



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**ÍVILA SANTOS CABRAL**

**ESTUDO DOS EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS LOCAIS E RENAIIS INDUZIDOS  
PELA PEÇONHA DE *Crotalus durissus* ssp. DO ESTADO DA BAHIA**

Feira de Santana, BA

2018

**ÍVILA SANTOS CABRAL**

**ESTUDO DOS EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS LOCAIS E RENAIIS INDUZIDOS  
PELA PEÇONHA DE *Crotalus durissus ssp.* DO ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ilka Biondi

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt

Feira de Santana, BA

2018

### Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

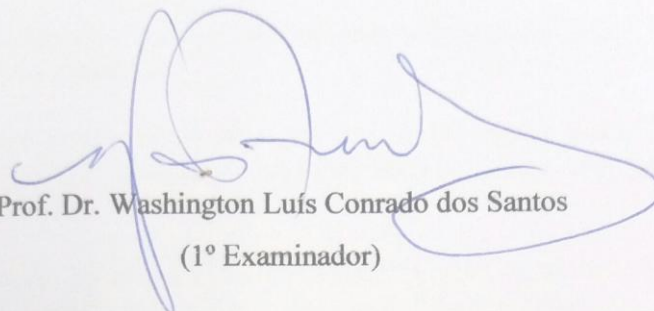
C117 Cabral, Ívila Santos Cabral  
Estudo dos efeitos fisiopatológicos locais e renais induzidos pela  
peçonhade *Crotalus durissus ssp.* do estado da Bahia / Ívila Santos  
Cabral. –Feira de Santana, 2018.  
96 f.: il.

Orientadora: Ilka Biondi  
Coorientadora: Alexandre Havt  
Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de  
Santana, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

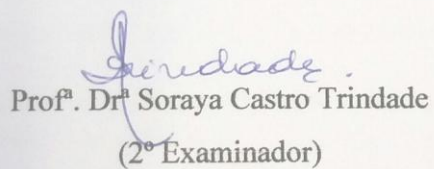
1. *Crotalus durissus ssp* – Espécie de cascavel. 2. Serpente -  
Peçonha. 3. Lesão renal e local. I. Biondi, Ilka, orient. II. Havt,  
Alexandre, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.  
Título.

CDU: 598.126

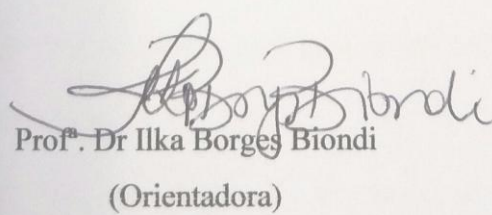
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Washington Luís Conrado dos Santos  
(1º Examinador)



Prof.ª Dr.ª Soraya Castro Trindade  
(2º Examinador)



Prof.ª Dr. Ilka Borges Biondi  
(Orientadora)

Aos meus pais e demais familiares,  
que sempre me incentivaram a fazer  
o meu melhor e despertaram minhas  
melhores qualidades.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse seguir respeitando e conquistando;

Aos meus pais e minha avó Alaíde, batalhadores, pela total dedicação e incentivo. São, sem dúvidas, meus maiores exemplos;

Agradeço ao meu irmão unicamente por existir na minha vida. Pela companhia, incentivo, apoio, preocupação, cuidado e carinho, ao seu modo, me passando extrema segurança;

À minha orientadora, professora Ilka Biondi (Pró), pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço imensamente a sua dedicação, disponibilidade e vontade de me proporcionar e de me estimular, a cada dia, a buscar mais saberes. Obrigada por sua generosidade e afeto, por abrir as portas de sua casa;

Ao meu co-orientador, professor Alexandre Havt, pelas orientações, por todo aprendizado e, sobretudo por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório;

À toda a equipe do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH);

Aos colegas, Cléber, Adelvane, Alejandra, Jéssica, Rafaela e demais companheiros do Laboratório de Toxicologia Molecular da UFC;

Um agradeco especial à João Victor, meu braço direito nesta caminhada;

Agradeço aos meus amigos, especialmente, Elen, Joelma, Patrícia e Samara por toda força e carinho;

À banca examinadora pela disponibilidade para avaliar este trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro;

À todos que não foram citados, mas que foram e são muito importantes em toda minha caminhada.

“E aprendi que se depende sempre  
de tanta, muita, diferente gente  
toda pessoa sempre é as marcas  
das lições diárias de outras tantas pessoas.”

Gonzaguinha

## RESUMO

Os acidentes ofídicos envolvendo as espécies do gênero *Crotalus* são considerados graves e apresentam número elevado de óbitos. Os efeitos desencadeados após acidentes com este gênero podem variar de forma intra e interespecífica em decorrência da ampla variabilidade da composição da peçonha. Dessa forma, este trabalho avaliou os possíveis danos locais e renais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp. do Estado da Bahia. Para tanto, foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 20 e 22g separados em grupos controle (inoculados com PBS) e peçonha (inoculados com 1,5ug da peçonha de *Cd*-ssp). Os danos locais foram avaliados pela quantificação da reação edematogênica local, de citocinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e pela migração leucocitária. Danos miotóxicos foram avaliados pela análise dos níveis de Creatina quinase (CK). A toxicidade renal foi avaliada, seguindo tempos de exposição à peçonha de 6, 12, 24 e 72 horas, a partir da análise dos níveis séricos de creatinina e ureia, das frações de excreção de sódio (%FENa) e de potássio (%FEK), dos níveis de malondialdeído (MDA) e de mieloperoxidase (MPO) e, da expressão gênica do biomarcador precoce de lesão renal (KIM-1) e dos marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , CXCL-1 e IL-18). Além disso, foi feita a análise histológica da região interplantar do coxim plantar, da musculatura do gastrocnêmio e do tecido renal. Foi observado que a peçonha de *Cd*-ssp desencadeou: a) processo inflamatório local, avaliado pela produção de edema acentuado, de IL-1 $\beta$ , de IL-6 e pelo recrutamento de leucócitos para o local da inoculação; b) processo miotóxico, indicado pelo aumento dos níveis de CK em 6, 12 e 24h após a inoculação; c) processo nefrotóxico confirmado pelo aumento dos níveis séricos de creatinina (24 e 72h), pelo aumento da %FENa (24 e 72h), da %FEK (72h), pelo aumento de MPO e da expressão relativa do KIM-1 (12h), de IL-1 $\beta$  (12h e 24h) e de CxCL-1(12h); d) aumento do processo oxidativo do tecido renal pelo aumento dos níveis de MDA. A técnica histológica demonstrou a presença de infiltrado inflamatório e edema na região interplantar, necrose e infiltrado inflamatório na musculatura do coxim plantar e do gastrocnêmio e ectasia vascular intersticial, desorganização da arquitetura tubular com marcante vacuolização e degeneração do epitélio tubular renal. Conclui-se, assim, que a peçonha de *Cd*-ssp promoveu alterações locais, diferentemente de outras *Crotalus* brasileiras e causou alterações renais comprovadas por parâmetros bioquímicos, histológicos e moleculares.

**Palavras-chave:** *Crotalus durissus* ssp.; edema local; lesão renal aguda; biomarcadores renais.



## ABSTRACT

The ophidian accidents involving species of the genus *Crotalus* are considered serious and present a high number of deaths. The effects triggered after accidents with this genus can vary intra and interspecifically due to the wide variability of the composition of the venom. Thus, this study evaluated the possible local and renal damages triggered by the venom of *Crotalus durissus* ssp. of the State of Bahia. For this, male Swiss mice weighing between 20 and 22 g separated in control (inoculated with PBS) and venom (inoculated with 1.5 µg of the *Cd*-ssp venom) were used. Local damage was assessed by quantification of the local edematogenic reaction, of the cytokines (IL-6 and IL-1β) and by leukocyte migration. Myotoxic damage was assessed by the analysis of creatine kinase (CK) levels. Renal toxicity was assessed, following venom exposure times of 6, 12, 24 and 72 hours, from the analysis of serum creatinine and urea levels, of the sodium excretion fractions (% FENa) and potassium (% FEK), of the levels of malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) and of the inflammatory markers (IL-1β, CXCL-1 and IL-18). In addition, the histological analysis of the interplantar region of the plantar cushion, the gastrocnemius musculature and the renal tissue was made. It was observed that the *Cd*-ssp venom triggered: a) local inflammatory process, assessed by the production of marked edema, IL-1β, IL-6, and the recruitment of leukocytes to the site of inoculation; b) myotoxic process, indicated by increased CK levels at 6, 12 and 24h after inoculation; c) nephrotoxic process confirmed by increased serum creatinine levels (24 and 72 hours), by the increase of % FENa (24 e 72h), of % FEK (72h), by the increase of MPO and of the relative expression of the KIM-1 (12h), IL-1β (12h and 24h) and CxCL-1 (12h); d) increased renal tissue oxidative process by increasing MDA levels. The histological technique demonstrated the presence of inflammatory infiltrate and edema in the interplantar region, necrosis and inflammatory infiltrate in the plantar cushion musculature and gastrocnemius and interstitial vascular ectasia, disorganization of the tubular architecture with marked vacuolization and degeneration of the renal tubular epithelium. It was concluded, therefore, that *Cd*-ssp venom promoted local alterations, unlike other Brazilian *Crotalus*, and caused renal alterations confirmed by biochemical, histological and molecular parameters.

**Keywords:** *Crotalus durissus* ssp.; local edema; acute kidney injury; renal biomarkers.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
2	<b>OBJETIVOS</b>	21
2.1	<b>Objetivos gerais</b>	21
2.2	<b>Objetivos específicos</b>	21
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	23
3.1	<b>O gênero <i>Crotalus</i>: aspectos gerais</b>	23
3.2	<b>Epidemiologia</b>	25
3.3	<b>Composição química das peçonhas de <i>Crotalus</i></b>	29
3.4	<b>Manifestações clínicas após o emponhamento</b>	31
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
4.1	<b>Animais experimentais e aspectos éticos</b>	40
4.2	<b>Peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp.</b>	40
4.3	<b>Dosagem de proteínas</b>	40
4.4	<b>Avaliação dos efeitos locais desencadeados pela peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.</b>	40
4.4.1	<b>Reação edematogênica</b>	40
4.4.2	<b>Quantificação de leucócitos no local da inoculação</b>	41
4.4.3	<b>Quantificação de citocinas</b>	41
4.4.4	<b>Avaliação dos processos de rolamento, adesão e transmigração de leucócitos pelo uso da microscopia intravital na microcirculação cremaster dos camundongos inoculados com a peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.</b>	42
4.5	<b>Avaliação da miotoxicidade e dos danos renais desencadeada pela peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.</b>	43
4.5.1	<b>Protocolo piloto</b>	43
4.5.2	<b>Desenho Experimental</b>	44
4.5.3	<b>Coleta de urina, de sangue e dos rins</b>	44
4.5.4	<b>Avaliação da miotoxicidade</b>	46
4.5.5	<b>Biomarcadores da Função Renal</b>	46
4.6	<b>Análise histológica</b>	47
4.7	<b>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</b>	47
4.8	<b>Análise do perfil oxidativo</b>	47

4.9.	<b>Avaliação da expressão relativa dos genes KIM-1, CXCL-1, IL-18 e IL-1<math>\beta</math> na transcrição de mRNA renal</b>	47
4.9.1	<b>Extração do RNA total</b>	47
4.9.2	<b>Síntese de cDNA</b>	49
4.9.3	<b>PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)</b>	49
4.10	<b>Análise estatística</b>	50
5	<b>RESULTADOS</b>	52
5.1	<b>Reação edematogênica e quantificação leucocitária</b>	52
5.2	<b>Quantificação de citocinas</b>	52
5.3	<b>Avaliação dos processos de rolamento, adesão e transmigração leucocitária</b>	52
5.4	<b>Avaliação da miotoxicidade e dos danos renais desencadeados pela peconha de <i>Crotalus durissus ssp</i></b>	58
5.4.1	<b>Atividade miotóxica</b>	58
5.4.2	<b>Avaliação dos parâmetros da função renal</b>	58
5.5	<b>Avaliação histológica dos órgãos</b>	61
5.6	<b>Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)</b>	66
5.7	<b>Análise do perfil oxidativo renal</b>	66
5.8	<b>Avaliação da transcrição gênica da KIM-1 renal</b>	66
5.9	<b>Avaliação da transcrição gênica da IL-1<math>\beta</math></b>	66
5.10	<b>Avaliação da transcrição gênica da CxCL-1</b>	67
5.11	<b>Avaliação da transcrição gênica da IL-18</b>	67
6	<b>DISCUSSÃO</b>	72
7	<b>CONCLUSÃO</b>	83
	<b>REFERÊNCIAS</b>	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Imagem da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp com guizo na extremidade da cauda	25
<b>Figura 2</b>	Foto da <i>Crotalus durissus</i> demonstrando presas móveis inoculadora de peçonha (A); e o órgão termoreceptor (fosseta loreal) (B).	25
<b>Figura 3</b>	Número de acidentes causados por serpentes do gênero <i>Crotalus</i> no período de 2010 a 2016 no Brasil.	27
<b>Figura 4</b>	Mapa com a espacialização do número de acidentes causados por serpentes do gênero <i>Crotalus</i> nas Mesorregiões e Microrregiões do Estado da Bahia.	28
<b>Figura 5</b>	Estrutura 3D do complexo crotoxina.	30
<b>Figura 6</b>	Desenho experimental.	46
<b>Figura 7</b>	Atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	53
<b>Figura 8</b>	Indução de recrutamento de leucócitos pela peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	53
<b>Figura 9</b>	Indução da produção de citocinas pela peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	54
<b>Figura 10</b>	Avaliação do rolamento e da velocidade de roleamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	55
<b>Figura 11</b>	Avaliação da aderência dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	56
<b>Figura 12</b>	Foto da aderência dos leucócitos ao endotélio dos vasos da microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	56
<b>Figura 13</b>	Avaliação da transmigração dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	57
<b>Figura 14</b>	Fotos da transmigração dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	57

<b>Figura 15</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. sobre os níveis séricos de Creatina quinase (CK) de camundongos <i>Swiss</i> .	58
<b>Figura 16</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. sobre os níveis urinários de creatinina de camundongos <i>Swiss</i> .	59
<b>Figura 17</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. sobre os níveis séricos de creatinina de camundongos <i>Swiss</i> .	60
<b>Figura 18</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. sobre os níveis séricos de ureia de camundongos <i>Swiss</i> .	60
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografias da morfologia da região interplantar do coxim plantar dos camundongos inoculados com PBS estéril e com a dose de 1,5µg de peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	63
<b>Figura 20</b>	Fotomicrografias da morfologia da musculatura do coxim plantar e do gastrocnêmio dos camundongos inoculados com a dose de 1,5µg da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	64
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografias dos rins dos camundongos inoculados com PBS e com 1,5µg/animal da peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	65
<b>Figura 22</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	68
<b>Figura 23</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na peroxidação lipídica (MDA) do tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	68
<b>Figura 24</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na transcrição gênica de KIM-1 do tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	69
<b>Figura 25</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na transcrição gênica de IL-1β do tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	69
<b>Figura 26</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na transcrição gênica de CxCL-1 do tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	70
<b>Figura 27</b>	Efeito da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus</i> ssp. na transcrição gênica de IL-18 do tecido renal de camundongos <i>Swiss</i> .	70

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Evolução clínica dos acidentes causados por serpentes, de acordo com o agente etiológico identificado, no período de 2010-2015, ocorridos no Estado da Bahia, Brasil.	29
<b>Tabela 2</b>	Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.	50
<b>Tabela 3</b>	Dados da fração de excreção de sódio ( $FENa^+$ ) e potássio ( $FEK^+$ ) de camundongos inoculados com a peçonha de <i>Crotalus durissus</i> ssp.	61
<b>Quadro 1</b>	Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada.	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BSA</b>	Albúmina bovina de soro
<b><i>Cd-ssp.</i></b>	<i>Crotalus durissus ssp.</i>
<b><i>Cdcase</i></b>	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
<b><i>Cdcolli</i></b>	<i>Crotalus durissus collinelatus</i>
<b><i>Cdt</i></b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CK</b>	Creatina quinase
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Íon cloreto
<b>CxCL-1</b>	Quimiocina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>%FEK<sup>+</sup></b>	Fração de excreção de potássio
<b>%FENa<sup>+</sup></b>	Fração de excreção de sódio
<b>HBSS</b>	Solução salina equilibrada de Hank
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina -1beta
<b>IL-6</b>	Interleucina - 6
<b>IL-18</b>	Interleucina -18
<b>IRA</b>	Injúria Renal Aguda
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>KIM-1</b>	Molécula de injúria renal-1
<b>LAO</b>	L-aminoácido oxidase
<b>LAPH</b>	Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LRA</b>	Lesão renal aguda
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon sódio

<b>NTA</b>	Necrose tubular aguda
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PBST</b>	Salina tamponada com fosfato e Tween
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>SAC</b>	Soro anticrotático
<b>TC</b>	Tempo de coagulação
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular
<b>TMB</b>	Taxa de metabolismo basal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>UEFS</b>	Universidade Estadual de Feira de Santana
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>VU</b>	Volume urinário



# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ocasionados por serpentes no Brasil, especialmente por serpentes do gênero *Crotalus*, são casos de emergência médica, por conta da frequência que acontecem e, principalmente da gravidade dos efeitos. Por isso, inúmeras pesquisas envolvendo as peçonhas dessas serpentes vêm sendo realizadas pelo grupo de estudo do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH/UEFS) na busca de um melhor entendimento dos mecanismos de ação destas peçonhas.

As *Crotalus durissus*, popularmente conhecidas como cascavéis e única espécie de serpentes deste gênero encontrada no Brasil, se enquadram no grupo de serpentes com problemas quanto à definição do seu *status* taxonômico, apresentando populações heterogêneas, mesmo tendo algumas subespécies com alguma similaridade entre si. As *Crotalus durissus* ssp (*Cd*-ssp) se distribuem geograficamente pelo Estado da Bahia e, apresentam uma ampla variabilidade. Testes preliminares envolvendo caracteres morfológicos, de morfometria geométrica craniana e de biologia molecular, confirmaram a existência de uma nova subespécie de cascavel no Estado da Bahia.

Devido à existência de variações individuais e/ou populacionais na composição e nos efeitos das peçonhas de serpentes, estudar os efeitos desencadeados por ela é fundamental para o reconhecimento dos sintomas clínicos e da terapia frente aos acidentes. Este fato torna importante a investigação de possíveis reações inflamatórias locais desencadeadas pela peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp, eventos estes característicos de algumas serpentes da família Viperidae.

Uma das complicações mais graves após um acidente crotálico, que inclusive pode aparecer após administração do tratamento específico e resultar em dependência dialítica dos indivíduos acidentados, é a injúria renal aguda (IRA), o que merece também uma atenção especial. Este dano pode elevar os níveis séricos de creatinina e ureia, alterar os padrões eletrolíticos e, culminando numa grande desordem no equilíbrio do organismo. No entanto, avaliações bioquímicas usuais, como análise dos níveis séricos de ureia e creatinina, são pouco específicas e sensíveis às lesões renais precoces, sendo de suma importância a análise conjunta com biomarcadores moleculares, a fim de identificar precocemente a IRA e entender a fisiopatologia renal do empeçonhamento.

Além disso, muitos estudos envolvendo danos renais após acidentes com *Crotalus* se limitam à técnica de perfusão, a qual não reproduz a realidade dos agravos no tecido dos rins por ser um experimento apenas com o órgão isolado, uma vez que os rins apresentam um

eficiente mecanismo de autorregulação do fluxo de sangue. Sendo assim, o detalhamento dos danos renais num sistema completo faz-se necessário.

O presente trabalho, portanto, visa demonstrar experimentalmente os possíveis danos locais e renais desencadeados pela peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. e, contribuir, dessa forma, para o melhor entendimento da evolução dos efeitos clínicos desencadeados pela peçonha e, instigar novos estudos para o desenvolvimento de condutas terapêuticas eficientes.

# **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar danos locais e renais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp. do Estado da Bahia em modelo experimental *in-vivo*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os eventos associados à indução da resposta inflamatória local provocados pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp.;
- Avaliar a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp., utilizando o parâmetro bioquímico CK total;
- Identificar as alterações nos parâmetros bioquímicos tradicionais da função renal em camundongos gerados pela inoculação da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.;
- Avaliar as principais alterações histológicas renais e musculares desencadeadas pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp.;
- Investigar a atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido renal de camundongos inoculados com a peçonha de *Crotalus durissus* ssp.;
- Identificar o perfil oxidativo renal após o empeçonhamento dos camundongos inoculados com a peçonha de *Crotalus durissus* ssp.;
- Avaliar o perfil molecular da expressão de mRNA de marcadores precoces associados com o processo de lesão renal e inflamatórios sobre o tecido renal de camundongos inoculados com a peçonha de *Crotalus durissus* ssp.

# **REVISÃO DE LITERATURA**

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O gênero *Crotalus*: Aspectos gerais

As serpentes são animais vertebrados, carnívoros e ectotérmicos que pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes (RÉPTARIUM, 2017). Elas são componentes importantes da biodiversidade, pois, ao mesmo tempo em que controlam o número de roedores, também fornecem compostos bioativos naturais, como peçonha e suas toxinas, os quais são muito utilizados na farmacologia para a produção de diversos tipos de medicamentos (EVANGELISTA, 2008; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

As serpentes do gênero *Crotalus* pertencem à família Viperidae, à subfamília Crotalinae e são causam, no Brasil, um grande número de acidentes (RÉPTARIUM, 2017; BRASIL, 2010). Popularmente conhecidas como cascavéis, são robustas, pouco ágeis, de hábito terrestre e, facilmente reconhecidas por possuírem um guizo/chocalho na extremidade da cauda (Figura 1). Apresentam fosseta loreal, órgão sensorial termorreceptor situado entre os olhos e a narina e, presas móveis inoculadoras situadas na porção anterior do maxilar (Figura 2) (BRASIL, 2001; CARDOSO et al., 2009). Este gênero é originado na América do Norte, dispersando-se até a América Central e do Sul (ECHEVERRYGARAY et al., 2001) e, compreende, na atualidade, 47 espécies (UETZ; FREED; HOSEK, 2017).

Dentro deste gênero, a espécie *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) é a única representante encontrada no Brasil, pois foi a única a apresentar populações com dispersão gradual do seu centro de origem no México para a América Central, e posteriormente para o Norte e Sul da América do Sul (WUSTER et al., 2005; PLACE; ABRAMSON, 2004;), colonizando áreas em formações sazonalmente secas, savanas e florestas sazonais secas, porém nunca em florestas tropicais (WUSTER et al., 2005).

