



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

**ALINE DIOGO MARINHO**

**EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE CELULAR PROMOVIDOS PELO**  
**VENENO DA SERPENTE *Bothropoides pauloensis***

**Fortaleza**

**2013**

**ALINE DIOGO MARINHO**

**EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE CELULAR PROMOVIDOS PELO  
VENENO DA SERPENTE *Bothropoides pauloensis***

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

**Fortaleza**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

M29e Marinho, Aline Diogo.

Efeitos renais e mecanismos de morte celular promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*. / Aline Diogo Marinho. – 2013.

101 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Farmacologia Cardio-renal.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Morte Celular. 2. Rim. 3. Venenos. I. Título.

**ALINE DIOGO MARINHO**

**EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE CELULAR PROMOVIDOS PELO  
VENENO DA SERPENTE *Bothropoides pauloensis***

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

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena Serra Azul Monteiro

Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar

Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Universidade Federal do Ceará-UFC

## **DEDICATÓRIA**

À Deus pelo milagre de acordar todos os dias, por me dar forças para chegar até aqui.

Ao meu amor, minha vida, Renato.

Aos meus pais, Marinho e Fátima.

## AGRADECIMENTOS

À Renato Oliveira, por todo o amor, por toda a felicidade, por dar sentido a minha vida, pelo incentivo, pela atenção, pela paciência. Por ter idealizado junto a mim este momento, me apoiando incondicionalmente. É por você e para você essa conquista.

Agradeço aos meus pais por suportarem tantas adversidades junto a mim.

À toda a minha família MARINHO, em especial meus irmãos, sobrinhos e avó: Yana, Nara, Fabrício, Fabrício Júnior, Maria Isadora, Isabelle, Raimundinha por me fazerem esquecer de todos os problemas e me proporcionarem imensa felicidade por estar em sua presença e à minha família OLIVEIRA, por estarem junto a mim, acreditando e torcendo por essa superação. Família guerreira, que eu só tenho a agradecer por tê-los comigo.

À minha tia Neuma por sempre me apoiar e estar presente nos momentos de dificuldade.

À minha cunhada, Regiane Oliveira, por ser mais que amiga, uma irmã, pelo carinho e atenção a mim dedicados.

À tia Cida e à tia Bia, por me terem como uma verdadeira sobrinha, proporcionando a mim eternos momentos de alegria.

À minha orientadora Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que foi fundamental para a conclusão dessa etapa tão importante da minha vida. Sem o seu apoio e incentivo, nada disso seria possível. Não tenho palavras para agradecer tudo que a senhora fez por mim. É um orgulho para mim ser sua orientanda e poder participar do seu cotidiano.

Às minhas amigas Roberta Jeanne e Isabel Cristina, pelas quais tenho profunda admiração, agradeço em primeiro lugar pela amizade incondicional, em todos os momentos, pela paciência, pelo apoio, pelo incentivo, pelo carinho e pela ajuda acadêmica, compartilhando conhecimento e me auxiliando nos experimentos.

Aos meus amigos de laboratório (LFAVET), Antônio Rafael, Silvia Helena e Alison, pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

À Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, por ter me recebido no seu laboratório e disponibilizado tudo que foi necessário para concluir o projeto.

À equipe que faz parte do LCC, em especial : Dânya, Ramon e Alba.

À Profa. Dra. Janaína Serra Azul Evangelista, por ter gentilmente me recebido em seu laboratório e ter me auxiliado. Aos seus IC's pela ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos, pela amizade verdadeira que me proporcionam, pela dedicação e carinho. Alguns em especial: Cristina, Geirlane, Eduardo, Hellen, Sávía, Marcela, Rebeca, Dandara, Helana, Mara, Rafaela.

Jardim de Lembranças

Atravessando o jardim,  
Senti teu forte perfume,  
Procurei, não te encontrei,  
Nem sei o que buscava...  
Seria a razão de viver?  
Ou o viver com razão?  
Lembrei daquela vida,  
Delícias de outrora,  
Momentos insanos,  
São desejos de agora.  
Recordar é viver?  
Ou viver é recordar?  
Entre flores e lembranças,  
Não encontrei o que queria.  
Continuo com a esperança  
O que passou voltará forte  
Que nem o perfume da flor.

A magia das flores.

Verbena Lima Vale e Marcus Vale.

## RESUMO

**EFEITOS RENAIIS E MECANISMOS DE MORTE CELULAR PROMOVIDOS PELO VENENO DA SERPENTE *Bothropoides pauloensis*.** Departamento de Fisiologia e farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2013.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos no país e a insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação grave dos envenenamentos por estas serpentes. Neste trabalho, foram investigados os efeitos renais do veneno total de *Bothropoides pauloensis* (VBp) em sistema de rim isolado de rato e em cultura de células tubulares renais da linhagem MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Para perfusão de rim isolado foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250 e 300g, cujos rins foram excisados cirurgicamente e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6%p/v de albumina bovina previamente dialisada. Foram investigados os efeitos do VBp (3µg/mL e 10 µg/mL; n=6). Verificamos queda na pressão de perfusão (PP) na concentração de 10µg/mL aos 90 e 120 min. A resistência vascular renal (RVR) também diminuiu na concentração de 10µg/mL aos 90 e 120 minutos e na concentração de 3 µg/mL aos 120 min. O fluxo urinário (FU) diminuiu aos 90 e 120 minutos em ambas as concentrações, não apresentando diferença significativa entre as concentrações no tempo de 120min. O ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentou uma redução aos 60 minutos em ambas as concentrações, mantendo-se diminuída até o final do experimento, não havendo diferença significativa entre as concentrações no tempo de 60min. O percentual de transporte tubular de sódio (%TNA<sup>+</sup>) foi reduzido em ambas as concentrações nos tempos de 60,90 e 120min, não apresentando diferença significativa entre as concentrações no tempo de 60 min; O transporte tubular de cloreto(%TCI) também foi reduzido aos 60, 90 e 120min. Em ambas as concentrações; O transporte tubular de potássio (%TK<sup>+</sup>) diminuíram aos 60, 90 e 120 minutos na concentração de 10µg/mL, na concentração de 3µg/mL reduziu aos 60 min,retornando a valores próximos ao controle no tempo de 90 e 120min. Não havendo diferença significativa entre as concentrações nos tempos de 60 e 90 min. A análise mostrou a presença de alterações morfológicas significativas, como acúmulo de proteínas a nível tubular. Na cultura de células MDCK, o VBp foi capaz de diminuir a viabilidade celular (CI<sub>50</sub>= 7,5µg/mL). Citometria de fluxo com anexina V e iodeto de propídio mostrou que a morte celular ocorreu predominantemente por apoptose. Tratamento com VBp (7,5 µg / mL) levou a despolarização significativa do potencial de membrana mitocondrial. Verificamos a geração de Espécies Reativas de Oxigênio. A análise morfológica das células mostrou características indicativas de apoptose. Esses resultados demonstram que o veneno de *B. pauloensis* alterou todos os parâmetros renais avaliados na perfusão de rim isolado e foi citotóxico para cultura de células MDCK.

**Palavras-chave:** *Bothropoides pauloensis*; Efeitos Renais; Morte Celular.

## ABSTRACT

**RENAL EFFECTS AND MECHANISMS OF CELL DEATH PROMOTED BY SNAKE VENOM *Bothropoides pauloensis*.** Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, 2013.

According to the Ministry of Health of Brazil, Bothrops are the main involved in snakebites in the country and acute kidney injury is a serious complication of poisoning by these snakes. In this work, we investigated the renal effects of total venom *Bothropoides pauloensis* (VBP) in isolated rat kidney system and in cultured renal tubular cell line MDCK (Madin - Darby Canine Kidney). For perfusion of isolated kidney Wistar rats were used weighing 250- 300g, whose kidneys were surgically excised and perfused with Krebs- Henseleit solution containing 6% w/v pre-dialysed bovine serum albumin. The effects of VBP (n = 3µg/mL and 10 mg/mL; n=6) was investigated. Reduction was observed in perfusion pressure (PP) at a concentration of 10µg/mL at 90 and 120 min. Renal vascular resistance (RVR) also decreased the concentration of 10µg/mL at 90 and 120 minutes and at a concentration of 3 mg/mL at 120 min. The urinary flow (FU) decreased at 90 and 120 minutes in both concentrations, no significant difference between the concentrations at the time of 120min. The glomerular filtration rate (GFR) was reduced to 60 minutes in both concentrations and remained decreased until the end of the experiment, no significant difference between the concentrations in the time of 60min. The percentage of tubular sodium transport (%TNA<sup>+</sup>) was reduced by both concentrations in times of 60, 90 and 120 min, with no significant difference between the concentrations at time 60 min. The tubular transport of chloride (%TCl<sup>-</sup>) was also reduced to 60, 90 and 120 min. In both concentrations; the tubular potassium transport (%TK<sup>+</sup>) decreased at 60, 90 and 120 minutes at a concentration of 10µg/mL in a concentration of 3µg/mL reduced to 60 min, returning to near control at 90 and 120min values. No significant difference between the concentrations in the times of 60 and 90 min. The analysis showed the presence of significant morphological changes such as the accumulation of proteins plate level in the culture of MDCK cells, the VBP was able to reduce cell viability (IC<sub>50</sub> = 7.5 g/ mL). Flow cytometry with Annexin V and propidium iodide showed that cell death occurred by apoptosis predominantly. VBP treatment ( 7.5 mg/ml) led to a significant depolarization of the mitochondrial membrane potential. We verified the generation of Reactive Oxygen Species. Morphological analysis of the cells showed features indicative of apoptosis. These results demonstrate that the venom of *B. pauloensis* altered all renal parameters evaluated in the kidney perfusion was cytotoxic to isolated and MDCK cell culture.

**Keywords:** *Bothropoides pauloensis*; Renal Effects; Cell Death.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Aspectos gerais e epidemiológicos.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Gênero <i>Bothrops</i> e <i>Bothropoides</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Bothropoides pauloensis</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>Mediadores inflamatórios (citocinas e o envenenamento).....</b>	<b>21</b>
<b>1.5</b>	<b>Morte celular.. ..</b>	<b>22</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Necrose.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Apoptose.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Alterações morfológicas e bioquímicas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5.4</b>	<b>Vias de sinalização.....</b>	<b>26</b>
<b>1.6</b>	<b>Importância do estudo de venenos e toxinas.....</b>	<b>28</b>
<b>1.7</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção do veneno.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Ensaio biológico.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Perfusão de órgão isolado.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Animais de experimentação.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Sistema utilizado.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Calibração do sistema.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Solução perfusora.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Análises bioquímicas.....</b>	<b>38</b>

3.2.7	Determinação dos parâmetros funcionais renais.....	38
3.2.8	Análise histopatológica.....	39
3.2.9	Grupos experimentais.....	40
3.3	Ensaio com cultura de células .....	40
3.3.1	Linhagem celular .....	40
3.3.2	Cultivo das células MDCK.....	40
3.3.3	Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	41
3.3.3.1	Ensaio com MTT.....	41
3.3.3.2	Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.....	43
3.4	Medida do potencial de membrana mitocondrial.....	44
3.5	Geração de espécies reativas de oxigênio intracelular.....	45
3.6	Determinação das alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothropoides pauloensis</i> em células MDCK.....	46
3.7	Aspectos éticos.....	46
4.	RESULTADOS.....	48
4.1	Perfusão de rim isolado.....	48
4.2	Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente <i>Bothropoides pauloensis</i> .....	55
4.3	Avaliação da atividade do veneno da serpente <i>Bothropoides pauloensis</i> sobre células MDCK.....	58
4.3.1	Ensaio de viabilidade celular.....	58
4.3.2	Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo.....	59
4.4	Medida do potencial de membrana mitocondrial.....	60
4.5	Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio.....	61
4.6	Alterações morfológicas induzidas pelo veneno de <i>Bothropoides pauloensis</i> em células MDCK.....	62
5.	DISCUSSÃO.....	68

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

As serpentes pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Reptilia*, subclasse *Lepdosaura*, ordem *Squamata*, subordem *Serpentes* (HICKMAM; ROBERTS e LARSON, 2004). Estão presentes em praticamente todo o mundo, constituindo o maior número de reptéis vivos, totalizando aproximadamente 3 mil espécies. No Brasil, estão presentes 75 gêneros, agrupados em 10 famílias, dessas apenas 2 famílias, Viperidae e Elapidae (figura 1), são consideradas peçonhentas, ou seja, possuem glândula produtora de veneno e aparelho inoculador (BÉRNILS, 2011). A família *Elapidae* compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus*, com mais de 50 espécies. A família *Viperidae*, composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis*, *Crotalus* e *Lachesis*, representa o mais importante grupo de serpentes, pois é responsável pela maioria e mais graves casos de acidentes ofídicos registrados nos países da América, inclusive no Brasil (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública, com especial importância nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade (como amputações, deformações e falência renal) que ocasionam (GUTIÉRREZ, 2012). Na América Central, são notificados cerca de 4.000 casos de acidentes ofídicos por ano, sendo a maior parte destes ocasionados pelas espécies da família *Viperidae* (GUTIÉRREZ, 2011). Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes. O Sinan registrou, no ano de 2012, 25 mil casos de acidentes ofídicos em humanos no Brasil, sendo a família *Viperidae* envolvida em 82,7% dos casos, e a família *Elapidae*, em 0,9% (BRASIL, 2012), seguido do Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (CHIPPAUX, 1998; WARREL, 2004).

No Brasil, as regiões Norte, Nordeste e Sudeste possuem a maior incidência de casos, respectivamente 9.191; 8.238 e 6.343. Na região Nordeste há predomínio dos acidentes crotálicos e elapídicos (BRASIL, 2012) registrando-se a maior letalidade (0,81%) cerca do dobro da média nacional (0,45%) (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009). A sazonalidade dos acidentes ofídicos é muito variada nestas diferentes regiões. Entretanto, há uma hipótese aceita de que o aumento dos casos esteja relacionado ao período chuvoso e de altas temperaturas, em que as espécies residentes próximas às margens de rios se deslocam a procura de terra firme, facilitando seu contato com o homem (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

No estado do Ceará foram notificados 445 casos envolvendo picadas de serpentes peçonhentas em 2012, tendo sido 68,1% atribuídos aos gêneros *Bothrops sp.* e *Bothropoides sp.*, 8,3% ao gênero *Crotalus sp.*, 1,6% ao gênero *Micrurus sp.* e 0,9% ao gênero *Lachesis sp.* (BRASIL, 2012). Esses dados corroboram com os encontrados por Rocha (2008), que descreve uma prevalência de 74,2%, envolvendo o gênero *Bothrops*, principalmente indivíduos de 21 a 50 anos. Como o gênero *Bothropoides* sofreu alterações taxonômicas nos últimos anos, os dados incluem também esse gênero (FENWICK *et al.*, 2009). Entretanto, o registro é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia dos acidentes ofídicos.

Esses dados sobre acidentes por animais peçonhentos, no Brasil, são coletados através de sistemas de notificação como Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox/Fiocruz/MS), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde/MS e o Sistema de Informações sobre Mortalidade/MS (SIM). Apesar de todos esses sistemas, os dados epidemiológicos disponíveis não retratam a real magnitude do problema, provavelmente devido à subnotificação dos casos, tendo em vista, entre outros fatores, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde de muitos municípios brasileiros (LEMOS *et al.*, 2009).

## **1.2 Gênero *Bothrops* e *Bothropoides***

Fenwick *et al.* (2009) e Bérnils *et al.* (2010) classificaram as serpentes da família *Viperidae*, mais precisamente o gênero *Bothrops*, em 5 gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*. Esta classificação está fundamentada em um conjunto de dados morfológicos e multigênica mitocondrial (análise comparativa mitocondrial), que reconhece linhagens evolutivamente, ecologicamente e morfológicamente distintas como gêneros. Além dos dados morfológicos e de multigênica mitocondrial, foi considerada a diversidade nutricional à que cada espécie é submetida, pois influencia na composição da peçonha, levando à diversificação destes animais. O arranjo taxonômico pode ter um impacto importante na área médica, no qual a correta identificação da espécie responsável pelo acidente de uma determinada área é essencial para a produção e uso eficiente da soroterapia (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Portanto, o gênero *Bothrops* estão incluídas as espécies: *Bothrops atrox*, *Bothrops brasili*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops muriciensis* ( Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012).

O gênero *Bothropoides* (derivado do grego sendo “bothros” e “ops” relacionados ao poço facial e “oides” que significa semelhante) inclui as espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erytromelas*, *Bothropoides insulares*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*. Essa nova classificação é aceita e fornecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012.

Essas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (ALBUQUERQUE, 2004; MELGAVAREJO, 2003).

**Família *Elapidae***Gênero *Micrurus* sp.**Família *Viperidae***Gênero *Bothrops* sp.Gênero *Bothropoides* sp.Gênero *Lachesis* sp.Gênero *Crotalus* sp.**Figura 1.** Famílias de serpentes da Fauna Brasileira com importância médica.**Fonte:** Adaptado de <http://www.fiocruz.br>.

### 1.2.1 *Bothropoides pauloensis*

A serpente *Bothropoides pauloensis* conhecida popularmente como jararaca-pintada, objeto deste estudo, é encontrada na região sudeste do Brasil, Estado de São Paulo, habita principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (TICLI, 2006).

O veneno da *B. pauloensis* contém uma variedade de enzimas que inclui proteinases com atividades hemorrágica, metaloproteinase fibrinolítica, fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), L-amino oxidases e uma variedade de peptídios potenciadores da bradicinina que podem contribuir para as ações biológicas dos venenos. (ABREU *et al.*, 2007).



**Figura 2:** *Bothropoides pauloensis* (FONTE: Nogueira, 2003)

O veneno de *Bothropoides pauloensis* (*B. pauloensis*), de acordo com isolado até o momento, tem mostrado uma variedade de fosfolipases, principalmente miotóxicas: BnSP-6 e BnSP-7 (PLA<sub>2</sub> miotóxica Lys49), Bp-PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> ácida miotóxica Asp49), BnpTX-I e BnpTX-II (PLA<sub>2</sub> básicas miotóxicas Asp49) e Bp-12 (PLA<sub>2</sub> Lys49), além de outras frações como Bp-LAAO (LAAO), BpSP-I (serinoprotease trombina-like) e neuwiedase (metaloprotease) (CASTANHEIRA *et al.*, 2013).

