ %; V24: $1,013 \pm 0,27$ %; C72: $0,252 \pm 0,06$ %; V72: $0,892 \pm 0,24$ %).

Gráfico 10: Avaliação das alterações da fração de excreção de sódio (FeNa^+) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.



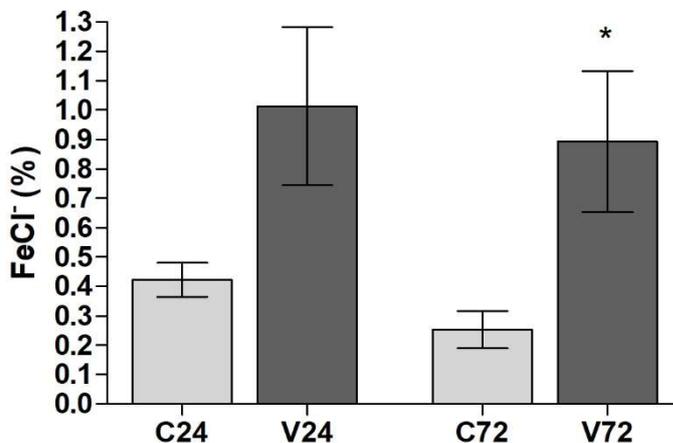
As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão da fração de excreção de sódio (FeNa^+) em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Gráfico 11: Avaliação das alterações da fração de excreção de potássio (FeK^+) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.



As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão da fração de excreção de potássio (FeK^+) em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Gráfico 12: Avaliação das alterações da fração de excreção de cloreto (FeCl⁻) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* nos tempos experimentais de 24 e 72 horas.

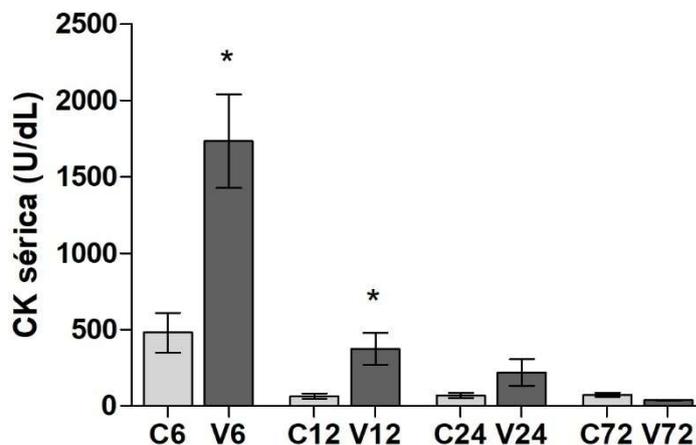


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão da fração de excreção de cloreto (FeCl⁻) em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.3 Dosagem de Creatina-Quinase (CK)

No **Gráfico 13**, observa-se que os níveis séricos de creatina-quinase (CK) tiveram aumento significativo apenas no tempo de 6 e de 12 horas (C6: 479,8 \pm 130,3 U/dL; V6: 1732,0 \pm 305,4 U/dL; C12: 64,4 \pm 18,5 U/dL; V12: 373,3 \pm 104,4 U/dL). Nos demais tempos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos venenos e controles (C24: 67,0 \pm 16,4 U/dL; V24: 219,3 \pm 87,6 U/dL; C72: 72,5 \pm 13,4 U/dL; V72: 36,0 \pm 2,9 U/dL).

Gráfico 13: Avaliação das alterações dos níveis séricos de creatina-quinase (CK) induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.

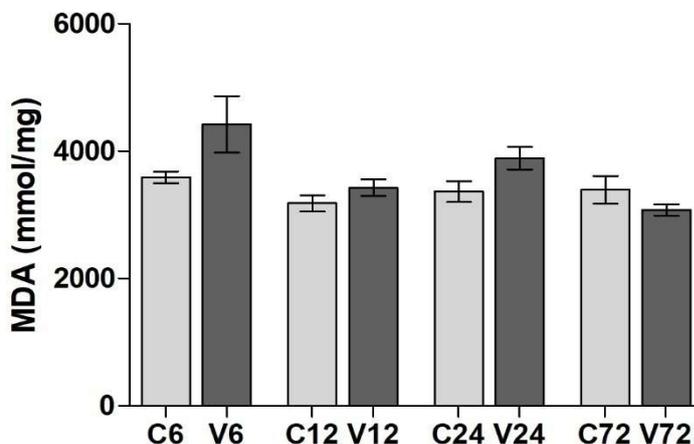


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão dos níveis séricos de creatina-quinase (CK) em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste *t* de Student, com $p < 0,05$.

5.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Não foram observadas alterações significativas dos valores de malondialdeído (MDA) no tecido renal dos animais em nenhum dos tempos experimentais analisados, como evidenciado no **Gráfico 14** (C6: 3592 \pm 92,65 mmol/mg; V6: 4423 \pm 445,2 mmol/mg; C12: 3180 \pm 129,4 mmol/mg; V12: 3428 \pm 129,4 mmol/mg; C24: 3367 \pm 162,3 mmol/mg; V24: 3889 \pm 176,70 mmol/mg; C72: 3395 \pm 215,6 mmol/mg; V72: 3077 \pm 89,49 mmol/mg).

Gráfico 14: Avaliação das alterações dos valores de malondialdeído (MDA) tecidual induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.

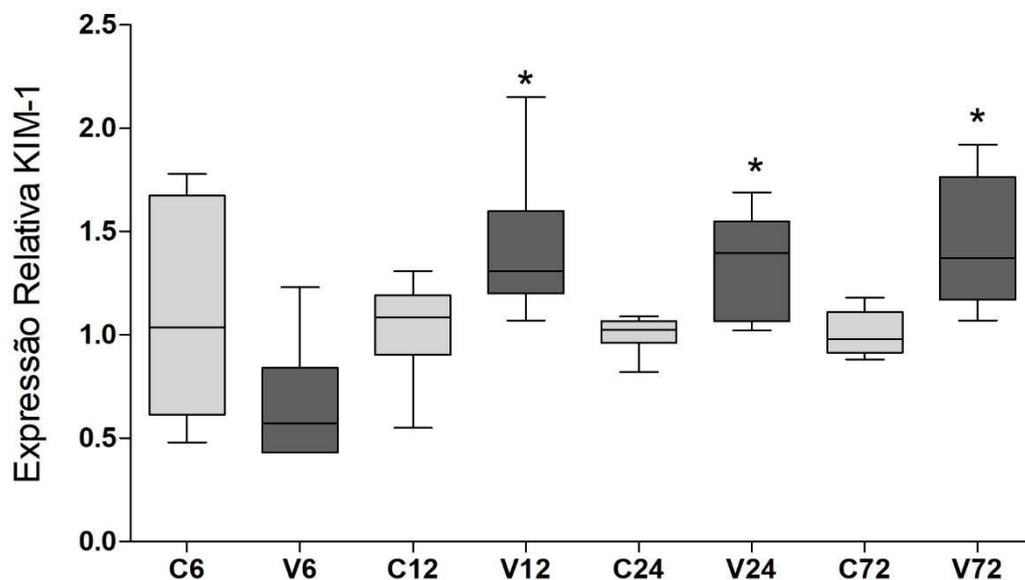


As colunas e barras representam os valores médios \pm erro padrão de malondialdeído (MDA) tecidual em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.5 Avaliação da Expressão Gênica (RT-qPCR)

Como mostra o **Gráfico 15**, os animais envenenados apresentaram um aumento significativo da expressão relativa de KIM-1 nos tempos de 12, 24 e 72 horas [C12: 1,1 (0,55 – 1,3); V12: 1,3 (1,1 – 2,2); C24: 1,0 (0,82 – 1,1); V24: 1,4 (1,0 – 1,7); C72: 0,98 (0,88 – 1,2); V72: 1,4 (1,1 – 1,9)]. Não houve alteração entre o grupo veneno e o controle do tempo de 6 horas [C6: 1,0 (0,48 – 1,8); V6: 0,57 (0,43 – 1,2)].

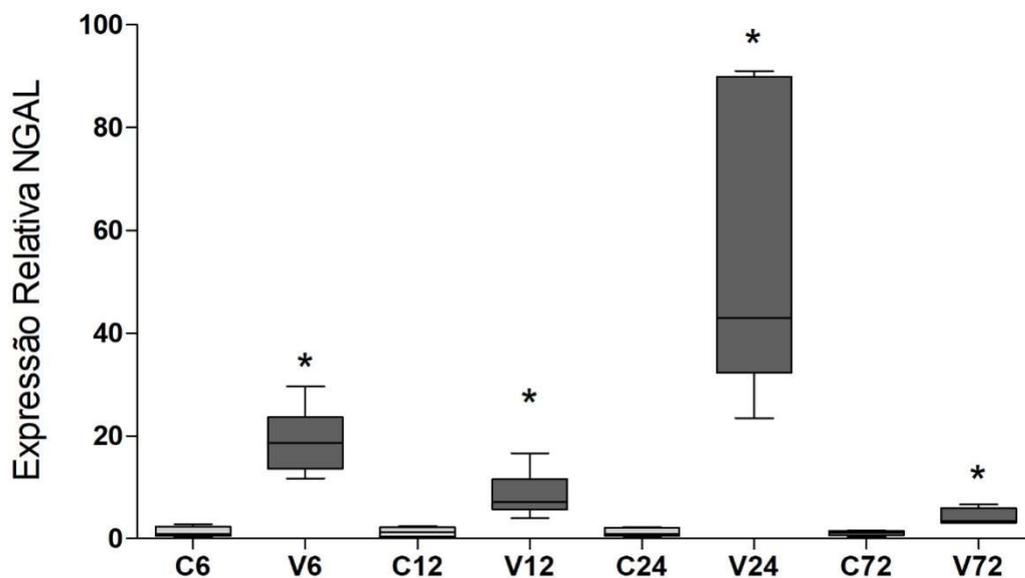
Gráfico 15: Avaliação das alterações da transcrição gênica de KIM-1 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) padrão da transcrição gênica de KIM-1 em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

No **Gráfico 16** é observado um aumento significativo da expressão relativa de NGAL em todos os tempos experimentais analisados [C6: 0,86 (0,33 – 2,88); V6: 19 (12 – 30); C12: 1,3 (0,32 – 2,5); V12: 7,1 (4,1 – 17); C24: 0,9 (0,46 – 2,3); V24: 43 (24 – 91); C72: 1,2 (0,37 – 1,6); V72: 3,5 (3,1 – 6,7)].