Das subespécies de *Crotalus durissus* reconhecidas no Brasil, tem-se as *C. d. cascavella* descrita para toda região Nordeste do Brasil, indo até o extremo Nordeste de Minas Gerais; *C. d. collilineatus*, encontrada no Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Sul do Brasil; *C. d. marajoensis* que tem como habitat Ilha de Marajó; *C. d. ruruima* que tem como habitat o cerrado do Estado de Roraima; e *C. d. terrificus*, encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

As *Crotalus durissus* se enquadram no grupo de serpentes com problemas quanto à definição do seu *status* taxonômico, uma vez que as espécies e subespécies foram

identificadas morfológicamente a partir dos padrões do tamanho, coloração e da escamação do corpo, levando à formação de um grupo sistematicamente complexo, mal definido e com populações heterogêneas, mesmo com algumas subespécies apresentando alguma similaridade entre si (WUSTER et al., 2005).

Da necessidade de se utilizar espécimes deste grupo de animais como fornecedores de matéria-prima para a fabricação de soros envolvidos na produção de imunobiológicos no Estado da Bahia, surgem questionamentos por parte de bioquímicos e toxicologistas sobre o status taxinômico do Complexo *Crotalus durissus*. Esta situação levou a equipe do LAPH-UEFS a reavaliar o *status* taxinômico das cascavéis, utilizando técnicas tradicionais envolvendo caracteres morfológicos e de morfometria geométrica craniana (ANDRADE, 2009), sendo então possível detectar uma nítida distinção entre os espécimes de cascavéis sinonimizados, com a formação de um clado distinto para o Estado da Bahia e para a região Sudeste do Brasil. Além disso, o emprego de técnicas de biologia molecular, como marcador molecular de diferentes regiões mitocondriais, foi possível confirmar a existência de uma nova subespécie de cascavel no Estado da Bahia (ANDRADE, 2009).

Esta nova subespécie, *Crotalus durissus* ssp, é a serpente de interesse desse estudo, que se distribui geograficamente pelo ecossistema caatinga e em região de Mata Decidual, dentro do Estado da Bahia (BIONDI et al., 1994) e, apresenta uma ampla variabilidade bioquímica e farmacológica. Em estudo preliminar, perfis cromatográficos e eletroforéticos, realizados com a peçonha desta serpente (BIONDI, et al., 2004) demonstraram a existência de uma grande similaridade desta peçonha com as de *C. d. cumanensis* e *Crotalus vegrandeis*, provenientes da Venezuela (AGUILAR; GIRON; RODRIGUES-ACOSTA, 2001).

A controversa taxonomia presente neste grupo, atrelado aos padrões de variações geográficas por se tratar de uma espécie amplamente distribuída, fazem das cascavéis do Brasil um importante modelo para investigar a composição e o efeito das suas peçonhas (WUSTER et al; 2005; VANZOLINI & HEYER, 1985; CHIPPAUX et al., 1991). Estudar as variações individuais e/ou populacionais que ocorrem na composição e nos efeitos das peçonhas de serpentes é de importância fundamental para o reconhecimento da patologia e terapia dos acidentes ofídicos (CHIPPAUX et al., 1991).

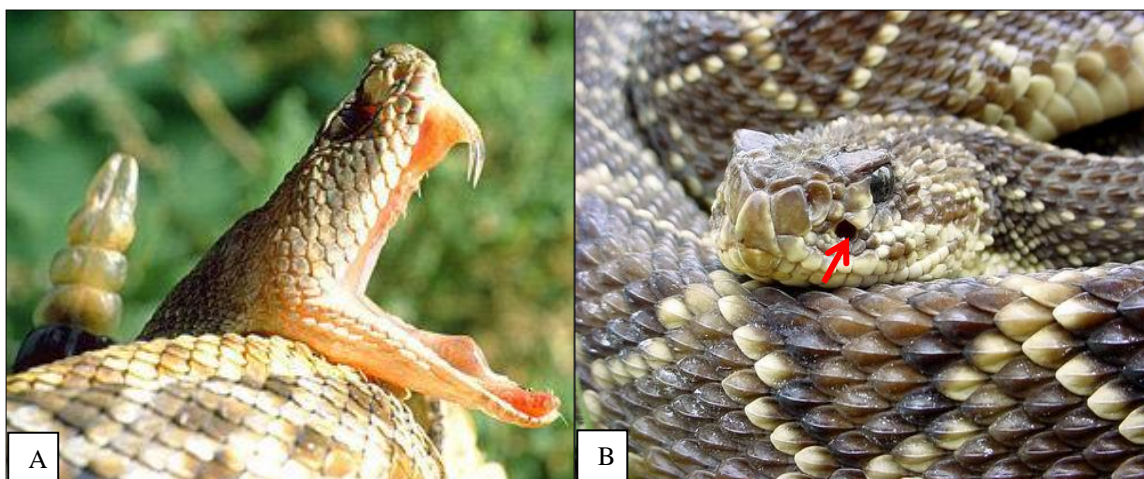


**Figura 1** - Imagem da serpente *Crotalus durissus* ssp com guizo na extremidade da cauda.



Fonte: Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH-UEFS).

**Figura 2** - Foto de *Crotalus durissus* demonstrando presas móveis inoculadoras de peçonha (A); e seta indicando o órgão termoreceptor (fosseta loreal) destes animais (B).



Fonte: <http://www.viaradicalbrasil.com/venenosos>.

### 3.2 Epidemiologia

O acidente ofídico, especialmente ocasionado por serpentes peçonhentas, em virtude da gravidade dos casos e da frequência que ocorre, constitui ainda um tema de relevância clínico-epidemiológica e um importante problema médico. Este fato é particularmente mais grave nos países subdesenvolvidos das regiões tropicais e subtropicais, uma vez que as populações, nessas regiões, sofrem de alta morbidade e mortalidade por conta do acesso precário aos serviços de saúde (GUTIERREZ, 2010; KASTURIRATNE, 2008).

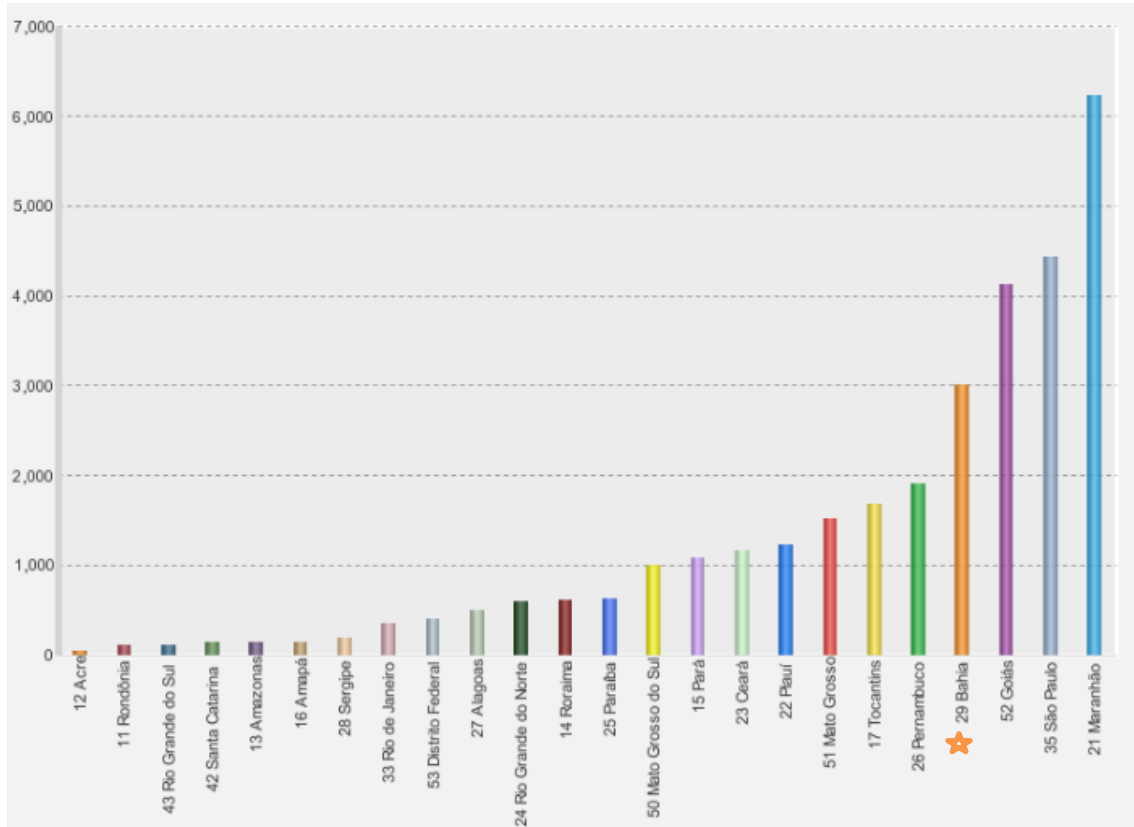
O temor pelas serpentes encontra-se impregnado no imaginário popular, muito embora esse medo não tenha sido suficiente para motivar medidas eficientes no controle dos acidentes provocados (CARDOSO et al., 2009). Estimativas apontam que ocorrem anualmente, no mundo, cerca de 421.000 a 1.841.000 acidentes por serpentes peçonhentas, com 20.000 a 94.000 mortes (KASTURIRATNE et al., 2008).

No Brasil, foram notificados, em 2008, 26.156 acidentes por serpentes com uma incidência de 13,8/100.000 habitantes (BRASIL, 2009) e, no ano de 2010 ocorreram 29.505 casos de acidentes notificados pelo SINAN (MACHADO, BOCHNER, 2012). Em 2013 estes números aumentaram para 27.181 casos (BRASIL, 2014) e, segundo Bochner, Fizon e Machado (2014), houve 329.180 acidentes por serpentes no Brasil durante o período de 2001 a 2012, cujo aumento anual médio foi de 4.1%, colocando a Região Nordeste em terceiro lugar em números de casos registrados. Mais recentemente, Chippaux (2015), avaliou o perfil dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil utilizando uma série histórica de 2001-2012, destacando que a média de incidência anual aumentou para todos os grupos de animais peçonhentos analisados, com um maior percentual de mortalidade para os acidentes por serpentes e, destacando em terceiro lugar a Região Nordeste em incidência (14.3/100.000 habitantes) e em mortalidade (0.09 %).

No caso específico dos acidentes por *Crotalus durissus*, foram registrados no Brasil aproximadamente 8% dos casos de acidentes por serpentes notificados no país, com letalidade de quase 2% e com alta frequência de evolução para insuficiência renal aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2018). Num estudo epidemiológico retrospectivo entre o período de 1990 a 1993, no Estado da Bahia, pôde-se identificar a ocorrência de 245 acidentes graves, nove óbitos e 15 sequelados por Insuficiência Renal após acidentes provocados por cascavéis (BIONDI et al, 1994).

Analisando os dados de um recorte temporal de 2010 a 2016, ocorreram no país 14.774 acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. No Estado da Bahia ocorreram 1.001 acidentes, ficando em quarto lugar no ranking nacional (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE /SINAN, 2018).

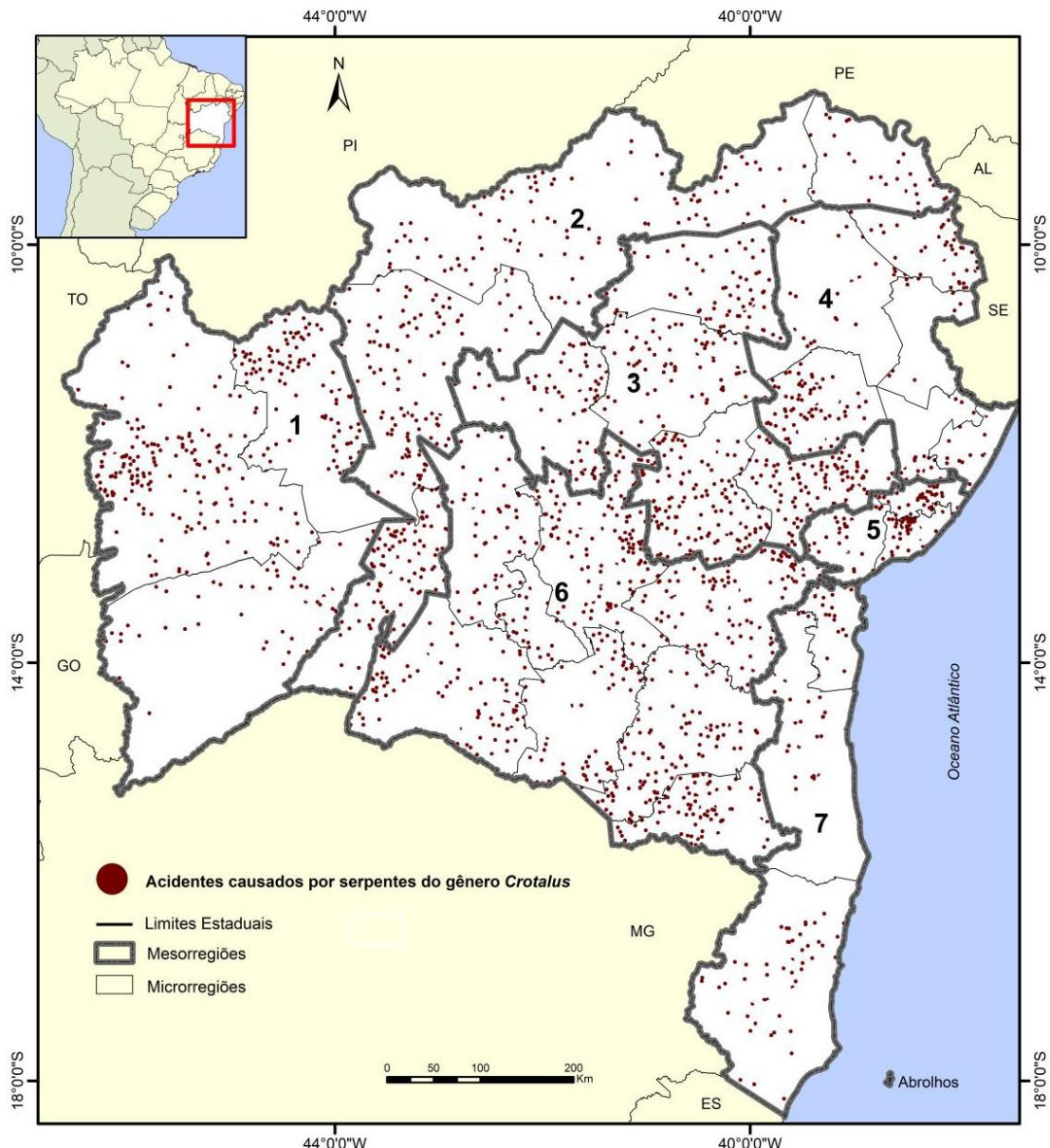
**Figura 3** - Número de acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus* no período de 2010 a 2016 no Brasil.



Fonte: Ministério da saúde –SINAN (2018). Com alterações.

Estudos recentes, utilizando dados secundários, avaliaram o perfil dos acidentes por serpentes nas Mesoregiões do Estado da Bahia no período de 2010 a 2015. Esta investigação indicou um crescente aumento de acidentes por esta serpente quando comparado a estudos anteriores. Dos 15.651 acidentes por serpentes, 850 foram causados por *Crotalus* que levou 13 indivíduos ao óbito, cuja evolução das manifestações clínicas e fisiopatológicas desenvolvidas foi desconhecida (Figura 4; Tabela 1) (BIONDI, 2018).

**Figura 4.** Mapa com a espacialização do número de acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus* nas Mesorregiões e Microrregiões do Estado da Bahia.



**Mesorregiões (números de ocorrências por acidentes; percentuais)**

1 - Extremo Oeste Baiano	(134; 15,76%)
2 - Vale São Franciscano da Bahia	(138; 16,24%)
3 - Centro Norte Baiano	(175; 21,18%)
4 - Nordeste Baiano	(71; 8,35%)
5 - Metropolitana de Salvador	(47; 5,52%)
6 - Centro Sul Baiano	(240; 28,24%)
7 - Sul Baiano	(40; 4,71%)
<b>Total de casos</b>	<b>(850)</b>

Fonte: SIG-BA, 2003; IBGE, 2010  
 Agentes etiológicos: SINAN (2010-2015)  
 Sistema Coordenadas: Lat/Long  
 Sistema Geodésico: Sirgas 2000  
 Dado Organizado: Ilka Biondi, 2017  
 Elaborado: Eduarda de Jesus S. Lima, 2017

Fonte: Biondi (2018).

**Tabela 1** - Evolução clínica dos acidentes causados por serpentes, de acordo com o agente etiológico identificado, no período de 2010-2015, ocorridos no Estado da Bahia, Brasil.

Agente etiológico	Evolução do caso						Total	
	Cura		Óbito		Ignorado		N	%
	N	%	N	%	N	%		
<i>Bothrops</i>	9.666	87,93	57	64,77	1.772	38,77	11.495	73,45
<i>Crotalus</i>	688	6,26	13	14,77	149	3,26	850	5,43
<i>Micrurus</i>	157	1,43	-	-	19	0,42	176	1,12
<i>Lachesis</i>	58	0,53	-	-	10	0,22	68	0,43
Não peçonhentas	424	3,86	3	3,41	50	1,09	477	3,05
Ignorado	-	-	15	17,05	2.570	56,24	2.585	16,52
<b>Total</b>	<b>10.993</b>	<b>100</b>	<b>88</b>	<b>100</b>	<b>4.570</b>	<b>100</b>	<b>15.651</b>	<b>100</b>

Fonte: Biondi (2018).

### 3.3 Composição química das peçonhas de *Crotalus durissus*

De forma geral, as peçonhas de serpentes são constituídas por misturas complexas de proteínas, peptídeos e enzimas, dentre outras substâncias. Dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos, como ontogenia, distribuição geográfica, dieta, idade e sexo das serpentes, as peçonhas podem variar, assim como os seus efeitos biológicos (BRAZIL, 2011; WHITE, 2005).

A peçonha crotálica apresenta uma ampla variedade de componentes inorgânicos e orgânicos. Os compostos inorgânicos (cerca de 10%) incluem: sódio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobalto e níquel, com funções importantes na ativação enzimática. Dentre os compostos orgânicos (cerca de 90%) estão presentes as enzimas hidrolíticas (fosfolipase A<sub>2</sub>, fosfodiesterases, fosfomonoesterases), as enzimas não hidrolíticas (L-aminoácido-oxidase - LAAO), as enzimas proteolíticas (endopeptidases, exopeptidases, collagenases, elastases, arginina éster-hidrolases, hialuronidases e NAD-nucleosidases) e as toxinas características como a convulxina, giroxina, crotoxina, crotamina, proteínas do tipo trombina e peptídeos, alguns destes natriuréticos (BEGHINI, 2001). Estes componentes apresentam um conjunto diversificado de ações que interferem em vários processos fisiológicos, sendo responsáveis por determinadas manifestações locais e sistêmicas e pelas atividades miotóxica, neurotóxica, nefrotóxica e coagulante (CASTRO, 2006; CISSA, 1997; CHIPPAUX et al., 1991).

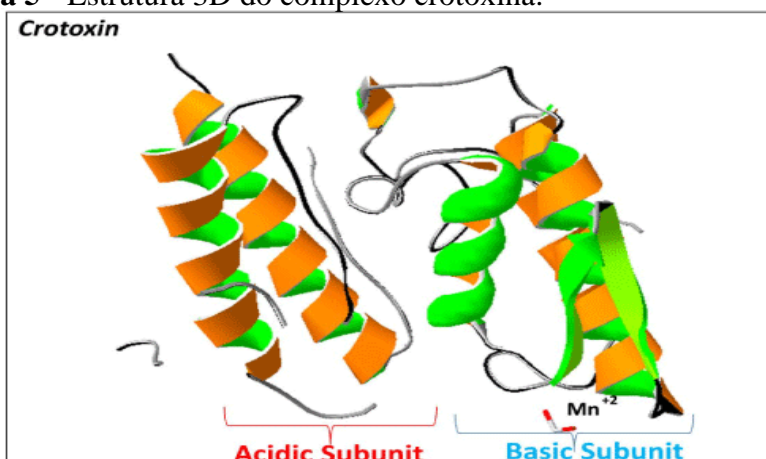
A crotoxina foi a primeira neurotoxina isolada da peçonha de cascavéis em 1938 por Slotta e Fraenkl Conrat (CHANG E LEE, 1977). Ela é componente majoritário da peçonha

(50% das proteínas) e é clinicamente a mais importante, pois pode desempenhar tanto atividades neurotóxicas, miotóxicas, hemolíticas, e atuar como agregantes de plaquetas (LOMEO et al., 2014; BEGHINI et al., 2004). Ela é uma neurotoxina pré-sináptica que atua na junção neuromuscular inibindo a liberação da acetilcolina pelos impulsos nervosos, desencadeando, assim bloqueio neuromuscular e, conseqüentemente paralisias motoras e respiratórias (BEGHINI et al., 2004; MARTINS et al., 2002).

Estruturalmente a crotoxina é um heterodímero não covalente formado pela associação de duas proteínas: uma básica, hidrofóbica e tóxica denominada de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e, uma ácida não tóxica denominada de crotapotina (Figura 5). A PLA<sub>2</sub> é um componente tóxico responsável por desencadear efeitos farmacológicos ocasionados pelo complexo crotoxina. A crotapotina não apresenta toxicidade, mas atua como um carreador de PLA<sub>2</sub>, dificultando a formação de interações em sítios de ação não específicos. Dessa forma, a atuação sinérgica destas duas subunidades é o que confere a alta toxicidade da peçonha (LOMEO et al., 2014; BEGHINI et al., 2004; ; SALVINI et al., 2001; FAURE; BON, 1988; SANTOS, 1988).

As PLA<sub>2</sub> apresentam uma diversidade molecular com formas cataliticamente ativas e inativas e são classificadas em quatro grupos (I, II, III e IV), sendo as do grupo II encontradas nas peçonhas das serpentes da família Viperidea, onde estão alocadas as serpentes do gênero *Crotalus* (KINI, 1997). A PLA<sub>2</sub>, quando dissociada do complexo crotoxina, é capaz de desencadear a formação de edema, inflamação e mionecrose, podendo levar à morte (COSTA, 2008; RANGEL-SANTOS et al., 2004; KINI, 1997; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984).

**Figura 5** - Estrutura 3D do complexo crotoxina.



Fonte: Gasanov et al. (2014).