Rodrigues e colaboradores, (1998) isolaram e caracterizaram as PLA<sub>2</sub> mitóxicas BnSP-6 e BnSP-7, mostrando alta similaridade com miotoxinas Lys49 de outros venenos botrópicos. A BnSP-7 apresentou atividades anticoagulante, mionecrosante e edematogênica (RODRIGUES *et al.*, 1998), bactericida (contra *Escherichia coli*), bloqueio de contração neuromuscular, ruptura de lipossomas cálcio independentes (SOARES *et al.*, 2000), dano tecidual local e regeneração tardia, com aumento de produção/liberação citocinas pró-inflamatórias, além do aumento da expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 e 9 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

BnpTX-I mostrou efeitos neurotóxicos e bactericida (contra *E. coli*), além de apresentar atividades anticoagulante, mionecrosante, edematogênica, citotóxicas contra mioblastos/miotúbulos, comuns também para a toxina BnpTX-II (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em um estudo anterior Borja-Oliveira e colaboradores (2003) haviam mostrado com o veneno total de *B. pauloensis* um efeito neurotóxico com ação pré-sináptica.

A Bp-12, PLA<sub>2</sub> enzimaticamente inativa, apresentou alta homologia com outras fosfolipases de venenos botrópicos contendo lisina na posição 49, e foi responsável tanto diretamente quanto indiretamente, pelo bloqueio na junção neuromuscular em preparação de nervo frênico-diafragma (RANDAZZO-MOURA *et al.*, 2008).

Indução de agregação plaquetária, atividade hemolítica, edema intenso, miotoxicidade com abundante infiltrado leucocitário e dano muscular após 24 horas de injeção, foram reportadas para a fração enzimaticamente ativa Bp PLA<sub>2</sub> (Rodrigues *et al.*, 2007).

A Bp-LAAO, isolada por Rodrigues e colaboradores (2009) exibiu atividades antitumoral contra as linhagens de câncer de mama (SKBR-3), células leucêmicas T agudas (Jurkat) e tumor ascítico de Erlich (ETA), bactericida diante das cepas de *E. coli* (gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram positiva) e leishmanicida frente *Leshmania ssp* (*L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. major*) com efeitos dose - dependentes.

Uma alta atividade coagulante e calicreína – like, foram mostradas para a BpSP-I. Em contrapartida, esta serinoprotease trombina - like não apresentou atividades hemorrágica e miotóxica, apenas edema moderado em doses mais elevadas (COSTA *et al.*, 2009).

A neuwiedase, caracterizada bioquimicamente por Rodrigues e colaboradores (2000), mostrou alterações hematológicas (aumento ou redução de elementos figurados do sangue periférico) e hemostáticas (fibrinogénólise e atividade coagulante), hemorragia pulmonar na

presença de altas doses desta fração e ausência de alterações teciduais locais após envenenamento sistêmico (IZIDORO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2001).

### 1.3 Composição química e atividade biológica dos venenos botrópicos

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos (BON, 1997). Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares, pelos mecanismos mais variados. Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas, incluindo fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) relacionadas à produção de derivados do ácido aracdônico (SIX e DENNIS, 2000), as metaloproteinases, responsáveis pela proteólise das membranas basais dos vasos, as trombina símiles, que ativam fatores de coagulação, transformam o fibrinogênio em fibrina e induzem a agregação plaquetária (SANTOS *et al.*, 2000) e as L-aminoácido oxidases (LAAO) que induzem ou inibem a agregação plaquetária, além de promover apoptose (DU e CLEMETSON, 2005).

As fosfolipases são comumente encontradas na família *Viperidae*, sendo assim amplamente estudadas devido às suas características químicas e efeitos biológicos. As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas de grande interesse médico-científico devido ao envolvimento em inúmeras patologias humanas inflamatórias e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas. A atividade das FLA<sub>2</sub> foi observada pela primeira vez em peçonha de cobra (*Naja naja*) e em extratos pancreáticos de mamíferos (SOARES e GIGLIO, 2004). São enzimas que suportam altas temperaturas sem perda de atividade e podem ou não possuir isoformas.

As FLA podem ser divididas em intracelular e extracelular. As intracelulares são aquelas presentes na transdução de sinal, metabolismo de fosfolipídios e nas mais variadas funções celulares. As extracelulares estão presentes no suco pancreático humano e nas peçonhas de serpentes e insetos, apresentando atividade esterásica, promovendo a catálise de fosfolipídeos e glicerolipídeos e, como principal ação, a quebra do ácido aracdônico dando início à cascata de eicosanóides, responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios (GUTIERREZ e OWNBY, 2003).

Em um mesmo veneno são encontradas uma variedade de PLA<sub>2</sub> que podem exercer uma grande variedade de atividades farmacológicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (BORGES

*et al.*, 2000). Todas são dependentes de cálcio para atuar e os resíduos da alça de ligação ao cálcio são particularmente conservados (MURAKAMI e ARNI, 2003). Essa propriedade gera um grande interesse nessa fração, pela interferência na biossíntese de eicosanoides, moléculas importantes em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas (MOREIRA *et al.*, 2011).

As enzimas FLA<sub>2</sub> catalizam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolípídios e ácidos graxos (KOH *et al.*, 2006; KINI, 2003). Os ácidos graxos liberados podem atuar como segundos mensageiros ou podem estar envolvidos em outras reações, como o ácido aracdônico, que é responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (VARGAS *et al.*, 2010). As FLA<sub>2</sub> estão agrupadas em três famílias principais: (I) citosólicas (cFLA<sub>2</sub>); (II) secretórias dependente de Ca<sup>+2</sup> (sFLA<sub>2</sub>) e (III) intracelulares não dependentes de Ca<sup>+2</sup> (iFLA<sub>2</sub>). Dentre as fosfolipases dos venenos são reconhecidas três tipos diferentes, as clássicas, com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), as quais apresentam atividade catalítica e variantes contendo lisina ou serina no carbono 49 (Lys49 e Ser49, respectivamente), sendo essas duas últimas enzimaticamente inativas. Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as FLA<sub>2</sub> desestabilizam os fosfolipídios das membranas celulares, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis que culmina com a morte celular (LOMONTE;ÂNGULO e CALDERÓN, 2003).

Outro componente protéico encontrado no veneno bothropico são as enzimas L-aminoácido oxidases (LAAOs). São flavoenzimas que catalizam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (PAIVA *et al.*, 2011). O mecanismo de ação pelo qual a LAAO exerce seus efeitos ainda é incerto. Vários trabalhos descrevem amplos efeitos biológicos e farmacológicos, como: indução de apoptose (TORII *et al.*, 1997; DU e CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006; NAUMANN *et al.*, 2011), agregação plaquetária (LI *et al.*, 1994), indução de edema (TICLI, 2006), atividade bactericida (CISCOTTO *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2010), leishmanicida (TOYAMA *et al.*, 2006; NAUMANN *et al.*, 2011).

As metaloproteinases, por sua vez, participam do remodelamento do tecido conectivo no processo de cicatrização das feridas dos seres humanos (MITCHELL, 2005). Nos venenos das serpentes, além de lesarem as células endoteliais, contribuindo para a hemorragia local e sistêmica (RUIZ DE TORRENTE *et al.*, 1999), facilitam a disseminação do veneno a partir

do local de inoculação (ANAI *et al.*, 2002), onde contribuem para a mionecrose, a dermonecrose, a formação de bolhas e a inflamação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

A especificidade de substratos das metaloproteinases dos venenos das serpentes (SVMPs) é muito semelhante ao das metaloproteinases da matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal da microvasculatura (TANJONI *et al.*, 2003), a qual, quando rompida, deixa extravasar sangue, constituindo o mecanismo fisiopatológico da hemorragia provocada pelas SVMPs (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Uma das SVMPs bem estudada, a jararhagina, isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, é um dos principais componentes responsáveis pela hemorragia. Além de degradar a matriz extracelular, também atua em proteínas plasmáticas da coagulação importantes para hemostasia (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

Sem atividade enzimática são observadas as neurotoxinas de atividade pré e pós-sinápticas que afetam a função neuromuscular (HAWGOOD e SANTANA DE SÁ, 1979), as cardiotoxinas que atuam na membrana celular do músculo cardíaco e despolarizam de modo persistente a membrana das células excitáveis acarretando hemólise (REID, 1964) e as lectinas, que se ligam à glicoproteínas e interfere na formação do coágulo e na agregação plaquetária (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Dentre os componentes sem atividade enzimática há constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Os constituintes não orgânicos conhecidos são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH e TU, 1971). Alguns estudos sugerem que o cálcio, o manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON e FOX, 1994).

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

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência de envenenamento ofídico, dentre elas, glomerulonefrite, arterite e necrose tubular, glomerulite e nefrite

intersticial, necrose cortical e insuficiência renal (SITPRIJA, 2012). Foram descritas ainda hematuria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (SANO-MARTINS *et al.*, 2011).

A insuficiência renal aguda (IRA) é a principal causa de morte por acidentes com venenos ofídicos, ocorrendo secundariamente aos processos anteriormente descritos (AIRD, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1998), mesmo após o tratamento com soro antiofídico (SITPRIJA, 2012).

A patogênese da IRA não está ainda completamente elucidada. No entanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008).

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

No modelo de perfusão de rim isolado foi demonstrado por Pirotzky *et al.* (1984), que o rim é capaz de produzir serotonina, histamina e PAF. Embora muitos desses fatores não estejam envolvidos diretamente no sistema de perfusão de rim, as células renais, sob efeito do veneno, podem liberar prostaglandinas, citocinas, bradicinina, fração de complemento e fator de agregação plaquetária (BARRAVIERA; LOMONTE e TARKOWISKI, 1995).

Em estudos prévios, realizados por Martins *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2010; Sousa, 2010; Monteiro, 1990; Havt *et al.*, 2001; 2005; Barbosa *et al.*, 2002; Braga, 2006; Morais *et al.*, 2013; Norões, 2009, foi demonstrado que os venenos de diferentes *Bothrops* alteram os parâmetros de função renal em sistema de rim isolado (*B. erytromelas*, *B. marajoensis*, *B. lutzi*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. insularis*, *B. leucurus*, *B. atrox*, respectivamente).

Como se pode observar no Quadro 1 os efeitos de venenos de serpentes botrópicas em modelo de rim isolado mostra que, apesar de se tratarem de venenos de um mesmo gênero, existem diferenças nas alterações dos parâmetros funcionais renais quanto a significância e tempo que ocorrem.

Ainda de acordo com o Quadro 1, resultados semelhantes às alterações dos parâmetros funcionais renais do nosso estudo são encontrados no trabalho realizado por Morais *et al.*, 2013; Evangelista *et al.*, 2010; Braga, 2006; Havt *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2002 e Monteiro, 1990, De maneira geral, todos reduziram os parâmetros renais avaliados.

Por estes resultados, reforçam as afirmações de que os efeitos biológicos dos venenos variam de acordo com diversos fatores, dentre eles a concentração da peçonha, pois o dano tecidual pode ser relacionado a quantidade de veneno a que foi exposto, gerando uma série de sinais e sintomas bastante diversificado e às vezes contraditórios (QUEIROZ *et al.*, 2008). A composição do veneno é responsável pelas variadas atividades observadas, pois a concentração de determinados componentes podem atuar em sinergismo, ou mesmo inibindo a ação de outros, promovendo efeitos extremamente contraditórios ou opostos (MARQUES-PORTO *et al.*, 2008) e também depende da localização geográfica do animal, alimentação, idade (ROCHA e FURTADO, 2005).

Quadro 1: Estudos com veneno total de espécies do gênero *Bothrops* em Perfusão de Rim Isolado.

Espécie botropica	PP	RVR	FU	RFG	%TNa <sup>+</sup>	%TCI	%TK <sup>-</sup>	Referência
<i>B. erythromelas</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 90 minutos.	(MARTINS <i>et al.</i> , 2005).
<i>B. marajoensis</i>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Não alterou.	(EVANGELISTA <i>et al.</i> , 2010).
<i>B. lutzi</i>	Redução aos 60 e 90 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 90 e 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(SOUSA, 2010).
<i>B. jararaca</i>	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	Dados não apresentados.	Redução dos 60 aos 100 minutos.	(MONTEIRO, 1990).
<i>B. jararacussu</i>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Dados não apresentados.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	(HAVT <i>et al.</i> , 2001).

<b><i>B. pirajai</i></b>	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(HAVT et al., 2005).
<b><i>B. moojeni</i></b>	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumenta aos 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	Redução aos 90 e 120 minutos.	(BARBOSA et al., 2002).
<b><i>B. insularis</i></b>	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 60,90 e 120 minutos	Não alterou.	(BRAGA, 2006)
<b><i>B. leucurus</i></b>	Redução aos 60, 90 e 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza a aos 120 minutos.	Redução aos 60 e 90 minutos. Normaliza aos 120 minutos.	Redução aos 90 minutos	Redução aos 60 e 90 minutos	Não alterou.	(MORAIS et al, 2013).
<b><i>B. atrox</i></b>	Redução aos 60 e 90 minutos.	Redução aos 90 minutos.	Redução aos 60 minutos. Aumento aos 120 minutos.	Aumento aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Redução aos 120 minutos.	Não alterou.	(NORÕES, 2009).

#### 1.4 Mediadores inflamatórios (as citocinas e o envenenamento)

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

Embora a fisiopatologia do envenenamento não seja completamente compreendida . O envenenamento é responsável por desencadear respostas imunes, levando a liberação de citocinas e óxido nítrico. As citocinas iniciam uma cascata de eventos que conduzem aos sintomas, tais como febre, edema, e, bem como uma série de eventos fisiológicos, tais como a ativação de vasodilatação, hipotensão e aumento da produção de óxido nítrico. O acúmulo destas citocinas vai desempenhar um papel importante na mediação de recrutamento e ativação de células necessárias para a inflamação e a reparação de danos nos tecidos (SITPRIJA, 2006).

Alterações hemodinâmicas desempenham um papel importante na patogênese da IRA induzida pelo acidente botrópico. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação

plaquetária (PAF), catecolaminas e endotelina, são alguns dos mediadores envolvidos. Foi verificada liberação de substâncias vasoativas após acidente por víbora de Russell e aumento de concentrações plasmáticas de norepinefrina, epinefrina, dopamina, tromboxano e endotelina. Envenenamento por *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* induziu elevações significativas de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e NO (SITPRIJA, 2012).

O veneno de *B. asper* induz a expressão de COX-2 com consequente aumento da concentração de prostaglandinas em macrófagos peritoneais (MOREIRA *et al.*, 2009). AS PLA<sub>2</sub> Asp 49 e Lys 49 desse veneno, por sua vez, causam morte celular e, em concentrações subletais, provocam aumento da capacidade fagocítica, liberação de peróxido de hidrogênio (ZULIANI *et al.*, 2005). A *jararhagin* apresenta efeito ativador em macrófagos, com produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (CLISSA *et al.*, 2001).

As peçonhas botrópicas contêm uma variedade de PLA<sub>2</sub> miotóxicas básicas que exercem diversos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares (GUTIERREZ e OWNBY, 2003). A atividade fosfolipásica pode produzir diversas prostaglandinas vasodilatadoras renais responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e consequente diurese, natriurese e caliurese ou por outro lado liberação de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  que tem ação vasoconstrictora. Através da cicloxigenase a PLA<sub>2</sub> pode ativar o tromboxano A<sub>2</sub> que também tem ação vasoconstrictora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BARBOSA, 2006).

Dessa forma, acredita-se que parte dos efeitos tóxicos encontrados em animais e pacientes envenenados com peçonhas botrópicas possa ser explicado pela identificação das alterações celulares induzidas por essas substâncias, incluindo parâmetros de morte celular, alterações morfofuncionais e liberação de substâncias que interfiram em processos biológicos.

### **1.5 Morte celular**

A morte celular é a resposta a uma lesão celular, a qual chega a um ponto em que os danos causados são irreversíveis. A morte celular é classificada em três tipos, apoptose, necrose e autofagia, de acordo com o NNCD (*The Nomenclature Committee on Cell Death*) (KROEMER *et al.*, 2009).

A autofagia ocorre geralmente em momentos de privação de nutrientes, na qual a célula degrada os próprios componentes celulares através do mecanismo lisossômico de modo a gerar energia à célula. São observados vacúolos, sugerindo presença de membranas celulares nessa estrutura (KROEMER, KEPP e GALLUZZI, 2012).

### 1.5.1 Necrose

A necrose é desencadeada principalmente por lesões mecânicas, agentes citotóxicos e hipóxia. Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina, a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos. Devido a depleção de ATP ocorre alteração na permeabilidade da membrana, que tem como consequência comprometimento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Ocorre rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local. Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

Em células renais a morte celular por necrose resulta de efeitos combinados de uma série de vias bioquímicas diferentes que são simultaneamente ativadas por lesões extremamente graves para a célula. Os múltiplos caminhos bioquímicos que são ativados pelo dano celular grave e podem levar à necrose incluem os seguintes eventos: a depleção severa de reservas de energia celular (ATP); aumento do cálcio citosólico livre; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de várias enzimas, incluindo as fosfolipases, proteases e endonucleases (RANA, SATHYANARAYANA, LIEBERTHAL, 2001).

### 1.5.2 Apoptose

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Currie (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese, como também em processos patológicos como o câncer. Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas, a natureza das vias intracelulares, a complexa biologia de genes e elementos efetores, a sua relação no desenvolvimento embrionário, o seu papel na homeostase celular e o seu envolvimento na patogênese de várias doenças, tais como doenças auto-imunes, neurodegenerativas, lesões isquêmicas e câncer. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à

produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente (ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY, NICOTERA, 2003).

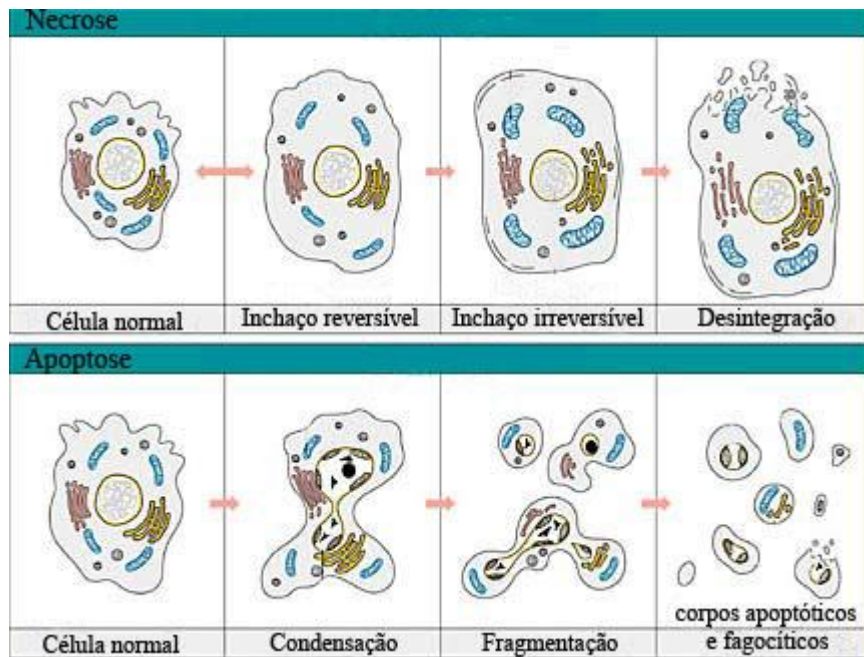
Vários estímulos podem levar a apoptose em células tubulares renais, como injúria celular desencadeada pela isquemia/hipóxia, estresse oxidativo, danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, perda da adesão célula- matriz e da adesão célula-célula, dentre outros (RANA, SATHYANARAYANA, LIEBERTHAL,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

Assim como a gravidade da depleção de ATP, exposição a grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz morte por necrose, enquanto, estresse oxidativo menos grave leva a apoptose. A produção de grandes quantidades de ROS pode causar danos oxidativos diretos para a célula e seus componentes levando a morte por necrose. Com relação a apoptose o aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do  $\Delta\Psi_m$ . A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que ROS funciona como segundo mensageiro na sinalização da ativação das caspases -9 e -3 (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

### **1.5.3 Alterações Morfológicas e Bioquímicas**

Ao entrar em apoptose podemos destacar características muito marcantes do processo de morte celular programada, como redução do tamanho da célula (retração celular), citoplasma denso, organelas fortemente compactadas, condensação da cromatina, formação de blebs (prolongamentos da membrana celular), aumento do número e tamanho dos blebs que se rompem formando assim os corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófago sem causar inflamação (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

A necrose caracteriza-se morfologicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo. Consequentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte celular das células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ELMORE, 2007).