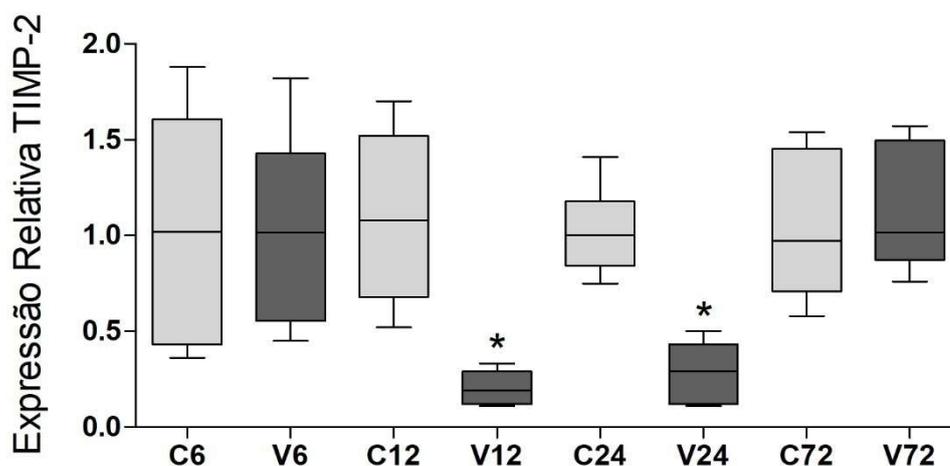
Gráfico 16: Avaliação das alterações da transcrição gênica de NGAL induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de NGAL em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

O **Gráfico 17** apresenta a expressão relativa de TIMP-2 que reduziu significativamente nos tempos de 12 e 24 horas [C12: 1,1 (0,52 – 1,7); V12: 0,19 (0,11 – 0,33); C24: 1,0 (0,75 – 1,4); V24: 0,29 (0,11 – 0,50)], enquanto nos tempos de 6 e 72 horas não houve alterações [(C6: 1,0 (0,36 – 1,9); V6: 1,0 (0,45 – 1,8); C72: 0,97 (0,58 – 1,5); V72: 1,0 (0,76 – 1,6)].

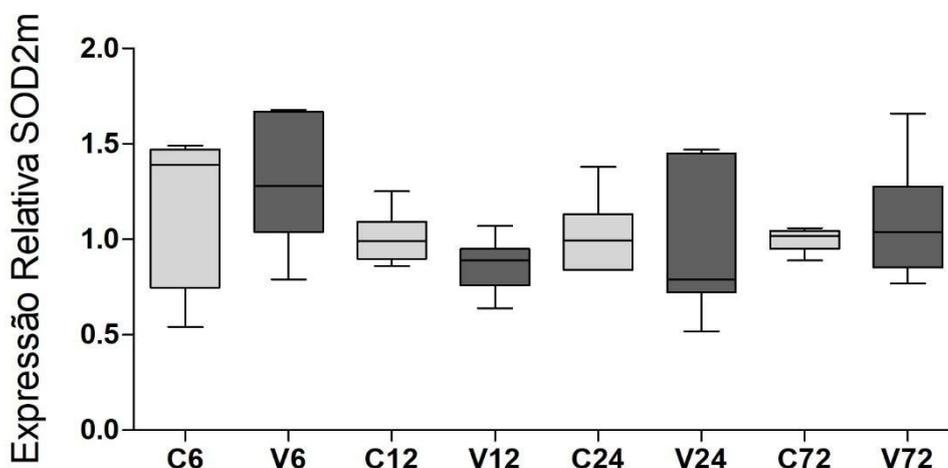
Gráfico 17: Avaliação das alterações da transcrição gênica de TIMP-2 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de TIMP-2 em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

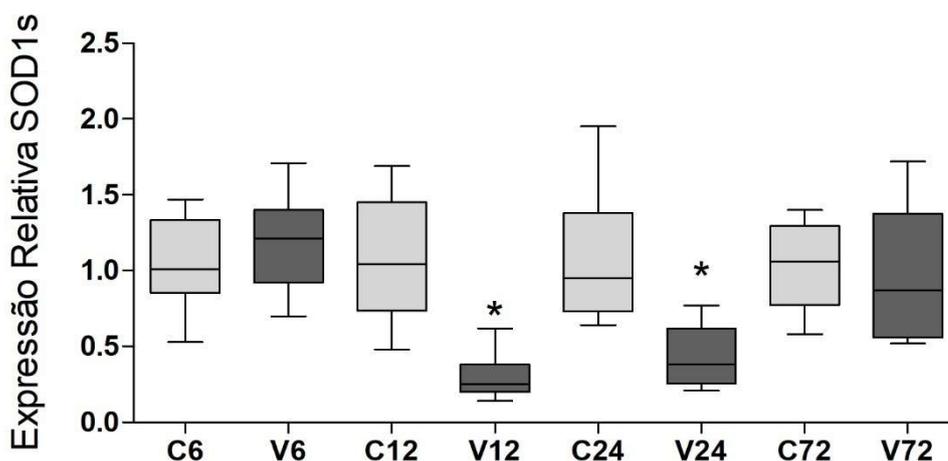
Em relação aos genes da superóxido dismutase (SOD), no **Gráfico 18** é possível visualizar que não houve alterações significativas da expressão relativa do mRNA de SOD2m [(C6: 1,4 (0,54 – 1,5); V6: 1,3 (0,79 – 1,7); C12: 0,99 (0,86 – 1,3); V12: 0,89 (0,64 – 1,1); C24: 1,0 (0,84 – 1,4); V24: 0,79 (0,52 – 1,5); C72: 1,0 (0,89 – 1,1); V72: 1,0 (0,77 – 1,7)]. Já no **Gráfico 19**, a expressão relativa de SOD1s apresentou diminuição da expressão relativa nos tempos de 12 e 24 horas [(C12: 1,0 (0,48 – 1,7); V12: 0,25 (0,14 – 0,62); C24: 0,94 (0,64 – 2,0); V24: 0,38 (0,21 – 0,77)], enquanto os tempos de 6 e 72 horas não se alteraram [(C6: 1,0 (0,53 – 1,5); V6: 1,2 (0,48 – 1,7); C72: 1,1 (0,58 – 1,4); V72: 0,87 (0,52 – 1,7)].

Gráfico 18: Avaliação das alterações da transcrição gênica de SOD2m induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de SOD2m em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Gráfico 19: Avaliação das alterações da transcrição gênica de SOD1s induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.

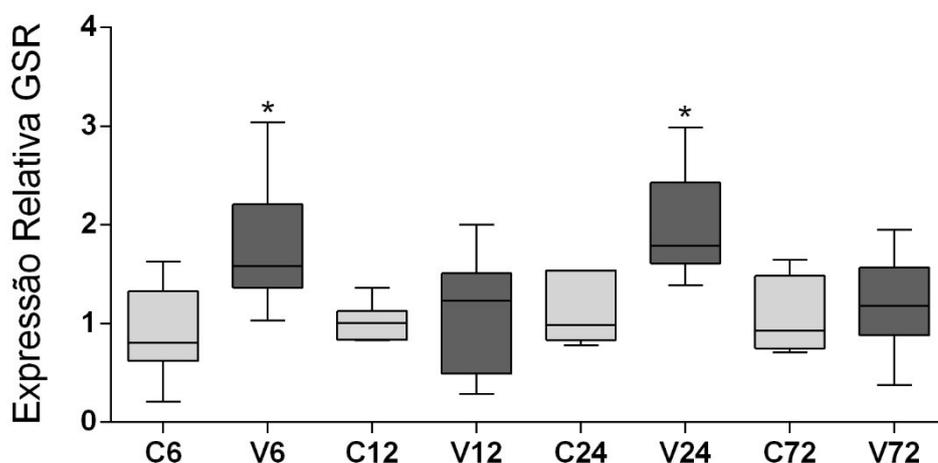


As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de SOD1s em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

A expressão relativa de GSR alterou-se de modo significativo em dois momentos, com um aumento em 6 horas [C6: 0,81 (0,21 – 1,6); V6: 1,6 (1,0 –

3,0)] e um novo aumento em 24 horas [C24: 1,5 (0,78 – 1,5); V24: 218 (1,4 – 3,0)]. Não foram observadas alterações nos tempos de 12 e 72 horas [C12: 1,0 (0,83 – 1,4); V12: 1,2 (0,29 – 2,0); C72: 0,93 (0,71 – 1,7); V72: 1,2 (0,38 – 2,0)]. Os efeitos do veneno de *L. acrochorda* sobre a expressão relativa de GSR estão ilustrados no **Gráfico 20**.

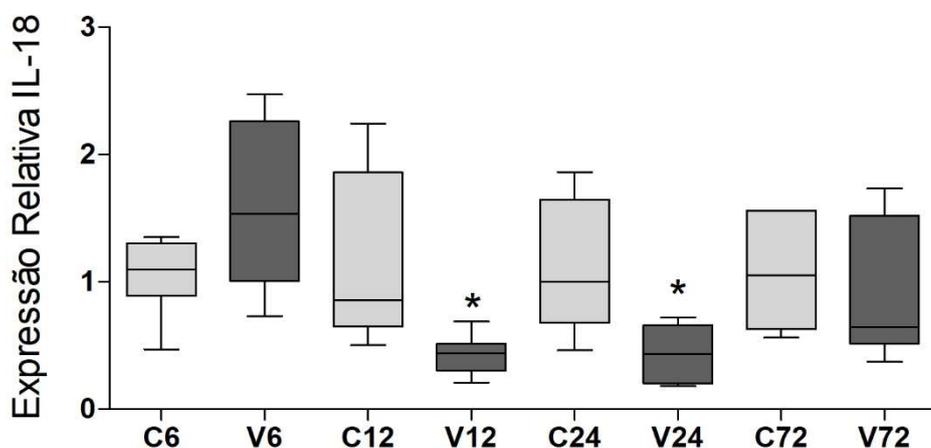
Gráfico 20: Avaliação das alterações da transcrição gênica de GSR induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de GSR em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

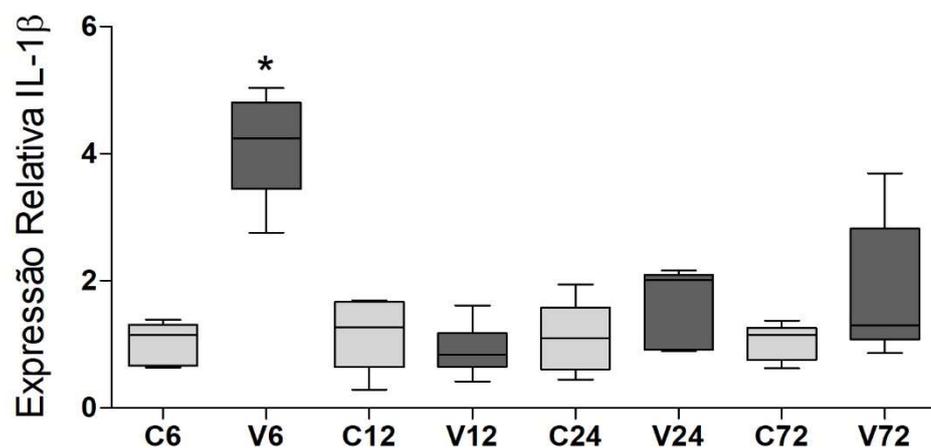
Finalmente, o **Gráfico 21** mostra que a expressão relativa do mRNA de IL-18 apresentou redução nos tempos de 12 e 24 horas [C6: 1,1 (0,47 – 1,4); V6: 1,5 (0,73 – 2,5); C12: 0,86 (0,50 – 2,2); V12: 0,44 (0,21 – 0,69); C24: 1,0 (0,46 – 1,9); V24: 0,43 (0,18 – 0,72); C72: 1,1 (0,56 – 1,6); V72: 0,65 (0,37 – 1,7)], enquanto o **Gráfico 22** evidencia que a expressão relativa do mRNA de IL-1 β apresentou um aumento apenas no tempo de 6 horas [C6: 1,2 (0,64 – 1,4); V6: 4,2 (2,8 – 5,0); C12: 1,3 (0,29 – 1,7); V12: 0,84 (0,42 – 1,6); C24: 1,1 (0,45 – 1,9); V24: 2,0 (0,90 – 2,2); C72: 1,2 (0,62 – 1,4); V72: 1,3 (0,86 – 3,7)].