A crotamina, isolada em 1956 por Gonçalves e Arantes, é uma proteína básica e miotóxica que possui toxicidade leve. Não há um consenso sobre seu mecanismo de ação,

entretanto, estudos sugerem que seu principal local de ação seja a membrana plasmática de células da musculatura esquelética, onde interage com canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), aumentando o influxo deste íon nas células musculares. Esta capacidade de despolarização do potencial de membrana pode produzir contratura muscular esquelética de origem periférica como paralisia e espasmos, além de um processo degenerativo (vacuolização) e morte do tecido (necrose) (LOMONTE et al., 2003; NICASTRO et al., 2003; CHEYMOL et al., 1971).

A giroxina, isolada por Barrio (1961), é uma glicoproteína tóxica não letal. Bioquimicamente, ela é semelhante à trombina e apresenta ação fibrinolítica. Dessa forma, é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina e, assim, aumentar o tempo de coagulação do sangue (CUNHA; MARTINS, 2012; SANO-MARTINS et al., 2001). Pode, ainda, atuar sobre o sistema nervoso central, levando à lesão labiríntica (SEKI et al., 1980), caracterizada por movimentos rápidos de rotação do corpo de camundongos e produzir síndrome convulsiva nos mesmos (BEGHINI. et al., 2004).

A convulxina foi isolada por Prado-Franceschi & Vital Brazil (1981), os quais demonstraram a capacidade desta toxina induzir convulsões e distúrbios respiratórios e circulatórios em animais experimentais como camundongos, gatos e cães. Ela é uma glicoproteína responsável pela indução de alterações de equilíbrio como rotações ao longo do eixo longitudinal do corpo dos animais, alterações gastrointestinais, distúrbios respiratórios, taquicardia levando à dispnéia seguida de apnéia, aumento da salivação e alterações visuais logo após sua inoculação (CASTRO, 2006; ALEXANDER et al., 1988). Hematologicamente produz agregação plaquetária ligando-se fortemente aos receptores glicoproteicos VI presentes nas membranas, causando distúrbios na hemostasia com subsequente isquemia cerebral, podendo levar a convulsões, seguida de óbito (CUNHA; MARTINS, 2012; PRADO-FRANCESCHI; BRASIL, 1981).

Peçonhas com variações na composição têm provocado importantes implicações nos acidentes humanos devido à dificuldade em realizar uma correlação segura entre o agente etiológico e as manifestações clínicas, como também em estabelecer uma terapia que responda adequadamente às manifestações clínicas desenvolvidas pelo acidentado (CARDOSO; MOTA, 1997; DALTRY et al., 1996; CHIPPAUX et al., 1991).

### **3.4 Manifestações clínicas após o empeçonhamento**

A maioria das peçonhas exerce seus efeitos em quase todas as células e tecidos e suas propriedades farmacológicas podem ser determinadas pela quantidade de um constituinte

específico e biologicamente ativo que se acumula num sítio de reconhecimento onde é capaz de produzir injúria (CUNHA; MARTINS, 2012).

As manifestações locais, como a indução severa de edema, infiltração de leucócitos e liberação de vários mediadores inflamatórios estão relacionadas ao emponhamento de serpentes da família Viperidae, principalmente aquelas do gênero *Bothrops* e do gênero *Crotalus* que habitam a América do Norte e Central (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2013; CALVETE et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009; GUTIERREZ e BOLANOS, 1980). Após acidentes com as *Crotalus* brasileiras, estas respostas locais, entretanto, são geralmente discretas, raramente apresentam dor, edema e eritema. (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HENRY, 2003).

As manifestações sistêmicas são caracterizadas por ações neurotóxicas, miotóxicas, distúrbios na coagulação, hepatotóxica e nefrotóxica (BRASIL, 2001). As manifestações clínicas gerais como mal-estar, náuseas, prostração e cefaleia podem aparecer precocemente. (CARDOSO et al., 2009; CASTRO, 2006; BRASIL, 2001).

Distúrbios na coagulação após acidente crotálico ocorrem devido à presença de uma proteína do tipo trombina que atua na cascata de coagulação sanguínea, convertendo o fibrinogênio diretamente em fibrina. Este evento resulta na formação de uma rede de fibrina mais instável e susceptível à ação de agentes fibrinolíticos, podendo, conseqüentemente, prolongar o tempo de coagulação (TC) ou tornar o sangue incoagulável. Geralmente não há redução do número de plaquetas e as manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas e restritas às gengivas (CASTRO, 2006; SILVA, 2004; BRASIL, 2001).

Na atividade neurotóxica, a mais grave decorrente da peçonha crotálica, o complexo crototoxina age de forma pré-sináptica, inibindo ou excitando determinados neurotransmissores, o que acarreta uma variedade de efeitos fisiopatológicos, como, por exemplo, a de inibir a liberação de acetilcolina, principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular, provocando paralisias motoras e respiratórias, manifestações características do emponhamento crotálico (CASTRO, 2006; GUTIÉRREZ, 2002).

As principais manifestações neurotóxicas presentes nos acidentes crotálicos são a ocorrência de ptose palpebral uni ou bilateral, oftalmoplegia, visão turva ou diplopia, derivada da paralisia da musculatura extrínseca e intrínseca do globo ocular, por comprometimento do terceiro par dos nervos cranianos. Geralmente, elas são evidenciadas nas primeiras seis horas após o acidente (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HENRY, 2003). Alterações neurológicas como convulsões, distúrbios respiratórios, contratura ao contrário da coluna dorsal (opistótono) e indução de alterações de equilíbrio como rotações ao longo do eixo



longitudinal do corpo dos animais podem ser desencadeadas pela ação a toxina convulxina, componente da peçonha crotálica (CASTRO, 2006; ALEXANDER et al., 1988).

Os efeitos miotóxicos sistêmicos, também conhecidos como rabdomiólise, são caracterizados por lesões degenerativas das fibras musculares esqueléticas, com a libertação de substâncias intracelulares, como mioglobina e creatina quinase (CK) para a circulação, que a seguir, são excretadas na urina. A caracterização clínica dessa ação da peçonha é o aparecimento de urina com coloração avermelhada ou marrom, traduzindo a eliminação de quantidades variáveis da mioglobina (mioglobinúria) (PINHO et al., 2008; ROSA et al., 2005; AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HENRY, 2003; HAAPANEN et al., 1988). Entretanto, só se torna detectável na urina com concentrações plasmáticas superiores a 300 ng/ml, mas só produz alteração da coloração da urina com concentrações urinárias de 100 mg/dL, pois é rapidamente depurada (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HENRY, 2003; ; VANHOLDER et al, 2000; FERRABOLI, et al, 1995).

O potencial nefrotóxico da mioglobina liberada após processo de rabdomiólise é amplamente reconhecido. Contudo, a fisiopatologia da IRA é ainda pouco conhecida. Sugerem-se como possíveis mecanismos o efeito tóxico direta da mioglobina e/ou a obstrução tubular pelos cilindros formados pelo pigmento mioglobina (PINHO et al; 2008; PINHO et al. 2000).

Baseando-se nas manifestações clínicas e visando orientar a terapêutica a ser utilizada, os acidentes crotálicos também são classificados em leve, moderado e grave (Quadro 1). As manifestações classificadas como leves são caracterizadas pela presença tardia de sinais e sintomas neurotóxicos discretos, com mialgia discreta ou sem mialgia e ausência de rabdomiólise. As moderadas caracterizam-se pela presença precoce de sinais e sintomas neurotóxicos discretos, mialgia discreta e a urina pode apresentar coloração alterada. Nas manifestações graves, os sinais e sintomas neurotóxicos são evidentes e intensos (fácies miastênica, fraqueza muscular), a mialgia é intensa e generalizada, a urina é escura, podendo haver oligúria ou anúria (BRASIL, 2001).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para acidentes ofídicos consiste na administração, mais precoce possível, de soro específico para cada tipo de acidente e, de acordo com a gravidade do envenenamento. No caso dos acidentes com cascavéis, o soro é o anticrotálico (SAC) ou polivalente a depender do agente etiológico (BRASIL, 2001).

**Quadro 1** - Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada.

Manifestações e Tratamento	Classificação (Avaliação Inicial)		
	Leve	Moderada	Grave
Fácies miastêmica/ Visão turva	ausente ou tardia	discreta ou evidente	evidente
Mialgia	ausente ou discreta	discreta	intensa
Urina vermelha ou marrom	ausente	pouco evidente ou ausente	presente
Oligúria/Anúria	ausente	ausente	presente ou ausente
Tempo de Coagulação (TC)	normal ou alterado	normal ou alterado	normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAC/SABC*	5	10	20
Via de administração	intravenosa		

\* SAC = Soro anticrotálico/SABC = Soro antibotrópico-crotálico.

Fonte: BRASIL, Ministério da saúde (2001).

Outra complicação desencadeada após o empeçonhamento crotálico é a injúria renal aguda (IRA) com degeneração e necrose tubular, sendo, inclusive, uma das alterações mais graves e mais frequentes, bem como uma importante causa de óbito (ALBUQUERQUE et al., 2013; CASTRO, 2006; PINHO et al., 2000).

A IRA é uma complicação sistêmica e consiste na via final comum de muitas diferentes doenças do rim e do trato urinário. Ela é definida quando os rins não são capazes de remover os produtos de degradação metabólica do corpo ou de realizar as funções reguladoras. As substâncias normalmente eliminadas na urina acumulam-se nos líquidos corporais em consequência da excreção renal comprometida, e levam a uma ruptura nas funções endócrinas e metabólicas, bem como a distúrbios hidroeletrolíticos e acidobásicos. (RIBEIRO et al., 2008).

A fisiopatologia da IRA devido às toxinas de animais após acidentes ofídicos não foi completamente elucidada. As lesões renais podem ser causadas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos como mudanças hemodinâmicas, reações inflamatórias e efeito nefrotóxico, provocados pela ação da peçonha no organismo (ALBUQUERQUE et al., 2013; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012). Estudos experimentais sugerem que a patogênese para este tipo de injúria renal aguda, especialmente a causada pela peçonha crotálica, seja

multifatorial, incluindo como principais causas a rabdomiólise, hemólise, choque, coagulação intravascular e um possível efeito nefrotóxico direto (ALBUQUERQUE 2013; GUTIERRÉZ, 2009).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a lesão renal causada pela peçonha crotálica. Pesquisas apontam que esta peçonha pode apresentar ações nefrotóxicas indireta e direta. De acordo com Magalhães et al (1986) e Rovere et al. (1978), uma das ações indiretas é decorrente principalmente de rabdomiólise acentuada, a qual é caracterizada por necrose muscular e liberação de constituintes intracelulares do músculo, a exemplo da mioglobina, para a circulação, elevando os níveis de enzimas marcadoras de lesão muscular como creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST), alterando, inclusive, a coloração da urina (FERREIRA, 2012; ROSA et al., 2005; FERRABOLI et al., 1995).

As frações miotóxicas, crotalina e crotamina, da peçonha de *Crotalus* apresentam grande importância no desencadeamento da rabdomiólise e, conseqüentemente de lesões renais, uma vez que estas toxinas atuam sobre o sarcolema das membranas plasmáticas de células musculares, causando lesões como necrose das fibras musculares e, por conseguinte liberação de mioglobina, a qual, por ser altamente tóxica, afeta todo o organismo, sobretudo os rins. A rabdomiólise é apontada em estudos como a causadora de lesões renais em cerca de 50% dos indivíduos acidentados (ROSA et al., 2005). Foi reportada na literatura, que a peçonha crotálica também foi capaz de desencadear, em ratos, vasoconstrição da arteríola aferente renal e, conseqüentemente a redução na taxa de filtração glomerular (ROVERE et al, 1978 apud PINHO et al., 2000). No entanto, este é um mecanismo ainda não elucidado.

No mecanismo de lesão renal direta, o principal dano ocasionado é a necrose tubular, a qual pode evoluir para a insuficiência renal. Os rins apresentam uma habilidade imprescindível para manter a homeostasia corporal, por meio da secreção e reabsorção de água e eletrólitos a partir do filtrado glomerular. No entanto, toxinas como as de serpentes crotálicas permanecem na luz tubular, o que torna as células tubulares dos rins altamente vulneráveis às mais diversas injúrias devido a sua exposição desproporcional às substâncias circulantes e aos mecanismos de transporte tubular (SANTOS et al., 2009; AMORA, 2006).

Quando há ocorrência de lesões renais, podem-se evidenciar manifestações clínicas como ausência ou presença de mialgia, alteração da coloração da urina e oligúria ou anúria. As ferramentas diagnósticas bioquímicas convencionais utilizadas para a detecção da injúria renal compreende o estabelecimento da azotemia pela análise conjunta dos valores de ureia,

ácido úrico e creatinina séricas, bem como por exames urinários de proteinúria, excreção de íons e uma análise descritiva da urina (CASTRO et al., 2016; MALAGRINO, 2014).

Os efeitos clínicos da IRA estão associados com o volume de urina, o qual pode se encontrar normal ou pode resultar em oligúria ou até mesmo anúria e com a retenção progressiva de produtos nitrogenados do metabolismo como a ureia e creatinina, que são normalmente excretados pelos rins e, constituem o parâmetro laboratorial mais utilizado para a definição detecção da IRA (PERES et al, 2013; VAIDYA; BONVENTRE, 2006).

A creatinina é produzida pelos músculos de forma constante, sendo eliminada principalmente por filtração glomerular. Pequenos aumentos nos valores de creatinina correspondem a grandes perdas da taxa de filtração glomerular (TFG) (CASTRO et al., 2016; MALAGRINO, 2014; NUNES et al., 2010).

A ureia plasmática é outro marcador importante de função renal. A produção de ureia e sua excreção são extremamente variáveis e dependem de fatores como, estado de hidratação, dieta e lesão tecidual. Não é um marcador definitivo de função renal isoladamente e deve ser analisada em conjunto com outros parâmetros (BERNARDI, 2007).

Outro parâmetro importante na IRA, mas não tão usual, é o eletrolítico, o qual é utilizado na avaliação da excreção fracionada de eletrólitos como sódio, cloro e potássio, conferindo a capacidade da função tubular renal, pois a regulação destes eletrólitos, excreção de excesso ou manutenção mediante deficiências, é feita pelo rim, sendo filtrados pelo glomérulo e reabsorvidos por mecanismos específicos localizados no túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal (CASTRO et al., 2016).

Os parâmetros descritos, usualmente utilizados no indicativo da IRA, apresentam baixa sensibilidade e alteram de forma significativa quando a lesão já está em estágios evoluídos. Dessa forma, na busca de uma avaliação mais precoce e mais específica, a fim de melhorar o quadro clínico do paciente, evitando complicações maiores durante a evolução da doença renal, diferentes tipos de biomarcadores renais têm sido utilizados, tais como Molécula de injúria renal-1 [KIM-1], interleucina 18 [IL-18], interleucina [IL-1 $\beta$ ] e quimiocina [CxCl-1] (PERES et al, 2013; VAIDYA; BONVENTRE, 2006).

A KIM-1 é uma glicoproteína transmembrana tipo 1, que se encontra expressa em baixos níveis nos rins normais e está situada nas células do túbulo proximal, localizada principalmente na membrana apical das células onde o ectodomínio da KIM-1 é eliminado da superfície celular por um processo dependente de metaloproteinase (HAN et al., 2002). Ela é um dos biomarcadores mais importantes, sendo muito útil na lesão tubular proximal renal, facilitando o diagnóstico precoce da doença e servindo como um diagnóstico diferencial da

lesão renal. Embora o gene KIM-1 ou a expressão da proteína seja indetectável no rim normal, após lesão, o mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) é rapidamente sintetizado e a proteína KIM-1 gerada é localizada em altos níveis na membrana apical do túbulo proximal (PERES et al, 2013; HAN et al., 2002).

Citocinas são um grupo diversificado de proteínas não humorais que agem como mediadoras entre células. São produzidas por células do sistema imune ou não à medida que são necessitadas, sendo sua síntese iniciada por transcrição gênica e seus mRNA têm vida curta (ORTEGA; FORNONI, 2010). As citocinas com funções celulares pleiomórficas na inflamação, crescimento e diferenciação celular, são classificadas como pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e seus níveis sistêmicos podem estar elevados em casos de injúria renal aguda devido a um aumento de sua expressão pelas células renais (CUNNINGHAM et al., 2002). Uma das primeiras citocinas envolvidas com o início da inflamação é a interleucina 1 (IL-1). A isoforma IL-1 $\beta$  causa aumento na expressão de moléculas de adesão celular, contribuindo para a adesão e transmigração dos leucócitos no endotélio (JUSTIZ-VAILLANT; QURIE, 2018), estabelecendo um microambiente adequado ao desenvolvimento da inflamação.

Quimiocinas são moléculas com função quimiotática e são agrupadas na grande família das citocinas. São produzidas por leucócitos e por vários tipos de células teciduais e consideradas moléculas chaves na regulação e migração de leucócitos para os tecidos lesados, desempenhando funções importantes nas diferentes vias dos processos inflamatórios (BAGGIOLINI et al., 2005; GERARD, 2001). As quimiocinas, entre elas as da família CXC (CXCL1), são produzidas por células epiteliais dos túbulos renais e são relatadas como indutoras do deslocamento de neutrófilos polimorfonucleares, promovendo inflamação intersticial nas infecções renais (GRAHAM et al., 2009; HUNG et al., 2006).

Processos inflamatórios mediados por citocinas têm sido implicados na patogênese da injúria renal aguda, em que ocorrem danos de células e dos tecidos associadas com a liberação de alguns mediadores que podem iniciar um processo de inflamação (HAMASAKI, 2015; ORTEGA et al., 2010; AKCAY et al., 2009).

Toxinas de animais, especialmente aquelas que apresentam atividade enzimática, a exemplo da fosfolipase A2, são conhecidas por iniciarem processos inflamatórios que envolvem a geração de citocinas pró-inflamatórias e mediadores vasoativos, resultando em alterações hemodinâmicas sistêmicas e renais. A expressão de citocinas caracteriza quadro de insuficiência renal aguda, glomerulonefrite e, portanto, pode ser utilizada como marcador de injúria renal aguda, pois células endoteliais e tecidos danificados estão associados com a

liberação de alguns mediadores que podem iniciar a cascata inflamatória (HAMASAKI, 2015; SITPRIJA, 2008).

A combinação de marcadores metabólicos mostra-se promissora devido à sua estabilidade superior em comparação à maioria das proteínas e a disponibilidade de melhores métodos de validação e quantificação. Os biomarcadores proteicos da função renal devem trazer um maior impacto na prática clínica do que as estratégias de novos marcadores metabólicos (PERES et al, 2013).

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais experimentais e aspectos éticos**

Foram utilizados camundongos Swiss machos e com peso de 20-22g, fornecidos pelo Biotério da UEFS e pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em salas isoladas e em condições controladas de temperatura (22 e 25°C), luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), umidade e circulação de ar, recebendo água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram submetidos e aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC (protocolo 107/2016) e da UEFS (protocolo 006/2016) e, conduzidos de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal.

### **4.2. Peçonha da serpente *Crotalus durissus ssp.***

A peçonha foi coletada dos espécimes de *Crotalus durissus ssp.* (*Cd-ssp.*) do cativeiro do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), seguindo os protocolos de extração deste laboratório previamente estabelecidos (dados não publicados).

### **4.3. Dosagem de proteínas**

A concentração de proteína da peçonha foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST. Louis, MO, USA). A quantidade da peçonha foi expressa pelo seu conteúdo protéico.

### **4.4. Avaliação dos efeitos locais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus ssp.***

A dose utilizada para avaliar os efeitos locais desencadeados pela serpente *Crotalus durissus ssp.* foi de 1,5µg/animal (BIONDI, 2009).

#### **4.4.1 Reação edematogênica**



Os camundongos (n=18) foram inoculados com 1,5µg da peçonha de *Crotalus durissus* ssp diluída em 30µl de Salina tamponada com fosfato estéril (PBS), na região interplantar da pata traseira esquerda (pata experimental). Foi escolhida como controle a pata direita traseira dos mesmos animais. O edema local foi quantificado através da medição da espessura das patas dos camundongos utilizando um paquímetro (Mytutoyo Sul Americana, SP, Brasil), nos tempos de 15min, 30min, 60 min, 120min, 180min, 360min, 480min e 720min após a inoculação. Os resultados foram expressos pela diferença entre a espessura da pata experimental e da pata controle do mesmo animal. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

Doze animais deste mesmo experimento foram escolhidos aleatoriamente em intervalos de 15min (n=04), 30min (n=04) e 2horas (n=04) respectivamente, e eutanasiados com sobredose de quetamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg), para a análise histológica da região interplantar e da musculatura do coxim plantar.

#### **4.4.2 Quantificação de leucócitos no local da inoculação**

Os leucócitos foram quantificados na região interplantar dos camundongos (n=08) de acordo com o protocolo descrito por Lima et al. (2003), baseado na contagem de leucócitos. A peçonha de *Cd-ssp* (1,5µg de peçonha diluída em 30µl de PBS) foi inoculada na região interplantar da pata traseira direita (experimental). Os animais inoculados com 30µl de PBS estéril foram considerados como controles (n=06). 30 minutos e 24 horas após a inoculação, os animais foram eutanasiados e as patas foram amputadas. O tecido da pata foi macerado em um homogenizador de vidro em 200 ml de HBSS. O líquido da maceração foi centrifugado por 10 minutos a 1500rpm a 4°C, o sobrenadante foi separado e congelado a -20°C para análises das citocinas. O material restante contendo células foi ressuspensão em 1mL de PBS + 0,1% BSA. A contagem total dos leucócitos foi efetuada em câmara de Neubauer.

#### **4.4.3 Quantificação de citocinas**

As citocinas Interleucina-1 beta (IL-1β) e Interleucina-6 (IL-6) foram quantificadas do sobrenadante obtido (item 4.4.3 da metodologia) pela técnica de ELISA sanduiche. Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 100 µl do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato pH 9,5 (IL-1β e IL-6), incubadas por 18 horas a 4°C e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS + 5% gelatina, por 90 minutos. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes

com PBS e, em seguida, adicionados 100 µL/poço de PBST + 0,1% de BSA nas duas primeiras fileiras, onde foi diluído, na razão de 1:2, o padrão das citocinas recombinantes. Nas fileiras seguintes, as amostras foram diluídas e distribuídas. As placas foram, então, incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas com PBST e 100 µl/poço do segundo anticorpo biotilado (IL-1β e IL-6) diluído em PBST + 0,1% BSA foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Mais 4 lavagens com PBST foram feitas e 100 µl/poço de estreptoavidina-peroxidase diluído em PBST + 0,1% BSA foram adicionados às placas e incubadas por mais 1 hora. Novo ciclo de lavagens foi feito e a reação foi revelada pela adição de 100 µl/poço de TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. A quantidade das citocinas nas amostras foi calculada a partir das curvas-padrão obtidas com concentração de proteínas recombinante na faixa de 7,81 a 1000 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média aritmética ± DP para amostras em triplicado.