**Figura 3:** Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose. A necrose (a) é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. O processo apoptótico (b) envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

Na figura também é demonstrado que no processo de morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP interferindo na função da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , levando a tumefação celular devido ao aumento de  $\text{Na}^+$  citosólico. O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem ruptura da membrana plasmática, ativação de proteases com conseqüente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando a migração de macrófagos ativando uma resposta inflamatória imune. Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um intumescimento celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ocasionando da permeabilidade seletiva da membrana (BOUJRAD *et al.*, 2007; KERR *et al.*, 1995).

Em contraste, o processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA via ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de “corpos apoptóticos”. Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, esta sinalização ocorre

devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “marcando” as células que deverão ser fagocitadas (ANAZETTI e MELO, 2007).

A maioria das alterações morfológicas observadas por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), é causada por uma série de cisteíno proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose. Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. A especificidade pelos seus respectivos substratos é determinada por quatro resíduos amino-terminal no sítio de clivagem. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desmontagem da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (FISHER, 2001; GESKE e GERSCHENSON, 2001; LORO *et al.*, 2003).

#### **1.5.4 Vias de sinalização**

Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte, sendo que em geral, duas vias distintas podem estar ativas: via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte) (ELMORE, 2007).

A via intrínseca pode ser desencadeada por estímulos (positivos ou negativos) intracelulares que agem diretamente em alvos dentro da célula e iniciam eventos mitocondriais (ELMORE, 2007).

Estímulos negativos são caracterizados pela ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, levando a falha de supressão de morte programada e ativação de apoptose. Por outro lado, os estímulos positivos incluem (mas não se limitam a esses): radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (ELMORE, 2007).

Qualquer estímulo (positivo ou negativo) causará mudanças na membrana mitocondrial, ocasionando a perda do potencial de membrana, posterior aumento da permeabilidade e a liberação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas (HAIL *et al.*, 2006).

O primeiro grupo compreende: citocromo c, Smac/BIABLO e HtrA2/Omi que ativam a via mitocondrial caspase-dependente. O citocromo c liga-se a Apaf-1 e este complexo liga-se à pró-caspase 9 originando o apoptossomo. Por sua vez, leva a ativação da caspase 9 (iniciadora) e consequente ativação de caspase-3, 6 ou 7 (efetoras) (HAIL *et al.*, 2006; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas incluem AIF (fator indutor de apoptose), a endonuclease G e CAD (DNase Caspase-Ativado), porém são liberados tardiamente, após desencadeamento da apoptose. A proteína AIF promove fragmentação do DNA além da condensação da cromatina nuclear periférica, considerada como estágio I da condensação. A endonuclease G cliva a cromatina nuclear e produz DNA oligossomal fragmentado, de modo que ambos AIF e endonuclease G tenham função caspase-independente. CAD é liberado depois de endonuclease G e AIF e também promove a fragmentação do DNA oligossomal e condensação de cromatina (estágio II) (ELMORE, 2007).

O processo apoptótico é controlado por proteínas da família Bcl-2, sendo reguladas por *p53* (proteína supressora tumoral), que regula a expressão de outras proteínas da família Bcl-2 (anti ou pró-apoptóticas). Dentre as proteínas antiapoptóticas podem ser citadas: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-w, BAG e pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. Essas proteínas têm a função de promover ou abortar o processo de apoptose e possuem ainda função de regular a liberação do citocromo c (HAIL *et al.*, 2006).

A via extrínseca tem o envolvimento de receptores transmembrânicos que medeiam a interação. Os receptores são da família TNF, membros dessa família compartilham domínios extracelulares ricos em cisteínas e no citoplasma possuem o “domínio de morte” DD (death domain), que leva os sinais de superfície da membrana para a via de sinalização intracelular (HAIL *et al.*, 2006).

Dentre os aceptores e receptores que participam da via extrínseca podemos citar: FASL/FASR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo21/DR5 onde a sequência de eventos que difundem a fase extrínseca são FASL/FASR e TNF- $\alpha$ /TNFR1. Eventos que

recrutam proteínas adaptadoras do citoplasma exibindo o domínio de morte irão se complexar com receptores FASL/FASR que resultam no adaptador FADD e TNF- $\alpha$ /TNFR1 na proteína TRADD, recrutando FASS e Rip. Assim, FADD associa-se a pró-caspase 8, o complexo DISC (death inducing signaling complex, complexo sinalizador e indução de morte) é formado e leva à ativação de caspase 8. Uma vez ativada, a caspase 8 é iniciado o processo de apoptose (ELMORE 2007).

O veneno de *B. leucurus* induz em apoptose em células tubulares renais e tumorais, com redução do potencial transmembrânico e aumento da concentração intracelular de íons cálcio (MORAIS *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2012). Além disso, a jararagin, metaloproteinase isolada do veneno de *B. jararaca*, causa morte celular por apoptose e indução gênica de mediadores inflamatórios em células endoteliais (LOPES *et al.*, 2012). A PLA2 Lys 49 do veneno de *Bothrops asper* produz rápida morte celular em macrófagos, com liberação de ATP citoplasmático e de outros constituintes celulares (TONELLO *et al.*, 2012; LEIQUEZ *et al.*, 2011). A metaloproteinase desse veneno, por sua vez, causa morte celular em células endoteliais e tumorais, com evidências da ocorrência de apoptose e outras formas alternativas de morte (BRENES *et al.*, 2010).

## **1.6 Importância do estudo de venenos e toxinas**

As pesquisas com venenos vêm atingindo grande progresso, tanto pela descoberta do seu emprego como ferramentas farmacológicas, como pelo potencial terapêutico ou até mesmo pela busca de terapias alternativas ao tratamento convencional. No quadro 2 pode-se destacar alguns medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais.

Quadro 2- Alguns exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais		
Fármaco	Uso terapêutico	Fonte
Eptifibatide (Integrilin®)	Anticoagulante	Serpente <i>Sistrurus miliaris barbouri</i>
Echistatin	Anticoagulante	Serpente <i>Echis carinatus</i>
Captopril	Antihipertensivo	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>
Ranatensin	Antihipertensivo	Sapo do Gênero Rana
Ancrod (Viperinex™)	Anticoagulante para Acidente vascular cerebral isquêmico agudo	Serpente <i>Calloselasma rhodostoma</i>
Ziconotida (Prialt®)	Tratamento da dor crônica	Molusco marinho <i>Conus magus</i>
Exenatida	Diabetes Melitus tipo 2	Réptil <i>Heloderma suspectus</i>

**Quadro 2:** Adaptado de Beeton, Gutman e Chandy (2006).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A elucidação dos mecanismos envolvidos em efeitos locais e/ou sistêmicos, como a Insuficiência Renal Aguda (IRA) que permita a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização de respostas com vistas à interrupção da sequência de eventos celulares/moleculares que poderiam culminar em lesão.

Em virtude da ausência de estudos com veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* em sistema de perfusão renal, pôde-se especular mecanismos de ação sobre os parâmetros funcionais renais através da comparação entre os resultados encontrados no presente trabalho, os achados dos efeitos renais de veneno de outras espécies, estudados por pesquisadores do grupo (LFAVET) e informações presentes na literatura científica, bem como sua toxicidade sobre linhagens de células tubulares renais (MDCK – Madin Darby canine kidney), podendo assim, contribuir para esclarecer os mecanismos de nefrotoxicidade, bem como ajudar na busca de agentes terapêuticos que possam ser úteis para o tratamento da insuficiência renal causada pelo envenenamento botrópico.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos renais e mecanismos de morte celular promovidos pelo veneno de *Bothropoides pauloensis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos induzidos pelo veneno total de *Bothropoides pauloensis* em rim isolado de rato;
- Estudar os efeitos do veneno total de *Bothropoides pauloensis* sobre a viabilidade de células tubulares renais (Madin-Darby Canine Kidney - MDCK);
- Estudar o mecanismo de morte induzido pelo veneno de *Bothropoides pauloensis* nas células MDCK;
- Avaliar a participação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na morte celular induzida pelo veneno de *Bothropoides pauloensis* em células MDCK;
- Avaliar o efeito do veneno de *Bothropoides pauloensis* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em célula MDCK;

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Obtenção do veneno**

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

#### **3.2 Ensaio biológicos**

##### **3.2.1 Perfusão de órgão isolado**

##### **3.2.2 Animais de experimentação:**

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

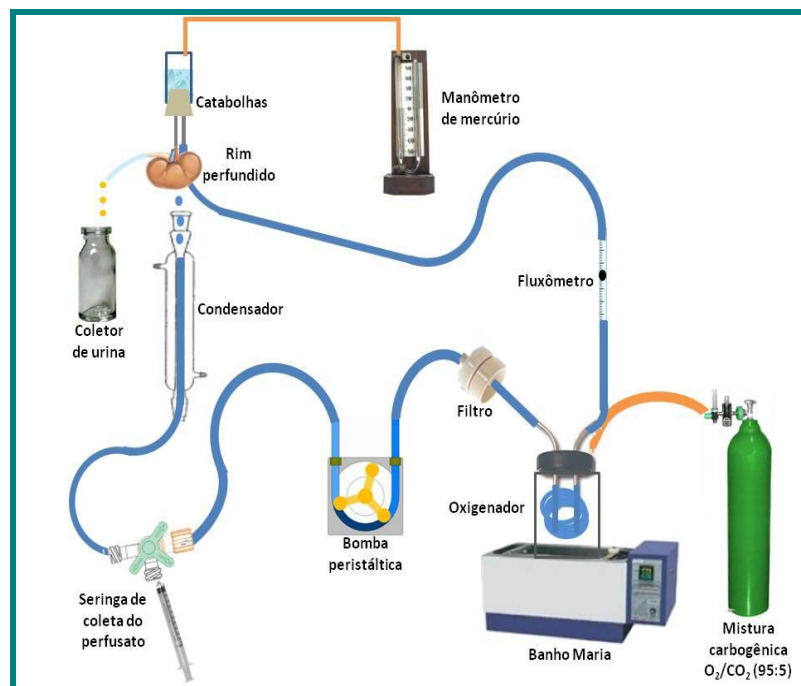
##### **3.2.3 Sistema utilizado**

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  (Figura 4 e 5). Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.



**Figura 4:** Foto do sistema de perfusão de rim isolado.

**Fonte:** LAFAVET – UFC

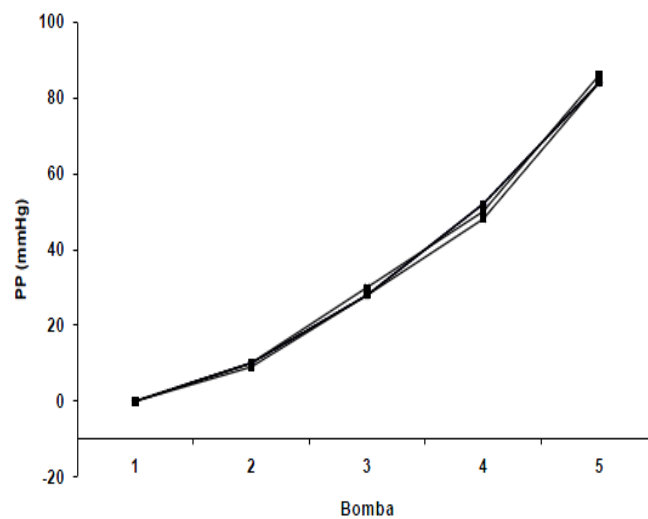


**Figura 5:** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

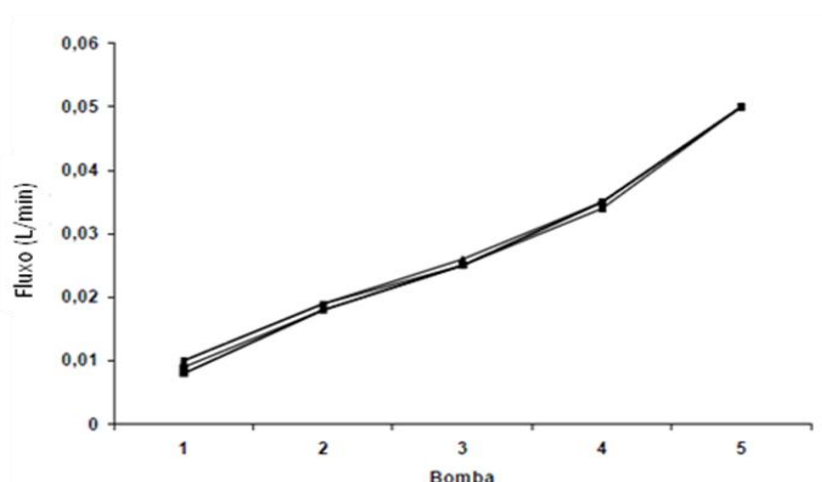
**Fonte:** LAFAVET – UFC

### 3.2.4 Calibração do sistema

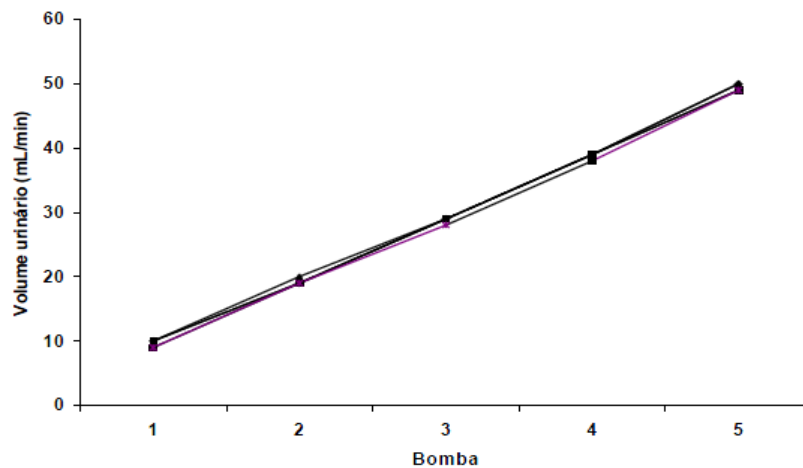
O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foi avaliado em cada uma das bombas (1,2,3,4 e 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/min) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As figuras 6, 7 e 8 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.



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



**Figura 7:** Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 8:** Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

### 3.2.5 Solução perfusora

A solução de Krebs-Henseleit modificada (FONTELES, 1998), concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 3,2g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO<sub>3</sub> = 4,2g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK e LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

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

#### Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por Balhnamann, Giebisch e Ochwad (1967), Ross (1978) e Fonteles *et al.* (1983). Inicialmente, a veia femoral foi

isolada e manitol (100mg/mL – 3 mL) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

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

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



**Figura 9:** Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão

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

glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) e cloreto (%TCl<sup>-</sup>).

### 3.2.6 Análises bioquímicas

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

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

### 3.2.7 Determinação dos parâmetros funcionais renais

O quadro 3 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Parâmetros renais	Fórmula
1. <b>PP</b> (mmHg)- Pressão de Perfusão	<u>Leitura em manômetro</u>
2. <b>FU</b> (mL.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo Urinário	<b>FU</b> = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3. <b>RFG</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Ritmo de Filtração Glomerular	<b>RFG</b> = (DOU <sub>in</sub> / DOP <sub>in</sub> x FU) sendo DOU <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina na urina e DOP <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina no perfusato.
4. <b>FPR</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo
5. <b>RVR</b> (mmHg/mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Resistência vascular renal.	<b>RVR</b> = PP (mmHg) / FPR

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

**Quadro 3 :** Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais.

### 3.2.8 Análise histopatológica

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (controle), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu\text{m}$ . Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon).

### 3.2.9 Grupos experimentais

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

- Grupo controle: rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (n = 6);
- Grupo tratado com o veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* na concentração de 10µg/mL e 3µg/mL (n = 6).

#### Análise estatística

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

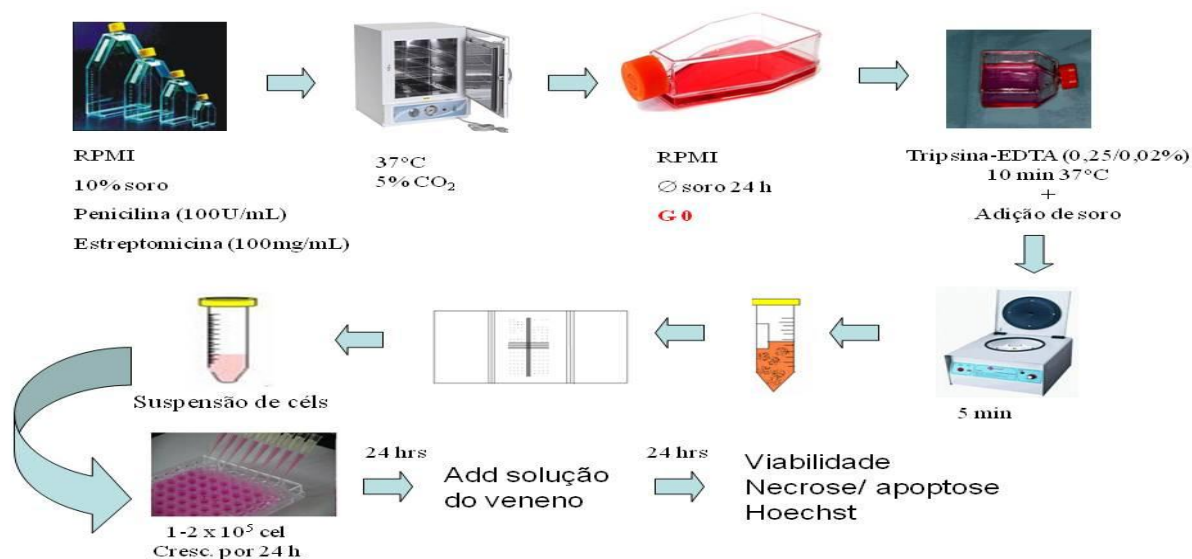
## 3.3 Ensaio com cultura de células

### 3.3.1 Linhagem celular

As células utilizadas foram células tubulares epiteliais renais MDCK (*Madin-Darby Kanine Kidney*) cedidas pela Profa. Alice Martins e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

### 3.3.2 Cultivo das células MDCK

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER e DAWSON, 1992).