Gráfico 21: Avaliação das alterações da transcrição gênica de IL-18 induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de IL-18 em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Gráfico 22: Avaliação das alterações da transcrição gênica de IL-1 β induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em diferentes tempos experimentais.



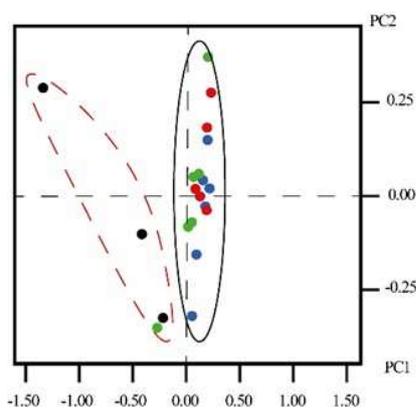
As colunas e barras representam os valores de mediana (mínimo – máximo) da transcrição gênica de IL-1 β em animais envenenados com a dose de 38,25 mg/kg de veneno de *L. acrochorda* nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5.6 Perfil Metabolômico Urinário

O gráfico de escore PC1 x PC2 apresentou 75,51% da variância total dos dados com PC1 representando 57,96% e PC2 descrevendo um adicional de 17,55% (**Figura 4**). A formação de duas tendências pôde ser observada em PC1, com as amostras de 24 horas ocupando o lado negativo de PC1. A análise do gráfico de *loadings* revelou a presença dos compostos creatina (δ 3,03), creatinina (δ 3,05 e δ 4,07), taurina (δ 3,43), betaína (δ 3,93), α -glicose (δ 5,23), β -glicose (δ 4,65) e alantoína (δ 5,41) como responsáveis por esse comportamento (**Tabela 3**). Enquanto isso as amostras provenientes dos tempos zero hora, 48 e 72 horas ocuparam o lado positivo de PC1. Os compostos responsáveis por essa tendência são acetato (δ 1,93), succinato (δ 2,45), 2-oxoglutarato (δ 2,45 e 3,01), citrato (δ 2,55 e 2,57), trimetilamina (δ 2,89) e hipurato (δ 7,83) (**Tabela 3**).

Figura 4: Espectros representativos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio da urina dos animais envenenados e gráfico de escores e *loadings* da análise de componentes principais.

Gráfico de escores 2D



- Hora Zero
- 24H
- 48H
- 72H

Espectros de ^1H

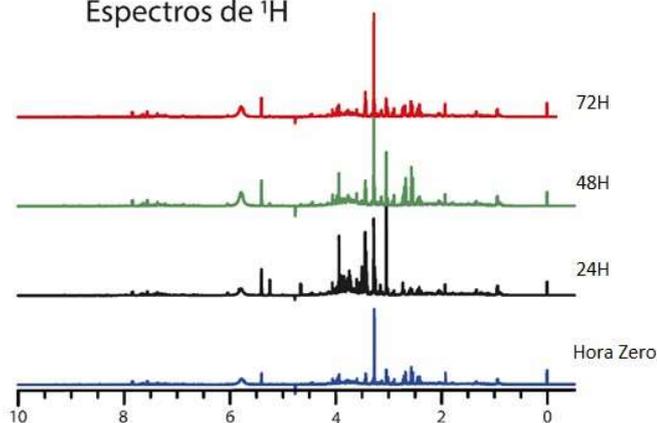
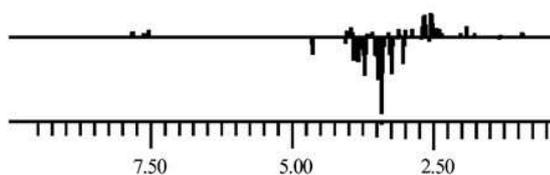


Gráfico de loadings 1D



Fonte: Autor

Tabela 3: Assinalamento dos compostos presentes na urina de camundongos que foram responsáveis pela tendência observada.

Metabólitos	Assinalamento	δ ^1H	Multiplicidade (Hz)	δ ^{13}C
Acetato	CH_3	1,93	s	26,1
Succinato	$2\times\text{CH}_2$	2,45	s	36,8
2-Oxoglutarato	CH_2	2,45	<i>t</i> (7,0)	33,4
	CH_2	3,01	<i>t</i> (7,0)	38,7
Citrato	CH_2	2,56	<i>d</i> (16,0)	47,6
	CH_2	2,70	<i>d</i> (16,0)	47,6
Trimetilamina	$\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	2,89	s	47,5
Creatina	CH_3	3,03	s	39,7
	CH_2	3,93	s	56,7
Creatinina	CH_3	3,04	s	32,9
	CH_2	4,05	s	59,1
Taurina	CH_2	3,27	<i>t</i> (6,6)	50,3
	CH_2	3,43	<i>t</i> (6,6)	38,3
Betaína	CH_3	3,27	s	62,3
	CH_2	3,93	s	56,6
β -Glucose	CH	4,65	<i>d</i> (7,0)	99,0
α -Glucose	CH	5,24	<i>d</i> (3,7)	95,1
Alantoína	CH	5,41	s	66,0
Hipurato	CH	7,55	<i>dd</i> (7,8 and 7,4)	135,6
	$(\text{CH})_2$	7,64	<i>t</i> (7,4)	135,0
	$(\text{CH})_2$	7,83	<i>d</i> (7,8)	130,0

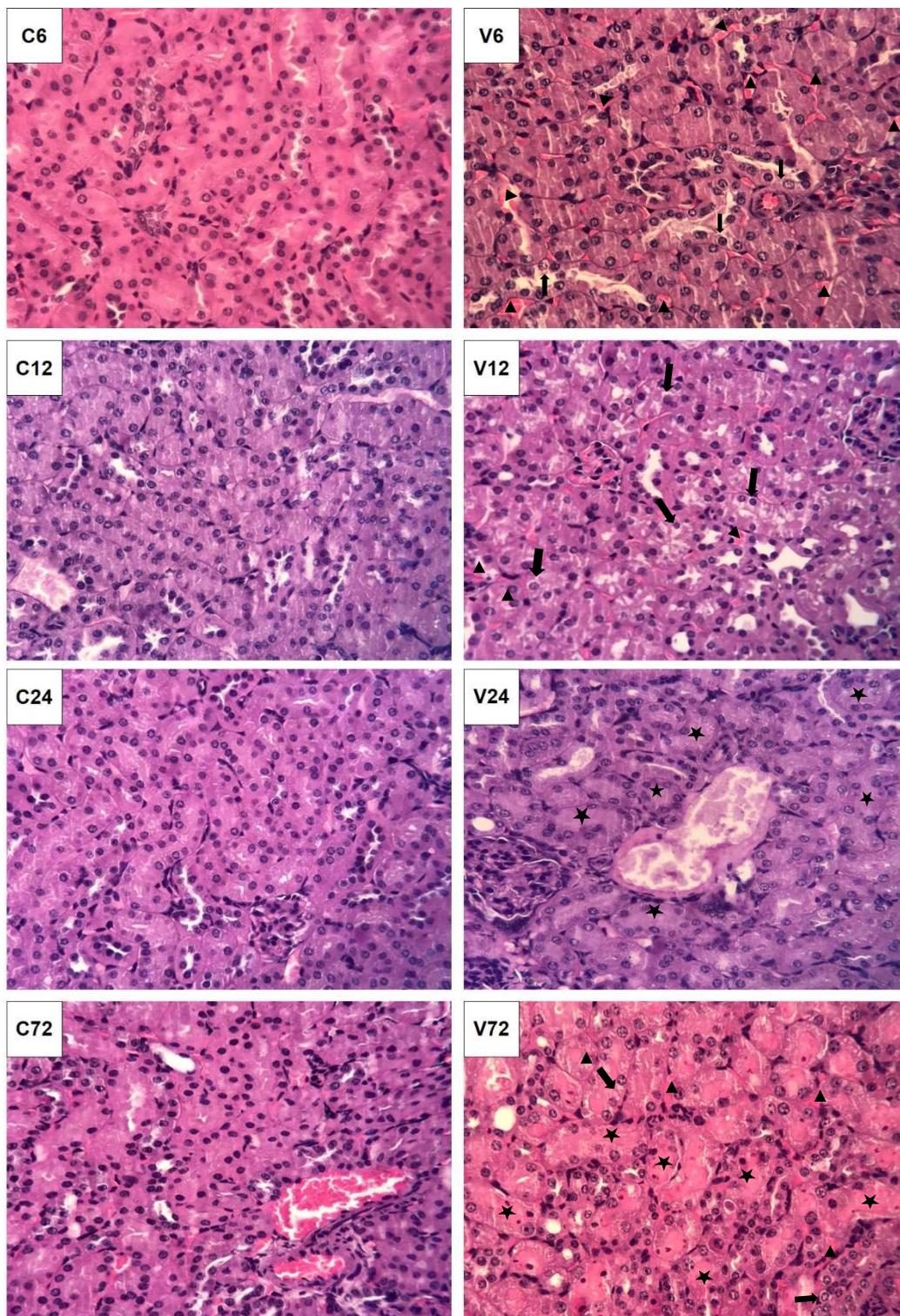
Fonte: Autor

5.7 Avaliação Histopatológica

As secções histológicas dos grupos controles de todos os tempos analisados evidenciaram estruturas glomerulares, arquitetura cortical e arquitetura medular preservadas. Observou-se, na maioria dos casos, leve tumefação do epitélio tubular, ectasia (dilatação tubular) e raros focos de hemorragia intersticial. Em relação aos grupos envenenados, os achados no tempo de 6 horas foram iguais aos do grupo controle. No tempo de 12 horas também se observou estruturas glomerulares preservadas, assim como a arquitetura cortical e medular. Na maioria dos casos observou-se leve tumefação do epitélio tubular, pequenos focos de vacuolização das células epiteliais tubulares, ductos dilatados, ectasia e raros focos de hemorragia intersticial. Já os animais do grupo envenenado por 24 horas evidenciaram estruturas glomerulares preservadas, porém com áreas de perda de arquitetura cortical. Foi observado, na maioria dos casos, marcante tumefação e