#### **4.4.4 Avaliação dos processos de rolamento, adesão e transmigração de leucócitos na microcirculação cremaster dos camundongos inoculados com a peçonha de *Crotalus durissus ssp.***

Para confirmar o processo inflamatório provocado pela peçonha de *Crotalus durissus ssp.*, utilizou-se a técnica de microscopia intravital por transiluminação com monitor do televisor (Axiolab, Carl-Zeiss, Oberkochen, DE) acoplado a uma câmera fotográfica (Nikon Coolpix 990-), utilizando uma objetiva 10/25 com distância longitudinal e abertura de 1,6 optovar. As imagens obtidas foram digitalizadas em um computador e analisadas com auxílio de um *software*. O músculo cremaster foi utilizado como principal tecido para análise das interações da parede do leucócito devido à sua natureza fina e transparente.

Foram utilizados cinco camundongos Swiss inoculados com dose de 1,5 µg/animal de peçonha dissolvido em 30 µl de PBS estéril, pela via interplantar da pata trazeira do lado direito dos camundongos. Outros três camundongos foram inoculados com PBS pela mesma via de inoculação, sendo estes o grupo controle. Quatro horas após a inoculação os camundongos foram anestesiados com quetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) por via intraperitoneal e, o músculo cremaster foi exposto para exame microscópico “in situ”, como descrito por Baez (1973) e Lomonte et al. (1994). Os animais foram mantidos em uma placa especial termostaticada a 37°C. Em seguida sofreram manipulação cirúrgica na bolsa escrotal para exposição do músculo cremaster, que foi fixado ao redor de uma área transparente da

placa. Esta foi posicionada sobre o “charriot” do microscópio óptico para possibilitar visualização *in-vivo* da microcirculação local. As vênulas pós-capilares com diâmetro entre 30-40  $\mu\text{m}$  e entre 60-80  $\mu\text{m}$  foram escolhidas para avaliar, a cada 10 minutos, os seguintes parâmetros: velocidade de rolamento de leucócitos pelo vaso, leucócitos firmemente aderidos e número dos leucócitos que transmigraram.

A análise da interação leucócito-endotélio foi realizada em vênulas pós-capilares pelo fato de elas serem consideradas o melhor local para adesão do leucócito à parede vascular em resposta a um estímulo inflamatório (FORTES et al., 1991), facilitando a observação deste processo.

A velocidade dos leucócitos rolantes foi determinada como o tempo em que o leucócito leva para atravessar um comprimento de 100  $\mu\text{m}$  e foi expressa em micrômetros por segundo. O número de leucócitos aderidos na vênula foi quantificado em um comprimento de 100  $\mu\text{m}$ , fixado em um ponto. Foi considerado como um leucócito firmemente aderido ao endotélio da vênula aquele que permaneceu parado por, no mínimo, 30 segundos.

A transmigração de leucócitos foi expressa como o número de leucócitos por campo de visão que ultrapassa a vênula. O número de leucócitos rolantes foi quantificado pelo número de células que passaram e foi fixado em um ponto (25  $\mu\text{m}$ ) do monitor do televisor.

#### **4.5. Avaliação da miotoxicidade e dos danos renais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus ssp***

A fim de determinar a dose utilizada nos testes experimentais para avaliar a miotoxicidade e a nefrotoxicidade desencadeada pela peçonha de *Crotalus durissus ssp*, foi realizado, inicialmente, um protocolo piloto.

##### **4.5.1. Protocolo piloto**

- **Grupo controle:** Os animais (n = 6) foram conduzidos e mantidos em gaiolas metabólicas e inoculados com PBS em um volume de 0,05 ml via intramuscular. 24 horas após a inoculação, a urina foi coletada, os animais foram eutanasiados para a coleta de sangue e dos rins conforme o item 4.5.3.
- **Grupo peçonha:** Os animais (n = 24) foram conduzidos e mantidos em gaiolas metabólicas e inoculados com as doses de 1,5 $\mu\text{g}$ /animal, 3,0 $\mu\text{g}$ /animal e de

4,5µg/animal (correspondentes a 25%, 50% e 75% da DL<sub>50%</sub> via intramuscular, respectivamente). 24 horas após a inoculação, a urina foi coletada, os animais foram eutanasiados para a coleta de sangue e dos rins conforme o item 4.5.3.

As amostras de urina, sangue e rins coletados foram armazenados a -80°C para posterior dosagem dos biomarcadores e análise histológica do tecido renal, conforme métodos descritos a seguir.

Após a realização destes testes, a dose escolhida para ser utilizada nos experimentos seguintes, será a menor dose a desencadear danos renais.

#### **4.5.2. Desenho Experimental**

Para a avaliação da atividade miotóxica e das funções renais *in vivo*, a partir da análise do soro, urina e dos tecidos muscular e renal, os camundongos foram separados em dois grupos, a saber:

- **Grupo controle:** Os animais (n=24) que foram inoculados com PBS em um volume de 0,05mL via intramuscular (i.m).
- **Grupo peçonha:** Os animais (n=32) que foram inoculados com a dose de 1,5µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus* ssp em um volume de 0,05mL via intramuscular (i.m). Tal dose foi considerada a menor, dentre as testadas (item 4.5.1), a desencadear nefrotoxicidade.

#### **4.5.3. Coleta da urina, do sangue e dos rins**

A coleta da urina foi realizada em quatro etapas, classificadas de acordo com o período de tratamento estudado:

- **Etapa 01:** Foram utilizados 14 camundongos, seis do grupo controle e oito do grupo peçonha, os quais foram expostos à peçonha por 6 horas;
- **Etapa 02:** Foram utilizados 14 camundongos, seis do grupo controle e oito do grupo peçonha, os quais foram expostos à peçonha por 12 horas;

- **Etapa 03:** Foram utilizados 14 camundongos, seis do grupo controle e oito do grupo peçonha, os quais foram expostos à peçonha por 24 horas;
- **Etapa 04:** Foram utilizados 14 camundongos, seis do grupo controle e oito do grupo peçonha, os quais foram expostos à peçonha por 72 horas.

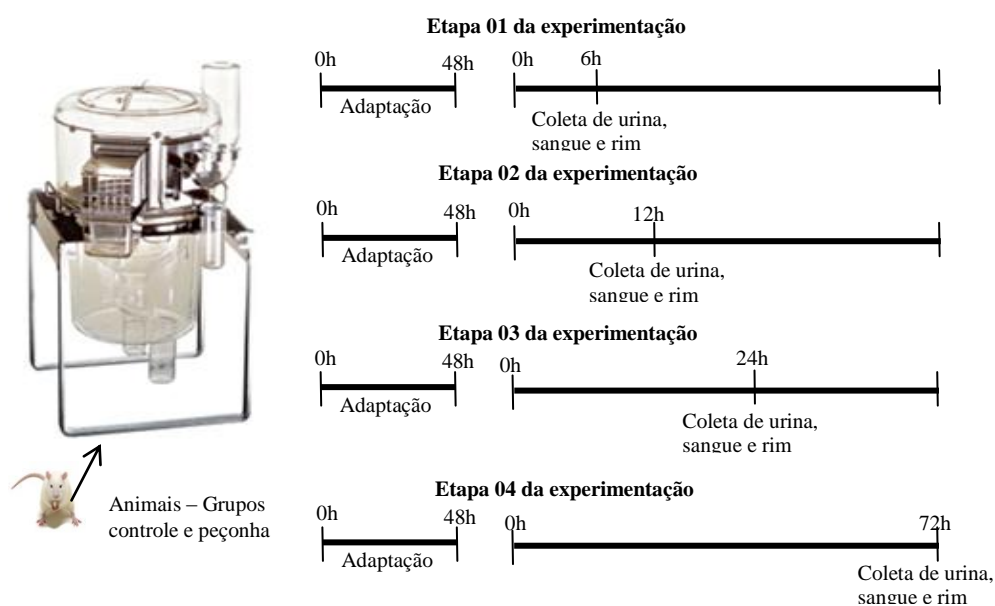
Todas as etapas destacadas acima foram realizadas seguindo o mesmo protocolo, respeitando o período de tempo de cada uma (Figura 6). 14 camundongos de cada etapa foram conduzidos e mantidos em gaiolas metabólicas. A priori, os animais passaram por um período de adaptação de 48 horas nas gaiolas metabólicas, recebendo água e ração. Ao término desse período, os animais do grupo controle foram inoculados com PBS e os do grupo peçonha foram inoculados com a dose de 1,5µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus ssp.*

Os camundongos expostos à peçonha por 24 e 72 horas foram mantidos em jejum alimentar, recebendo água *ad libitum*, 12 horas antes da coleta da urina e do sangue. Já os animais expostos à peçonha por 6 e 12 horas foram mantidos em jejum, recebendo água *ad libitum*, imediatamente após a inoculação da peçonha.

Ao fim de cada período de exposição à peçonha, a urina foi coletada em tubo de recuperação em gelo. Porém, no tempo de 72 horas a urina analisada foi das últimas 24 horas antes do término do período em análise. Após a coleta, a coloração foi analisada, o volume da urina foi mensurado e a mesma foi centrifugada por 12 minutos a 4.500 rpm, 4°C. Com auxílio de uma pipeta, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para eppendorfs e armazenado a -80°C para posterior realização dos testes bioquímicos. Além disso, durante todo o experimento foi realizada a mensuração do consumo de água e do peso corpóreo.

Todos os camundongos, após a coleta da urina, foram anestesiados com quetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), via intraperitoneal e, seguidamente a uma laparotomia, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 3.500 rpm, 4°C, para obtenção do soro. Com auxílio de uma pipeta, o soro obtido foi transferido cuidadosamente para eppendorfs e armazenado a -80°C para posterior realização dos testes bioquímicos. Posteriormente, os rins foram coletados. O rim direito foi armazenado em formol a 10% para os estudos histológicos e o esquerdo foi imediatamente armazenado a -80 ° C para posterior análise do perfil oxidativo e da biologia molecular.

**Figura 6** - Desenho experimental.



Fonte: Autor.

#### 4.5.4. Avaliação da miotoxicidade

Para investigar a atividade miotóxica foi feita a análise dos níveis de Creatina quinase (CK) em soro de animais inoculados com 1,5 $\mu$ g/animal da peçonha. A análise foi feita nos tempos de 6, 12, 24 e 72 horas utilizando o equipamento Cobas *c111* – Roche na Universidade Federal do Ceará.

Paralelamente, seis animais foram inoculados com PBS, grupo controle e, 12 animais foram inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ /animal via i.m. Em intervalos de 15 minutos, 30 minutos e 2 horas, os camundongos foram eutanasiados com sobredose de ketamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg) e, amostras da musculatura do gastrocnêmio foram coletadas para a análise histológica.

#### 4.5.5. Biomarcadores da Função Renal

Para avaliação dos parâmetros renais, foi analisada inicialmente a coloração da urina. Posteriormente, foram feitas análises dos níveis séricos e urinários de creatinina e séricos de uréia em equipamento Cobas *c111* – Roche na Universidade Federal do Ceará. Para a avaliação da fração tubular de excreção de eletrólitos, foi feita a mensuração dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, em urina e soro, por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil), através do método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Pak® (Roche, Brasil) para

preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos urinários. O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil).

Os cálculos das frações de excreção de eletrólitos utilizaram as seguintes fórmulas (TOLEDO et al., 2013 - adaptado):

$$\text{FENa (\%)} = [(\text{NaU}(\text{mmol/L})/\text{Na}^+(\text{mmol/L})) / (\text{CrU}(\text{mg/dL})/\text{SCr}(\text{mg/dL}))] \times 100$$

$$\text{FEK (\%)} = [(\text{KU}(\text{mmol/L})/\text{K}^+(\text{mmol/L})) / (\text{CrU}(\text{mg/dL})/\text{SCr}(\text{mg/dL}))] \times 100$$

KU = Potássio na urina, K = Potássio no soro, NaU = Sódio na urina, Na = Sódio no soro CrU = Creatinina na urina, CrS = Creatinina sérica.

#### 4.6. Análise histológica

Todas as amostras coletadas da região interplantar, do gastrocnêmio e dos rins foram armazenadas inicialmente em formol (10% tamponado) por no mínimo 48 horas, seguido de armazenamento em álcool até o exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafinização, cortados em uma espessura de 4µm e, em seguida, corados em solução de hematoxilina e eosina (HE). Os resultados foram registrados, após análise microscópica, através de fotomicrografias.

#### 4.7. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação indireta da migração de neutrófilos para o tecido renal de camundongos inoculados com a peçonha de *Cd-ssp* foi realizada com a verificação da atividade de Mieloperoxidase (MPO). Para tanto, as amostras do tecido renal coletadas nos tempos de 6, 12, 24 e 72h após a inoculação da peçonha foram pesadas (Balança digital SHIMADZU®, modelo AY220) e congeladas em freezer (Consul® biplex 480L) a 20° negativos e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamônio), na proporção de 50mg de tecido por mL. Posteriormente, foram homogeneizadas em macerador elétrico (IKA® T10 basic) antes de serem congeladas novamente.

O homogenato, então, foi centrifugado a 4500 rpm (INSTRUTHERM®) durante sete minutos a 4 °C. Do sobrenadante foi dosada a atividade da MPO por medição da alteração da absorvância a 450nm, utilizando o-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1% num espectrofotômetro para microplacas.

No ensaio, a medida que o peróxido era degradado, ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela produção de o-dianisidina em função do tempo de reação. Os resultados foram relatados em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de atividade de MPO foi definida como a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22 ° C. A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como UMPO/mg tecido (atividade de MPO).

#### **4.8. Análise do perfil oxidativo**

Para verificar o dano oxidativo direto no tecido renal, o grau de lipoperoxidação nos tecidos foi mensurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Ohkawa e colaboradores (1979). Para tanto, foi feito um homogenato dos tecidos a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Coletou-se 250  $\mu\text{L}$  do homogenato e, em seguida, foi adicionado 1,5ml de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 1% + 500  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Estes foram para banho-maria (95-100°C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em água corrente e, a seguir, foi adicionada 2ml de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por 1min e centrifugado a 1200rpm/15 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante para realização da leitura em espectrofotômetro (520-535 nm). Os resultados de MDA foram expressos em nmol/mg de tecido.

#### **4.9. Avaliação da expressão relativa dos genes KIM-1, CXCL-1, IL-18 E IL-1 $\beta$ na transcrição de mRNA renal**

##### **4.9.1. Extração do RNA total**

A extração de RNA foi realizada com o kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (LIFE, technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente 30mg de tecido renal foi inicialmente homogeneizado em tampão de lise (0,6 mL), provido pelo kit, acrescido 2- $\beta$ -mercaptoetanol numa concentração final de 1%. A lise foi realizada no equipamento TissueLyser LT (Qiagen) por 4 minutos à oscilação máxima permitida pelo equipamento. O material lisado foi centrifugado a 12.000 g por dois minutos. O sobrenadante obtido foi acrescido de 0,6 mL de etanol 70% e, então, o volume total foi aplicado à coluna de filtração fornecida pelo kit. A filtração do material lisado foi feita por centrifugação a 12.000 g por 15



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

#### **4.9.2. Síntese de cDNA**

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

#### **4.9.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)**

Analizamos a transcrição do mRNA dos genes relacionados ao dano da lesão renal e aos processos pró-inflamatórios celulares, pela transcrição de KIM-1, IL-18 e IL-1β e CxCL-1 realizadas com o aparelho CFX96 Touch qPCR System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). Na tabela 2 encontram-se as sequências dos iniciadores específicos para cada um dos genes avaliados. O gene de referência utilizado foi o GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Para as reações de qPCR utilizamos 10µL da SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1µL de cDNA das amostras completando com água livre de nucleases para um volume final de 20µL. Todas as amplificações foram iniciadas com a temperatura de 50°C por 2 minutos, seguido da temperatura de 95°C por mais dois minutos e 45 ciclos nas temperaturas de 95°C por 15

segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto. Todas as reações foram finalizadas com a curva de fusão realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico onde a temperatura foi acrescida em 0.5°C a cada 5 segundos iniciando em 60°C até atingir a temperatura de 95°C.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , em que  $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$  como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

**Tabela 2** – Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Primer senso</b>	<b>Primer antisenso</b>
<b>KIM-1</b>	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCCACTCTCCAGCTGCA
<b>CxCL-1</b>	GCTGGGATTCACCTCAAGAA	TGGGGACACCTTTTAGCATC
<b>IL-18</b>	GACAACCTTTGGCCGACTTCA	CTGGGGTTCCTGGCACTTT
<b>GAPDH</b>	AGCCTCGTCCCGTAGACAAA	TGAATTTGCCGTGAGTGGAG

Fonte: Autor.

#### 4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPadPrism®, versão 5.0. Primeiramente, foi realizada a análise da curva de normalidade e homogeneidade de variância dos dados pelo teste Kolmogorov - Smirnov. Para os estudos *in-vivo* foi realizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Os dados de qPCR foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) em cada grupo, considerando uma significância de  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Reação edematogênica e quantificação leucocitária

A figura 7 demonstra que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp induziu edema na região interplantar superior a 50% nos tempos de 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a inoculação e, depois de 120 minutos foi observado um edema superior a 30% na espessura da pata, regredindo totalmente após 720 minutos, quando comparado com a espessura da pata controle. Além disso, a peçonha induziu recrutamento leucocitário duas vezes maior no tempo de 30 minutos após a inoculação, quando comparado com o grupo controle (Figura 8).

### 5.2. Quantificação de citocinas

A figura 9 (A e B) demonstra que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp induziu a produção significativa de IL-1 $\beta$  e de IL-6 com 30 minutos após a inoculação. Após 24 horas, não houve detecção de IL-6 na suspensão celular (Figura 9B).

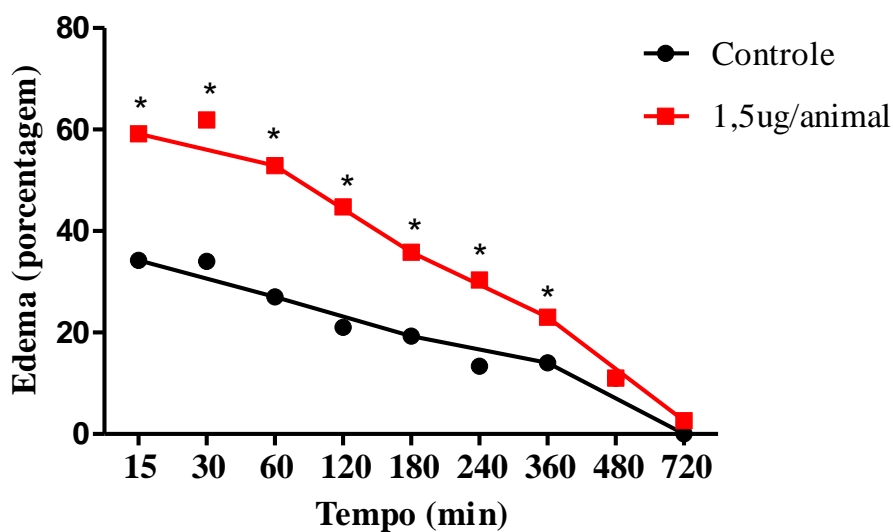
### 5.3. Avaliação dos processos de rolamento, adesão e transmigração leucocitária.

A Figura 10A demonstra que a peçonha provocou um aumento do rolamento de leucócitos nas vênulas a partir de 10 minutos com o pico máximo em aproximadamente 30 minutos. A partir dos 40 minutos observa-se uma diminuição do rolamento dos leucócitos quando comparado ao grupo controle. A Figura 10B demonstra que aos 10 minutos começa a haver um declínio da velocidade dos leucócitos quando comparado ao controle. Após 40 minutos, este declínio chega ao limite de velocidade mínima, tanto em vênulas de grande e de pequeno calibre.

A Figura 11 demonstra que a aderência de leucócitos à parede endotelial começa a aumentar aos 10 minutos após a observação. O pico máximo de aderência ocorre aos 40 minutos e aos 50 minutos observa-se uma diminuição da aderência de leucócitos nas paredes das vênulas. Na Figura 12 é possível verificar a aderência dos leucócitos nas paredes das vênulas com grande nitidez.

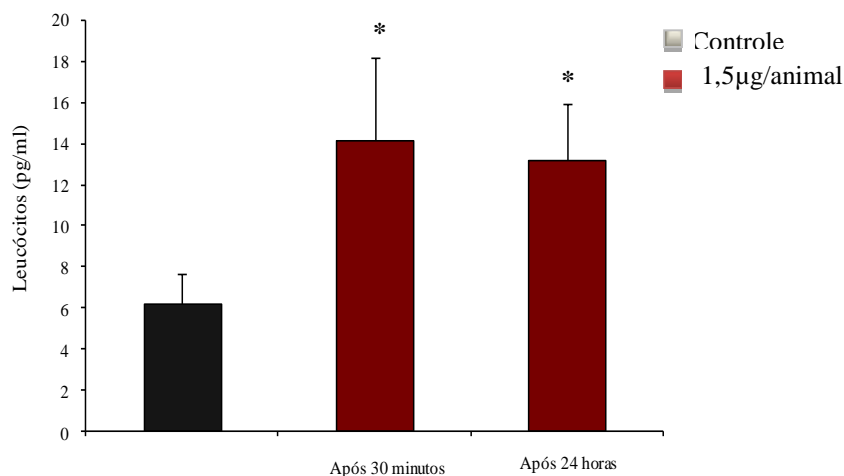
A transmigração leucocitária (Figura 13) foi observada aos 30 minutos após o início da observação, chegando ao seu pico máximo aos 50 minutos. Foi possível observar a transmigração dos leucócitos nas paredes das vênulas com grande nitidez (Figura 14).