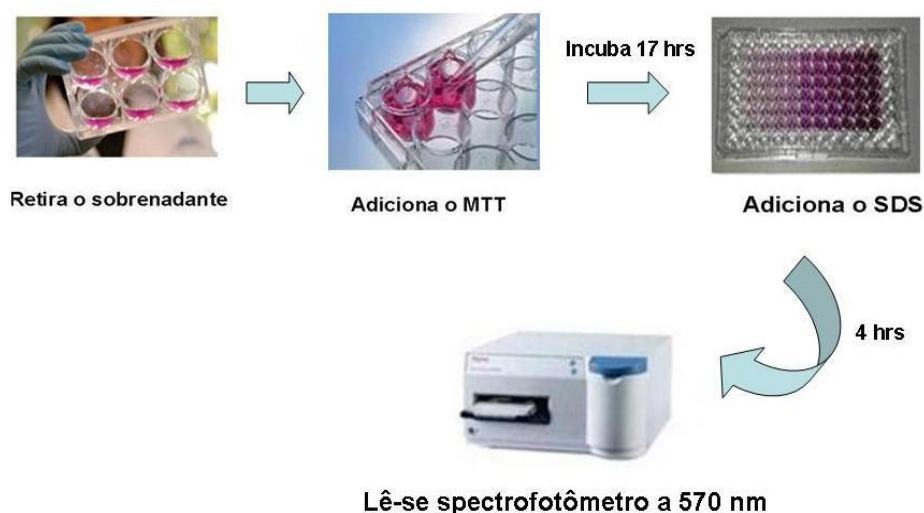


**Figura 10:** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK.

### 3.3.3 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

#### 3.3.3.1 Ensaio com MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomiais. Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorvância. A intensidade da coloração do produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH *et al.*, 2005).



**Figura 11:** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade celular.

### Protocolo experimental

As células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas para sincronizá-las entre as fases  $G_0$  e  $G_1$  do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 10 min em estufa de  $CO_2$  a  $37^\circ C$ , suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram plaqueadas a  $1 \times 10^5$  céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12  $\mu g/mL$ ). Após 24 horas do tratamento com a substância-teste, foi removido 100 $\mu L$  do sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se 10 $\mu L$  da solução do sal de tetrazolium (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de  $CO_2$  à  $37^\circ C$ , adicionou-se 90 $\mu L$  da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de  $CO_2$  à  $37^\circ C$  e após 17 horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

Controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição da substância teste e a viabilidade celular foi

determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

#### Análise estatística

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

#### **3.3.3.2 Análise de efeitos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo.**

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

estágio final de desintegração celular não havendo como diferenciar células em necrose de células em apoptose tardia por este ensaio (BOERSMA *et al.*, 2005).

### Protocolo experimental

As células MDCK foram tratadas com o veneno de *B. pauloensis* na concentração de 7,5 µg/mL. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi coletado, colocado em um tubo (50 mL) e centrifugado a 500 x g por 10 min para coletar células em suspensão. As células aderidas a placa foram lavadas com PBS três vezes e tripsinizadas. O “pellet” obtido após a tripsinização foi ressuscitado no meio que foi retirado do frasco e separado previamente. As células foram centrifugadas novamente e o “pellet” então, ressuscitado em 500µL de tampão do Kit para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100µL desta suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida foi adicionado 5µL de anexina V, iodeto de propídeo, ou ambos, em cada frasco do citômetro, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos com papel alumínio. Por fim, foi adicionado 400µL do tampão e os frascos foram levados para o citômetro de fluxo.

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

### Análise estatística

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

### **3.4 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Essa técnica baseia-se na capacidade de um corante fluorescente específico, se ligar diretamente as mitocôndrias de células viáveis. O éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), é um indicador catiônico que se acumula preferencialmente em mitocôndrias energizadas.

Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo do TMRE de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência.

#### Protocolo experimental

Após 24 horas do tratamento com as substâncias teste, as células foram recolhidas e colocadas em frascos do citômetro, centrifugadas e o precipitado ressuspense em 200µL PBS contendo o TMRE na concentração de 50 nM , após 20 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo.

### **3.5 Medição de EROs intracelular**

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) geradas intracelularmente foram avaliadas utilizando diacetato-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Sigma, EUA), que se difunde através das membranas celulares e é facilmente hidrolizado por esterases intracelulares para formar o DCFH (não fluorescente) que depois é rapidamente oxidado a DCF (2',7'-diclorohidrofluoresceína), altamente fluorescente, por uma ampla diversidade de EROs. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formadas intracelularmente.

#### Protocolo experimental

Após o tratamento de 12 horas com VBp (7,5 µg) , as células foram incubadas com 20 µM de H<sub>2</sub>DCF-DA e mantidas a 37°C por 30 minutos no escuro. Após terminar o período total de incubação as células foram centrifugadas duas vezes, lavadas e ressuspensas com tampão PBS e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo, com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. O hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com DMSO. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan. Os dados baseados no canal FL1 foram analisados com o programa CellQuest.

### Análise estatística

Em cada experimento foram analisados 10000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### **3.6 Determinação das alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* em células MDCK.**

Para estudo das alterações morfológicas induzidas por *VBp* sobre as células MDCK, foi realizada coloração de May Grunwald-Giemsa das células tratadas. Para tal, as células foram cultivadas sobre a superfície de lamínulas de 13 mm em placas de 24 poços na presença de PBS, Triton X-100 ou *VBp* (7,5  $\mu\text{g/mL}$ ) por 12 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada (4000 RPM por 5 minutos), o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram imersas por 2 minutos em metanol gelado para fixação das células. O metanol foi retirado, as lamínulas foram lavadas com água tamponada e, em seguida, imersas em corante May Grunwald por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada desse corante e lavagem com água tamponada, as amostras foram imersas em corante Giemsa (diluição 1:20) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após retirada do corante e nova lavagem com água tamponada, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente da placa de cultivo e postas a secagem em temperatura ambiente. Por fim, a montagem das lâminas foi realizada utilizando entelan. A leitura das lâminas foi realizada em Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam e os grupos foram analisados qualitativamente em relação ao grupo controle.

### **3.7 Aspectos éticos**

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo 79/08).

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Perfusão de rim isolado

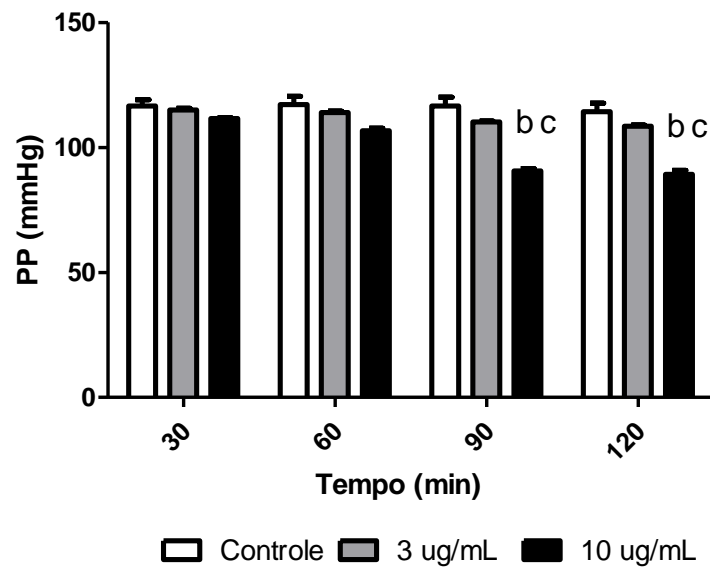
O veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* foi administrado ao sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos após o início dos experimentos. Os 30 minutos iniciais foram considerados como controle interno de cada experimento. Os grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram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

Após aplicação do veneno da *Bothropoides pauloensis* foram observadas alterações na fisiologia renal em todos os parâmetros estudados em pelo menos uma das concentrações testadas. Com relação aos parâmetros vasculares, verificamos queda na pressão de perfusão (PP) na concentração de 10µg/mL aos 90 e 120 min. A resistência vascular renal (RVR) também diminuiu na concentração de 10µg/mL aos 90 e 120 minutos e na concentração de 3 µg/mL aos 120 min (Tabela 1; Figuras 12 e 13, respectivamente).

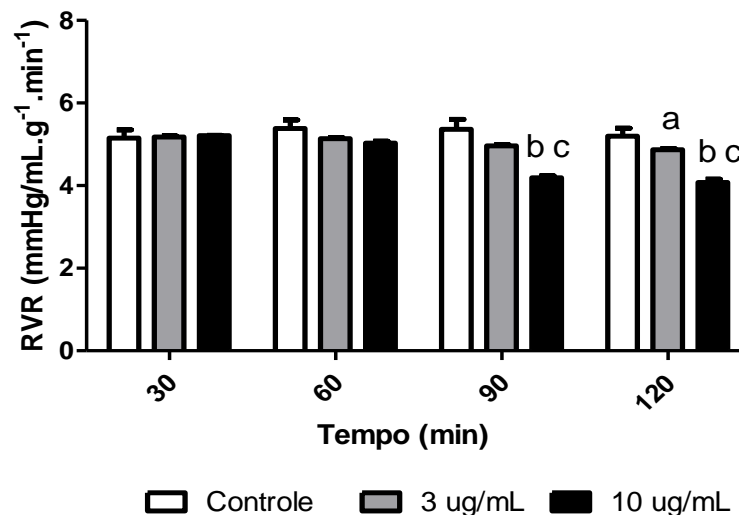
**Tabela 1:** Parâmetros vasculares da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothropoides pauloensis* (3µg/mL e 10µg/mL).

Tempo	PP (mmHg)			RVR (mmHg.mL/g/min.)		
	Controle	VBp(3µg/mL)	VBp(10µg/mL)	Controle	VBp(3µg/mL)	VBp(10µg/mL)
30	111.6 ± 3.2	112.8 ± 1.00	113.4 ± 0.5	5.1 ± 0.5	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.0
60	111.1 ± 3.8	111.8 ± 1.1	109.4 ± 2.5	5.4 ± 0.5	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
90	111.1 ± 4.2	108.0 ± 1.5	91.3 ± 2.7 <sup>*#</sup>	5.4 ± 0.6	5.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1 <sup>*#</sup>
120	112.0 ± 3.1	106.1 ± 1.6	88.9 ± 4.2 <sup>*#</sup>	5.2 ± 0.5	4.9 ± 0.1 <sup>*</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>*#</sup>

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando p<0,05\*(controle externo) e p<0,05<sup>#</sup>(entre as concentrações).



**Figura 12:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* na pressão de perfusão em rim isolado de rato, na concentração de 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL (n=6). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 10 $\mu$ g/mL controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.



**Figura 13:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL (n=6) na resistência vascular renal (RVR). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “a” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 3 $\mu$ g/mL com o controle externo, “b”

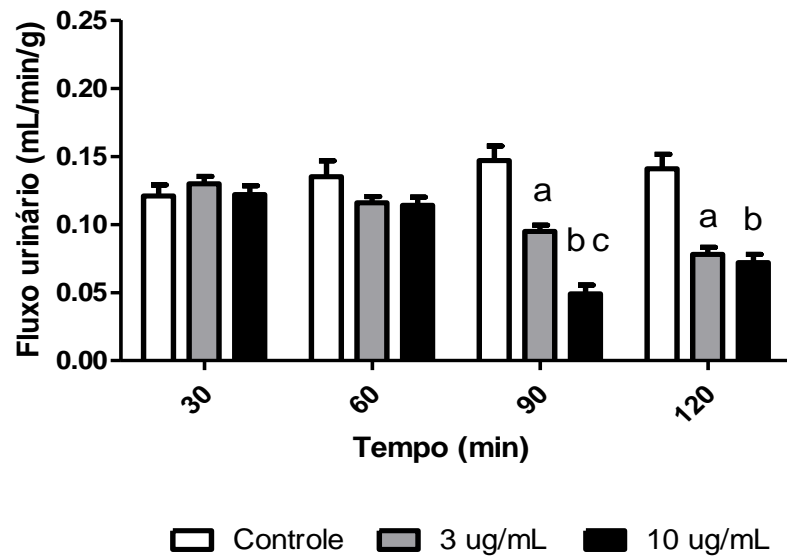
representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  controle externo, "c" representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.

O fluxo urinário (FU) diminuiu aos 90 e 120 minutos em ambas as concentrações, não apresentando diferença significativa entre as concentrações no tempo de 120min. O ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentou uma redução aos 60 minutos em ambas as concentrações, mantendo-se diminuída até o final do experimento, não havendo diferença significativa entre as concentrações no tempo de 60min (Tabela 2, Figuras 14 e 15, respectivamente).

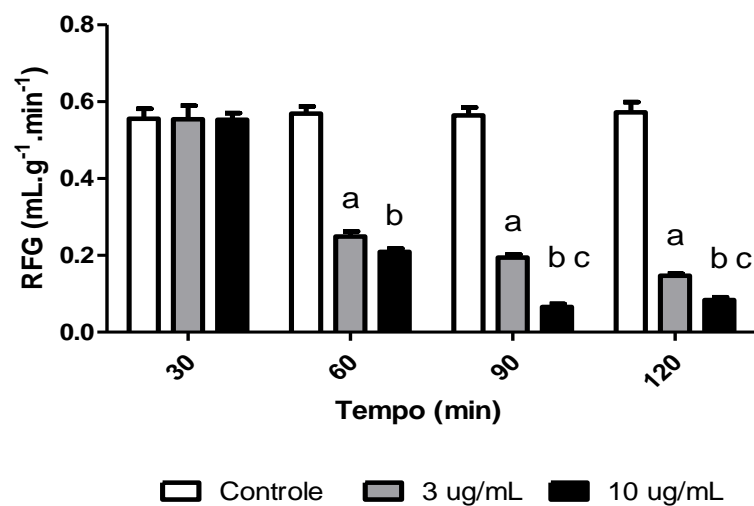
**Tabela 2:** Parâmetros funcionais da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothropoides pauloensis* ( $3\mu\text{g/mL}$  e  $10\mu\text{g/mL}$ ).

Tempo	FU ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )			RFG ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )		
	Controle	VBp( $3\mu\text{g/mL}$ )	VBp ( $10\mu\text{g/mL}$ )	Controle	VBp( $3\mu\text{g/mL}$ )	VBp( $10\mu\text{g/mL}$ )
30	$0.12 \pm 0,02$	$0.13 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$0.56 \pm 0,06$	$0.55 \pm 0,09$	$0.55 \pm 0,04$
60	$0.16 \pm 0,03$	$0.12 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$	$0.57 \pm 0,05$	$0.25 \pm 0,03^*$	$0.21 \pm 0,02^*$
90	$0.15 \pm 0,03$	$0.10 \pm 0,01^*$	$0.05 \pm 0,02^{* \#}$	$0.56 \pm 0,05$	$0.19 \pm 0,02^*$	$0.07 \pm 0,02^{* \#}$
120	$0.14 \pm 0,03$	$0.08 \pm 0,01^*$	$0.07 \pm 0,02^*$	$0.57 \pm 0,07$	$0.15 \pm 0,01^*$	$0.08 \pm 0,02^{* \#}$

Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando  $p < 0,05^*$  (controle externo) e  $p < 0,05^{\#}$  (entre as concentrações).



**Figura 14:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL (n=6) no fluxo urinário (FU). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “a” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 3 $\mu$ g/mL com o controle externo, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de 10 $\mu$ g/mL controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.



**Figura 15:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL (n=6) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “a”

representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $3\mu\text{g/mL}$  com o controle externo, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.

O percentual de transporte tubular de sódio ( $\% \text{TNA}^+$ ) foi reduzido em ambas as concentrações nos tempos de 60, 90 e 120 min, não apresentando diferença significativa entre as concentrações no tempo de 60 min; O transporte tubular de cloreto ( $\% \text{TCl}^-$ ) também foi reduzido aos 60, 90 e 129 min. Em ambas as concentrações; O transporte tubular de potássio ( $\% \text{TK}^+$ ) diminuíram aos 60, 90 e 120 minutos na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$ , na concentração de  $3\mu\text{g/mL}$  reduziu aos 60 min, retornando a valores próximos ao controle no tempo de 90 e 120 min. Não havendo diferença significativa entre as concentrações nos tempos de 60 e 90 min. (Tabela 3 e 4, Figuras 16, 17 e 18, respectivamente).

**Tabela 3:** Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de sódio e cloreto da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothropoides pauloensis* ( $3\mu\text{g/mL}$  e  $10\mu\text{g/mL}$ ).

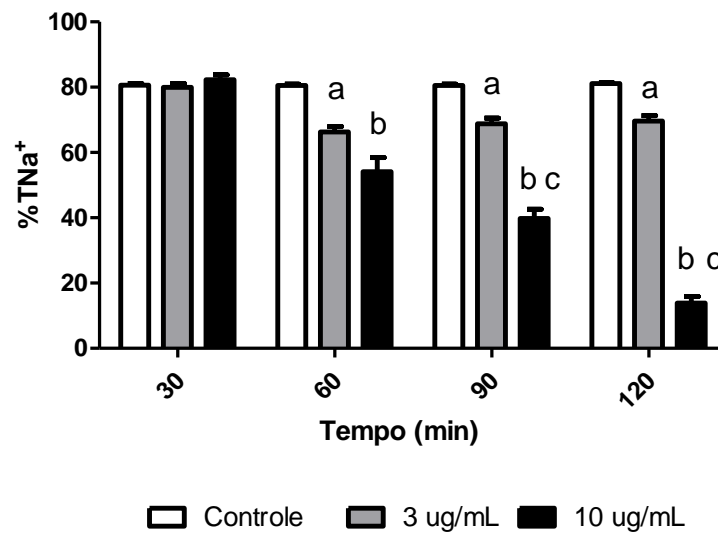
Tempo	% $\text{TNa}^+$			% $\text{TCl}^-$		
	Controle	VBp( $3\mu\text{g/mL}$ )	VBp( $10\mu\text{g/mL}$ )	Controle	VBp( $3\mu\text{g/mL}$ )	VBp( $10\mu\text{g/mL}$ )
30	80.7 $\pm$ 1.1	80.0 $\pm$ 2.7	82.3 $\pm$ 3.6	78.8 $\pm$ 1.3	75.9 $\pm$ 1.7	80.1 $\pm$ 1.0
60	80.5 $\pm$ 1.2	66.3 $\pm$ 4.3*	54.1 $\pm$ 10.6*	80.2 $\pm$ 2.9	57.3 $\pm$ 4.6*	48.6 $\pm$ 1.5*#
90	80.5 $\pm$ 1.1	68.8 $\pm$ 4.2*	39.8 $\pm$ 6.9*#	81.3 $\pm$ 1.2	58.9 $\pm$ 1.2*	36.6 $\pm$ 2.7*#
120	81.2 $\pm$ 0.5	69.6 $\pm$ 4.0*	13.6 $\pm$ 4.9*#	80.5 $\pm$ 2.5	60.5 $\pm$ 1.5*	12.8 $\pm$ 3.6*#

Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando  $p < 0,05^*$  (controle externo) e  $p < 0,05^{\#}$  (entre as concentrações).