vacuolização do epitélio tubular (degeneração hidrópica), ductos dilatados, por vezes contendo acúmulos eosinofílicos luminais (degeneração hialina), degeneração de células epiteliais tubulares, além de focos de necrose tubular, ectasia e hemorragia intersticial. Quadro semelhante ocorreu com três animais no tempo de 72 horas, onde, apesar de evidentes estruturas glomerulares preservadas, observou-se perda de arquitetura cortical, marcante tumefação e vacuolização do epitélio tubular, ductos dilatados, por vezes contendo acúmulos amorfos luminais, degeneração de células epiteliais tubulares, além de focos de necrose tubular, ectasia e hemorragia intersticial (**Figura 5**).

Figura 5: Estudo de imagem qualitativo das alterações histológicas induzidas pelo veneno de *L. acrochorda* em tecido renal.



Fotomicrografia dos tecidos renais processados pela técnica de coloração hematoxilina-eosina nos tempos experimentais de 6, 12, 24 e 72 horas. Setas: correspondem a degeneração hidrópica; cabeças de seta: hemorragia intersticial; estrelas: degeneração hialina. Quadros do lado esquerdo: grupos controles; quadros do lado direito: grupos envenenados por *L. acrochorda*. Aumento total: 500x.

6 DISCUSSÃO

A escolha por esta via de administração intramuscular visou mimetizar o que ocorre em uma situação acidental, onde geralmente o veneno é injetado intramuscularmente e os membros inferiores são os locais mais acometidos (WARREL, 2010). A DL₅₀ IM de *Lachesis muta rhombeata* era a única disponível na literatura para uma espécie do gênero *Lachesis*. Atualmente, o teste de DL₅₀ é amplamente desencorajado, principalmente por motivos éticos e científicos. Esses testes causam sofrimento significativo ao animal e muitas vezes não refletem com precisão os efeitos que uma substância teria em humanos. Há uma crescente busca por métodos alternativos, como testes *in vitro* e modelagem computacional, que reduzam ou substituam o uso de animais nesses experimentos (RISPIN *et al.*, 2002; PARAMVEER *et al.*, 2010). Visto que a composição dos venenos das espécies pertencentes a este gênero possui uma alta conservação interespecífica (PLA *et al.*, 2013) e que calcular a DL₅₀ IM de *Lachesis acrochorda* demandaria um alto dispêndio de veneno e de animais, optou-se por testar valores iguais aos de doses subletais (25%, 50% e 75%) da DL₅₀ IM de *L. m. rhombeata*

No experimento para determinação da dose de trabalho, o grupo inoculado com a maior dose (38,25 mg/kg) do veneno de *L. acrochorda* apresentou alteração em dois dos três parâmetros analisados para se determinar a presença de injúria renal: creatinina sérica, ureia sérica e volume de urina de 24 horas, com aumento dos dois primeiros. Recentemente, o comitê da AKIN (*Acute Renal Injury Network* – Rede para a Injúria Renal Aguda) estabeleceu o diagnóstico de IRA como sendo uma abrupta (dentro de 48 horas) redução na função renal definida como um aumento na creatinina sérica de pelo menos 0,3 mg/dL (ou um aumento percentual de 50% ou mais) ou uma redução na formação de urina (oligúria registrada de < 0,5 mL/kg/h por um período maior que 6 horas) (MEHTA *et al.*, 2006). A IRA também está associada com a retenção de ureia (PALEVSKY; MURRAY, 2006). O grupo envenenado com a dose intermediária (25,5 mg/kg) apresentou alteração apenas de creatinina sérica, enquanto o grupo envenenado com a menor dose (12,75 mg/kg) não apresentou mudanças em nenhum dos parâmetros. Assim,

seguiu-se com a dose maior, de 38,25 mg/kg, para o experimento de avaliação do tempo de indução de IRA.

No curso do tempo, o veneno de *L. acrochorda* elevou os níveis séricos de creatinina em 12 e em 24 horas, enquanto os níveis de ureia elevaram-se logo em 6 horas, persistindo elevados em 12 e em 24 horas. Em 72 horas, houve reversão do aumento de ambos os parâmetros. O aumento das concentrações séricas de creatinina e ureia são comumente observadas após o envenenamento humano por *L. muta* (sic) (CREMONEZ *et al.*, 2016). Coágulos de fibrina podem ser os responsáveis por esta resposta observada nos grupos envenenados. De acordo com Lima e colaboradores (2009), o aumento da ureia é possivelmente o resultado da deposição de coágulos de fibrina nos rins, secundária à ação de serinoproteases trombina-símiles presentes no veneno laquétrico, que promovem a clivagem de trombina em fibrinogênio e coágulos de fibrina. O aumento da concentração de creatinina é usualmente acompanhada pelo aumento da ureia, sendo indicativo de diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). Pardal e colaboradores (2004), em um relato de caso de envenenamento humano por *L. muta* (sic), notaram um aumento de creatinina durante o primeiro dia após a picada, que retornou aos níveis normais depois disso, achado semelhante ao que ocorreu em camundongos neste estudo. Num estudo de envenenamento experimental por *L. m. rhombeata* por via IM em ratos, Cremonez e colaboradores (2016) encontraram aumento de ureia sérica em 1 e 6 horas após a inoculação do veneno, que não foi observada em 24 horas. Contudo, não observaram alterações na creatinina nos mesmos períodos.

O dano renal evidenciado pelas alterações nos parâmetros de creatinina e ureia séricas pode ser também consequência do depósito de mioglobina nos rins, visto que o veneno laquétrico é miotóxico, ou devido a períodos de hipotensão renal (DAMICO *et al.*, 2005; WHITE, 2010).

A miotoxicidade do veneno de *L. acrochorda* foi evidenciada pelo aumento sérico de creatina-quinase (CK) em 6 e 12 horas após o envenenamento. Não foi realizado estudo histológico do músculo afetado pela inoculação do veneno, apesar da evidente ferida que se notava no local da injeção. A rabdomiólise é associada com a liberação de mioglobina na circulação, que é livremente filtrada pelo glomérulo e forma cilindros nos

túbulos. Contudo, cilindros de mioglobina podem ser problemáticos de serem diagnosticados por microscopia óptica e podem ser confundidos com cilindros paraprotéicos. Seria necessário a marcação por imuno-histoquímica para o diagnóstico positivo da presença de cilindros de mioglobina (LIAPIS *et al.*, 2016), o que não foi realizado neste estudo.

Um menor aporte de volume sanguíneo para o rim (hipotensão renal) pode ter influenciado negativamente a TFG nas primeiras horas após a inoculação do veneno e explicar a retenção de produtos metabólicos (creatinina e ureia). A diminuição da creatinina urinária no tempo de 24 horas está em consonância com a retenção sanguínea no mesmo período. Contudo, o *clearance* de creatinina, parâmetro indicativo da TFG, não pôde ser mensurado no tempo de 6 horas, insuficiente para o acúmulo de urina, nem no tempo de 12 horas, onde os animais envenenados não urinaram. Nos tempos de 24 e de 72 horas, não foi observado influência do envenenamento sobre o volume de urina e, conseqüentemente, do *clearance* de creatinina, que depende deste parâmetro.

A necessidade de inclusão do volume de urina como um critério de diagnóstico para IRA é baseada no conhecimento de que, em pacientes criticamente enfermos, este parâmetro geralmente prediz a disfunção renal antes de elevações da creatinina sérica. Entretanto, especialistas da área de nefrologia dizem que este critério não é específico o suficiente para seguramente resultar em uma diagnóstico de IRA. Fatores como o estado de hidratação e presença de obstruções podem influenciar o volume urinário, assim sendo necessário considerar o contexto clínico. Adicionalmente, a medição acurada do volume de urina pode não ser de fácil disponibilidade em alguns casos, principalmente em pacientes que não estão em unidades de terapia intensiva. Assim, o valor deste parâmetro como um critério independente para o diagnóstico de IRA ainda precisa de validação (MEHTA *et al.*, 2007).

A proteinúria é considerada um marcador importante na progressão da fibrose renal e desenvolvimento de doença renal crônica (DRC), especialmente em casos de envenenamento por serpentes do gênero *Lachesis*. Quando proteínas que normalmente não deveriam passar pelo sistema de filtração glomerular aparecem na urina, isso indica uma disfunção no sistema de

filtração do rim, particularmente nos podócitos e na membrana basal glomerular. Essa condição contribui para a sobrecarga de proteínas nos túbulos renais, o que pode provocar inflamação e danos nas células tubulares, ativando um processo inflamatório e fibrinogênico nos rins. A longo prazo, esses danos induzem a ativação de fibroblastos e a deposição excessiva de matriz extracelular, resultando na formação de cicatrizes e fibrose, que compromete a função renal e favorece o desenvolvimento de DRC (KUUSNIEMI *et al.*, 2005).

No contexto de envenenamento por *Lachesis*, o veneno pode desencadear danos diretos aos tecidos renais, promovendo necrose tubular aguda e exacerbação da proteinúria. A exposição prolongada a esses danos aumenta o risco de fibrose, o que pode progredir para uma doença renal crônica. A proteinúria, nesse caso, não apenas marca o dano inicial, mas também pode agravar a lesão renal ao induzir inflamação intersticial e acelerar o ciclo de lesão-fibrose (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006).

Estudos mostram que, à medida que a fibrose avança, há uma redução na capacidade regenerativa dos túbulos renais, o que leva a um declínio funcional irreversível, culminando em doença renal crônica (SITPRIJA, 2006). No desenho experimental deste estudo, um aumento dos níveis de proteína urinária foi verificado 72 horas após o envenenamento, não sendo possível afirmar se houve recuperação após esse período.