**Figura 7** - Atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp.



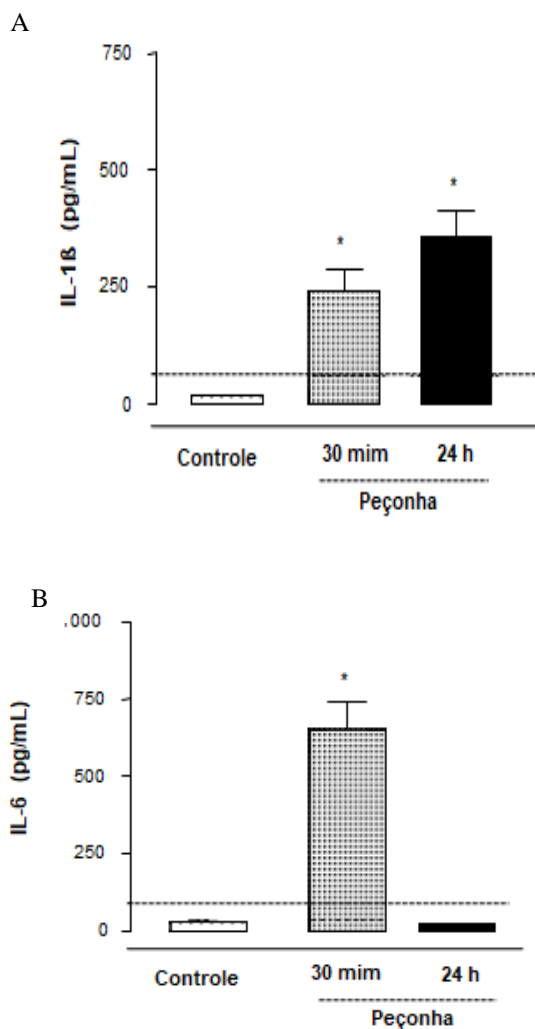
Os resultados foram expressos pela diferença entre a espessura da pata dos camundongos dos grupos experimental e controle. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP (n=9/grupo).

**Figura 8** - Indução de recrutamento de leucócitos pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp. Camundongos inoculados com 1,5  $\mu$ g/animal da peçonha na região interplantar com a. Animais do grupo controle foram injetados apenas com PBS.



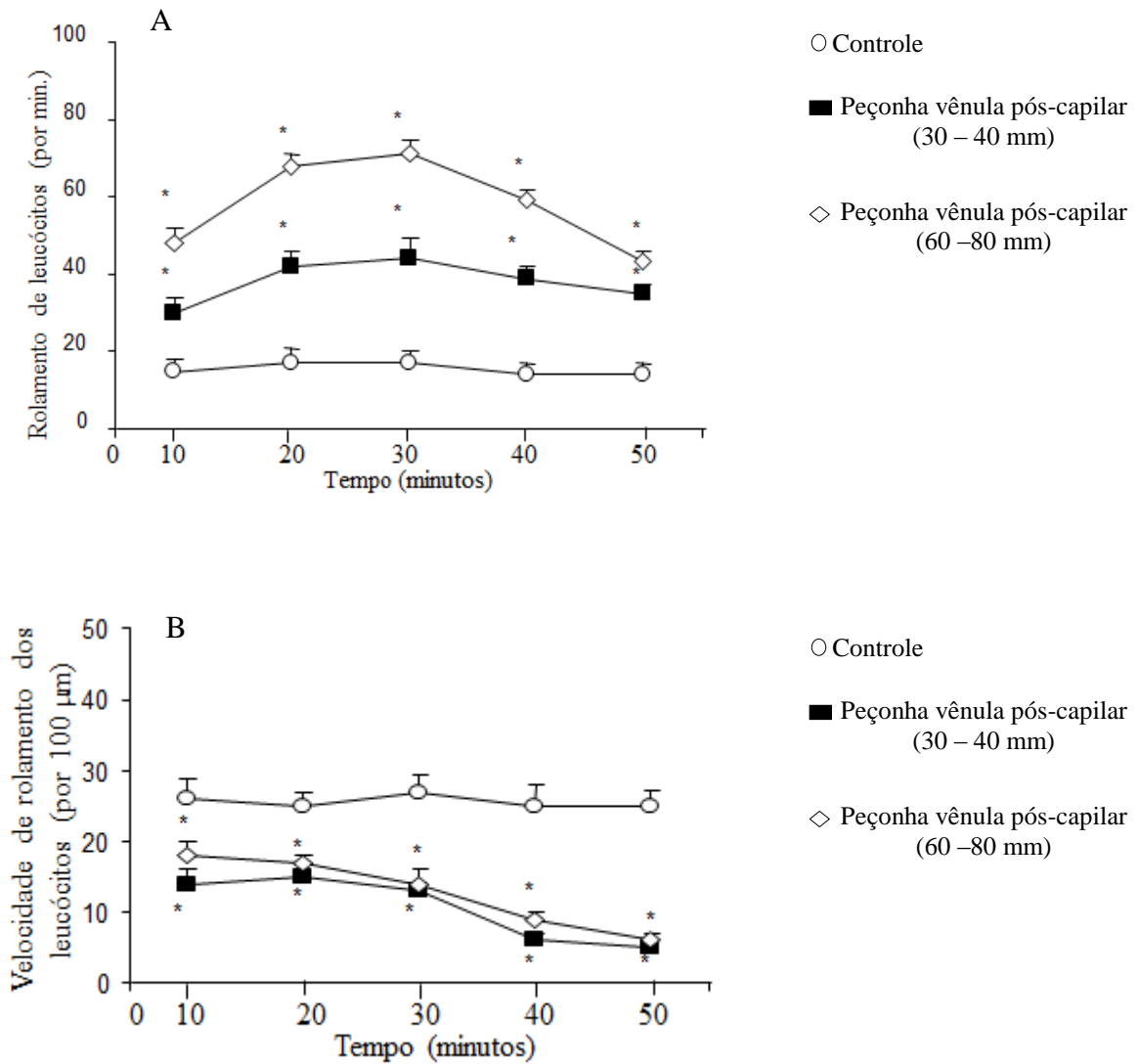
Cada barra representa os resultados pela média  $\pm$ DP (n=8). \*p < 0,05 em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

**Figura 9** - Indução da produção de citocinas pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp. Camundongos foram injetados na região interplantar com a peçonha (1,5 µg/animal) diluída em 50 µL de PBS estéril. Animais do grupo controle foram injetados apenas com PBS.



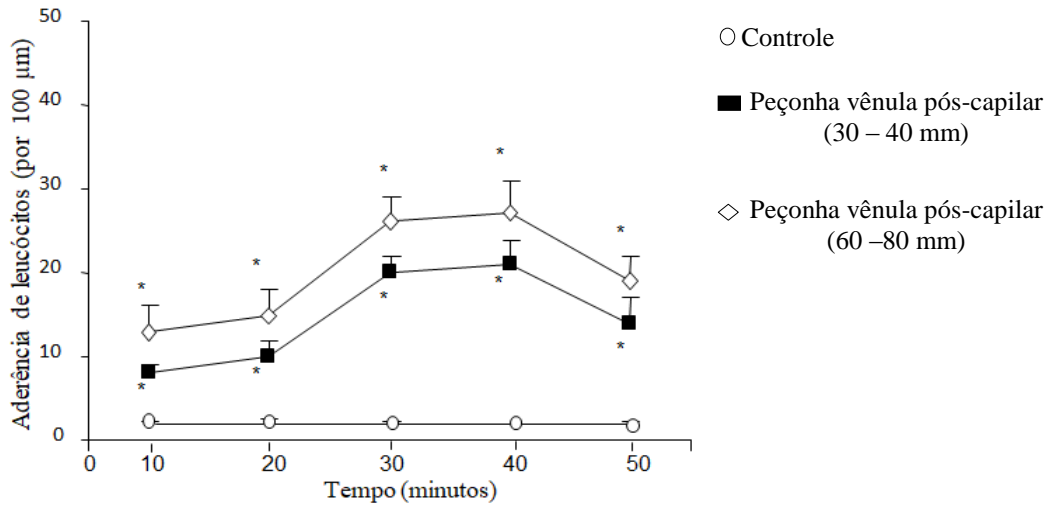
A linha pontilhada representa o limite inferior de detecção do método (para IL-1  $\beta$  – 31,25pg/mL e para IL-6 – 31,25pg/mL). Os resultados foram reportados pela média  $\pm$ DP (n=8). A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle. #p < 0,05 em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Figura 10** - Avaliação do rolamento e da velocidade de roleamento dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.



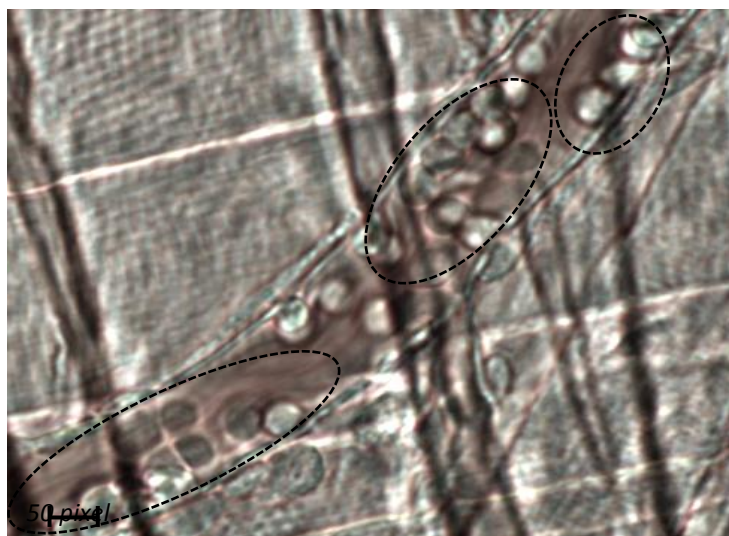
Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=5/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS).

**Figura 11** - Avaliação da aderência dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.



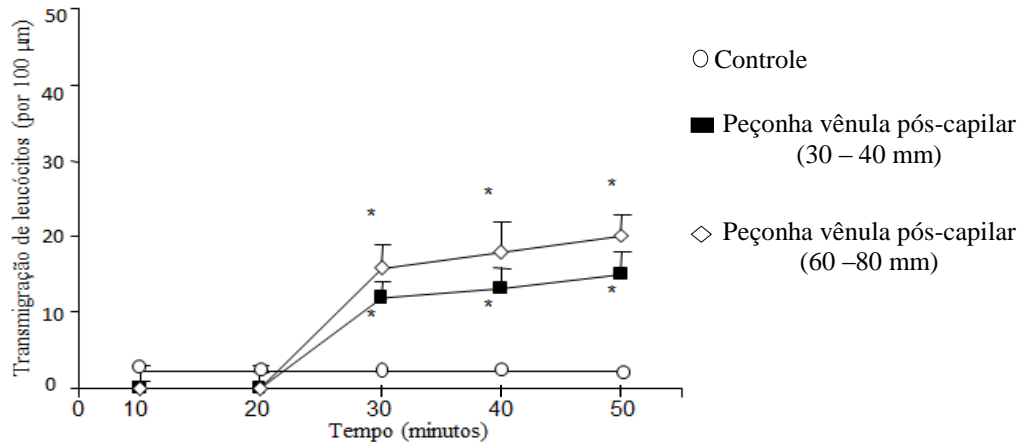
Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=5/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*p<0,05 quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS).

**Figura 12** - Foto da aderência dos leucócitos ao endotélio dos vasos da microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.



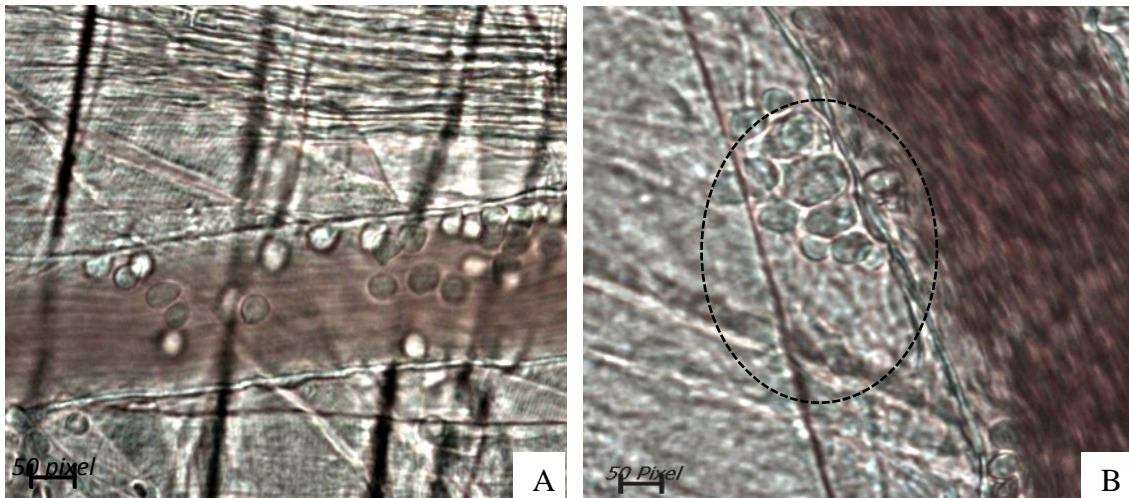


**Figura 13** - Avaliação da transmigração dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus ssp.*



Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=5/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS).

**Figura 14** - Fotos da transmigração dos leucócitos na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus ssp.*



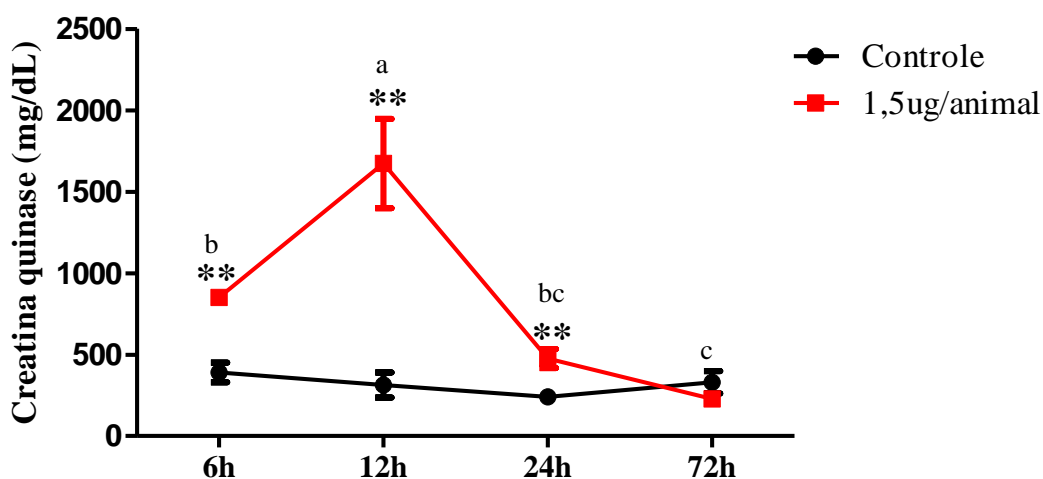
## 5.4 Avaliação da miotoxicidade e dos danos renais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus ssp*

Depois da análise dos resultados obtidos do protocolo piloto (dados não mostrados), a dose escolhida para a avaliação da cinética dos danos miotóxicos e renais desencadeados pela peçonha de *Crotalus durissus ssp* foi a de 1,5µg/animal. Esta dose correspondeu a menor dose a causar miotoxicidade e nefrotoxicidade em 24 horas após a inoculação desta peçonha.

### 5.4.1. Atividade miotóxica

Houve aumento significativo dos níveis séricos de creatina quinase (CK) dos animais inoculados com 1,5 µg/animal da peçonha de *Cd*-ssp nos tempos de 6, 12 e 24 horas, com maior pico em 12 horas, retornando aos níveis de normalidade após 72 horas da inoculação, quando comparado aos controles (Figura 15).

**Figura 15** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus ssp*. sobre os níveis séricos de Creatina quinase (CK) de camundongos *Swiss*.



Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>abc</sup> $p < 0,05$  em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

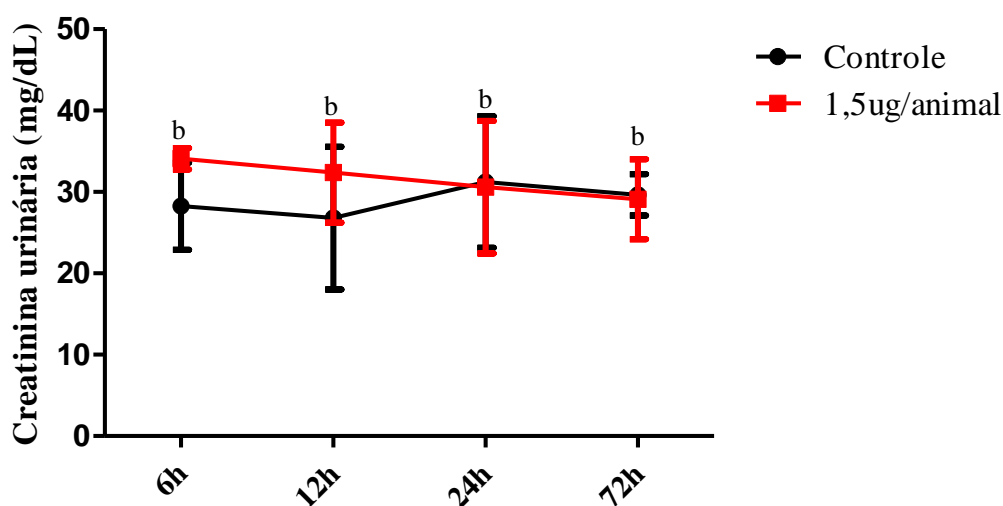
### 5.4.2. Avaliação dos parâmetros da função renal

As urinas coletadas dos animais do grupo peçonha apresentaram uma coloração amarelo-citrino, assim como as urinas dos animais do grupo controle. Não foi notada, em nenhuma amostra urinária, coloração acastanhada ou avermelhada.

A dose de 1,5µg/animal da peçonha de *Cd*-ssp não provocou alterações da creatinina urinária quando comparado ao controle e nem entre os tempos de tratamento com a peçonha (Figura 16). Houve um acúmulo de creatinina sérica nos tempos de 24 e 72 horas quando comparado aos controles. Os tempos de 6, 12 e 72 horas não diferiram entre si, não havendo também diferença significativa entre os tempos de 24 e 72 horas (Figura 17). Em relação aos níveis séricos de ureia, a dose desta peçonha não desencadeou diferenças significativas entre os grupos experimentais e nem quando comparados aos grupos controles (Figura 18).

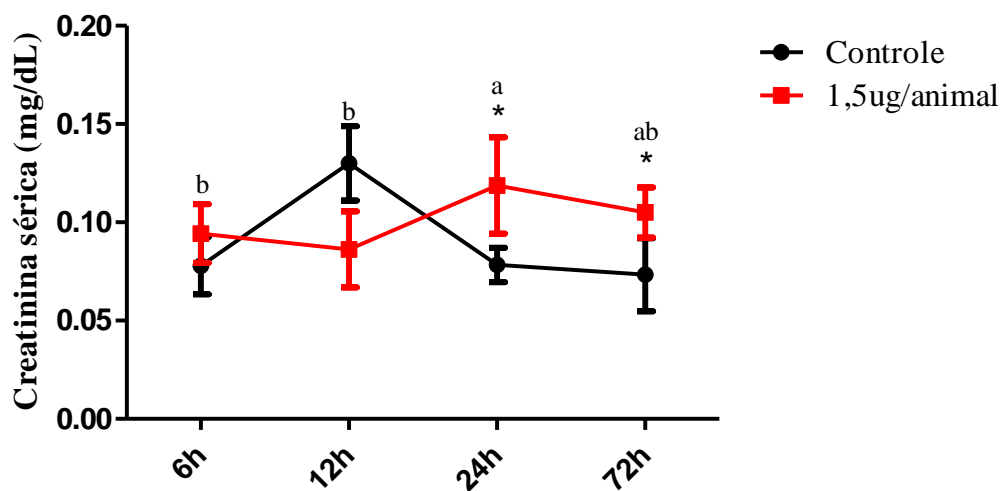
A fração de excreção de sódio (%FENa) foi maior no grupo de 24 horas quando comparada ao controle e aos grupos de 6 e 12 horas. Os grupos de 12 e 72 horas também diferiram dos controles, não havendo diferenças entre os demais grupos (Tabela 03A). A fração de excreção de potássio (%FEK) do grupo de 72 horas apresentou um aumento significativo em relação ao controle, assim como o grupo de 24 horas em relação aos grupos de 6, 12 e 72 horas (Tabela 03B).

**Figura 16** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. sobre os níveis urinários de creatinina de camundongos *Swiss*.



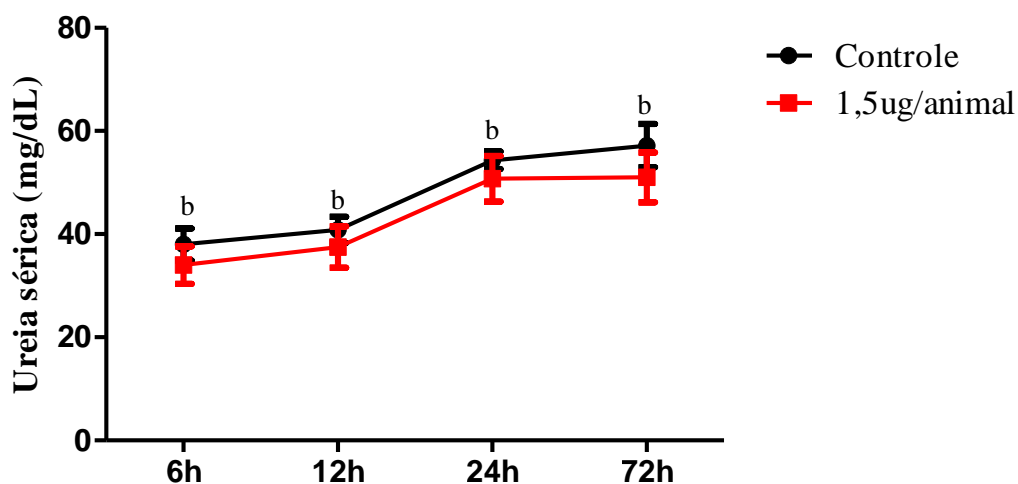
Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \* p<0,05 quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>b</sup>p < 0,05 em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Figura 17** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. sobre os níveis séricos de creatinina de camundongos Swiss.



Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>ab</sup> $p < 0,05$  em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Figura 18** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. sobre os níveis séricos de ureia de camundongos Swiss.



Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Tabela 3** - Dados da fração de excreção de sódio (%FENa<sup>+</sup>) e potássio (%FEK<sup>+</sup>) de camundongos do grupo controle (CT6, CT12, CT24, CT72), inoculados com PBS, e do grupo peçonha (P6h, P12h, P24h e P72h), inoculados com 1,5 µg/animal da peçonha de *Cd*-ssp.