**Tabela 4:** Parâmetros eletrolíticos relativos ao transporte de potássio da perfusão de rim isolado de ratos na presença do veneno da *Bothropoides pauloensis* (3µg/mL e 10µg/mL).

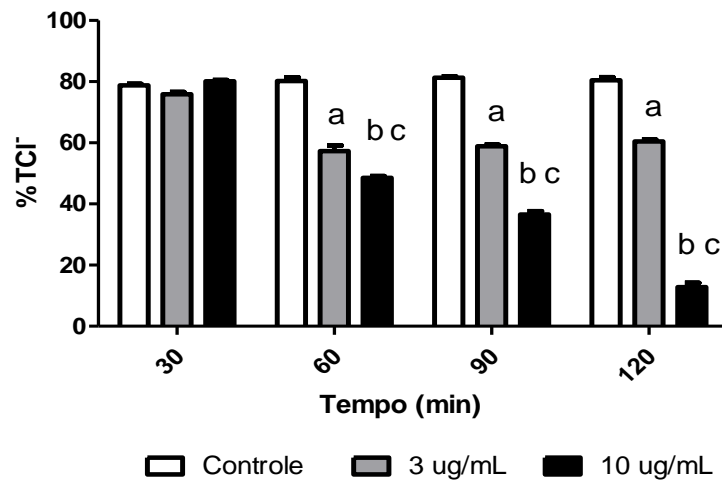
% TK <sup>+</sup>			
Tempo	Controle	VBp(3µg/mL)	VBp(10µg/mL)
30	82.1 ± 2.9	81.4 ± 2.9	84.7 ± 2.3
60	83.7 ± 2.4	68.9 ± 5.7*	61.1 ± 9.0*
90	83.2 ± 3.3	69.2 ± 7.9	54.6 ± 6.3*
120	84.5 ± 3.4	72.5 ± 7.3	21.0 ± 4.4*#

Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, considerando p<0,05\* (controle externo) e p<0,05#(entre as concentrações).

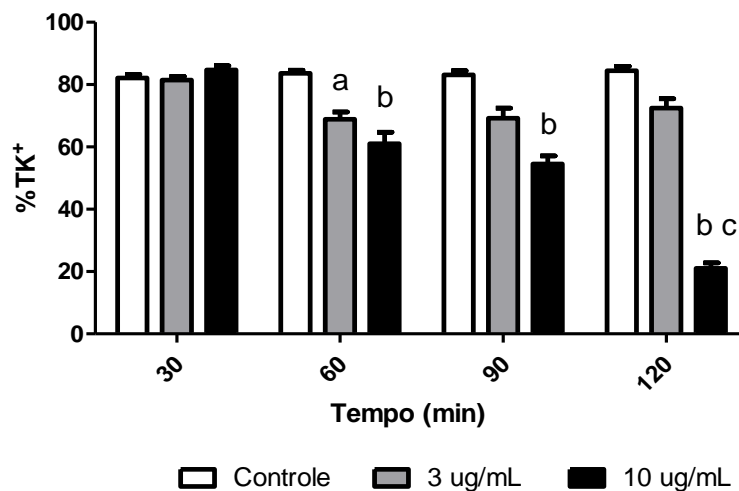


**Figura 16:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* 3µg/mL e 10µg/mL (n=6) no percentual de transporte tubular total de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “a” representa p<0,05 relacionando a concentração de 3µg/mL com o controle

externo, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.



**Figura 17:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*  $3\mu\text{g/mL}$  e  $10\mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ ) no percentual de transporte tubular total de cloreto (%TCI). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de Student, “a” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $3\mu\text{g/mL}$  com o controle externo, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.

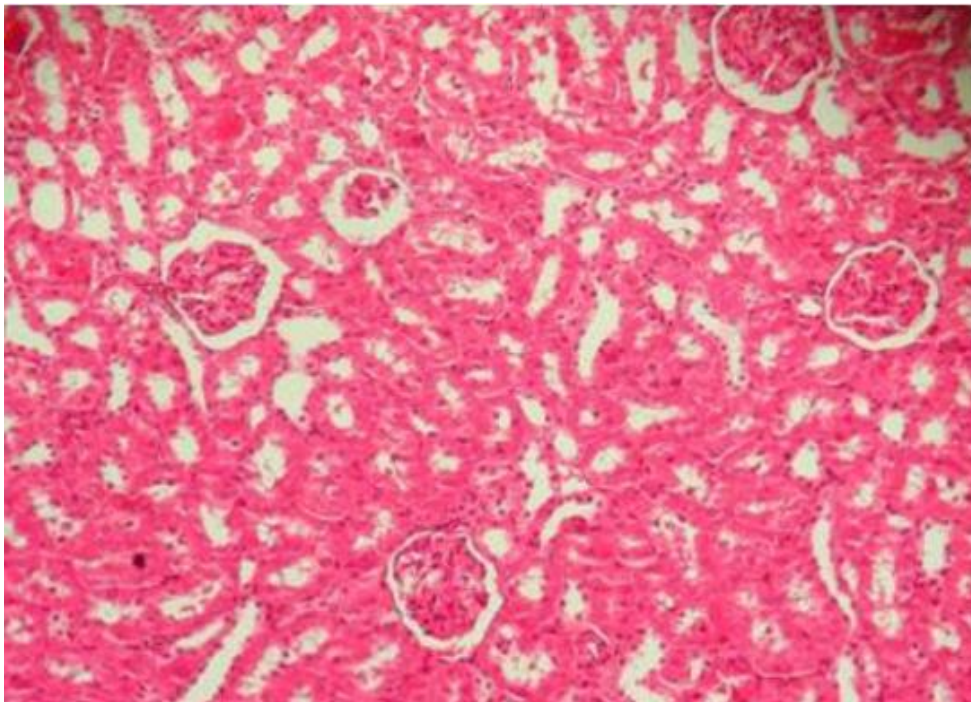


**Figura 18:** Efeitos promovidos pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*  $3\mu\text{g/mL}$  e  $10\mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ ) no percentual de transporte tubular total de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os dados são expressos em (média  $\pm$  E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t

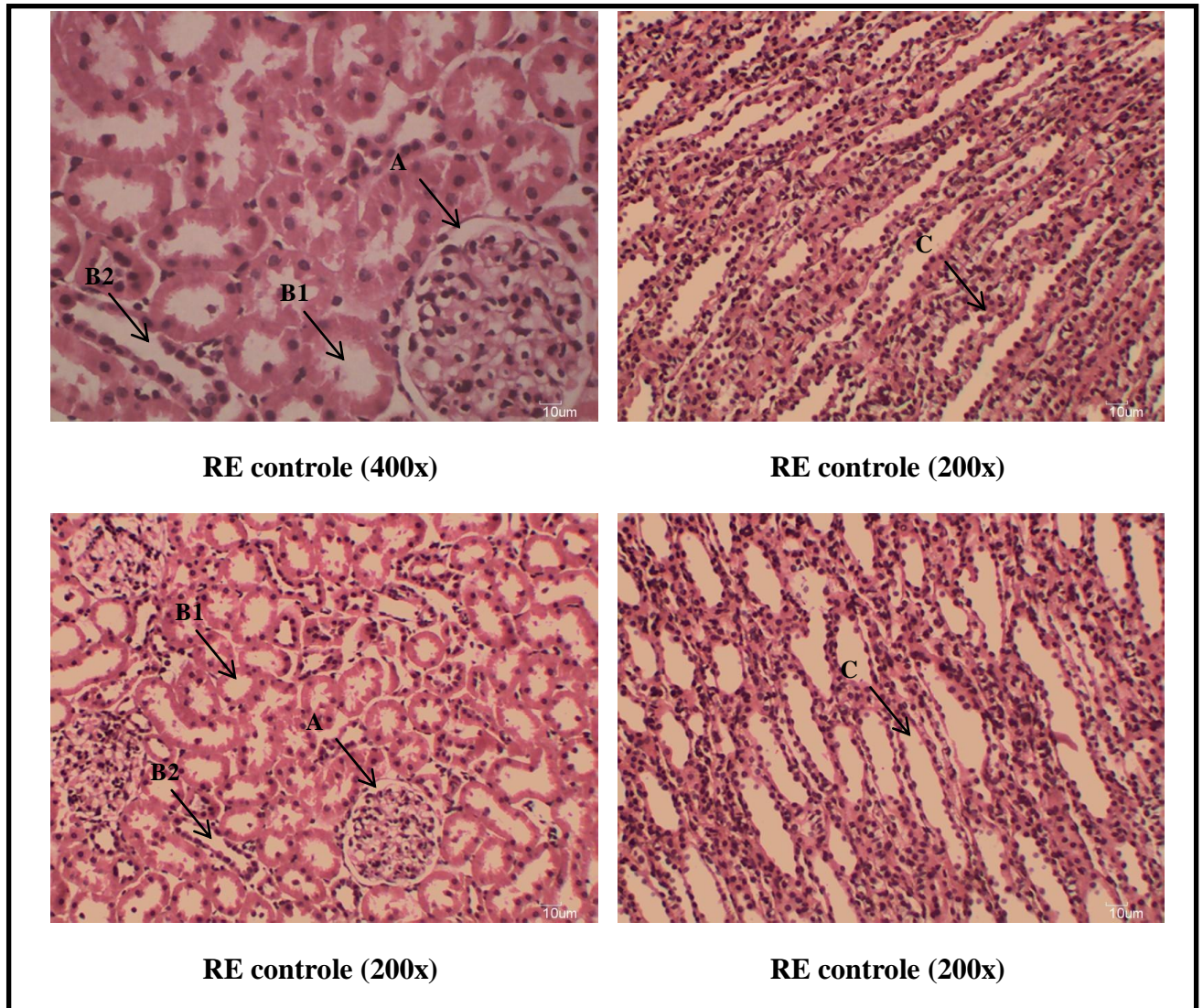
de Student, “a” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $3\mu\text{g/mL}$  com o controle externo, “b” representa  $p < 0,05$  relacionando a concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  controle externo, “c” representa  $p < 0,05$  relacionando as duas concentrações entre si.

#### **4.2 Análise histológica dos rins perfundidos com o veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.**

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

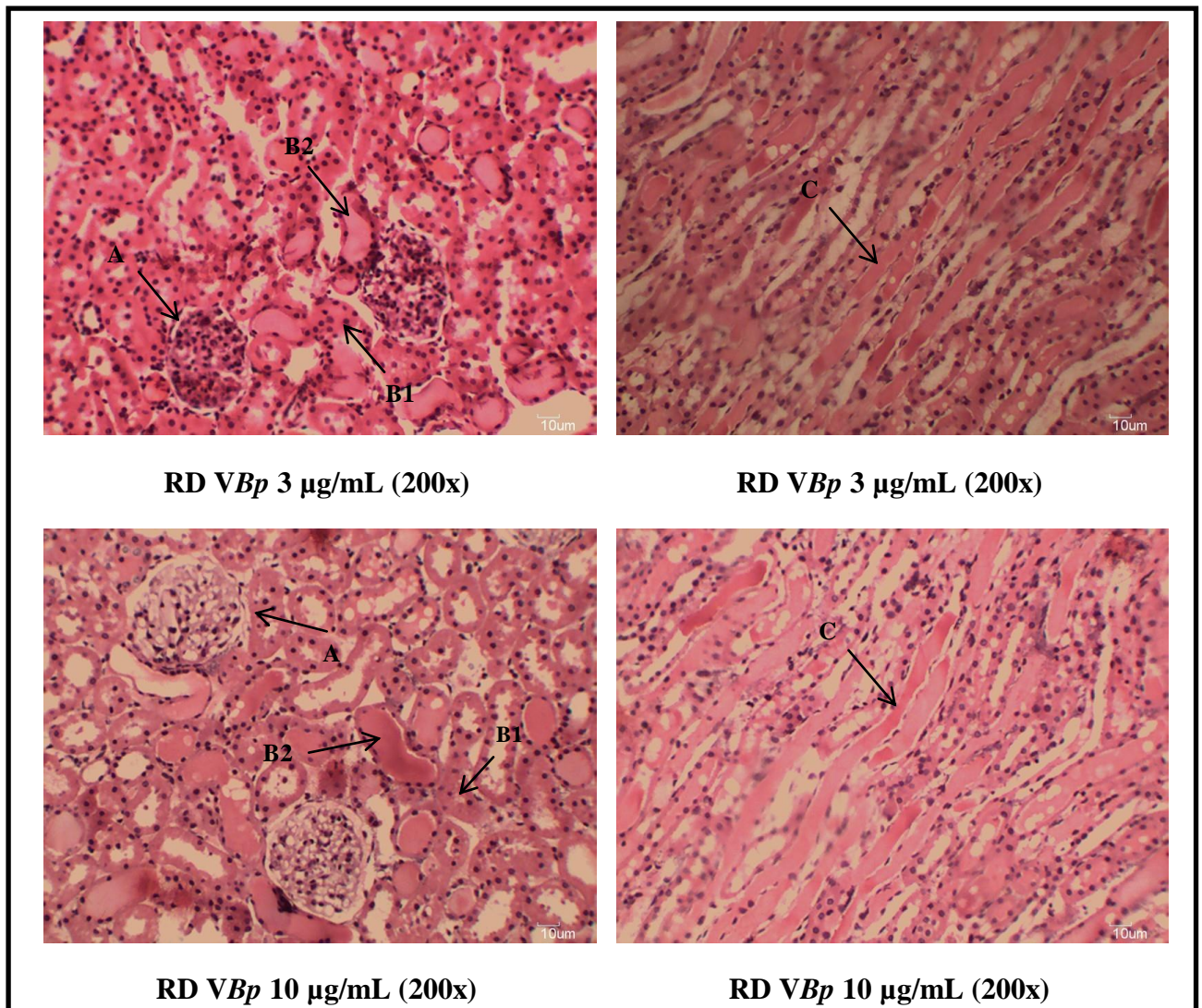


**Figura 19:** Corte histopatológico de rim perfundido somente com solução de Krebs-Hanseleit modificada por 120 min (n=6, coloração de hematoxilina-eosina, aumento 100X).



**Figura 20:** Fotomicrografias de rins não perfundidos, (RE) Rim Esquerdo, em aumentos de 200x e 400x: (A) Glomérulo;(B1) Túbulo Contorcido Proximal; (B2) Túbulo Contorcido Distal; (C) Alça de Henle. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

Na análise histológica dos rins perfundidos com o veneno de *B. pauloensis* na dose de  $3\mu\text{g/mL}$  e  $10\mu\text{g/mL}$ , observamos discreta e moderada deposição proteinácea a nível tubular, respectivamente. Presença pequenos focos de núcleos tubulares picnóticos. Glomérulos, interstícios e vasos normais (Figura 21).

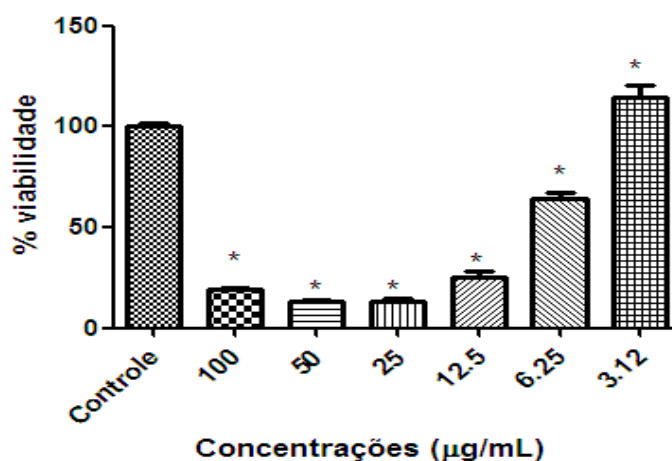


**Figura 21:** Fotomicrografias de rins perfundidos, (RD) Rim Direito, por VBP (3 µg/mL e 10 µg/mL) em aumentos de 200x e 400x, evidenciando alterações na arquitetura renal: Discreta e moderada deposição de material proteínico nas concentrações de 3 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente, em (B1) Túbulo Contorcido Proximal; (B2) Túbulo Contorcido Distal; (C) Alça de Henle. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

### 4.3 Avaliação da atividade do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis* sobre células MDCK.

#### 4.3.1 Ensaio de viabilidade celular.

A citotoxicidade do veneno da *Bothropoides pauloensis* (VBp) foi avaliado em células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (100; 50, 25, 12,5 , 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ ) . No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que o veneno reduziu significativamente a viabilidade das células MDCK em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle, apresentando citotoxicidade até 3,12  $\mu\text{g/mL}$  ( $\text{CI}_{50}=7,5\mu\text{g/mL}$ ). A figura 22 representa a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

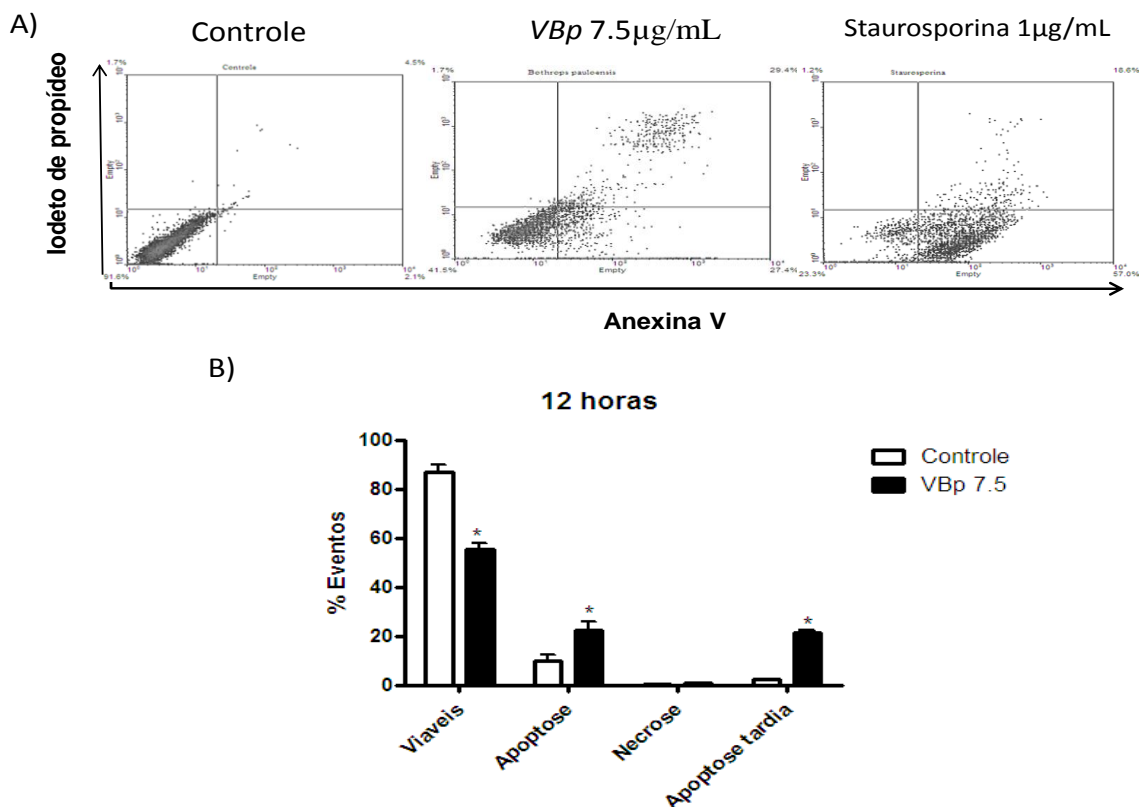


**Figura 22:** Efeito do Veneno Total de *Bothropoides pauloensis* em diferentes concentrações sobre as células MDCK. Os dados são expressos por média  $\pm$  EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Considerando  $p < 0,05^*$ .