A presença de colágeno do tipo IV na membrana basal da parede capilar glomerular restringe a filtração da maioria das proteínas presentes no plasma, criando uma permeabilidade seletiva com base no tamanho da molécula e na sua carga elétrica (o glomérulo capilar é negativamente carregado, portanto impeditivo da passagem de proteínas com a mesma carga negativa, como a albumina). Proteínas de peso molecular menor e positivamente carregadas que passam pela parede capilar do glomérulo são quase que completamente reabsorvidas por células epiteliais tubulares. Esta reabsorção ocorre principalmente no túbulo contorcido proximal e possui uma taxa máxima de transporte, podendo ocorrer proteinúria se este máximo é excedido. Na injúria nefrotóxica, o dano às células epiteliais tubulares também promove proteinúria. Além disso, a diminuição da reabsorção das proteínas filtradas pode ser devida a alguma patologia túbulo-intersticial. Em alguns casos, a proteinúria túbulo-

intersticial pode ser acompanhada de aumento da excreção de eletrólitos (GRAUER, 2011), exatamente como foi observado neste estudo, com aumento da fração excreção de Na^+ e Cl^- , e de proteína urinária coincidindo em 72 horas. A patologia túbulo-intersticial foi evidenciada na análise histológica, com marcante tumefação e vacuolização do epitélio tubular, degeneração de células epiteliais tubulares, além de focos de necrose tubular e hemorragia intersticial no mesmo período.

A proteinúria observada em envenenamentos também pode estar associada a alterações glomerulares. Boer-Lima e colaboradores (2002) demonstraram que o veneno de *Bothrops moojeni* induz mesangiólise e alterações da membrana basal glomerular e da matriz mesangial, juntamente com proteinúria. O que não parece ter sido o caso do veneno de *L. acrochorda*, já que a análise histológica evidenciou estruturas glomerulares preservadas em todos os grupos analisados.

As células epiteliais tubulares são os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos de serpentes (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012). Alterações a nível de transcrição gênica no tecido renal encontradas neste estudo foram indicativas do dano tubular evidenciado pelo aumento da proteinúria e da fração de excreção de eletrólitos, e pelos distúrbios histopatológicos. A expressão relativa de RNA mensageiro de KIM-1 elevou-se em 12, 24 e 72 horas após a inoculação do veneno de *L. acrochorda*. O KIM-1 é expresso principalmente nos túbulos proximais após lesão renal e está relacionado com a regeneração e apoptose celular. Sua elevação sugere um dano renal tubular ativo, caracterizando uma resposta a uma agressão recente, como o envenenamento. NGAL, por outro lado, é liberado tanto nos túbulos quanto por células imunológicas durante a inflamação renal. A inoculação do veneno também provocou aumento da expressão relativa de NGAL no tecido renal em todos os tempos analisados. Esta molécula encontra-se suprarregulada em resposta a isquemia renal ou lesão nefrotóxica e parece ter atividade protetora no rim, limitando o dano renal (RONCO *et al.*, 2010). Além disso, em uma meta-análise de 19 estudos incluindo mais de 25 mil pacientes, verificou-se que os níveis séricos e urinários de NGAL conseguiram ter valor diagnóstico para IRA (HAASE *et al.*, 2009).

A elevação persistente do KIM-1 e NGAL 72 horas após o envenenamento sinaliza que o processo de lesão ainda está em andamento, mesmo que não haja outros sinais clínicos evidentes, o que justifica a suspeita de IRA progressiva (ZHANG *et al.*, 2016). Isso é especialmente importante porque a persistência de níveis elevados de KIM-1 e NGAL está correlacionada com um maior risco de evolução para doença renal crônica, caso o dano não seja revertido rapidamente. Ambos os marcadores são indicativos precoces de danos nos túbulos renais, que ocorrem antes do aumento de creatinina sérica, considerado um marcador tradicional de função renal (SONI *et al.*, 2010; BEKER *et al.*, 2013).

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória sintetizada pelas células do túbulo contorcido distal, em situações de lesão, como um precursor inativo de 23 kDa e cai no fluido tubular depois de ativada, sendo um preditor menos específico de IRA em comparação a NGAL quando quantificados em urina (GAN; ZHOU, 2018). Contudo, neste estudo, a expressão relativa do RNA mensageiro de IL-8 diminuiu 12 e 24 horas após o envenenamento. Este achado vai de encontro ao estudo de Reyes (2017), onde o veneno de *Bothrops ayerbei* elevou a expressão relativa de IL-18 em tecido renal de ratos 24 horas após o envenenamento.

A diminuição da expressão da IL-18 após 12 horas de envenenamento pode estar relacionada a várias respostas fisiológicas. No contexto de lesão renal, especialmente após uma agressão aguda como o envenenamento, a expressão de IL-18 tende a aumentar como parte da resposta inflamatória inicial. No entanto, após as primeiras horas, o organismo pode iniciar mecanismos regulatórios para atenuar a inflamação e evitar danos adicionais. A redução na expressão de IL-18 pode ser uma estratégia para controlar a extensão da inflamação e limitar danos teciduais severos, incluindo a progressão para fibrose renal. Isso ocorre especialmente porque a IL-18 está associada à polarização de macrófagos para o fenótipo M1, pró-inflamatório, e sua atividade prolongada poderia exacerbar o dano renal, contribuindo para a lesão crônica. Adicionalmente, em diversos modelos de IRA, a modulação da via do inflamassoma, que ativa IL-18, é crítica para o controle da resposta inflamatória. A diminuição na expressão pode refletir um ajuste do organismo

para evitar uma ativação excessiva da resposta imune que pode levar a danos renais permanentes (SCHIRMER *et al.*, 2015).

De forma geral, a redução do fluxo sanguíneo renal induzido por toxinas de venenos induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias que são fundamentais no desenvolvimento da nefropatia, tais como a IL-1 β , sintetizada pelas células mesangiais do glomérulo (FINN, PORTER, 2003; SITPRIJA, 2008). O veneno de *L. acrochorda* elevou a expressão relativa de IL-1 β apenas no tempo 6 horas, e a posterior infrarregulação da expressão de IL-18 sugere a ativação de algum mecanismo anti-inflamatório compensatório.

Em vista da possibilidade de envolvimento de dano isquêmico no dano renal ocasionado pelo veneno de *L. acrochorda*, investigou-se o envolvimento do estresse oxidativo no possível dano de isquemia e reperfusão.

Em situações de anaerobiose, ocorre um desequilíbrio na formação de radicais livres, que é acentuado pela reperfusão sanguínea. A formação de radicais livres causa danos nas células pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são metabólitos parcialmente reduzidos de moléculas de oxigênio, possuindo maior reatividade. O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre EROs e mecanismos antioxidantes, resultando em dano oxidativo de proteínas, lipídios e DNA (COSTA *et al.*, 2016).

O nível de peroxidação lipídica nos rins foi avaliado através da dosagem de MDA e não apresentou alterações em nenhum dos tempos experimentais analisados. Quando se avaliou os níveis de expressão relativa de TIMP-2 no tecido renal, verificou-se que o veneno induziu uma diminuição nos tempos de 12 e 24 horas, que foi acompanhada de uma redução no mesmo tempo dos níveis de SOD1s. Ambas são enzimas relacionadas a mecanismos de proteção contra injúria.

O TIMP-2, quando dosado na urina, foi recentemente identificado como um biomarcador precoce associado a IRA (KASHANI *et al.*, 2013). Esta molécula pode aumentar em resposta a uma variedade de insultos (inflamação, estresse oxidativo, radiação ultravioleta, drogas e toxinas). Isto pode explicar o porquê de ela corresponder a risco de IRA, uma síndrome conhecida por suas múltiplas etiologias, até em um mesmo paciente. Contudo, tais insultos não necessariamente destroem as células, e o TIMP-2 parece ser capaz de sinalizar de uma maneira autócrina e parácrina (KELLUM; CHAWLA, 2016).

Dessa forma, a diminuição de TIMP-2 em fases agudas de lesão, como após 12 horas de envenenamento, pode ser uma estratégia do organismo para favorecer a degradação de estruturas danificadas e facilitar o processo de inflamação, antes que a reparação e a estabilização da matriz extracelular ocorram. Essa diminuição, se não for restaurada nos estágios posteriores, pode predispor o rim à progressão para lesão renal crônica, uma vez que a regulação inadequada da matriz extracelular pode levar à fibrose e à disfunção renal prolongada (MADRIGAL, *et al.*, 2017; STRANSKY, *et al.*, 2018).

Estudos experimentais demonstraram redução da atividade de SOD na injúria renal aguda (COSTA *et al.*, 2016). Já Vaziri e colaboradores (2003) mostraram que a atividade de SOD estava reduzida em rins de ratos submetidos a nefrectomia.

No presente estudo, a expressão relativa de SOD2m não se alterou em nenhum dos tempos analisados. Contudo, a SOD1s é o membro mais abundante da família de enzimas antioxidantes, representando aproximadamente 90% das SODs (NOOR; MITTAL; IQBAL, 2002). Assim, os resultados deste trabalho com a SOD estão condizentes com outros estudos.

A expressão gênica da SOD2m não ter sido alterada em nenhum dos tempos estudados pode ser explicada por vários fatores, refletindo a complexa resposta celular a estresses oxidativos e danos comumente ocorridos na IRA. A estabilidade na expressão de SOD2m pode indicar uma resposta adaptativa das mitocôndrias, onde a produção de SOD2m é mantida estável para garantir a neutralização contínua de superóxidos, independentemente da agressão inflamatória ou oxidativa provocada pelo veneno. Um outro fator importante é que a resposta imediata ao envenenamento pode não induzir um aumento significativo na produção de EROs a ponto de desencadear um aumento na expressão de SOD2m. Se a quantidade de EROs geradas for controlada ou se outros mecanismos antioxidantes (enzimas como catalase e peroxidase) estiverem ativos, a necessidade de aumentar SOD2m pode ser desnecessária. É válido ressaltar que a regulação da expressão gênica de SOD2m também está sujeita a modificações epigenéticas que não resultam em mudanças na transcrição do gene, mas que ainda mantêm a funcionalidade da proteína (YANG *et al.*, 2006).

Na via oposta da diminuição da expressão relativa de RNA mensageiro de SOD1s e TIMP-2, a expressão de GSR é aumentada em dois momentos distintos: em 6 e em 24 horas após a inoculação do veneno de *L. acrochorda*. A GSR está presente nas células de praticamente todos os tecidos e, juntamente com a SOD, faz parte do sistema antioxidante. Vários estudos demonstraram uma depleção nos níveis de GSR e um aumento nos níveis de SOD em homogenatos de órgãos de animais experimentalmente envenenados (SANTHOSH *et al.*, 2013). Neste estudo, ao contrário, a indução do sistema de defesa enzimático ante a exposição ao veneno de *L. acrochorda*, como uma resposta compensatória ou adaptativa da célula na tentativa de se recuperar do dano, deu-se através do aumento de expressão de GSR.