Variáveis analisada	Grupos	Média ± DP	Teste t p valor	ANOVA Teste Bonferroni's			
				Comparações	IC		
<b>FE Na<sup>+</sup></b> (%)	CT6	0.2130 ± 0.0726	0,3464	6h x 12h	ns	-0.222 a 0.431	
	P6h	0.1249 ± 0.0534		6h x 24h	*	-0.734 a -0.049	
	CT12	0.2021 ± 0.0216	P<0.0001	6h x 72h	ns	-0.426 a 0.184	
	P12h	0.0203 ± 0.0051***		12h x 24h	**	-0.839 a -0.154	
	CT24	0.0776 ± 0.0101	0,0246	12h x 72h	ns	-0.531 a 0.079	
	P24h	0.5173 ± 0.1803*		24h x 72h	ns	-0.051 a 0.593	
	CT72	0.0848 ± 0.0123	0,0411				
	P72h	0.2459 ± 0.0315*					
	<b>A</b>						
	<b>FE K<sup>+</sup></b> (%)	CT6	38.03 ± 12.43	0,5915	6h x 12h	ns	-312.0 a 329.5
P6h		56.04 ± 24.55	6h x 24h		*	-747.8 a -49.58	
CT12		19.98 ± 5.893	0,1522	6h x 72h	ns	-339.2 a 302.4	
P12h		47.27 ± 12.49		12h x 24h	*	-745.1 a -69.87	
CT24		28.93 ± 7.286	0,0657	12h x 72h	ns	-335.4 a 281.0	
P24h		454.8 ± 199.7		24h x 72h	*	42.71 a 717.9	
CT72		46.34 ± 2.076	0,0399				
P72h		74.43 ± 5.660*					
<b>B</b>							

h= horas; ns = não significativo (P>0,05), \*P< 0,05, \*\*P< 0,01 e, \*\*\*P< 0,001. IC = intervalo de confiança para as diferenças das médias (95%).

### 5.5. Avaliação histológica dos órgãos

Houve acentuada dissociação de fibras de colágeno e edema intersticial difuso acentuado com acúmulo focal de leucócitos de permeio após 15 minutos da inoculação da dose de 1,5µg da peçonha de *Cd*-ssp na região interplantar da pata traseira esquerda dos camundongos (Figura 19B). Após 30 minutos, observa-se edema acentuado e a presença de leucócitos perivasculares (Figura 19C). Após duas horas da inoculação, verifica-se edema

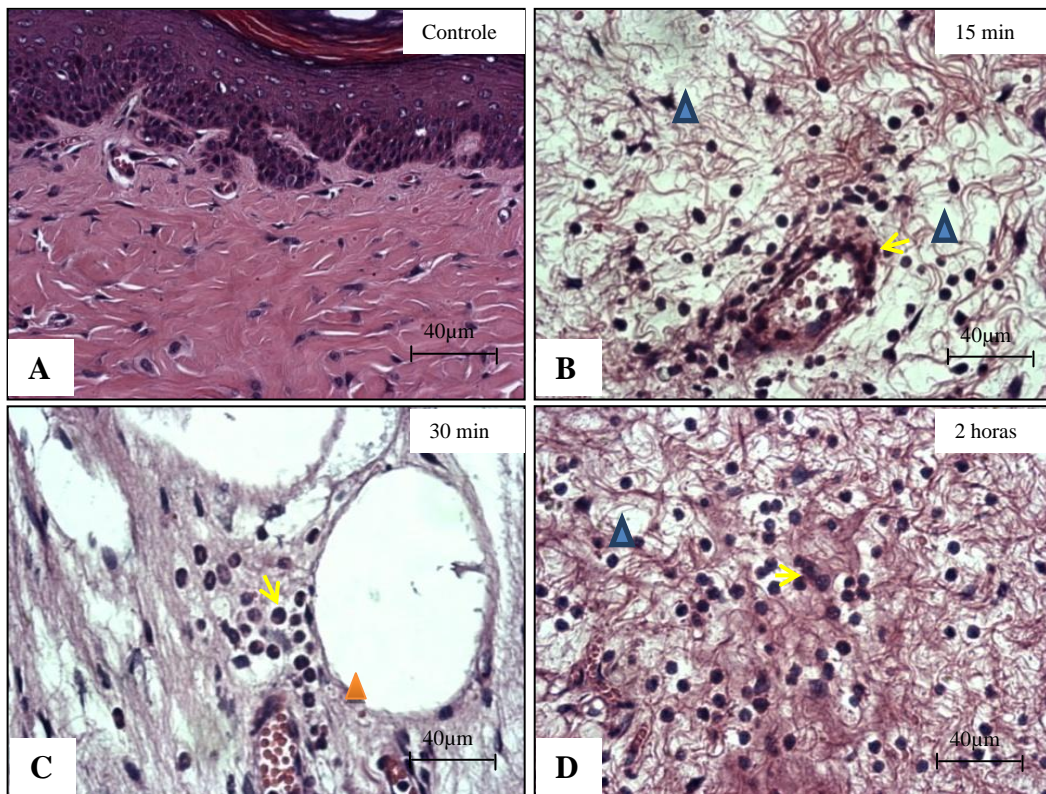
intersticial com leucócitos difusamente distribuídos e infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 19D). Não foi visualizada nenhuma alteração na região interplantar dos camundongos controles (Figura 19A).

Após 15 minutos da inoculação, a peçonha de *Cd-ssp* não provocou alterações nas fibras musculares do coxim plantar e nem do gastrocnêmio (Figura 20C e D, respectivamente). Após 30 minutos da inoculação, houve edema intersticial, vacuolização incipiente e necrose nas fibras musculares do coxim plantar (Figura 20E), e intenso infiltrado inflamatório, mas com integridade de fibras musculares do gastrocnêmio (Figura 20F). Com duas horas, observa-se infiltrado inflamatório e necrose em fibras musculares do coxim plantar (Figura 20H), e foi detectada a presença de uma proeminente desorganização miofibrilar na musculatura do gastrocnêmio, caracterizada por necrose focal (Figura 20G). As fibras necróticas do gastrocnêmio apresentaram coloração mais clara e um aspecto homogêneo em relação às fibras não alteradas (Figura 20G). Os grupos controles permaneceram sem alteração (Figura 20A e B).

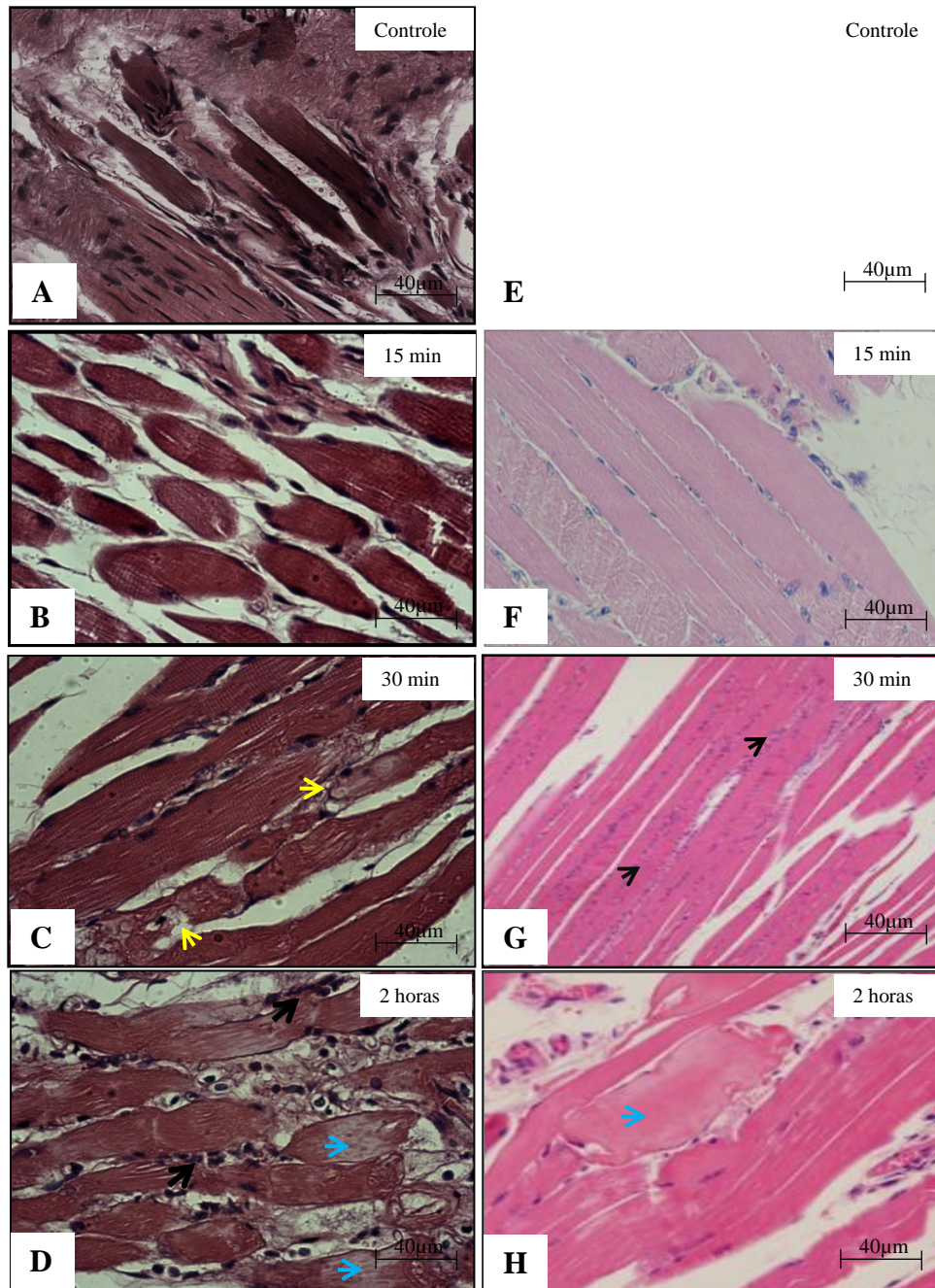
Os rins dos camundongos do grupo controle, inoculados com PBS, evidenciaram estruturas glomerulares preservadas, assim como a arquitetura cortical e medular. Não foi visualizado dilatação, degeneração e necrose tubular (Figura 21E).

Nos animais inoculados com 1,5µg/animal da peçonha de *Cd-ssp.*, os rins apresentaram estruturas glomerulares preservadas, bem como a arquitetura cortical e medular em todos os tempos de tratamento. Entretanto, observou-se, na maioria dos casos dos animais do grupo seis horas, leve tumefação do epitélio tubular, não sendo visualizada degeneração e nem necrose tubular (Figura 21A). Os rins dos camundongos do grupo 12, 24 e 72 horas apresentaram tumefação do epitélio tubular, vacuolização marcante do epitélio tubular com áreas de degeneração celular, além de túbulos exibindo acúmulo luminal de material eosinofílico amorfo de aspecto proteináceo (Figuras 21B, C e D, respectivamente).

**Figura 19** - Fotomicrografias da morfologia da região interplantar dos camundongos inoculados com a dose de 1,5 $\mu$ g de peçonha de *Crotalus durissus* ssp (Grupo peçonha) e com PBS estéril (Grupo controle). Edema com dissociação de fibras de colágenos dérmicas (triângulo), leucócitos perivascularares (seta amarela), edema intersticial difuso acentuado com acúmulo focal de leucócitos de permeio (triângulo laranja). Coloração HE.

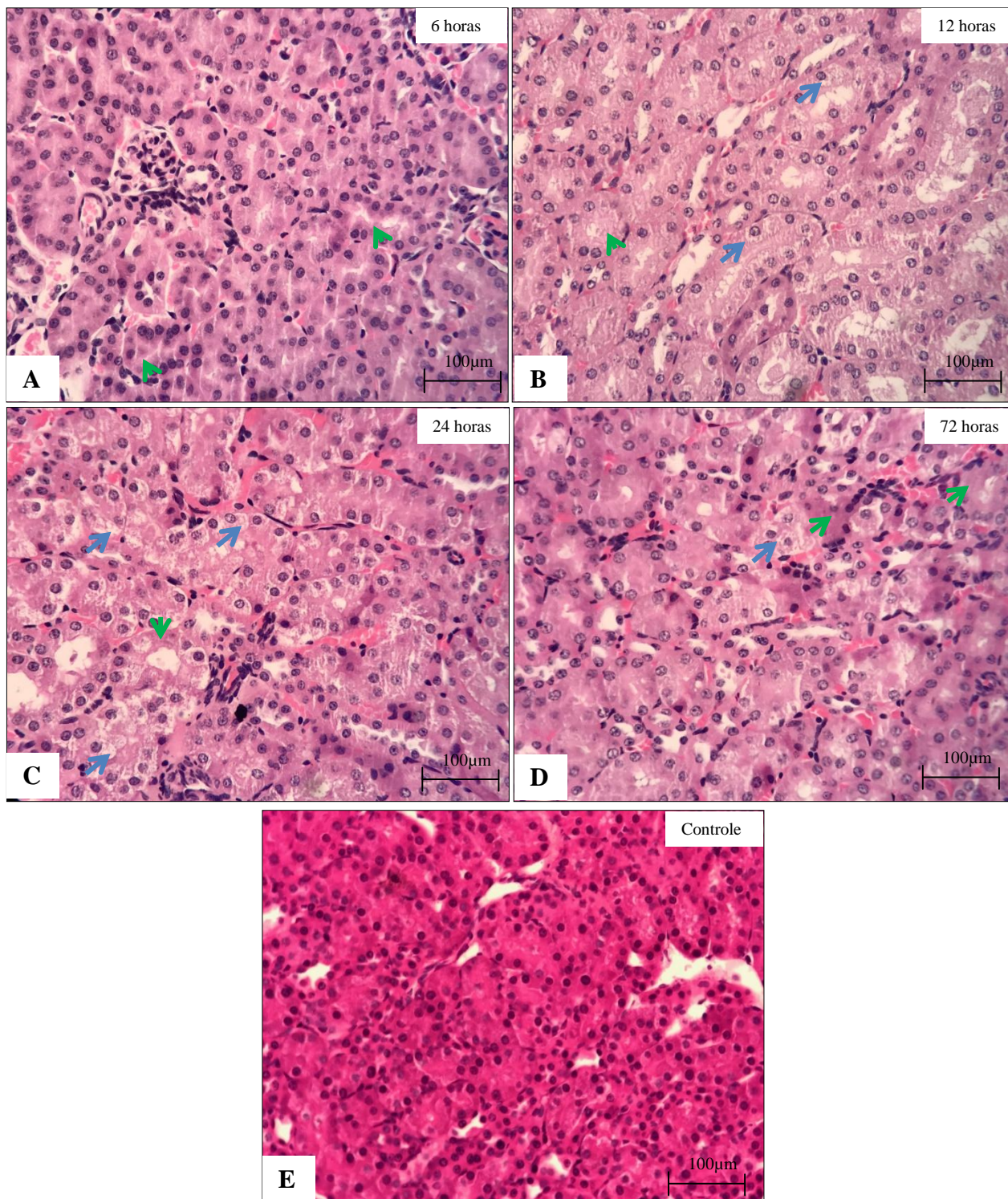


**Figura 20** - Fotomicrografias da morfologia da musculatura do coxim plantar (A-D) e do gastrocnêmio (E-H) dos camundongos inoculados com PBS (grupo controle) e com a dose de 1,5 $\mu$ g da peçonha de *Crotalus durissus* ssp (grupo peçonha). Vacuolização (seta amarela); necrose (seta azul); infiltrado inflamatório (seta preta). Coloração HE.





**Figura 21** - Fotomicrografias dos rins dos camundongos inoculados com 1,5µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus* ssp (grupo peçonha. A-D) e com PBS (grupo controle. E). Tumefação celular do epitélio tubular (seta verde), vacuolização marcante do epitélio tubular com áreas de degeneração celular (seta azul). Coloração HE.



## **5.6. Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)**

A peçonha de *Cd-ssp* induziu um aumento significativo na atividade de MPO em tecido renal de camundongos 12 horas após a inoculação quando comparado ao controle, entretanto os valores de MPO nos tempos de 6, 24 e 72 horas permaneceram inalterados, não havendo diferenças estatísticas entre eles e quando comparado aos grupos controles (Figura 22).

## **5.7. Análise do perfil oxidativo**

Os valores de MDA no tecido renal dos animais inoculados com a peçonha de *Cd-ssp* nos tempos de 6, 12 e 24 horas permaneceram inalterados, não havendo diferenças estatísticas entre eles e quando comparado aos grupos controles. Entretanto, a peçonha desencadeou um aumento significativo dos níveis de MDA no tempo de 72 horas quando comparado ao grupo controle (Figura 23).

## **5.8. Avaliação da transcrição gênica da KIM-1 renal de camundongos após inoculação da peçonha de *Crotalus durissus ssp.***

Conforme representado na figura 24, a peçonha de *Crotalus durissus ssp* aumentou a expressão gênica de KIM-1 12 horas após a inoculação ( $2,0 \pm 0,30$ ) e causou uma redução no tempo de 24 horas ( $0,51 \pm 0,13$ ) em relação aos grupos controles ( $0,94 \pm 0,20$ ;  $1,1 \pm 0,20$ , respectivamente), ( $p= 0,0242$  e  $p= 0,0260$ , respectivamente). Entretanto, a peçonha não foi capaz de desencadear alterações significativas nos tempos de 6 ( $1,1 \pm 0,25$ ) e 72 horas ( $1,0 \pm 0,24$ ) em relação aos controles ( $1,1 \pm 0,20$ ;  $1,1 \pm 0,25$ , respectivamente), ( $p= 0,1645$  e  $p= 0,6389$ , respectivamente).

## **5.9. Avaliação da transcrição gênica da IL-1 $\beta$ renal de camundongos após inoculação da peçonha de *Crotalus durissus ssp.***

A peçonha de *Crotalus durissus ssp* desencadeou um aumento significativo da expressão gênica de IL-1 $\beta$  em 12 horas ( $2,4 \pm 0,26$ ) e 24 horas ( $2,5 \pm 0,18$ ) após a inoculação quando comparado aos controles ( $1,1 \pm 0,21$ ;  $1,1 \pm 0,31$ ), respectivamente), ( $p= 0,0162$  e  $p= 0,0286$ , respectivamente), não havendo diferenças significativas entre os tempos de 6 ( $1,9 \pm$

0,23) e 72 horas ( $0,7 \pm 0,14$ ) em relação aos controles ( $0,96 \pm 0,35$ ;  $1,0 \pm 0,11$ , respectivamente), ( $p= 0,1645$  e  $p= 0,2284$ , respectivamente) (Figura 25).

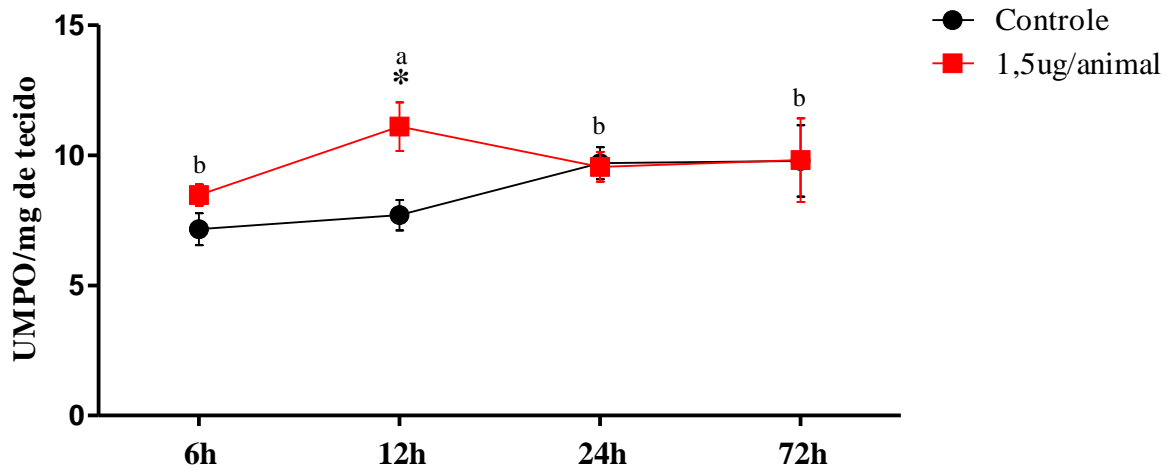
#### **5.10. Avaliação da transcrição gênica da CxCL-1 renal de camundongos após inoculação da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.**

A figura 26 demonstra que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp desencadeou um aumento significativo da expressão gênica de CxCL-1 apenas 12 horas após a inoculação ( $1,8 \pm 0,26$ ) quando comparado ao grupo controle ( $1,1 \pm 0,19$ ) ( $p= 0,0381$ ), não havendo diferenças significativas entre os tempos de 6 ( $1,1 \pm 0,26$ ), 24 ( $1,7 \pm 0,92$ ), e 72 horas ( $1,1 \pm 0,17$ ) em relação aos controles ( $1,1 \pm 0,27$ ;  $1,1 \pm 0,35$  e  $1,2 \pm 0,28$ , respectivamente), ( $p= 1,0000$ ;  $p= 0,8857$  e  $p= 0,8857$ , respectivamente).

#### **5.11. Avaliação da transcrição gênica da IL-18 renal de camundongos após inoculação da peçonha de *Crotalus durissus* ssp.**

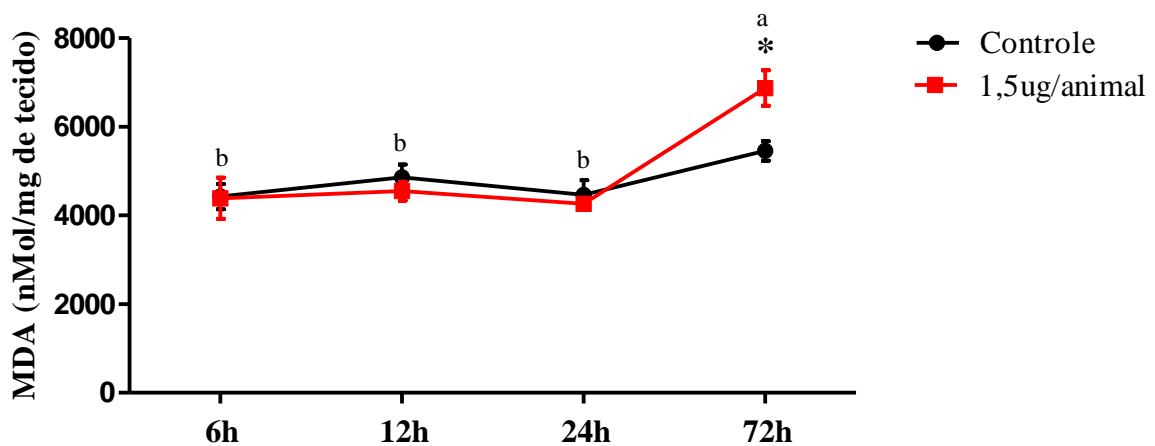
De acordo com a Figura 27, a peçonha de *Crotalus durissus* ssp não alterou a expressão gênica da IL-18 em nenhum tempo estudado quando comparados com seus respectivos controles. Controle 6 horas e grupo peçonha 6 horas ( $1,1 \pm 0,26$ ;  $1,0 \pm 0,15$ ;  $p= 0,9143$ ); Controle 12 horas e grupo peçonha 12 horas ( $0,97 \pm 0,09$ ;  $0,89 \pm 0,14$ ;  $p= 0,7551$ ); Controle 24 horas e grupo peçonha 24 horas ( $1,2 \pm 0,29$ ;  $1,5 \pm 0,20$ ;  $p= 0,2722$ ); Controle 72 horas e grupo peçonha 72 horas ( $1,1 \pm 0,16$ ;  $1,5 \pm 0,32$ ;  $p= 0,5273$ ).