### 4.3.2 Análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo.

Após verificar a citotoxicidade, buscamos identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por VBp, as células tratadas por 12 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por iodeto de propídio (PI) e anexina-FITC. No ensaio realizado, podemos observar que a morte celular ocorreu predominantemente por apoptose, com certa frequência de apoptose tardia (Figura 23 A).

Na figura 23 B, observa-se que a porcentagem de células marcadas com anexina V é predominante no experimento, evidenciando o processo de morte por apoptose na concentração de 7,5  $\mu\text{g/mL}$ . A marcação por PI (que evidencia células em processo de necrose) não foi significativa com relação ao controle. O processo de morte celular por necrose secundária (ou apoptose tardia) também foi observado, podendo representar evidências de um processo de morte celular por apoptose incompleto que culminou em necrose. A staurosporina foi utilizada para controle positivo.



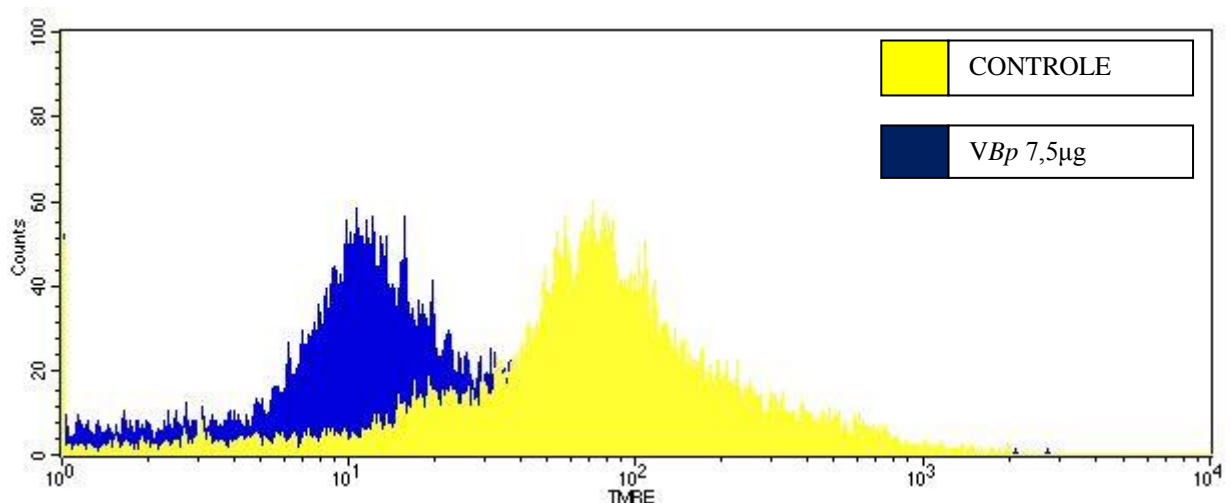
**Figura 23:** (A) Gráficos de dispersão representativos do perfil de marcação simultânea de células MDCK com Anexina-V-FITC (quadrante inferior direito das plotagens – indício de

apoptose), PI (quadrante superior esquerdo das plotagens – início de necrose). No quadrante inferior esquerdo das plotagens, estão representadas as células sem marcação (células que demonstram estar viáveis). No quadrante superior direito das plotagens estão representadas as células com dupla marcação (início de necrose secundária). **(B)** Quantificação do tipo de morte celular (Apoptose/Necrose) utilizando marcação de fluorescência com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) nas células MDCK expostas a uma única concentração do veneno da *Bothropoides pauloensis* por um período de 12h. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e os dados expressos como porcentagens de eventos  $\pm$  EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA,  $p < 0,05$ .

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

Nesse ensaio as células foram incubadas com tetrametilrodamina (TMRE), corante fluorescente específico que se liga diretamente as mitocôndrias de células viáveis. Em células que estejam em processo de apoptose, especificamente pela via intrínseca ou mitocondrial, a mitocôndria sofre alterações no seu potencial transmembrânico, ocorrendo perda do TMRE acumulado na mitocôndria para o citosol, havendo uma emissão menor de fluorescência na organela.

A análise do potencial de membrana mitocondrial foi avaliado com as células MDCK tratadas com o veneno da *B. pauloensis* na dose de  $7,5\mu\text{g/mL}$ . A figura 24 evidência que o tratamento com o VBp, aumenta a concentração do TMRE no citosol, após o seu extravasamento, conseqüente à despolarização mitocondrial, indicando queda do  $\Delta\Psi_m$ , mostrado pelo deslocamento do gráfico à esquerda.

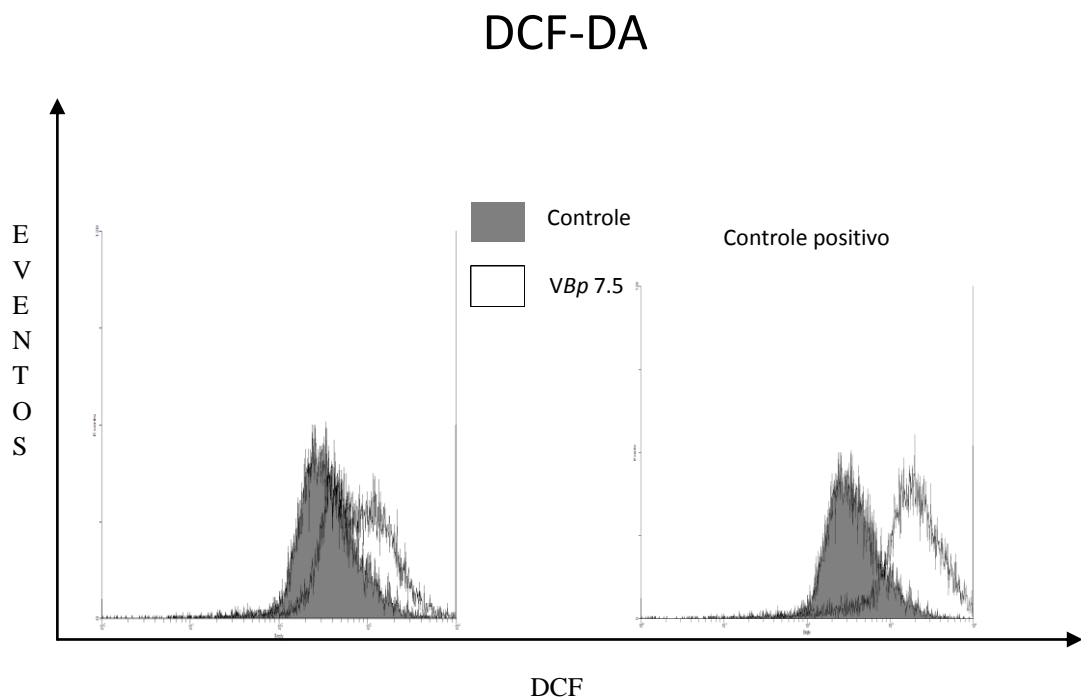


**Figura 24:** Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial em células tratadas com *VBp* 7,5µg/mL, foi medido pela coloração TMRE e detectado por citometria de fluxo. FCCP foi usado como controle positivo. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan.

#### 4.5 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um papel fundamental na via intrínseca de sinalização da apoptose, pois medeiam dano ao DNA, sendo o DNA mitocondrial particularmente vulnerável, devido à cadeia transportadora de elétrons (FRUEHAUF, MEYSKENS Jr., 2007).

Na análise, observou-se que a concentração testada ( $CI_{50} = 7,5 \mu\text{g}$ ) foi capaz de gerar EROs após 12h de incubação, representado pelo desvio à direita.



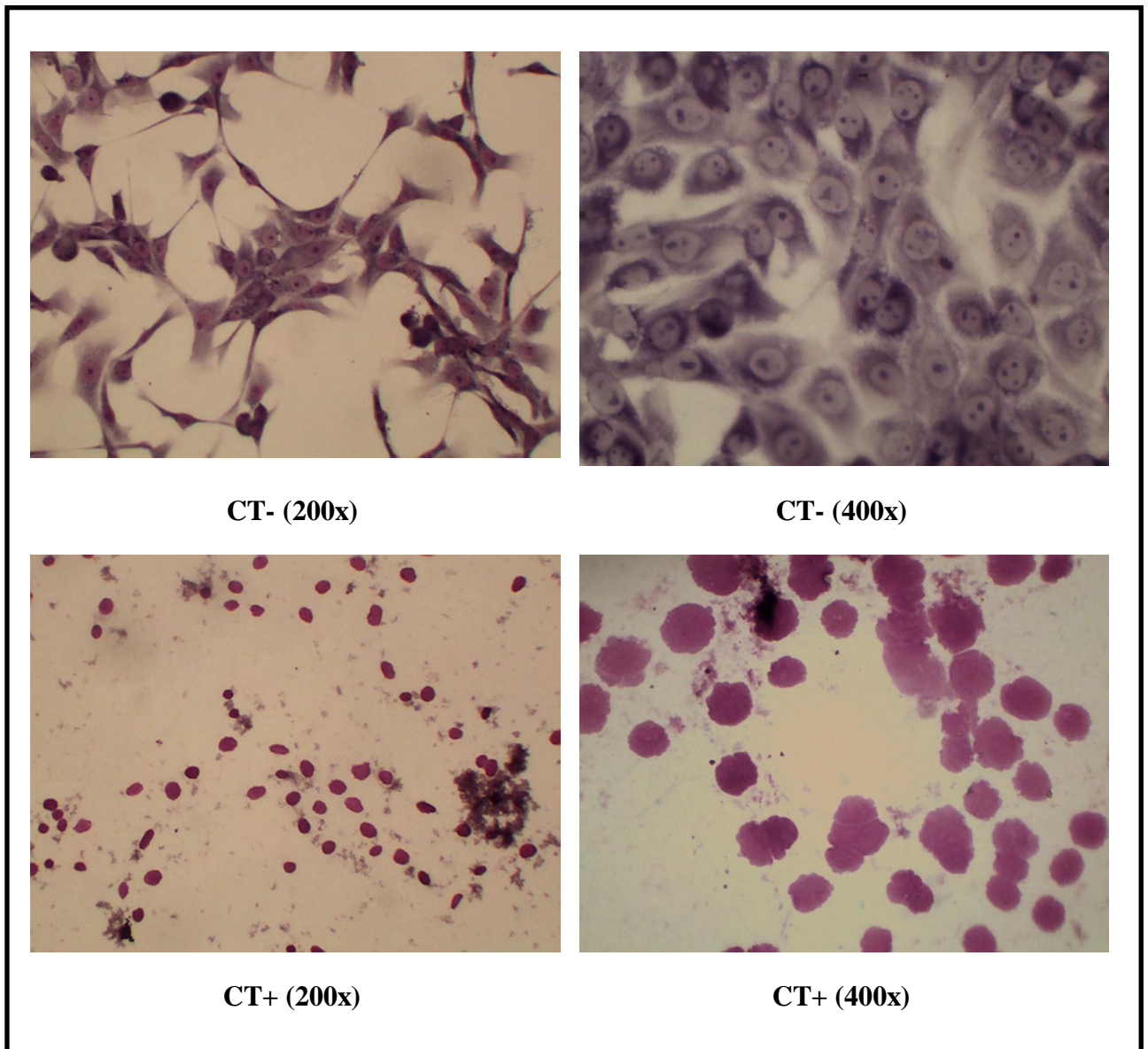
**Figura 25:** O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar a substância testada, ou seja o DMSO. O hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) foi utilizado como controle positivo. O citômetro de fluxo utilizado foi FACScan.

#### 4.6 Alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.

Após 12 horas de incubação das células MDCK com veneno de *B. pauloensis* (7,5 µg/mL), PBS (controle negativo) e Triton X-100 (controle positivo) sobre a superfície de lamínulas, as células foram fixadas e coradas para avaliação morfológica (coloração de May-Grunwald Giemsa). Os controles positivos e negativos encontram-se na figura 26. As alterações mais características e relevantes observadas após o tratamento com *VBp* foram microfotografadas e estão demonstradas na figura 27 e 28 e listadas na tabela 5. Foram encontradas diversas alterações morfológicas importantes e consistentes com células em processo de apoptose, como tumefação celular, lise, condensação nucléica, aumento do número de prolongamentos citoplasmáticos, *blebbing*, redução do volume celular e aparecimento de núcleos desnudos.

#### Quadro 4: Características controle negativo e controle positivo

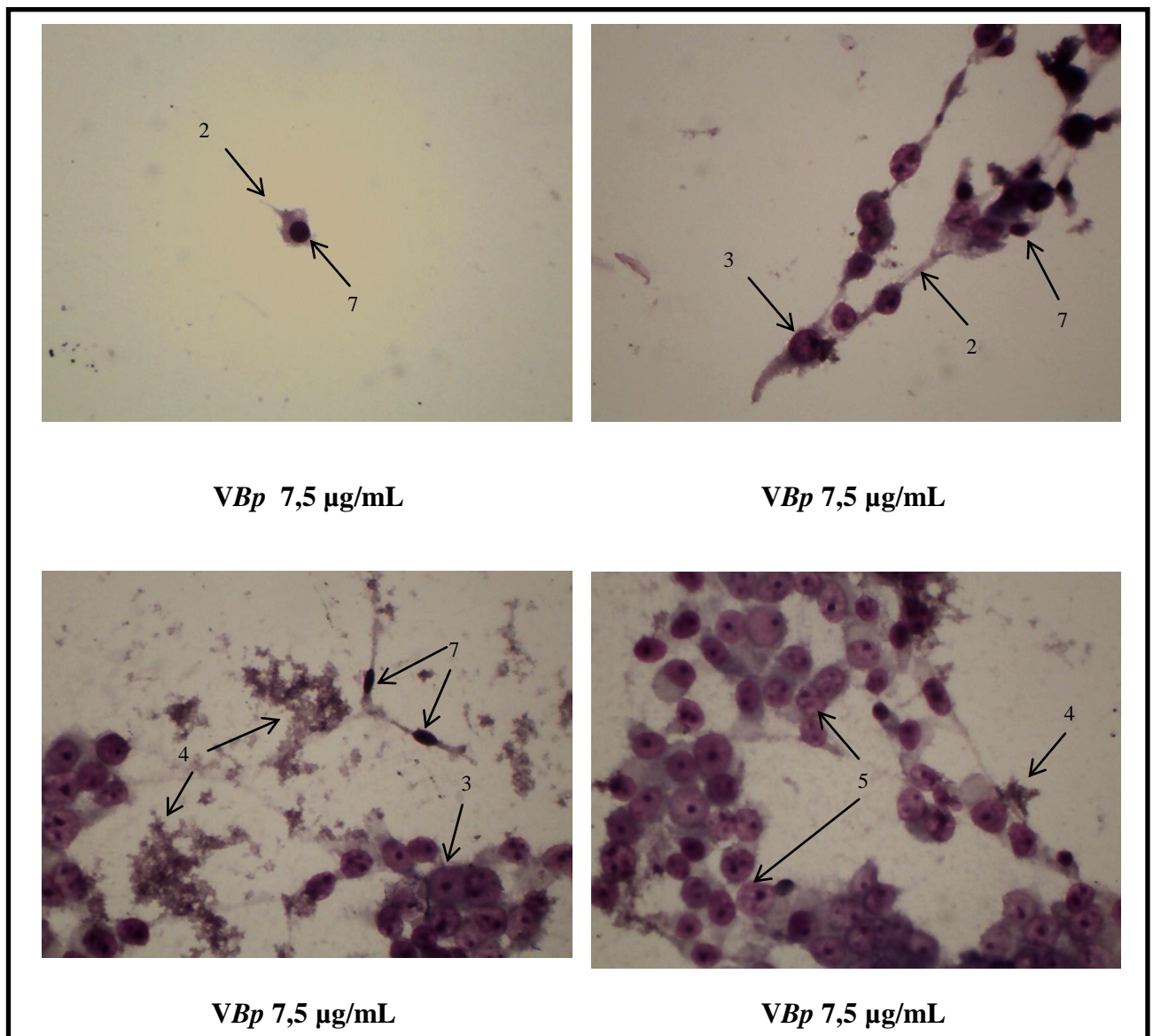
<u>CONTROLE NEGATIVO</u>	<u>CONTROLE POSITIVO</u>
Células de moderada coesão e organizadas em monocamada, que exibem pleomorfismo moderado (células poligonais, irregulares ou fusiformes), com citoplasma amplo, por vezes, com múltiplos pequenos vacúolos irregularmente distribuídos, núcleos de contornos regulares, cromatina fina e nucléolos evidentes. Raros focos de sobreposição celular. Algumas células gigantes e figuras de mitose entremeadas.	Células desnudas de moderada anisocariose com núcleos ovalados, arredondadas e fusiformes com cromatina irregularmente condensada, alguns deles picnóticos. As células estão isoladas. Não se encontrou figuras de mitose. Fundo rico em debris celulares.