A ativação de vias de sinalização que regulam a expressão de genes antioxidantes pode ocorrer independentemente da presença de peroxidação lipídica. Fatores de transcrição como o Fator Nuclear E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que induz a expressão de enzimas antioxidantes, podem ser ativados em resposta a estressores, promovendo a expressão de SOD1s e GSR como parte de um mecanismo de defesa redox, mesmo que os níveis de estresse oxidativo não sejam suficientemente altos para causar dano celular significativo (KARNATI, *et al.*, 2013). Essas informações encontradas na literatura corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa, uma vez que ocorreu aumento significativo na expressão gênica de GSR, porém não houve resultados significativos na análise de MDA. É válido relatar que a análise de MDA geralmente reflete danos resultantes de estresse oxidativo, mas o aumento na expressão de enzimas como SOD1s e GSR pode indicar que as células estão respondendo em uma fase inicial de dano, onde ainda não houve tempo suficiente para que a peroxidação lipídica se acumule (KIM *et al.*, 2017).

Em um passo além dado por este estudo, foi realizada uma análise metabolômica não enviesada para identificar as principais alterações de metabólitos na urina durante a progressão da IRA. A análise metabolômica é caracterizada pela não seleção antecipada de potenciais alvos de interesse (dessa forma, não enviesada). O metaboloma é então constituído por todo o conjunto de compostos de baixo peso molecular (metabólitos) presente em um fluido biológico, como a urina. O metaboloma fornece uma visão global da resposta final do organismo, refletindo mudanças que melhor se correlacionam

com estados de ativação ou supressão de vias metabólicas (LORENZO *et al.*, 2018).

Na análise do efeito do veneno de *L. acrochorda* sobre o perfil de metabólitos urinários, optou-se por avaliar apenas as urinas coletadas a cada 24 horas dos animais envenenados por 72 horas, e a urina coletada 24 horas antes da inoculação do veneno foi tomada como controle. Dessa forma, foi possível acompanhar a variação do perfil de componentes da urina no curso do tempo dos mesmos animais. Neste estudo, o melhor perfil distinguido pela análise dos componentes principais foi encontrado para os metabólitos urinários no tempo de 24 horas após a inoculação do veneno, sendo creatina, creatinina, taurina, betaína, α -glicose e alantoína as substâncias responsáveis por este comportamento. Este fato nos fez identificar que o impacto do veneno no perfil metabólico da urina do animal ocorreu nas primeiras 24 horas e que, após esse momento (48 e 72 horas), o perfil espectral da urina voltou a ser similar àquele observado nos animais antes do envenenamento (hora zero).

Os metabólitos identificados no tempo de 24 horas desempenham papéis cruciais no metabolismo energético e na regulação do estresse oxidativo. O aumento ou a diminuição desses metabólitos pode refletir processos celulares como a degradação de proteínas, o metabolismo energético e a resposta inflamatória. O retorno do perfil espectral da urina ao estado semelhante ao do controle após 48 e 72 horas sugere que, embora houvesse uma resposta aguda, o organismo dos camundongos pode ter ativado mecanismos compensatórios para restaurar a homeostase. Isso sugere uma adaptação rápida e pode indicar a eficácia dos mecanismos de defesa renal contra o estresse induzido pelo veneno (ARJMAND *et al.*, 2015).

A análise metabolômica é uma ferramenta poderosa em pesquisas biomédicas sobre IRA, proporcionando uma visão abrangente das alterações bioquímicas que ocorrem em resposta a insultos (PORTILLA; SCHNACKENBERG; BEGER; 2007). A importância dessa abordagem se destaca pela identificação dos biomarcadores, com o intuito de compreender melhor os mecanismos patológicos envolvidos com a nefropatia estudada, a possibilidade de cronicidade e o desenvolvimento de intervenções terapêuticas direcionadas que possam mitigar os efeitos lesivos renais (JOURET *et al.*, 2016; CHIHANGA *et al.*, 2018). Em uma perspectiva clínica, os indicadores

metabólicos encontrados neste estudo podem ser futuramente explorados para ajudar a estabelecer quais as alterações metabólicas que ocorrem conjuntamente com a IRA induzida por picada de serpentes e até associá-las à severidade da lesão.

De maneira geral, o veneno de *L. acrochorda* alterou de modo transiente os marcadores séricos convencionais de disfunção renal (creatinina e ureia), possivelmente devido a um menor aporte de fluxo sanguíneo nas primeiras horas após o envenenamento e obstrução por deposição de coágulos de fibrina resultantes da conhecida coagulopatia do veneno, mas não suficiente para causar um dano na estrutura glomerular. Os animais apresentaram uma anúria inicial que foi revertida, e, após a reversão, a grande variabilidade dos valores de urina entre os indivíduos não evidenciou influência do envenenamento sobre o volume de urina e o *clearance* de creatinina. Apesar de alguns se apresentarem alterados, estes marcadores convencionais apenas identificaram a injúria renal estabelecida, mas não deram pistas sobre os mecanismos fisiopatológicos. Propõe-se que a proteinúria foi secundária ao dano do epitélio celular tubular, evidenciado pela análise histopatológica, pela diminuição do transporte de eletrólitos, e pelo aumento da expressão de RNA mensageiro de genes relacionados a injúria celular (KIM-1 e NGAL), que foi persistente até 72 horas. Num prosseguimento deste estudo, grupos experimentais com maior tempo de envenenamento poderiam indicar a persistência desses achados. O aumento de CK sugere que há um provável envolvimento de rabiólise e consequente deposição de mioglobina na lesão tubular, que poderá ser confirmado futuramente por imunohistoquímica. Foi interessante notar a reversão do aumento da transcrição de gene relacionado a inflamação (IL-1 β) e até a infrarregulação de outro gene pró-inflamatório (IL-18). Interessante notar também que a suprarregulação da transcrição de GSR foi o mecanismo antioxidante ativado; e a infrarregulação de SOD1s e TIMP-2 como resposta adaptativa ao estresse sofrido.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o envenenamento experimental por *Lachesis acrochorda* promove alterações de parâmetros convencionais de função renal, assim como de novos marcadores relacionados à injúria renal aguda (IRA), que permitem propor o mecanismo a seguir.

Em um primeiro momento, o veneno promove dano muscular, retenção sérica de resíduos metabólicos e anúria, os quais são revertidos. O veneno gera um dano tecidual tubular, com envolvimento de estresse oxidativo, que resulta tardiamente em proteinúria e compromete a reabsorção de eletrólitos. Ademais, o veneno também ocasiona uma alteração transitória do perfil de metabólitos da urina.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 2974-2984, 2006.
- ALIROL, E. *et al.* Snake bite in South Asia: a review. **PLoS Neglected Disease**, v. 4, n. e603, 2010.
- ALVES, C. D. **Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Lachesis muta***. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- ARJMAND, M. *et al.* NMR-based metabolomics survey in rats envenomed by *Hemiscorpius lepturus* venom. **Toxicon**, v. 94, p. 16-22, 2015.
- BAILLY, V. *et al.* Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 39739 – 39748, 2002.
- BEKER, B. M. *et al.* Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. **International urology and nephrology**, v. 50, p. 705-713, 2018.
- BELLOMO, R. *et al.* Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Critical Care**, v. 8, n. R204 – R212, 2004.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bohtrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, p. 217 – 222, 2002.
- BOLAÑOS, R.; ROJAS, R.; ULLA FLORES, C. E. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordedura de serpiente por *Lachesis muta* (Ophidia: Viperidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 30, p. 53-58, 1982.
- BONVENTRE, J. V.; WEINBERG, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 199 – 210, 2003.
- BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney International**, v. 66, p. 480 – 485, 2004.
- 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, p. 1033 – 1046, 2017.
- CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snakebite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, p. 739 – 758, 2011.

CALVETE, J. J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, v. 75, p. 44 – 66, 2013.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venoms disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063 – 1074, 2005.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of The Western Hemisphere**. New York: Cornell University, 2004. 2 v.

CASTRILLÓN-ESTRADA, D. F. *et al.* Envenenamiento ofídico. **Salud Uninorte**, v. 23. p. 96 – 111, 2007.

CHIHANGA, T. *et al.* NMR-based urine metabolic profiling and immunohistochemistry analysis of nephron changes in a mouse model of hypoxia-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 315, n. 4, p. F1159-F1173, 2018.

CHIPPAUX, J. P. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. **Toxicon**, v.27, p. 586 – 599, 2011.

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

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

COLOMBIA. Instituto Nacional de Salud. **Accidente ofídico – Colombia, 2017**. Bogotá, 2018. 16 p.

COLOMBIA. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia de Accidente Ofídico. Bogotá, 2010. 21 p.

COSTA, N. A. *et al.* Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury. **Annals of Intensive Care**, v. 6, n. 95, 2016.

CREMONEZ, C. M. *et al.* Experimental *Lachesis muta rhombeata* envenomation and effects of soursop (*Annona muricata*) as natural antivenom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, n. 22, 2016.

CUMMINGS, J. J. *et al.* Intraoperative prediction of cardiac surgery-associated acute kidney injury using urinary biomarkers of cell cycle arrest. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, 2018.

DAMICO, D. C. S. *et al.* Neurotoxic and myotoxic actions of *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon**, v. 46, p. 222 – 229, 2005.

DE BOLD, A. J. *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, p. 89 – 94, 1981.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51 – 78, 2007.

DIXON, R. W.; HARRIS, J. B. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 55, p. 1230 – 1237, 1996.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Reptile C-Type Lectins. *In*: MACKESSY, S. P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 359-375.

DUNN, W. B. Systems levels studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 387 – 426, 2011.

DUQUE, A. M. H.; CORRALES, G. First report of the reproduction in captivity of the Chocoan Bushmaster, *Lachesis acrochorda* (García, 1896). **Herpetology Notes**, v. 8, p. 315 – 320, 2015.

ESCALANTE, T. *et al.* Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1781 – 1794, 2011.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiating of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, p. 347 – 349, 1965.

FINN, W. F.; PORTER, G. A. Urinary biomarkers and nephrotoxicity. *In*: DE BROE, M. E. (Ed.) **Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 621 – 655.

FOX, J.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969 – 985, 2005.

FRY, B. G. *et al.* The toxigenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animals venom. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 483 – 511, 2009.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232 – 241, 2014.

GAN, J.; ZHOU, X. Comparison of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 in prediction of acute kidney injury in adults. **Medicine**, n. e12570, 2018.