**Figura 22** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na atividade mieloperoxidase (MPO) em tecido renal de camundongos Swiss.



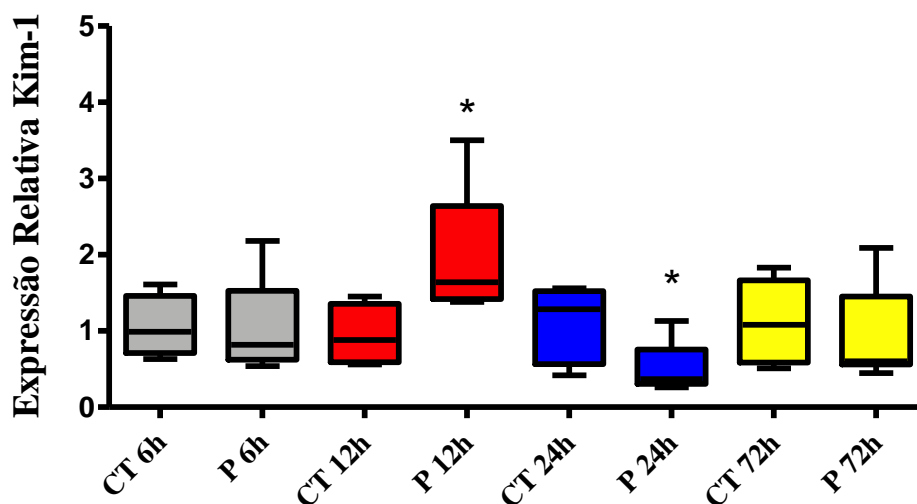
Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>ab</sup> $p < 0,05$  em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Figura 23** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na peroxidação lipídica (MDA) do tecido renal de camundongos Swiss.



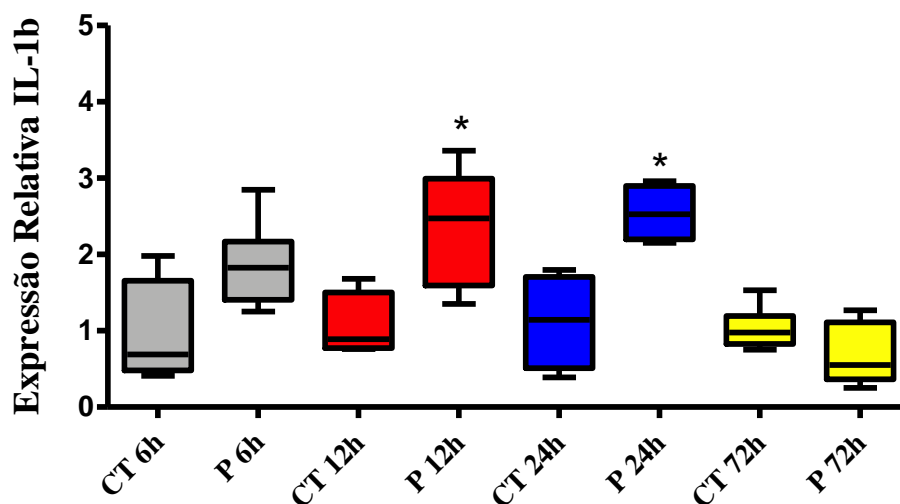
Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). A análise foi realizada por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (inoculados com PBS) e <sup>ab</sup> $p < 0,05$  em relação aos tempos de tratamento com a peçonha.

**Figura 24** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na transcrição gênica de KIM-1 do tecido renal de camundongos *Swiss*.



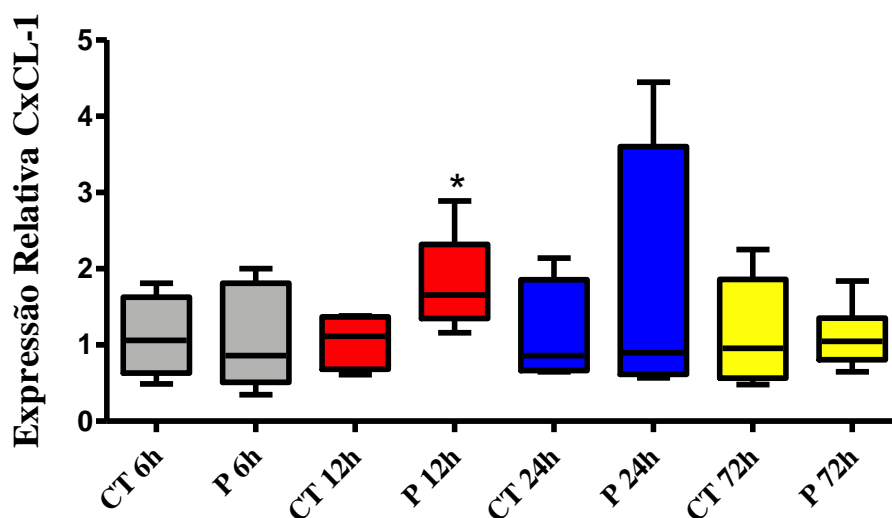
Os resultados foram expressos pelas medianas (min-máx) (n=6-8/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo controle (inoculados com PBS). A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney. CT (controle); P (peçonha); h (horas).

**Figura 25** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na transcrição gênica de IL-1 $\beta$  do tecido renal de camundongos *Swiss*.



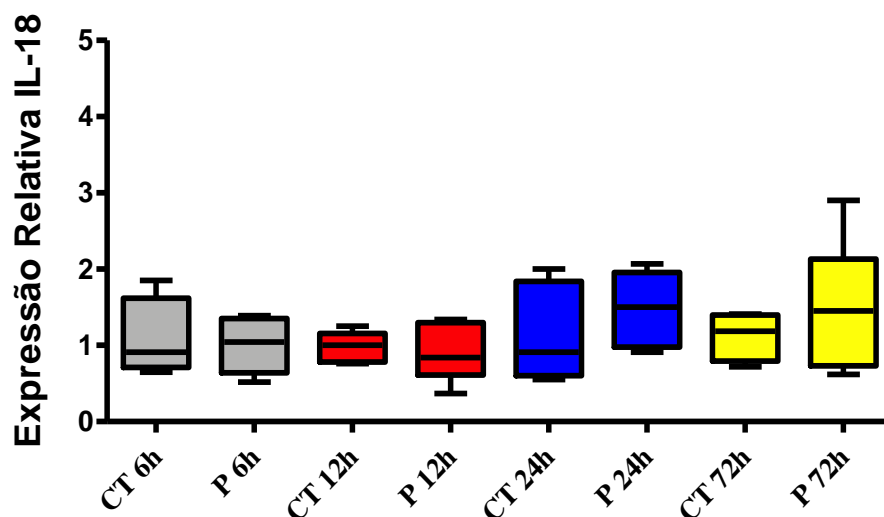
Os resultados foram expressos pelas medianas (min-máx) (n=6-8/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo controle (inoculados com PBS). A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney. CT (controle); P (peçonha); h (horas).

**Figura 26** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na transcrição gênica de CxCL-1 do tecido renal de camundongos *Swiss*.



Os resultados foram expressos pelas medianas (min-máx) (n=6-8/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo controle (inoculados com PBS). A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney. CT (controle); P (peçonha); h (horas).

**Figura 27** - Efeito da peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp. na transcrição gênica de IL-18 do tecido renal de camundongos *Swiss*.



Os resultados foram expressos pelas medianas (min-máx) (n=6-8/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo controle (inoculados com PBS). A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney. CT (controle); P (peçonha); h (horas).

**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A dose de 1,5 µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus* ssp. do Estado da Bahia induziu processo inflamatório local observado pela presença de leucócitos no local da inoculação e pela formação de um edema acentuado, resultados análogos às publicações prévias usando modelos de indução de edema em pata por *Crotalus durissus* que habitam o Brasil (CARVALHO, 2014; SANTORO et al., 1999; DOS SANTOS et al., 1993; SANCHEZ et al, 1992 ). Foi verificado, também, o desencadeamento de danos renais indicados pelas alterações dos níveis séricos de creatinina e das frações de excreção de sódio ( $\text{FeNa}^+$ ) e de potássio ( $\text{FeK}^+$ ), bem como pelos processos inflamatórios e oxidativos no tecido renal. Além disso, a peçonha da *Crotalus durissus* ssp. induziu um aumento acentuado na expressão do KIM-1, biomarcador precoce para lesão de células tubulares renais, efeito consistente com as alterações renais funcionais causadas pela peçonha desta serpente.

As respostas inflamatórias agudas com indução de edema, infiltração de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios é um processo característico dos empeçonhamentos por algumas serpentes da família Viperidae que depende da ação sinérgica de toxinas e de diferentes mediadores (MENALDO et al., 2017; NUNES et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2003a). A indução de edema local, atrelado a um expressivo recrutamento leucocitário para a região do coxim plantar dos camundongos, demonstra que a peçonha da *Crotalus durissus* ssp induz um processo inflamatório agudo local.

A curva temporal do edema induzida pela peçonha da *Crotalus durissus* ssp revela um efeito máximo, superior a 50%, nos primeiros 30 minutos após a sua aplicação interplantar, permanecendo acima de 30% até quatro horas da inoculação. Esta cinética da ação edematogênica da peçonha da *Crotalus durissus* ssp foi semelhante à observada com as *Crotalus* que habitam a América Central e do Norte (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2013; LOMONTE, 1985), com as *Bothrops* (COLLAÇO et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2004; CARNEIRO et al., 2002), com as *Lachesis* (FERREIRA et al., 2009), com as *Micrurus* (CASAI-SILVA; TEIXEIRA, 2017), com as *Philodryas* (LOPES et al., 2017) e análoga aos estudos anteriores de Carvalho (2014), Santoro et al. (1999), Dos Santos et al. (1993) e Sanchez et al, (1992), que demonstram uma baixa atividade edematogênica para as *Crotalus durissus* que habitam a América do Sul (Brasil).

Os processos inflamatórios desencadeados pela peçonha de serpentes podem apresentar ou não edema acentuado (TEIXEIRA et al., 2003), este fato pode está atrelado à



ampla variabilidade inter e intraespecífica de compostos da peçonha, desencadeando efeitos biológicos e fisiopatológicos diversos (GUTIERREZ et al., 2017; WHITE, 2005; CHIPPAUX et al., 1991). A presença de uma ação edematogênica local da peçonha da *Crotalus durissus* ssp., diferentemente do que acontece com outras *Crotalus durissus* encontradas no Brasil, evidencia possíveis variações intraespecífica na composição de sua peçonha.

A compreensão dos mecanismos formadores de edema é complexa (BARBOSA et al.; 2003), entretanto, há a menção de que a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, mecanismos primários do processo inflamatório que levam a formação de edema local, dependam da ativação de mediadores específicos, como histamina e eicosanoides (CASAI-SILVA; TEIXEIRA, 2017; HOFSTRA, et al., 2003; BARBOSA et al.; 2003). Estudos apontam que histaminas e prostaglandinas, liberadas pela ação da PLA<sub>2</sub> das peçonhas das serpentes botrópicas (SANTOS et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2004; BARBOSA et al., 2003), participam do processo inflamatório local com indução de edema. Contudo, mesmo que a ação edematogênica da peçonha da *Crotalus durissus* ssp tenha se mostrado semelhante à das peçonhas de serpentes crotálicas da América Central e das botrópicas, o presente trabalho não esclarece os mecanismos pelos quais a peçonha da *Crotalus durissus* ssp induz inflamação local com formação de edema, merecendo estudos posteriores.

A indução de edema na pata é comumente utilizada como método para avaliar os processos inflamatórios induzidos por toxinas de animais. Entretanto, poucos estudos investigam a migração leucocitária para os tecidos inflamados, apesar da relevância deste fenômeno para a compreensão da inflamação aguda desencadeada por componentes da peçonha de serpentes (TEIXEIRA, et al., 2003a). O presente trabalho reafirma claramente a ocorrência de resposta inflamatória induzida pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp ao observar rolamento, adesão e transmigração leucocitária, utilizando a técnica de microscopia intravital. A migração leucocitária é um processo que envolve vários passos que são mediados por uma dinâmica de interação entre moléculas de adesão expressas por leucócitos e células endoteliais, expressão essa regulada por citocinas e quimiocinas (KUBES, 2002; BIEDERMANN et al., 2000).

O rolamento, a aderência e a transmigração leucocitária desencadeada após aplicação da peçonha da *Crotalus durissus* ssp, confirmam o processo inflamatório já abordado ao analisarmos a ação edematogênica desta peçonha e a quantificação leucocitária no local da inoculação. O pico máximo, entre 30 e 40 minutos, apresentado pelo rolamento e pela aderência leucocitária na microcirculação do músculo cremaster dos camundongos após

aplicação da peçonha foi o mesmo observado para a diminuição da velocidade leucocitária com a transmigração de leucócitos nas vênulas pós-capilares, demonstrando um sincronismo dos eventos do processo de migração dos leucócitos.

Esta dinâmica de interação entre os leucócitos e as células endoteliais, observadas neste estudo, é dependente de diferentes famílias de moléculas de adesão, como as selectinas e as integrinas, as quais são responsáveis pelos eventos celulares como o rolamento, adesão e migração de leucócitos (KUBES, 2002). Dessa forma, sugerimos que componentes da peçonha de *Crotalus durissus* ssp atuem em sinergismo interferindo nos mecanismos envolvidos na adesão leucócitos-endotélio e, assim promovendo a interação de moléculas de adesão ou modulando a liberação de citocinas, mediadores envolvidos neste processo.

A liberação das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  nos primeiros 30 minutos do experimento para o local da inoculação, possivelmente modulada pela ação da peçonha de *Crotalus durissus* ssp, sugerem mecanismos de regulação cruzada dos eventos iniciais da resposta inflamatória aguda entre estes mediadores, uma vez que estas citocinas agem modulando a expressão ou a avidéz das moléculas de adesão e estimulam a movimentação direcional dos leucócitos (LOPES-FERREIRA et al., 2014; VORONOV et al., 2010; CRUZ et al., 2008; SHERWOOD, 2004). Porém, a detecção de apenas IL-1 $\beta$  após 24 horas, indica a sua permanência no recrutamento leucocitário, já que ela atua estimulando uma série de células efectoras, o que resulta no recrutamento de um complexo de sinalização e no aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias, incluindo as moléculas de adesão ICAM1, VCAM1 e SELE, quimiocinas e enzimas (MARTIN; WESCHE, 2002; BÉGUIN et al., 2018), promovendo indiretamente a adesão e a migração leucocitária.

Além disso, o edema com dissociação de fibras colágenas e o acúmulo leucocitário desencadeados pela peçonha da *Crotalus durissus* ssp, apresentado pela histologia do tecido do coxim plantar, também reafirma o processo inflamatório demonstrado pelo edema de pata e pela microscopia intravital.

Em relação aos aspectos nefrotóxicos, estudos que avaliem o perfil clínico da toxicidade renal desencadeada após acidentes crotálicos são escassos (CRUZ et al., 2011; FREZZATTI; SILVEIRA, 2011; AMORIM et al., 1969). A maioria deles é realizada utilizando a técnica de perfusão renal, a qual só se permite estudar a fisiologia renal de forma isolada, não reproduzindo, portanto, a realidade dos agravos no tecido dos rins num empeçonhamento crotálico, fazendo-se importante a realização de estudos como este que avaliem os agravos renais num sistema completo.

Dentre as fisiopatologias renais provocadas pelas peçonhas de serpentes, principalmente as da família Viperidae (*Bothrops* e *Crotalus*) (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992; SGRIGNOLLI et al., 2011; MARTINES et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2013; WEERAKKODY et al., 2016; NASIM et al., 2017), destaca-se a injúria renal aguda (IRA), com danos tubulares, como uma das principais complicações apresentadas pelo indivíduo acidentado. Sua patogênese ainda não é bem compreendida, no entanto, estudos apontam que ela pode ser decorrente de fatores multivariados como hemólise, hipotensão, rabdomiólise e a ação citotóxica tubular direta (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012; ALBUQUERQUE et al., 2013).

A ocorrência de infiltrado leucocitário, de vacuolização e de necrose focal das fibras musculares esqueléticas, visualizadas nas seções histológicas do coxim plantar e do gastrocnêmio, indicam um processo degenerativo do tecido muscular semelhante aos estudos envolvendo frações miotóxicas das peçonhas de *Crotalus durissus cascavella* (BEGHINI et al., 2004), *Crotalus oreganus lutosus* (ALMEIDA et al., 2016) e *Crotalus atrox* (SCHEZARO-RAMOS et al., 2018), *Bothrops alternatus* (MAMEDE et al., 2013), *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* (OLIVEIRA et al., 2009) e *Lachesis muta muta* (DAMICO et al., 2008).

A necrose muscular observada pode ter sido decorrente da ação direta de componentes miotóxicos da peçonha da *Crotalus durissus* ssp sobre a membrana das células musculares (HARRIS, 2003; GUTIÉRREZ, et al., 2009). Além disso, a presença de infiltrado inflamatório no local da lesão pode também ter contribuído para o processo de necrose, uma vez que células que participam dos mecanismos inflamatórios liberam mediadores, como citocinas e eicosanoides, que podem amplificar a resposta inflamatória e os danos locais (VORONOV; APTE; SOLER, 1999).

O aumento dos níveis séricos de creatina quinase (CK), analisadas bioquimicamente, paralelo às alterações musculares apontadas na histologia, confirmam que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp desencadeou rabdomiólise, processo este, caracterizado pelo aumento pronunciado nos níveis séricos de CK e mioglobínúria, o que pode gerar alterações renais diversas durante um empeçonhamento crotálico, como a IRA (SITPRIJA; SITPRIJA, 2012; CRUZ et al., 2011; SANTOS et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2008; ROSA et al., 2005; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985). Todas as amostras urinárias dos camundongos, entretanto, apresentaram coloração amarelo-citrino, não demonstrando mioglobínúria aparente, fato possivelmente associado a uma baixa excreção da mioglobina induzida pela dose da peçonha em estudo, 1,5µg /animal, bem como à sua rápida depuração (VANHOLDER et al, 2000; FERRABOLI, et al, 1995; KNOCHEL, 1982).

A não ocorrência de necrose generalizada nas fibras musculares induzida pela dose de 1,5µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus* ssp pode justificar uma baixa excreção de mioglobina na urina e, portanto, a ausência de mudanças na sua coloração, evento este que difere dos estudos clínicos e experimentais realizados com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* que habitam a América do Sul, a qual desencadeia rhabdomiólise com a presença de mioglobinúria e altos níveis de CK (PINHO et al., 2005; SOUSA-E-SILVA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 1986; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985). Contudo, é difícil fazer um diagnóstico preciso sobre a condição acima, uma vez que a hemoglobina livre e a mioglobina urinária não foram medidas neste trabalho, o que requer estudos adicionais.

A análise morfológica do tecido renal, pela histologia, demonstrou a ocorrência de tumefação, marcante vacuolização e áreas de degeneração tubular que permaneceram após 72 horas da inoculação, evidenciando que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp pode agir de forma direta nos túbulos renais devido à ação nefrotóxica de seus componentes que atuam isoladamente ou em sinergismo. Esses achados, observados na região tubular dos néfrons, desencadeiam perdas na funcionalidade das células tubulares e, conseqüentemente alterações nas taxas de filtração glomerular (TFG) e em desequilíbrios hidroeletrólíticos.

Os maiores riscos de lesões renais por ação direta da peçonha se devem ao fato dela ser de excreção predominante renal e dos rins apresentarem concentração da peçonha até 50% maiores que a concentração plasmática, fazendo com que os mecanismos de concentração e transporte tubular favoreçam a ocorrência de citotoxicidade tubular direta (CASTRO, 2006; GOMES et al., 2002). A ação direta nos túbulos renais também foi descrita por Martins et al (1998) nos estudos com a peçonha de *Crotalus durissus cascavella*, por Frezzatti; Silveira (2011) e Monteiro et al., (2001) com as *Crotalus durissus terrificus*, por Mello et al. (2014), Mello et al. (2010) e Dantas et al (2018) com *Bothrops*, por Mandal; Bhattacharyya (2007) para *Daboia russelli russelli*, por Luciano et al. (2004) nos estudos com a peçonha de *Loxosceles intermedia* e por Silva et al (2016) com *Tityus stigmurus*.

Vale ressaltar que a ocorrência de lesões renais desencadeadas pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus* pode ser influenciada em maior grau pela ação tóxica da mioglobina (PINHO et al., 2005; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985), devido a ocorrência de rhabdomiólise com mioglobinúria associada, fato que facilita o diagnóstico da lesão renal e da confirmação de um acidente crotálico nas Unidades Hospitalares. Por conta disso, surge a necessidade de se realizar estudos complementares, analisando a cinética das alterações renais com doses maiores, incluindo a medida do parâmetro de mioglobina urinária, a fim de se certificar da ocorrência ou não de mioglobinúria aparente. Caso não se detecte mioglobinúria

aparente, como possivelmente indicado após a aplicação da dose de 1,5µg/animal da peçonha da *Crotalus durissus ssp*, isso pode se constituir em um complicador no momento do diagnóstico básico de um acidente por *Crotalus* no Estado da Bahia.