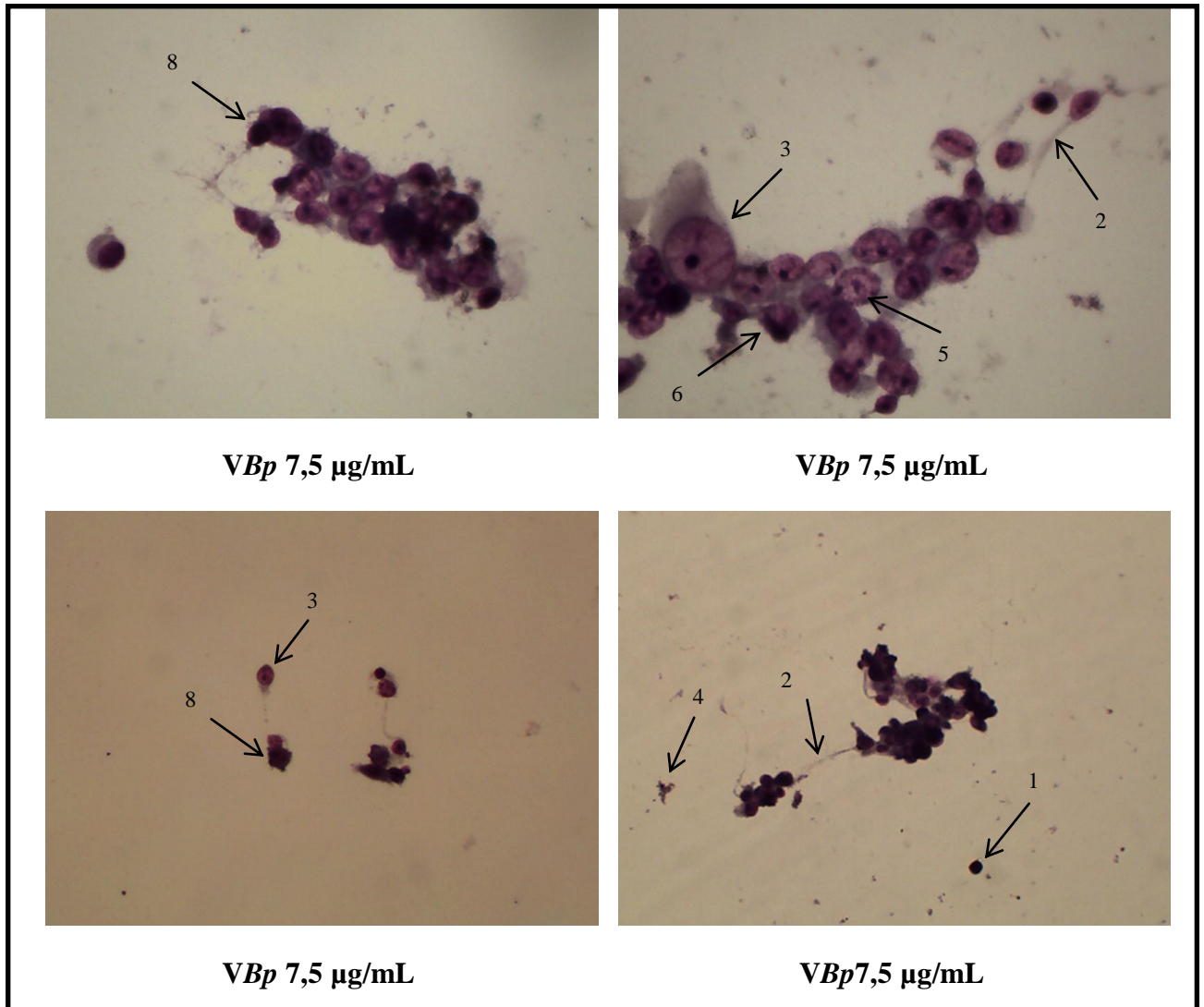
**Figura 26:** Fotomicrografias em aumentos de 200x e 400x de células MDCK. (CT-) Controle negativo (células não tratadas com *VBp*, usando apenas PBS). (CT+) Controle Positivo (células tratadas com Triton X). PBS foi utilizado como controle negativo e Triton X-100 como controle positivo. Coloração de May-GrunwaldGiemsa. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam.

**Tabela 5.** Alterações encontradas no ensaio de avaliação morfológica das células MDCK tratadas com o veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*.

Legenda	
1	Células com núcleos desnudos, indicativo de lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático.
2	Células com prolongamentos citoplasmáticos semelhantes a pseudópodes.
3	Tumefação celular.
4	Aparecimento de detritos celulares.
5	Aumento do número de células vacuolizadas.
6	Diminuição do volume celular, com morfologia semelhante a corpos apoptóticos.
7	Condensação nuclear e picnose.
8	<i>Blebbing</i> – Formação de estruturas bolhosas na membrana indicativas de apoptose.



**Figura 27:** Fotomicrografias em aumento de 400x das alterações morfológicas induzidas por VBp em células MDCK após 12 horas de incubação, observadas após coloração May-GrunwaldGiemsa. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam. A legenda para as alterações apontadas encontra-se na tabela 5.



**Figura 28:** Fotomicrografias em aumentos de 200x e 400x das alterações morfológicas induzidas por *VBp* em células MDCK após 12 horas de incubação, observadas após coloração May-GrunwaldGiemsa. Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam. A legenda para as alterações apontadas encontra-se na tabela 5.

## **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* é composto por peptídeos, enzimas, proteínas e substâncias químicas produzidas pelos animais para a predação, digestão e proteção, que podem causar lesão celular, levando a um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde dor local e edema a sintomas sistêmicos severos, dependendo da quantidade de veneno inoculado (WARRELL, 2010).

Após o envenenamento, uma cascata imunológica conduz uma resposta protetora aos indivíduos picados ou animais experimentais. Embora essa ativação do sistema imunológico seja geralmente de proteção, pode ocorrer um choque séptico, devido a resposta imune excessiva ou mal regulada para a lesão ocorrida no organismo. Essa reação desequilibrada prejudica a vítima do acidente ofídico, uma vez que provoca a geração desordenada de mediadores endógenos (BAUD e KARIN, 2001).

Muitos mecanismos estão envolvidos na patogênese do envenenamento. Foi demonstrado também que componentes isolados do veneno, como fosfolipases, promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores. Metaloproteínases dependentes do zinco induzem a liberação inicial de fator de necrose tumoral. Todos esses mediadores são o passo inicial para o desenvolvimento de complicações teciduais renais, incluindo a IRA (SITPRIJA, 2012). As citocinas estão envolvidas em dois grupos importantes: as pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e as anti-inflamatórias, tais como IL-10. Outro mediador envolvido é o NO, que atua na manutenção do tônus vasodilatador e da pressão arterial e tem sido sugerido que o choque circulatório é causado por ativação da isoforma induzível (tipo II) da NOS (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Efeitos hemodinâmicos de toxinas em experimentos de perfusão de rim isolado refletem o efeito vascular renal das toxinas sem interferências que ocorreriam em metodologias *in vivo*, onde os efeitos observados seriam provenientes de respostas renais secundárias de mediadores inflamatórios vasoativos endogenamente produzidos no animal em estudo. No caso do estudo com o veneno da víbora de Russell (SITPRIJA, 2012) observa-se a diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular em estudo com animal *in vivo*, enquanto que na perfusão de rim isolado o fluxo sanguíneo renal não é alterado, mas a taxa de filtração glomerular é reduzida. Essa descoberta indica que o veneno em estudo não

tem efeito vascular no músculo liso e a taxa de filtração glomerular reduzida é devido ao efeito de veneno em células mesangiais, envolvendo a liberação de mediadores inflamatórios vasoativos endogenamente gerados, incluindo as catecolaminas, renina, angiotensina II, endotelinas (CHAIYABUTR e SITPRIJA, 1999). Estudo posterior provou que o efeito era mediada por prostaglandinas, tendo seu efeito bloqueado por indometacina (THAMAREE *et al.*, 1994).

Os venenos botrópicos apresentam vários peptídeos que intensificam a resposta à bradicinina, e conseqüentemente, a produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular. Rocha e Silva *et al.*, foram os primeiros a descobrir e descrever o neuropeptídeo bradicinina como regulador crucial da pressão sanguínea (Rocha e Silva *et al.*, 1949). Posteriormente, esses peptídeos foram isolados do veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwidi* e *Bothrops jararacussu* e foram caracterizados como inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (FERREIRA *et al.* 1970, 1992, 1998). A bradicinina participa fisiologicamente da regulação da pressão sanguínea e da função renal. Trata-se de uma potente substância vasodilatadora que atua através da ativação de receptores B2, estimulando a liberação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MOUREAU *et al.*, 2005). Guimarães *et al.*, 1986 demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal em rim isolado de rato.

O córtex renal normal produz grande quantidade de PGE2 e PGI2 e pouca quantidade de TXA2. PGE2 e PGI2 têm ação vasodilatadora no rim. Estes prostanóides seriam responsáveis por influenciar o fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e liberação de renina (OSBORN *et al.*, 1984). Infusões intrarenal de prostaglandinas aumentaram o fluxo sanguíneo renal e produziram efeito natriurético, inibindo a reabsorção tubular de sódio e na alça ascendente de Henle reduziram o transporte tubular de cloreto (SIMMONS *et al.*, 2004).

O estudo de Pirotzky *et al.* (1984) evidencia a participação de substâncias vasoativas como histamina e PAF podem ser liberadas em rim isolado de rato. O PAF em doses baixas produz vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular.

Foi demonstrado também que componentes isolados do veneno, como fosfolípases, promovem a liberação de corticosteróides e resposta de fase aguda ao estímulo. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetário, catecolaminas e endotelina estão envolvidos como mediadores. Metaloproteinases dependentes do zinco induzem a liberação inicial de fator de necrose tumoral. Todos esses mediadores são o passo inicial para o desenvolvimento de complicações teciduais renais, incluindo a IRA (SITPRIJA, 2012).

Por se tratar de um experimento que utilizou-se o veneno total de *Bothropoides pauloensis*, não se pode afirmar que a redução da PP observada é devida a um componente específico. Mesmo com essa limitação, mediadores como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-10 e interferon-gama (INF- $\gamma$ ), podem estar envolvidos nesse processo de diminuição da PP, uma vez que peçonhas geralmente induzem a liberação dessas substâncias (CRUZ *et al.*, 2008). Pode haver ainda compostos que exerçam ação direta no tecido renal. Em relação ao supracitado, os peptídeos potenciadores da bradicinina, juntamente com a liberação dos mediadores inflamatórios com ação vasodilatadora, poderiam estar envolvidos na redução da pressão de perfusão observados nesse estudo, em particular na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , pois esses parâmetros não foram alterados pela concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ , podendo ser justificado pela própria concentração experimental utilizada, que é significativamente menor, não sendo capaz de modificar tais parâmetros vasculares (não foi suficiente para liberar mediadores em quantidade suficiente para diminuir a PP).

Esses mediadores inflamatórios com potencial relaxante podem ter contribuído também para a redução da Resistência Vascular Renal (RVR), na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , tornando-se significativa na concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de 120 min. Esses resultados tornam a identificação de moléculas endógenas e exógenas cada vez mais importante para elucidarmos esse complexo mecanismo do tônus vascular.

A redução do RFG e do FU, pode ser correlacionado com a diminuição da PP e da RVR, no caso da concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , o que pode ter ocasionado isquemia em algumas áreas dos rins, e dessa forma promover lesão renal de modo indireto e também por ação citotóxica direta do veneno. Na concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ , também se observa a redução dos parâmetros anteriormente citados, porém não há uma relação direta com a diminuição da PP, já que essa concentração não foi capaz de modificar esse parâmetro vascular, podendo ser resultado então de uma ação direta do veneno.

Ressaltando-se, novamente, a participação do NO, além de ser um agente vasodilatador, alterando a hemodinâmica renal, ele também participa do controle de fluidos extracelulares. Esse mediador exerce um papel importante na excreção renal. Um estudo no qual se inibiu experimentalmente a produção de NO, resultou em diminuição da irrigação renal e na diminuição do transporte de sódio, demonstrando que esse mediador estimula a excreção de sódio (SANTHOSH *et al.*, 2013).

A literatura também destaca que os venenos Botrópicos são extremamente lesivos aos túbulos renais (SITPRIJA, 2012). Os efeitos renais no envenenamento ofídico podem ser decorrentes de coagulação intravascular disseminada, ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica do veneno ou a espasmos dos vasos sanguíneos decorrentes da liberação de substâncias vasoativas (CHAIYABUTR; SITPRIJA, 1999; CALGAROTTO et al., 2008). Vários autores concordam que a ação proteolítica dos venenos botrópicos tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ e LOMONTE, 1995), induzindo liberação de uma série de mediadores inflamatórios com propriedades vasoativas (CHAVES *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que o veneno de *Bothropoides pauloensis* apresenta uma intensa atividade proteolítica (OLIVEIRA *et al.*, 2009), podendo desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. O próprio acúmulo de proteínas nos túbulos pode estar impedindo a reabsorção de Na<sup>+</sup>. O aumento da permeabilidade (possivelmente com o envolvimento do PAF ou mediadores inflamatórios, como histamina) pode estar ocasionando o extravasamento de proteínas, tornando-se lesivo aos túbulos renais. Todos esses fatores citados podem estar contribuindo para a perda da função de transporte das células epiteliais renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos como sódio, cloreto e potássio observados nesse estudo (em ambas as concentrações).

Neste trabalho, o estudo da histologia renal é compatível com um efeito citotóxico direto do *VBp*. As alterações nos túbulos renais se mostram mais pronunciadas na maior concentração (10 µg/mL). Observou-se deposição proteinácea em túbulos proximais, distais, coletores e alça de henle, podendo, assim, justificar a diminuição do transporte de eletrólitos (sódio, cloreto e potássio). Apresentando glomérulos, interstícios e vasos normais.

A ausência de achados glomerulares discordam de pesquisas realizadas por Boer-Lima (2002) que observou alterações glomerulares ao estudar o veneno da serpente *Bothrops moojeni*, porém corroboram com outros resultados encontrados como *Bothrops lutzi* (SOUSA, 2010). Essa divergência pode ser devido à variabilidade dos componentes dos venenos estudados. No caso de Boer-Lima 2002, deve-se dar atenção especial ao protocolo experimental (utilização de animais *in vivo*), uma vez que se atribui o depósito de proteínas, como hemoglobina, a mioglobina e a fibrina, nas estruturas glomerulares, ao desenvolvimento de um quadro de glomerulonefrite e alterações funcionais e morfológicas dessas estruturas (SITPRIJA, 2012). Ressaltando que o nosso protocolo experimental é em órgão isolado e que na solução perfusora não há células e a única proteína presente é a albumina bovina. Isso pode

ter contribuído para a não observação de possíveis degenerações glomerulares e de células mesangiais.

Ainda nos achados histológicos, observou-se a discreta presença de núcleos tubulares picnóticos. Sugerindo um possível mecanismo apoptótico/dano celular direto às células tubulares. Podendo ser conseqüência de uma hipoperfusão promovida pelo veneno. Dessa forma, a hipoperfusão seria devido à diminuição da PP e RVR.

Vários estímulos podem levar as células tubulares renais à apoptose: injúria celular desencadeada pela isquemia/hipóxia (própria hipoperfusão), estresse oxidativo, danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, perda de adesão celular, entre outros (TAIT e GREEN, 2010).

O processo de necrose não foi levantado, pois não havia indícios de infiltrados inflamatórios, o que iria diferenciar do processo de apoptose, porém, ressaltando-se novamente a metodologia empregada, na solução perfusora não há células, impossibilitando a visualização desses infiltrados.

Para análise da possível via de morte celular, realizamos as seguintes metodologias: análise do efeito apoptótico e necrótico por citometria de fluxo, medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), assim como a análise morfológica celular.

Uma das primeiras indicações que as mitocôndrias participam da regulação de apoptose originou-se da observação de que em *Caenorhabditis elegans* CED -9 (o ortólogo verme de linfoma de células B humano 2 (BCL-2), um componente do núcleo maquinaria apoptótica, está amarrado a membrana mitocondrial externa (KROEMER, 2012).

Inicialmente, pensava-se que as mitocôndrias funcionavam como mero sinalizador nesse contexto, mas logo se evidenciou que elas participavam ativamente da morte celular programada, abandonando então a visão simplista de que as mitocôndrias são puramente organelas metabólicas (KROEMER, 2012).

A descoberta do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) constitui um passo inicial e irreversível de múltiplas cascatas de transdução que conduzem à morte da célula por apoptose. Desde então, as vias de sinalização para apoptose através da perturbação da permeabilidade de membrana mitocondrial externa, tem sido extensivamente caracterizadas.

Assim, as mitocôndrias ocupam uma posição central na regulação e execução da morte celular. Deste modo, os eventos que alteram o potencial mitocondrial, estão associados com uma grande variedade de patologias humanas, incluindo doenças infecciosas, condições de isquemia, distúrbios neurodegenerativos e câncer (TAIT e GREEN, 2010).

Além disso, tornou-se recentemente claro que mitocôndrias são capazes de emitir uma série de sinais intracelulares de perigo para alertar a célula de perturbações na homeostase mitocondrial. Estes incluem, mas não se limitando a estes, produtos metabólicos do DNA mitocondrial (mtDNA), como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas codificadas pelo núcleo (KROEMER, 2012).

Realizou-se o estudo do efeito do *VBp* em diferentes concentrações sobre células tubulares renais MDCK, que trata-se de uma linhagem de células com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO, SUEUR e CRUZ-HÖFLING, 2002). Utilizamos o ensaio de MTT, técnica largamente usada para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular (MOSMAN *et al.*, 1993). Observamos uma redução significativa da viabilidade celular, em todas as concentrações estudadas (CI<sub>50</sub>=7,5 µg/mL). Resultado que corrobora com outros dados descritos na literatura. Nascimento *et al.*, (2007) avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus*, Collares buzato *et al.*, (2002) estudos com a *Bothrops moojeni* e Moraes *et al.*, 2013, com a *Bothrops leucurus*, todos em células MDCK, também verificaram redução da viabilidade celular.

Os experimentos para o estudo de indução de apoptose e de necrose foram realizados com Kit para detecção de morte celular que permite a marcação das células com anexinaV-FITC, que caracteriza a apoptose e iodeto de propídeo (PI) que caracteriza necrose. Foi observado nesse ensaio o aparecimento de três populações celulares: células viáveis, não marcadas com PI ou anexina-FITC; células apoptóticas, detectadas pela ligação específica da anexina-FITC à fosfatidilserina translocada para o folheto externo da membrana plasmática; e células marcadas duplamente, consideradas células que passaram pelo processo de indução apoptótica e, por não terem sido fagocitados, são lisados e entram em necrose secundária (ou apoptose tardia).

Mora *et al.*, (2005), ao estudarem a citotoxicidade de PLA<sub>2</sub> miotóxicas sobre células linfoblásticas, verificaram que em concentrações elevadas da toxina, a morte ocorreu predominante por necrose, caracterizada por rompimento da membrana plasmática e tumefação mitocondrial. Em concentrações menores, a toxina induziu apoptose. Os autores

concluíram que o tipo de resposta citotóxica predominante observada, ou seja, apoptose ou necrose, depende da concentração da toxina e, conseqüentemente, da extensão da lesão da membrana plasmática.