GARCÍA, A. F. *et al.* Caracterización de los casos de accidente ofídico atendidos por el Centro de Información y Estudio de Medicamentos y Tóxicos (CIEMTO) de Medellín, Colombia durante 2016. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, v. 49, n. 3, 2017.

GEERING, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 2, p. F241-F250, 2006.

GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion and Animal Medicine**, v. 26, p. 121 – 127, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223 – 1235, 2010.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLOS Medicine**, v. 3, n. e150, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease 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. **Intensive Care Medicine**, v. 54, p. 1012 – 1024, 2009.

HABIB, A. G. *et al.* Envenoming after carpet viper (*Echis ocellatus*) bite during pregnancy: timely use of effective antivenom improves maternal and foetal outcomes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, p. 1172 – 1175, 2008.

HABIB, A. G. *et al.* Snakebite is under appreciated: appraisal of burden from West Africa. **PLoS Neglected Disease**, v. 9, n. e0004088, 2015.

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

HARRISON, R. A. *et al.* Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Neglected Diseases**, v. 3, n. e569, 2009.

HERGET-ROSENTHAL, S. *et al.* Proteomic biomarkers for the early detection of Acute Kidney Injury. **Prilozi**, v. 33, p. 27 – 48, 2012.

HO, P. L. *et al.* Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, p. 144 – 149, 1997.

HSIANG, A. Y. *et al.* The origin of snakes: revealing the ecology, behavior and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 87, 2015.

HULIN, A.; OCH, O. A.; DESBORDES, J. M. Envenimations par des cotralides em Guyana Française. **Medicine d'Afrique Noire**, v. 29, p. 249 – 255, 1982.

HVIDBERG, V. *et al.* The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. **FEBS Letters**, v. 579, p. 773 – 777, 2005.

JAIN, K. **The Handbook of Biomarkers**. Springer, New York, 2010. 188 p.

JIMÉNEZ, N. *et al.* Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 2421 – 2428, 2008.

JORGE, M. T. *et al.* Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. **Toxicon**, v. 35, p. 545 – 554, 1997.

JOURET, F. *et al.* Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of mouse kidney, urine and serum following renal ischemia/reperfusion injury. **PloS One**, v. 11, n. 9, p. e0163021, 2016.

KARNATI, S. *et al.* Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. **Histochemistry and cell biology**, v. 140, p. 105-117, 2013.

KASHANI, K. *et al.* Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. **Critical Care**, v. 17, n. 25, 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. e218, 2008.

KELLUM, J. A.; CHAWLA, L. S. Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, p. 16 – 22, 2016.

KELLUM, J. A. *et al.* Developing a consensus classification system for acute renal failure. **Current Opinion in Critical Care**, v. 8, p. 509 – 514, 2002.

KIM, Y. S. *et al.* Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 86, 2017.

KINI, R. M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1133 – 1145, 2005.

KINI, R. M.; KOH, C. Metalloproteinases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins (Basel)**, v. 8, n.10, p. 284, 2016.

KRISHNAN, S. M. *et al.* IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? **British Journal of Pharmacology**, v.171, n. 24, p. 5589 – 5602, 2014.

KUUSNIEMI, A. *et al.* Kidneys with heavy proteinuria show fibrosis, inflammation, and oxidative stress, but no tubular phenotypic change. **Kidney international**, v. 68, n. 1, p. 121-132, 2005.

LIMA, M.E. *et al.* **Animal toxins: state of the art - perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009, 800p.

LIAPIS, H. Myoglobin casts in renal biopsies: immunochemistry and biological spectrum. **Human Pathology**, v. 54, p. 25 – 30, 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)). **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LORENZO, M. M. *et al.* Urine metabolomics insight into acute kidney injury point to oxidative stress disruptions in energy generation and H₂S availability. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, p. 1399 – 1409, 2018.

MADRIGAL, M. *et al.* Cross-reactivity, antivenomics, and neutralization of toxic activities of *Lachesis* venoms by polyspecific and monospecific antivenoms. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005793, 2017.

MADRIGAL, M. *et al.* Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 280-297, 2012.

MEHTA, R. L. *et al.* AKIN: Acute Kidney Injury Network: report of a initiative. In: **AKIN Summit**. Amsterdam: AKIN Comm, 2006.

MEHTA, R. L.; CHERTOW, G. M. Acute renal failure definitions and classification: time for change? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p. 2178 – 2187, 2003.

MEHTA, R. L. *et al.* Acute Kidney Kidney Network: report of a initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Critical Care**, v. 11, n. R31, 2007.

MERCHANT, M. R. *et al.* Clinicopathological study of acute renal failure following viperine snake bite. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 37, p. 430 – 433, 1989.

MILLER, R. C. *et al.* Comparison of specific gravity and creatinine for normalizing urinary reproductive hormone concentrations. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 924 – 932, 2004.

MOHAPATRA, B. *et al.* Snakebite mortality in India: a nationally representative mortality survey. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. e1018, 2011.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2897 – 2912, 2008.

MORAN, S. M.; MYERS, B. D. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. **Kidney International**, v. 27, p. 928 – 937, 1985.

NOOR, R., MITTAL, S., IQBAL, J. Superoxide dismutase – applications and relevance to human diseases. **Medical Science Monitor**, v. 8, p. 210 – 215, 2002.

NÚCLEO SERRO GRANDE. **Surucucu e os rins**. Disponível em: <<http://lachesisbrasil.blogspot./2013/09/surucucu-e-os-rins.html>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

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

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38388 – 38393, 2001.

OTERO PATINO, R. *et al.* Bites from the bushmaster (*Lachesis muta*) in Antioquia and Choco, report of five accidents (Abstract). **Toxicon**, v. 31, p. 97-179, 1993.

PALEVSKY, P. M.; MURRAY, P. T. Acute kidney injury and critical care nephrology. **Nephrology Self-Assessment Program**, v. 5, p. 72-120, 2006.

PARAMVEER, S. D. *et al.* Effective alternative methods of LD50 help to save number of experimental animals. **CABI Databases**. 2010.

PARDAL, P. P *et al.* Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 28 – 42, 2004.

PARK, J. T. Postoperative acute kidney injury. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 70, n.3, p. 258 – 266, 2017.

PELANTOVÁ, H. *et al.* Strategy for NMR metabolomic analysis of urine in mouse models of obesity— from sample collection to interpretation of acquired data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 225–235, 2015.

PETERS, J. A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the Neotropical Squamata: Part 1, Snakes. **Bulletin - United States National Museum**, v. 297, p. 1 – 347, 1970.

PINHO, F. M. O.; ZANETTA, D. M. T.; BURDMANN, E. A. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. **Kidney International**, v. 67, p. 659 – 667, 2005.

PINHO, F. M. O.; ZANETTA, D. M. T.; BURDMANN, E. A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. In: **Seminars in Nephrology**. WB Saunders, 2008. p. 354-362.

PLA, D. *et al.* Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence of high compositional and immunological across *Lachesis*. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 112-123, 2013.

PORTILLA, D.; SCHNACKENBERG, L.; BEGER, R. D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury. **Seminars in Nephrology**, v. 27, n. 6, p. 609 – 620, 2007.

PRAŽIENKOVÁ, V. *et al.* Impact of novel palmitoylated prolactin-releasing peptide analogs on metabolic changes in mice with diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 12, p. 1-23, 2017.

PYRON, R.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 93, 2013.

RANGEL, V. N. *et al.* Development of a sensitive enzyme immunoassay (ELISA) for specific identification of *Lachesis acrochorda* venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18(2), p.173-179, 2012.

REYES, M. A. V. **Biomarcadores precoces da injúria renal no envenenamento experimental induzido pela serpente colombiana *Bothrops ayerbei* em ratos.** 2017. (Dissertação) – Mestrado em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RIPA, D. Keys to understanding the bushmaster (genus *Lachesis* Daudin 1803). **Bulletin of the Chicago Herpetology Society**, v. 34, p. 45 – 92, 1999.

RIPA, D. **The Bushmasters (Genus *Lachesis*, Daudin 1803): Morphology in Evolution and Behavior.** Wilmington: Ripa Ecologica, 2006. 1 CD-ROM.

RISPIN, A. *et al.* Alternative methods for the median lethal dose (LD50) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. **ILAR journal**, v. 43, n. 4, p. 233-243, 2002.

ROBERTS, L. D. *et al.* Targeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. 30.2, 2012.

RONCO, C. *et al.* Oliguria, creatinine and others biomarkers of acute kidney injury. **Contributions to Nephrology**, v. 164, p. 118 – 127, 2010.

ROSENTHAL, R. *et al.* Intestinal ischemia after bushmaster (*Lachesis muta*) snakebite – a case report. **Toxicon**, v. 40, p. 217 – 220, 2002.

RUCAVADO, A. *et al.* Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom: toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, p. 123 – 131, 2005.

SANTHOSH, M. S., *et al.* Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: A therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflammation Research**, v. 62, p. 721–731, 2013.

SANZ, L. *et al.* Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 40 – 60, 2008.

SCHIRMER, B. *et al.* Deletion of IL-18 expression ameliorates spontaneous kidney failure in MRLlpr mice. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140173, 2015.

SCHRIER, R. M. *et al.* Acute renal failure: definition, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 5 – 14, 2004.

SEO, T. *et al.*, Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupt cell-cell adhesions *in vitro* and induces haemorrhage *in vivo*. **The FEBS Journal**, v. 284, p. 1657 – 1671, 2017.

SERRANO-CONTRERAS, J. I. *et al.* NMR-based metabolomic analysis of normal rat urine and faeces in response to (\pm)-venlafaxine treatment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 123, n. 10, p. 82-92, 2016.

SILVA-HAAD, J. Accidentes humanos por las serpientes de los generos *Bothrops* y *Lachesis*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 44/45, p. 403 – 423, 1981.

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. Nature clinical practice. **Nephrology**, v. 4, p. 616–27, 2008.

SITPRIJA, V. Snakebite Nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442 – 448, 2006.

SITPRIJA, V. SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60, p. 943 – 953, 2012.

SMITH, J. *et al.* Malignancy in chronic ulcers and scars of the leg (Majorlin's ulcer): a study of 21 patients. **Skeletal Radiology**, v. 30, p. 331 – 337, 2001.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. A new subspecies of the bushmaster, *Lachesis muta*, from the southeastern Costa Rica. **Journal of Herpetology**, v. 20, p. 463 – 466, 1986.

SONI, S. S. *et al.* NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. **International urology and nephrology**, v. 42, p. 141-150, 2010.

STRANSKY, S. *et al.* In vitro assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta muta* snake venom. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006427, 2018.

TIMOSHANKO, J. R. *et al.* Contributions of IL-1beta and IL-1alpha to crescentic glomerulonephritis in mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 4, p. 910 – 918, 2004.