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

No caso do nosso estudo, o resultado sugere que o principal tipo de morte induzido pelo VBp na concentração utilizada (CI<sub>50</sub>), no tempo de 12 horas, foi por indução de apoptose.

Outra importante característica associada à morte celular por apoptose é o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, que poder ser consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio ou aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , é considerado um indicador de dano mitocondrial e é geralmente definido como um estágio inicial de apoptose (SMAILI *et al.*, 2003). Assim no presente trabalho, decidimos investigar se o VBp na concentração de 7,5  $\mu\text{g/mL}$  (CI<sub>50</sub>) seria capaz de sensibilizar as mitocôndrias. Verificamos que nesta dose o veneno promoveu despolarização mitocondrial, o que é um indício de morte celular por apoptose. A literatura relata que as peçonhas ofídicas causam apoptose em uma variedade de células (SUHR; KIM, 1996), e este efeito é mediado por componentes como LAAO (ANDE *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; NAUMANN *et al.*, 2011), metaloproteínas (GUTIERREZ *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 2007) desintegrinas (COMINETTI *et al.*, 2003; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005) e fosfolipases A<sub>2</sub> (HIGUCHI *et al.*, 2008; GUTIERREZ e OWNBY, 2003).

Nosso estudo também revela a geração de EROs pelo VBp na concentração de 7,5  $\mu\text{g/mL}$ . A exposição à grande quantidade de EROs induz a morte celular por necrose, enquanto que o estresse oxidativo menos grave leva à apoptose. Pois a grande quantidade de EROs pode causar danos oxidativos diretos para a célula e seus componentes levando à morte por necrose. Com relação à apoptose, o aumento nos níveis de EROs leva à oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do  $\Delta\Psi_m$ . A resposta da mitocôndria ao dano

oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que EROs funcionam como segundos mensageiros na sinalização da ativação das caspases 9 e 3, caracterizando uma via intrínseca de ativação (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007)

As alterações morfológicas encontradas também são características de morte celular por apoptose, tais como tumefação celular, deposição de restos celulares (detritos), aparecimento de núcleos desnudos, redução do volume (picnose) e condensação nuclear, células com prolongamentos citoplasmáticos, corpos apoptóticos, blebbing, aumento do número de células vacuolizadas.

Os resultados obtidos e apresentados nesta dissertação demonstram o potencial citotóxico renal do veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*. Desta maneira, estudos futuros podem corroborar para o uso deste veneno como potencial ferramenta de indução de morte celular programada.

**CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

- O veneno de *Bothropoides pauloensis* na dose de 3µg/mL e 10µg/mL alterou os parâmetros funcionais renais com redução da PP, RVR, FU e RFG.
- Reduziu os transportes tubulares percentuais de sódio, cloreto e potássio.
- Análise histopatológica evidenciou: alterações na arquitetura renal, principalmente a nível tubular, apresentando espaço intersticial e vascular íntegros, assim como os glomérulos.
- O *VBp* foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas condições de estudo em células MDCK.
- O principal tipo de morte celular observado foi característico de indução de apoptose, ocorrendo alteração do potencial de membrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio, apresentando alterações morfológicas em células tratadas com o *VBp*, caracterizando apoptose.

## **REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A.; DAL BELO, C. A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, C. R. B.; HYSLOP, S.; FURTADO, M. F. D.; SIMIONI, L. R. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 148, p. 142-149, 2007.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon.**, v.40, n.4, p.335-393, 2002.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J, GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C., FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, p. 542-550, 2008.
- ANAI, K.; SUGIKI, M., YOSHIDA, E., MURUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v.40, n.1, p.63-68, 2002.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, O. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
- ANDE, R. S. ; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. de.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. v.40, n°10, p.1427-35, 2002.

- BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWISKI, A. A Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops spp.* and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins.** v.1, p.11-22, 1995.
- BAUD, V., KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives . **Trends Cell Biol.** V.11, p.372-377, 2001.
- BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p.403-414, 2006.
- BÉRNILS, R. S. (org.). 2011. *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. R.; CRUZ-HOFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli change in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.67, n.2, p. 217-222, 2002.
- BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) Snakes a natural history. **New York: Sterling Publishing Co.**, p.194-209, 1997.
- BORGES, M. H., SOARES, A .M., RODRIGUES, V. M., ANDRILAO-ESCARSO, S. H., DINIZ, H., HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIERREZ, J. M., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2000.
- BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DURIGON, A.M.; VALLIN, A.C.C.; TOYAMA, M.H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S. RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 617-624, 2003.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n.21, p. 2612-2619, 2007.
- BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno de *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

- BRASIL, 2012. **Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –SINAN Net**. Acesso em 27/09/2013.
- BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **ExpMolPathol**.v. 88, n. 3, p. 424-32, 2010.
- BURDMANN, E. A.; VIEIRA, J. R.; VIDAL, E. C. Nefropatia tóxica e tubulointersticial. In: RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios eletrolíticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. p. 472-474.
- CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2008.
- CASTANHEIRA, L.E., NUNES, D.C.O., CARDOSO, T.M., SANTOS, P.S., GOULART, L.R., RODRIGUES, R.S., RICHARDSON, M. BORGES, M.H., YONEYAMA, K.A.G., RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **I.J.Biol. Macromolecules**, v.54,p.57-64, 2013.
- CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. **J. Nat. Toxins** v. 20, n. 5, p. 574-577. 1999.
- CHAVE, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERRES, J. M. Role of TNF -  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p.171-178, 2005.
- CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin World Health Organization**, v. 5, n. 76, p. 515-524, 1998.
- CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E.A.F. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, 53, 330–340, 2009.
- CLEMETSON, K.J.; LU, Q.; CLEMETSON, J.M., Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors, **Pathophysiol. Haemost. Thromb**, v. 34, p. 150–155, 2005.
- COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103–121, 1977.
- COLLARES-BUZATO, C.B.; LE SUEUR, L.P.; CRUZ- HOFLING. M.A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in

Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, p. 124–132, 2002.

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

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and Functional Characterization of a Thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725-735, 2009.

CRUZ-HOFLING, M. A.; PARONETTO, C. C. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ÁBREU, A. C. F. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhóa) venom and phospholipase A<sub>2</sub>-containing fraction. **Histology and Histopathology**, v.16, p.185-195, 2001).

CRUZ, A.H., GARCIA-JIMENEZ, S., MENDONZA, R.Z., PETRICEVICH, V.L. Proandcanti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**. 2008.

DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A<sub>2</sub> (Lm TX-I) in cultured cells. **Toxicon**. v.49, p.678-692, 2007).

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, n.1, p.151-156, 2008.

DU, X.Y. e CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495-516, 2007.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A.; NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular

- effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1061-1070, 2010.
- FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.
- FERREIRA, L.A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; RABERMEUL, G. Isolation : analysis and properties of three bradykinin- potentiating peptides ( BPP-II, BPP- III, and BPP-V, from *Bothrops neuwied* venom. **J Protein chem**, v. 17, p. 285-289, 1998.
- FERREIRA, L.A.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M.B.C.; PREZOTO, B.C.; ANDREONI, A.S.S.; ZERNIK, R.; HABERMEHL, C. A new bradykinin- potentiating peptide ( peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 30, p. 33-40, 1992.
- FERREIRA, S.H.; BARTELD, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n.13, p. 2583- 2595, 1970.
- FISHER, D. E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 15, n. 5, 2001.
- FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci**, v. 33, n. 5, p. 431-436, 1983.
- FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2, p. 191-197, 1998.
- FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmac**, v.20, p.1549-1556, 1971.
- GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Hum Pathol**, v. 32, p. 1029-38, 2001.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**. v.48, n.1, p.44-54, 2006.

- GUIMARÃES, J.A.; VIEIRA, M.A.R.; CAMARGO, M.J.F.; MAACK, T. Renal vasoconstrictive effect of kinnins mediated by B1- kinnin receptores. **Eur. J. Pharmacol** , v. 130, p. 177 -185, 1986.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- GUTIÉRREZ, J.M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes em América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Bol. Malariol. Salud Amb**, v. 51, p. 1–16, 2011.
- GUTIÉRREZ, J.M. Snakebite envenoming: a public health perspective. In:Maddock J, editor. **Public health**—methodology, environmental and systems issues. Rojeka, Croatia: InTech; 2012.
- HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006
- HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.1, p.130-41, 2005.
- HAVT, F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF. **Toxicon**, v.39, n.12, p.1841-1846, 2001.
- HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked reeaseof transmitter induced by cortoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**, v..4, p.293-306, 1979.
- HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of câncer cells: A multiparameter aproach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-344, 2005.
- HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, p. 540-541, 846p.

- IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochime**, v. 85, n. 7, p. 669-675, 2003.
- KAMIGUT, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; XUXEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, n.6, p. 1996.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.
- KOH, D.C.I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v.63, p.3030-3041, 2006.
- KROEMER, G., KEPP, O. e GALLUZZI, L. Mitochondria: master regulators of danger signaling. **Nature**, v.13,p.780-789, 2012.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDERNABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUÑES, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death Differ**, v.16, n.1, p.3-11, 2009.
- LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J. P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A<sub>2</sub> from snake 86 venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A<sub>2</sub> and distinct signaling pathways. **J Leukoc Biol**. v. 90, n. 1, p. 155-166, 2011.
- LEMOES J.C.; ALMEIDA T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA A.A.; SIMOES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos noticiados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev Bras Epidemiol**; v. 12, p. 50-59, 2009.
- LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349-1358, 1994.
- LIRA-DA-SILVA, M.R.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 21-25, 2009.

- LOMONTE B, ANGULO Y., CALDERON L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, n.8, p. 885-901, 2003.
- LORO, L. L.; A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J Oral Pathol Med**, v. 32, p. 125-38, 2003.
- MARQUES-PORTO, R.; LEBRUM, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in *Bothrops jararaca* venom: **The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. Comparative Biochemistry and Physiology Part C** v.147, p424-433, 2008.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v1477, p146-156, 2000.
- MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.
- MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO H. D.; FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STARUCH, M. A.; FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N, CALILELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; SILVA A. J. M.; COSTA, P. R. R. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.
- MITCHELL, R. N. Hemodynamic disorders thromboembolic disease, and shock. In KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins and Cotran Pathologic basis of disease**. 7<sup>th</sup> ed Philadelphia: Saunders, 2005. 1525p. cap. 4, p.119-144.
- MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Subunit dissociation, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin like protein from snake venom. **Biochemistry**, v.42, n.2, p.509-515, 2003.
- MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da Ciclooxygenase no rim perfundido de rato**. 1990. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Estadual de Campinas, Sao Paulo, 1990.
- MORAIS, I. C.; TORRES, A. F.; PEREIRA, G. J.; PEREIRA, T. P.; BEZERRA DE MENEZES, R. R. P. P.; MELO, C. P.; COELHO, J. A. R.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.;

- MONTEIRO, H. S.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. M. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, 2013.
- MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 47, p. 75–86, 2005.
- MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; LOMONTE, B.; PRUGATO, E.; TEIXEIRA, C. A phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: Expression of cyclooxygenase-2 and PGE2 biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, p. 288–296, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.
- MOUREAU, M.E.; GARBACHI, N.; MOLINARO, G. ; BROWN, N.J. ; MARCEAU, F. ; ADAM, A. The kalikrein- Kinin system : Current and future pharmacological targets. **Jounarl of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.
- MURAKAMI, M. T. and ARNI, R. K. A.A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A2s. **Toxicon**, v.42, p903-913, 2003.
- NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSCOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol**, v. 85, p. 591–605 , 2007.
- NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F, EBLE, J. A, SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NOGUEIRA, C. **Call Photos**, 2003. Disponível em: [http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0803+0687](http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0803+0687). Acesso em 30 de agosto de 2011.

NORÕES, T. B. S. **Efeitos renais promovidos pelo veneno da serpente *Bothrops atrox* e a produção do óxido nítrico**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; HAMAGUCHI A, D. E ALCÂNTARA, T. M; CLISSA P. B; RODRIGUES V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.

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

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

OSBORN, J. L.; KOPP, U. C.; THAMES, M. D.; DIBONA, G. F. Interactions among renal nerves, prostaglandins, and renal arterial pressure in the regulation of renin release. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 706-713, 1984.

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

PINHO, F. M. O. e PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.47, n.1, p. 24-49, 2001.

PINHO, F. M. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v.22, n.3, p.162-168, 2000.

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

- QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of brasilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p.842-851, 2008.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflamation. **Toxicon**, v.44, p1-17, 2004.
- RANA, A.; SATHIANARA, P.; LIEBERTHAL, W. Role of apoptosis on renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. **Apoptosis**, v. 6, p. 83-102, 2001
- RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A(2) homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein Journal**, v. 27, n. 6, p. 355-362, 2008.
- REID, H. A. Cobra-bites. **Br. Med. J.**, v.2, p.540-561, 1964.
- RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES-DE-CAMPOS, V. A. F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo: avaliação de 43 casos,1988/93. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.44, n.4, p.312-318, 1998.
- ROCHA, I.C.A. **Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.
- ROCHA E SILVA, M., BERARDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.** V.156, p. 261–273, 1949
- RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.
- RODRIGUES, R. S.; SILVA, J F.; BOLDRINI-FRANCA, J; FONSECA, F. P. P.; HAMAGUCHI, A; MAGRO, A J; BRAZ, A S K.; SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M R M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** (Paris), v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, V. E. G. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: Editora UFLA, 2001, p. 62-63.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C ; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic Variations In The Composition Of Myotoxins From *Bothrops neuwiedi* Snake Venoms: Biochemical Characterization And Biological Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTANETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase; a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 471-479, 2001.

RODRIGUES, R.S., BOLDRINI-FRANÇA, J., FONSECA, F.P.P., de la TORRE, P., HENRIQUE-SILVA, F., SANZ, L., CALVETE, J. J., RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J. Proteomics**. V. 75, n. 9, p. 2707-20, 2012.

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

RUIZ DE TORRENTE, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK,S.; KOSCIONCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas Del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **APPTLA**, v.49, p.117-183, 1999.

SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CASTRO, S. C. B.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **J. Q. Med.**,v.95, p.551-559, 2011.

- SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBES Lett.**, v.477, p199-202, 2000.
- SANTHOSH, M.S., SUNDARAM, M.S., SUNITHA, K., KEMPARAJU, K., GIRISH, K.S. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflamm. Res.** v. 62, p.721-731, 2013.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T., Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.*, v. 56, n. 3, p. 387-437, Sept. 2004.
- SITIPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nefrology** v.11, p. 442-448, 2006.
- SITIPRIJA, V.; CHAIYABUR, N. Nefrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins.**, v.8, p.271-277, 1999.
- SITIPRIJA, V.; SITIPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v.60, p.943-953, 2012.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, n1-2, p.1-19, 2000.
- SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 183-190, 2003.
- SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p.201-209, 2000.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian reptilis- List of espécies disponível em: <<http://WWW.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 18.08.2012.
- SOARES, A M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications on phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.
- SOUSA, D. F. **Estudo das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzii***. 2010. 151 f. Dissertação (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

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

TAIT, S. W., GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** v.11, p. 621–632, 2010.

THAMAREE, S., SITPRIJA, V., LEEPIPATPAIBOON, S. Mediators and renal hemodynamics in Russell's viper envenomation. **J. Nat. Toxins** Vv.9, p. 43–48, 2000.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v.42, n.7, p.801-808, 2003.

TEIXEIRA, C., CURY, Y., MOREIRA, V., PICOLO, G., CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.54, p.67-76, 2009.

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

TONELLO, F.; SIMONATO, M.; AITA, A.; PIZZO, P.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. A Lys49-PLA2 myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death Dis.** Jul 5;3:e343, 2012.

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

TORRES, A. F. C.; COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795–804, 2010.

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

- TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Plenum Press**, p37-62, 1996.
- VARGAS, F. F. R.; SOTO, L. A. P.; SOUZA, D. M.; MARAGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 66–74, 2010.
- WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1995.
- WARREL D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds) The venomous reptiles of the Western Hemisphere. **Cornell University Press**, New York, p.709-715, 2004.
- WARRELL, D.A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77–88, 2010.
- ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News. Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.



**ARTIGO ACEITO**

1



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

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

4

5

3

Solanidane and iminosolanidane alkaloids from *Solanum campaniforme*

6 **qt** Maria Conceição M. Torres<sup>a</sup>, Roberta Jeane B. Jorge<sup>b</sup>, Rafael M. Ximenes<sup>b</sup>, Natacha Teresa Q. Alves<sup>b</sup>,  
 7 João Victor de A. Santos<sup>b</sup>, Aline D. Marinho<sup>b</sup>, Helena S.A. Monteiro<sup>b</sup>, Marcos H. Toyama<sup>c</sup>,  
 8 Raimundo Braz-Filho<sup>a,1</sup>, Edilberto R. Silveira<sup>a</sup>, Otilia Deusdênia L. Pessoa<sup>a,\*</sup>

9 <sup>a</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 12.200, Fortaleza-CE 60.021-970, Brazil

10 <sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Campus do Porangabaçu, Fortaleza-CE 60430-270, Brazil

11 <sup>c</sup> Laboratório de Química de Macromoléculas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus Experimental do Litoral Paulista, São Vicente-SP 11330-900, Brazil

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 April 2013

Received in revised form 22 August 2013

Available online xxx

## Keywords:

*Solanum campaniforme*

Solanaceae

Solanidane alkaloids

Iminosolanidane alkaloids

*Bothrops pauloensis*

## ABSTRACT

From the leaves of *Solanum campaniforme* (Solanaceae), eight solanidane alkaloids were isolated, four of which contain a *p*-hydroxyphenylethylamine unit. Their structures were established as: 22 $\beta$ ,23 $\beta$ -epoxy-solanida-1,4-dien-3-one; 22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-10-epi-solanida-1,4,9-trien-3-one; 22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-solanida-4-en-3-one; 22 $\beta$ ,23 $\beta$ -epoxy-solanida-4-en-3-one; (*E*)-*N*-[8'(4-hydroxyphenyl)ethyl]-22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-solanida-1,4,9-trien-3-imine; (*E*)-*N*-[8'(4-hydroxyphenyl)ethyl]-22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-solanida-1,4-dien-3-imine; (*Z*)-*N*-[8'(4-hydroxyphenyl)ethyl]-22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-solanida-1,4,9-trien-3-imine and (*Z*)-*N*-[8'(4-hydroxyphenyl)ethyl]-22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -epoxy-solanida-1,4-dien-3-imine. All structures were determined using spectroscopic techniques, such as 1D and 2D NMR, and HRESIMS. The cytotoxicity and the antiophidic activities of the alkaloids were evaluated. The alkaloids did not show any cytotoxicity, but inhibited the main toxic actions of *Bothrops pauloensis* venom.

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37