TURNER, E.; CARMICHAEL, R.; DE SOUZA, R. Dialogues on the Tao of *Lachesis*. **Bulletin of Chicago Herpetology Society**, v. 43, p. 157 – 164, 2008.

VAIDYA, V. S.; BONVENTRE, J. V. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.2, p. 697 – 713, 2006.

VAIDYA, V. S.; FERGUSON, M. A.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 463 – 493, 2008.

VAN, Q. N.; VEENSTRA, T. D.; ISAAQ, H. J. Metabolic profiling for the detection of bladder cancer. **Current Urology Reports**, v. 12, p. 34 – 40, 2011.

VAZIRI, N. D. *et al.* Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. **Kidney International**, v. 63, n. 1, p. 179 – 185, 2003.

VELLARD, J.A. El veneno de *Lachesis muta* (L.). **Publicaciones del Museo de Historia Natural "Javier Prado" UNMSM. Serie A. Zoología**, v. 1, p. 1 – 60, 1948.

VINK, S. *et al.* Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon**, v. 59, p. 434 – 445, 2012.

WARNOCK, D. G. Towards a definition and classification of acute kidney injury. **Journals of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. 3149 – 3150, 2005.

WARREL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77 – 88, 2010.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 951 – 967, 2005.

WHITE, J. Venomous Animals: clinical toxinology. **EXS**, v. 100, p. 233 – 291, 2010.

WILLIAMS, D. *et al.* The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 89 – 91, 2010.

WILLIAMS, S. S. *et al.* Delayed psychological morbidity associated with snakebite envenoming. **PLoS Neglected Disease**, v. 5, n. e1255, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for Africa. **Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa**. Cité du Djoé, 2010. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17810en/s17810en.pdf>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for South-East Asia. **Guidelines for the management of snakebites**. New Dehli, 2016. Disponível

em:<http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B5255.pdf?ua=1>. Acesso em: 1 dez. 2018.

YAMASHITA, K. M. *et al.* *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. e2814, 2014.

YANG, M. *et al.* The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. **The EMBO journal**, v. 25, n. 8, p. 1775-1783, 2006.

YU, L. *et al.* Insuficiência (Injúria) Renal Aguda. In: ZATZ, R. (Ed.). **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. São Paulo: Atheneu, 2012, p. 291 – 314.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Philogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*, *Viperidae*): implications for neotropical biogeography, systematics and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 421 – 422, 1997.

ZHANG, A. *et al.* Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Critical care**, v. 20, p. 1-13, 2016.

ZHANG, C. *et al.* Lys49 myotoxin from the Brazilian lancehead pit viper elicits pain through regulated ATP release. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 114, p. E2524 – E2532, 2017.

ZUK, A., BONVENTRE; J. V., MATLIN, K. S. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 280, p. F1037 – F1053, 2001.

ANEXOS

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos no envenenamento induzido por peçonha de *L. acrochorda* via intramuscular em camundongos, para determinação de dose subletal e para indução de IRA nos tempos de 06h, 12h, 24h, e 72h.

GRUPOS	Cr. S. (mg/dL)	Ureia S. (mg/dL)	V. Urina (μ l)	Cr. U. (mg/dL)	P. U. (mg/dL)	CCr. (ml/min)	FeNa ⁺ (%)	FeK ⁺ (%a)	FeCl ⁻ (%)	CK S. (U/dL)
C25	0,12 \pm 0,02	58,3 \pm 3,8	375,0 \pm 25,0	-	-	-	-	-	-	-
V25	0,10 \pm 0,02	52,0 \pm 2,7	366,7 \pm 57,3	-	-	-	-	-	-	-
C50	0,12 \pm 0,02	49,2 \pm 4,0	625,0 \pm 166,5	-	-	-	-	-	-	-
V50	0,28 \pm 0,06*	52,0 \pm 7,5	356,3 \pm 25,8	-	-	-	-	-	-	-
C75	0,15 \pm 0,02	45,3 \pm 1,9	375,0 \pm 242,0	-	-	-	-	-	-	-
V75	0,33 \pm 0,07*	119,5 \pm 37,6*	450,00 \pm 63,6	-	-	-	-	-	-	-
C6	0,10 \pm 0,01	42,4 \pm 1,3	-	-	-	-	-	-	-	479,8 \pm 130,3
V6	0,16 \pm 0,03	144,7 \pm 4,6*	-	-	-	-	-	-	-	1732,0 \pm 305,4*
C12	0,14 \pm 0,04	66,7 \pm 2,3	-	-	-	-	-	-	-	64,4 \pm 18,5
V12	0,89 \pm 0,09*	227,3 \pm 2,9*	-	-	-	-	-	-	-	373,3 \pm 104,4*
C24	0,13 \pm 0,00	67,8 \pm 2,0	380,0 \pm 98,2	58,86 \pm 8,11	109,50 \pm 13,19	97,04 \pm 9,2	0,308 \pm 0,04	15,21 \pm 0,74	0,422 \pm 0,06	67,0 \pm 16,4
V24	0,80 \pm 0,30*	199,0 \pm 50,5*	460,0 \pm 135,5	32,54 \pm 1,04*	94,92 \pm 9,31	132,6 \pm 26,25	0,214 \pm 0,11	18,54 \pm 3,96	1,013 \pm 0,27	219,3 \pm 87,6
C72	0,12 \pm 0,01	70,2 \pm 4,3	310,0 \pm 33,2	42,29 \pm 7,94	30,94 \pm 2,88	116,6 \pm 14,31	0,155 \pm 0,06	11,60 \pm 3,60	0,252 \pm 0,06	72,5 \pm 13,4
V72	0,13 \pm 0,01	75,2 \pm 20,3	791,7 \pm 216,2	27,95 \pm 1,94	44,69 \pm 4,00*	123,3 \pm 21,30	0,495 \pm 0,08*	22,37 \pm 3,00	0,892 \pm 0,24*	36,0 \pm 2,9

Os valores representam a média \pm erro padrão dos valores nos animais envenenados por peçonha de *L. acrochorda* para determinação de dose subletal e para indução de IRA após os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h e 72h. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, seguida de pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$. C25: controle 25% dose; V25: veneno 25% dose; C50: controle 50% dose; V50: veneno 50% dose; C75: controle 75% dose; V75: veneno 75% dose; C6: controle 6h; V6: veneno 6h; C12: controle 12h; V12: veneno 12h; C24: controle 24h; V24: veneno 24h; C72: controle 72h; V72: veneno 72h; Cr. S.: creatinina sérica; Ureia S.: ureia sérica; V. urina: volume de urina; Cr. U.: creatinina urinária; P. U.: proteína urinária; CCr: *clearance* de creatinina; FeNa⁺: fração de excreção de sódio; FeK⁺: fração de excreção de potássio; FeCl⁻: fração de excreção de cloreto; CK S.: creatina quinase sérica.

Tabela 5: Parâmetros moleculares no envenenamento induzido por peçonha de *L. acrochorda* via intramuscular em camundongos para indução de IRA nos tempos de 06h, 12h, 24h, e 72h.

GRUPOS	MDA (mmol/mg)	KIM-1	NGAL	TIMP-2	SOD2m	SOD1s	GSR	IL-18	IL-1 β
C6	3592 \pm 92,65	1,0 (0,48 – 1,8)	0,86 (0,33 – 2,88)	1,0 (0,36 – 1,9)	1,4 (0,54 – 1,5)	1,0 (0,53 – 1,5)	0,81 (0,21 – 1,6)	1,1 (0,47 – 1,4)	1,2 (0,64 – 1,4)
V6	4423 \pm 445,2	0,57 (0,43 – 1,2)	19 (12 – 30)*	1,0 (0,45 – 1,8)	1,3 (0,79 – 1,7)	1,2 (0,48 – 1,7)	1,6 (1,0 – 3,0)*	1,5 (0,73 – 2,5)	4,2 (2,8 – 5,0)*
C12	3180 \pm 129,4	1,1 (0,55 – 1,3)	1,3 (0,32 – 2,5)	1,1 (0,52 – 1,7)	0,99 (0,86 – 1,3)	1,0 (0,48 – 1,7)	1,0 (0,83 – 1,4)	0,86 (0,50 – 2,2)	1,3 (0,29 – 1,7)
V12	3428 \pm 129,4	1,3 (1,1 – 2,2)*	7,1 (4,1 – 17)*	0,19 (0,11 – 0,33)*	0,89 (0,64 – 1,1)	0,25 (0,14 – 0,62)*	1,2 (0,29 – 2,0)	0,44 (0,21 – 0,69)*	0,84 (0,42 – 1,6)
C24	3367 \pm 162,3	1,0 (0,82 – 1,1)	0,9 (0,46 – 2,3)	1,0 (0,75 – 1,4)	1,0 (0,84 – 1,4)	0,94 (0,64 – 2,0)	1,5 (0,78 – 1,5)	1,0 (0,46 – 1,9)	1,1 (0,45 – 1,9)
V24	3889 \pm 176,70	1,4 (1,0 – 1,7)*	43 (24 – 91)*	0,29 (0,11 – 0,50)*	0,79 (0,52 – 1,5)	0,38 (0,21 – 0,77)*	218 (1,4 – 3,0)*	0,43 (0,18 – 0,72)*	2,0 (0,90 – 2,2)
C72	3395 \pm 215,6	0,98 (0,88 – 1,2)	1,2 (0,37 – 1,6)	0,97 (0,58 – 1,5)	1,0 (0,89 – 1,1)	1,1 (0,58 – 1,4)	0,93 (0,71 – 1,7)	1,1 (0,56 – 1,6)	1,2 (0,62 – 1,4)
V72	3077 \pm 89,49	1,4 (1,1 – 1,9)*	3,5 (3,1 – 6,7)*	1,0 (0,76 – 1,6)	1,0 (0,77 – 1,7)	0,87 (0,52 – 1,7)	1,2 (0,38 – 2,0)	0,65 (0,37 – 1,7)	1,3 (0,86 – 3,7)

Os valores representam a média \pm erro padrão ou mediana (mínimo – máximo) dos valores nos animais envenenados por peçonha de *L. acrochorda* para indução de IRA após os tempos de envenenamento 6h, 12h, 24h e 72h. Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, seguida de pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$. C6: controle 6h; V6: veneno 6h; C12: controle 12h; V12: veneno 12h; C24: controle 24h; V24: veneno 24h; C72: controle 72h; V72: veneno 72h; KIM-1: Molécula de Injúria Renal 1; NGAL: Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; TIMP-2: Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 2; SOD2m: Superóxido Dismutase 2 Mitocondrial; SOD1s: Superóxido Dismutase 1 Solúvel; GSR: Glutaciona Redutase; IL-18: Interleucina 18; IL-1 β : Interleucina 1-beta.