Como parâmetro bioquímico, a creatinina sérica vem sendo amplamente utilizada em estudos experimentais como em estudos clínicos, no diagnóstico de IRA envolvendo peçonhas de serpentes (NASCIMENTO, 2012). O aumento dos níveis séricos de creatinina em 24 e 72 horas após a inoculação da peçonha de *Crotalus durissus ssp* indicam queda no ritmo de filtração glomerular (RFG) e possíveis alterações tubulares. Este parâmetro bioquímico também foi utilizado em diagnósticos de IRA após acidente crotálico em análises retrospectivas com indivíduos acidentados (PINHO et al., 2005; SILVEIRA; NISHIOKA, 1992; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985), sugerindo que a nefrotoxicidade da peçonha da *Crotalus durissus ssp*, demonstrada experimentalmente neste estudo, deva também ocorrer clinicamente.

Paralelamente às alterações dos níveis séricos de creatinina, o aumento das frações de excreção de sódio (%FENa) e potássio (%FEK) 24 e 72 horas após a inoculação da peçonha da *Crotalus durissus ssp*, comprovam, juntamente com as alterações histológicas, embora de forma mais tardia, o comprometimento tubular provocado por esta peçonha, uma vez que a perda na viabilidade das células tubulares diminui a reabsorção de substâncias e de eletrólitos, resultando em aumento da excreção fracionada de íons e na inabilidade do rim em manter o balanço hidroeletrólítico (SEGEV et al, 2015; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012; MARTINS et al, 2003).

A fração de excreção de sódio (%FENa) expressa a porcentagem de sódio filtrado que não é reabsorvido pelos túbulos proximais e excretado na urina (NUNES et al., 2010; COSTA et al., 2003). Dessa forma, valores elevados de FENa sugerem fortemente danos tubulares proximais, como necrose tubular aguda. No presente estudo, o aumento de FENa é justificado pela ocorrência de lesão das células do túbulo renal proximal, evento também observado em estudos anteriores, pela técnica de perfusão renal, realizados com as serpentes *Crotalus durissus cascavella* (MARTINS et al., 1998), *Crotalus durissus terrificus* (MONTEIRO et al., 2001), *Vipera russelli* (RATCLIFFE et al., 1989; TIN-NU-SWE et al, 1993; CHAIYABUTRA et al, 2014), e com os escorpiões *Tityus serrulatus* (ALVES et al., 2005) e *Tityus stigmurus* (SILVA et al 2016) .

O manejo de K<sup>+</sup> ocorre por meio de sua secreção pelos túbulos distais dos néfrons e depende da aldosterona, do processo de reabsorção de Na<sup>+</sup> e do fluxo do fluido tubular distal (MACIEL et al., 2014). Portanto, o aumento da %FEK desencadeado pela peçonha de *Cd-ssp*

reflete em uma elevada secreção tubular distal de  $K^+$  influenciada pelo aumento do aporte de sódio ao túbulo distal, devido à reabsorção prejudicada de  $Na^+$  no túbulo proximal, reforçando a ocorrência de lesão tubular proximal.

A inexistência de alterações nos níveis séricos de ureia em todos os tempos analisados não foi consistente com estudos experimentais anteriores com as serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* (CARVALHO, 2014), *Micrurus pyrrhocryptus* e *Micrurus fulvius* (ROODT et al 2012) e, *Naja naja karachiensis* (ASAD et al., 2014). Este resultado pode ter sido decorrente da dose, 1,5µg/animal, da peçonha da *Crotalus durissus ssp* utilizada. Além disso, as alterações nos níveis séricos de creatinina foram identificadas apenas com 24 horas da inoculação, evento possivelmente associado à baixa sensibilidade e especificidade destes marcadores convencionais de disfunção renal, gerando um complicador para a identificação precoce da IRA em acidentes por serpentes e, conseqüentemente a perda de oportunidade para a introdução de uma terapêutica precoce (NASCIMENTO, 2012; NUNES et al., 2010; MACEDO et al., 2008). Este fato nos levou a testar a eficácia do biomarcador de lesão renal, KIM-1, como parâmetro de identificação precoce da evolução da lesão renal tubular proximal (YANG et al., 2015; PERES et al., 2013; SIMSEK et al., 2013; BONVENTRE, 2008).

A elevada expressão de KIM-1, em 12 horas após a inoculação da peçonha da *Crotalus durissus ssp*, indica lesão nas células dos túbulos proximais, a qual pode estar relacionada à ação tóxica tubular direta desta peçonha, pois este parâmetro biomolecular é expresso apenas em células epiteliais tubulares proximais danificadas, fato demonstrado por testes utilizando técnicas de hibridização in situ e imunohistoquímica (HAN et al., 2002), bem como por uma abordagem genômica (AMIN et al., 2004). Portanto, o presente trabalho pontua que o uso do biomarcador KIM-1 se constitui em uma ferramenta promissora para diagnosticar lesões tubulares proximais de forma precoce em indivíduos acidentados por serpentes, assim como demonstrado em algumas publicações de estudos em humanos feitos com o uso do KIM-1 para o diagnóstico de LRA (ZHANG et al., 2017; LIANGOS et al., 2007; HAN et al., 2002) .

Estes achados indicam que as lesões a nível tubular, apontadas pela histologia e pela expressão de KIM-1, tenham sido responsáveis pela diminuição da TFG e pelos distúrbios eletrolíticos ocasionados pela peçonha da *Crotalus durissus ssp* ao avaliarmos os parâmetros bioquímicos da lesão renal. Assim, o aumento dos níveis séricos de creatinina, de  $FENa^+$  e de  $FEK^+$  podem ser justificados pela disfunção tubular promovida pela perda da viabilidade das células tubulares após inoculação da peçonha da *Crotalus durissus ssp*.

Aumentos dos níveis de mieloperoxidase (MPO) verificados no tecido renal dos camundongos 12 horas após a inoculação da peçonha da *Crotalus durissus* ssp. estão relacionados com o aumento da migração de neutrófilos e, portanto, sinalizam o dano inflamatório. Em consonância, aumentos da expressão de mRNA dos marcadores inflamatórios em tecido renal, IL-1 $\beta$  (12 e 24 horas) e de CxCL1 (12 horas), reafirmam o processo inflamatório renal, visto que altos níveis de IL-1 $\beta$  e de CxCL1 aumentam a expressão de moléculas de adesão celular, contribuindo para a adesão e indução do deslocamento de neutrófilos, estabelecendo um microambiente adequado ao desenvolvimento da inflamação (GRAHAM et al., 2009; HUNG et al., 2006; REN; TORRES, 2008). As lesões no tecido renal desencadeadas pela ação direta da peçonha de *Crotalus durissus* ssp., bem como a própria rabdomiólise podem diminuir a redistribuição do fluxo sanguíneo renal e liberar citocinas pro-inflamatórias e mediadores vasoativos, amplificando a reação inflamatória e, assim, contribuir para a fisiopatologia da IRA (SITPRIJA, 2008; SITPRIJA, 2006).

O estresse oxidativo induzido por peçonhas de serpentes tem sido bem documentado (YAMASAKI et al., 2008; ALEGRE et al., 2010; FREZZATTI e SILVEIRA, 2011; SANTHOSH et al., 2013; BARONE et al., 2014). A peroxidação lipídica do tecido renal provocada pela peçonha da *Crotalus durissus* ssp foi evidenciada pelos elevados níveis de Malondialdeído (MDA), após 72 horas da inoculação desta peçonha, evento que pode ter sido decorrente do processo inflamatório indicado pelo aumento dos níveis de MPO, uma vez que os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando liberadas em excesso podem resultar em estresse oxidativo e, conseqüentemente danos nas membranas celulares do tecido renal (MAFRA et al, 1999; WIESLANDER et al., 2011; MARINHO et al., 2015), justificando, assim, a presença e/ou a intensificação dos danos tubulares renais e das alterações bioquímicas e eletrolíticas descritas anteriormente. Esta relação entre aumentos dos níveis de MDA e a ocorrência de IRA foi também mencionado por Da Costa et al. (2015) e Kadkhodae et al. (2014).

Vários estudos (GUTIERREZ; LOMONTE, 2013; SITPRIJA; SITIPRIJA, 2012; TEIXEIRA, et al. 2009; GUTIÉRREZ et al., 2008; TEIXEIRA, et al. 2003; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE et al., 2003; KINI; EVANS, 1989) apontam a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fração tóxica da crotoxina, como o principal componente para a indução de resposta inflamatória, miotoxicidade e de nefrotoxicidade após empeçonhamento crotálico. Estudos preliminares realizados com a peçonha de *Crotalus durissus* ssp, avaliando o perfil eletroforético, enzimáticos e análise proteômica (BIONDI, 2009), detectaram a presença de

PLA<sub>2</sub>. A ação desta toxina em sinergismo com outros peptídeos biologicamente ativos, ainda desconhecidos para esta peçonha, pode está atrelada ao desencadeamento dos processos inflamatórios e à potencialização dos danos miotóxicos e nefrotóxicos observados neste trabalho.

O mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>s, após inoculação da peçonha, envolve principalmente a hidrólise de fosfolipídios da membrana, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina e, conseqüentemente a ativação do metabolismo do ácido araquidônico e, a liberação de seus metabólitos (SUNITHA et al., 2015), o que contribui para o desencadeamento de resposta inflamatória, ativação de citocinas, oxidação e danos teciduais como degeneração e morte celular (TEIXEIRA, 2003a; GUTIERREZ; OWNBY, 2003; SANTHOSH et al., 2013). Dessa forma, o processo inflamatório local, verificado pela presença de edema acentuado e migração leucocitária e, renal observados pelo aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e CxCl-1, bem como a necrose do tecido muscular e os processos degenerativos e oxidativos presentes no tecido renal podem estar associados à ativação do metabolismo do ácido araquidônico pela PLA<sub>2</sub> da peçonha de *Crotalus durissus* ssp., juntamente com a ação de outros peptídeos presentes nesta peçonha.

Diante dos dados expostos, é importante ressaltar que após 24 horas da inoculação da peçonha da *Crotalus durissus* ssp. não foram mais identificados aumentos na expressão do biomarcador KIM-1 e, que após 72 horas não foi mais detectado indícios de inflamação, evidenciando uma possível modulação dos rins aos efeitos da dose de 1,5  $\mu$ g/animal da peçonha. A presença de IL-1 $\beta$  até 24 horas infere uma possível resposta às lesões desencadeadas pela peçonha de *Crotalus durissus* ssp., bem como, sua participação nos processos de recuperação das lesões sofridas pelos rins após exposição à esta peçonha.

Além disso, por conta dos níveis de creatinina só se alterarem após 24 horas e se manterem elevados em 72 horas da inoculação da peçonha, a realização de novos estudos com maior tempo de avaliação e também com doses maiores devem ser considerados, a fim de confirmar se os rins, de fato, se recuperam dos efeitos desencadeados pela peçonha, como evidenciado pela expressão do KIM-1 e, pelo processo inflamatório inicial, ou se a dose de 1,5 $\mu$ g/animal influencia diretamente neste comportamento renal evidenciado.

Este é o primeiro estudo descrevendo reação inflamatória local induzida pela peçonha da serpente *Crotalus durissus* ssp caracterizada por atividade edematogênica e por recrutamento leucocitário, demonstrado pela técnica de microscopia intravital, bem como o pioneiro a correlacionar a expressão do biomarcador KIM-1 à ocorrência de lesões tubulares



proximais induzidos pela peçonha crotálica e a sua importância no diagnóstico de danos renais desencadeados por esta peçonha.

Concluimos que a peçonha de *Crotalus durissus* ssp desencadeou alterações locais, nos tecidos musculares e renais e, nos parâmetros biomoleculares, de forma precoce, e em alguns bioquímicos convencionais clínicos, mais tardiamente. Assim, reafirmamos aqui a importância de utilizar o biomarcador KIM-1, juntamente com os marcadores convencionais, para fornecer, de uma maneira mais completa, a compreensão da fisiopatologia renal após empeçonhamento crotálico.

O fato da peçonha de *Crotalus durissus* ssp apresentar efeitos singulares no que diz respeito à formação de edema local significativo implica possíveis diferenças na composição e no efeito da peçonha desta serpente em relação aos de outras *Crotalus* brasileiras, o que dificulta o tratamento convencional nas Unidades Hospitalares do Estado da Bahia. Dessa forma, este estudo esclarece os efeitos locais desencadeados por esta peçonha e evidencia a importância de se realizar, ao longo do tempo, novos estudos para o desenvolvimento de condutas terapêuticas mais eficazes.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicam que a dose de 1,5µg/animal da peçonha de *Crotalus durissus* ssp desencadeou: (i) processo inflamatório observado pela ação edematogênica e comprovado pela presença de rolamento, adesão e transmigração leucocitária por microscopia intravital; (ii) miotoxicidade, visualizadas por padrões bioquímico e histológicos; (iii) danos renais indicados pelas alterações, mais tardias, dos parâmetros bioquímicos convencionais e, mais precocemente, dos biomoleculares, bem como pelos processos inflamatórios e oxidativos no tecido renal. Foi verificada, ainda, a indução de rabdomiólise sem mioglobinúria, fato provavelmente atrelado à dose da peçonha utilizada.

De forma conjunta, os efeitos singulares desencadados pela peçonha da *Crotalus durissus* ssp, permitem verificar a existência de variações intra e interespecíficas entre os efeitos locais e renais desencadados poçonha da *Crotalus durissus* ssp e os efeitos de outras serpentes deste e de outros gêneros.

Além disso, considerando o fato da ausência de alterações dos níveis séricos de ureia em todos os tempos de tratamento estudados e da presença de aumentos nos níveis séricos de creatinina de forma tardia, evidenciou-se a eficácia do biomarcador KIM-1 como um parâmetro importantíssimo na identificação precoce da IRA, corroborando, juntamente com os parâmetros convencionais no entendimento da evolução dos danos renais desencadeados após um empeçonhamento crotálico.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR I, GIRÓN ME, RODRÍGUEZ-ACOSTA A. Purification and characterisation of a haemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1548: 57-65, 2001.
- AKCAY, A.; NGUYEN, Q.; EDELSTEIN, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. In: **Mediators Inflammation**, v. 2009, p. 137072, 2009.
- ALEGRE, V. S. et al. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, vol 56, pp 402–410, 2010.
- ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** Vol. 26, No. 10, pp. 953-960, 1988.
- ALBUQUERQUE, P.L.M.M. et al., Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, vol 55, nº5, pp 295-301, 2013.
- ALMEIDA, J. R. et al. Biochemical and functional studies of ColTx-I, a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Crotalus oreganus lutosus* (Great Basin rattlesnake) snake venom. **Toxicon**, vol 117, pp 1-12, 2016.
- ALVES, R. S. et al. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, vol 46, pp 271–276, 2005.
- AMIN, R. P. et al. Identification of Putative Gene-Based Markers of Renal Toxicity. **Genomics and Risk Assessment**, Vol 112, Nº 4, 2004.
- AMORA, Daniela N. et al. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon** , vol. 47, pp. 260–264, 2006.
- AMORIM, M. F. et al. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. **Mem. Instituto Butantan**, vol 34, pp 137-157, 1969.
- ANDRADE, D. F. **Estudo do complexo *Crotalus durissus cascavella* no Estado da Bahia utilizando variabilidade na peçonha e morfometria craniana.** 2009. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- ASAD, Muhammad Hassham Hassan Bin, et al. *Naja naja karachiensis* Envenomation: Biochemical parameters for cardiac, liver, and renal damage along with their neutralization by medicinal plants. **BioMed Research International**. Volume 2014.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M. et al Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis, **Toxicon**, vol. 25, no. 11, pp. 1163–1168, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, Palmira; HERING, Sylvia Evelyn. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Simpósio: Urgências e emergências dermatológicas e toxicológicas**. Capítulo IV. Medicina, Ribeirão Preto, 36: 480-489 abr./dez.2003.

BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.*, v. 5, p. 384-394, 1973.

BARBOSA, P. S. F et al. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, vol 40, pp 1427–1435, 2002.

BARBOSA, A. M. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, vol 42, pp 515–523, 2003.

BARONE, J. M. et al. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**, vol 79, pp 1–10, 2014.

BARRAVIEIRA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 65, p. 209-250, 1993.

BÉGUIN, Eelke P., et al. Integrated proteomic analysis of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  induced endothelial inflammation. **Journal of Proteomics** (2018).

BEGHINI, DG. **Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica**. Dissertação de mestrado, Bioquímica. Unicamp, Campinas SP, 2001.

BEGHINI, Daniela G. et al. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. **Toxicon**, vol 43, pp 255–261, 2004.

BERNARDI, Roberto Meister. **Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da insuficiência renal isquêmica: possibilidade terapêutica do uso de antioxidantes**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma - Santa Catarina. 2007.

BIEDERMANN, B. T. Mast Cells Control Neutrophil Recruitment during T Cell-mediated Delayed-type Hypersensitivity Reactions through Tumor Necrosis Factor and Macrophage Inflammatory Protein 2. **J. Exp. Med.** Volume 192, Number 10, 2000.

BIONDI, I.; MATOS, M. L. S.; LIMA, M. L. S. Estudo epidemiológico dos acidentes por *Crotalus durissus cascavella*, Wagler, 1824 (Serpente; Viperidae) na Bahia. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, suplemento I, p.247, 1994.

BIONDI, I. et al. Spatial distribution of ontogenic variability in venoms of *Crotalus durissus* from of two ecosystems (Caatinga and Deciduous Forest) of the state of Bahia, Brazil. In: **Congresso da sociedade brasileira de toxinologia/ symposium of the pan American section of the internatinal society on toxinology**, 2004. Angra dos Reis- Rio de Janeiro. Resumos/Abstracts, 2004.

BIONDI, I. **Caracterização Biológica e Bioquímica da Peçonha de *Crotalus durissus* no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado). Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. 2009.

BIONDI, I. **Os diferentes perfis dos acidentes por serpentes nas mesorregiões geográficas do Estado da Bahia**. (Titulação para professor Adjunto II). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. 2018.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al., Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of proteomics*, vol 7 3, pp 1 7 5 8 – 1 7 7 6, 2010.

BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule- 1 (KIM- 1): A specific and sensitive biomarker of kidney injury. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, vol 69, pp 78-83, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytica IBiochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da saúde, Fundação Nacional da saúde, **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos. In: **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília, 12p, 2009.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília-DF, (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 816 p. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SINAN: Mordidas por animais peçonhentos**. Notificações registradas no Sistema de Informação para Doenças Notificáveis – SINAN, 2014.

BRAZIL, Vital. **A defesa contra o ofidismo**. 100 anos depois. (Edição comemorativa “A defesa contra o ofidismo”). Instituto Vital Brazil, 2011.

CALVETE, J. J et al. Snake Venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as na adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. **Journal of Proteome Research** vol 9,pp 528–544, 2010.

CARDOSO, D. F. MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, 35: 607-612, 1997.

CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: SARAIVER, 2009.

CARNEIRO, Adriana S. et al. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, vol 40, pp 1571–1579, 2002.

CARVALHO, Letícia Helena. **Estudo comparativo dos efeitos locais e sistêmicos dos venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus cascavella* em camudongos swiss**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, 2014.

CASAI-SILVA, L. L.; TEIXEIRA, C. Neurogenic mediators contribute to local edema induced by *Micrurus lemniscatus* venom. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

CASTRO, Isac de. Estudo da toxilogia das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. Rev. **O Mundo da saúde de São Paulo**. vol. 4, p: 644-653, 2006.

CASTRO, Luma Tatiana Silva et al. **Biomarcadores no diagnóstico precoce da injúria renal aguda**. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p.53 2016.

CHAIYABUTRA, Narongsak et al. Acute effect of Russell's viper (*Daboia siamensis*) venom on renal tubular handling of sodium in isolated rabbit kidney. **Asian Biomedicine**. Vol. 8 No. 2, 2014; 195-202.

CHANG, C.C; LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like  $\beta$ -bungarotoxin . **Toxicon**, vol. 6, pp. 203-206, 1978.

CHEYMOL, J., Gonçalves, et al. Action neuromusculaire comparee de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus-I*. **Toxicon**, vol.9, 279–286, 1971.

CHIPPAUX, J.P. et al. Review article: Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toslron**, Vol .29, No. 11, pp. 1279-1303, 1991.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**. N21(13): p.1-17, p. 2015.

CISSA, Patrícia Bianca. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imonológicas**. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 1997.

COLLAÇO, Rita de Cássia O. et al. *Bothrops fonsecai* snake venom activities and cross-reactivity with commercial bothropic antivenom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2016.

COSTA, José Abrão Cardeal et al. Acute renal failure. In: **Simpósio Urgências e emergências nefrológicas**. Ribeirão Preto, v. 36, pp. 307-324, 2003.



COSTA, Tassia R. et al. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, vol 29, pp 1645 – 1656, 2008.

CRUZ, A. Hernandez et al. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Release in Mice Injected with *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Mediators of Inflammation**, 2008.

CRUZ, A. Hernandez et al. Inflammatory Mediators Release in Urine from Mice Injected with *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Mediators of Inflammation**. Vol. 11, 2011.

CUNHA, E.M.; MARTINS, O.A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v.2, n.2, p. 21-26, 2012.

CUNNINGHAM, Patrick N. et al., Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. **Journal Immunol**. Vol 168, pp 5817-5823, 2002.

DA COSTA, Marcus Felipe Bezerra, et al. Red propolis ameliorates ischemic–reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine** xxx (2015) xxx–xxx.

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

DAMICO, C. S et al. Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A2 (LmTX-I). **Protein J** vol 27, pp 384–391, 2008.

DOS SANTOS, M. C et al. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus* poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, Vol. 31, No .11, pp. 1459-1169, 1993 .

ECHEVERRYGARAY, Sergio et al. Random Amplified Polymorphisms Between Two South American Subspecies of Rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). **Braz. arch. biol. technol.** vol.44 no.3 Curitiba Sept. 2001

EVANGELISTA, J. S. A.M. et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**. Vol 52, Pages 737-744, 2008.

FAURE, Grazyna and BOM, Cassian. Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities? **Biochemistry**, vol 27, pp 730-738, 1988.

FERRABOLI et al. Insuficiência renal aguda por rabdomiólise de causa infecciosa: relato de dois casos e revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. Vol. 17, Nº2, pp122-126, 1995.

FERREIRA, Tatiane et al. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon** 53. pp 69–77, 2009.

FERREIRA, Daise Gomes. **Causas, efeitos e tratamento da rabdomiólise**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Enfermagem da Universidade Castelo Branco, 2012.

FORTES, Z.B., et al. Direct vital microscopic study of defective leukocyteendothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40,pp. 1267-1273, 1991.

FREZZATTI, Rodrigo; SILVEIRA, Paulo Flavio. Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom: comparison with probenecid. **PLoS Negl Trop Dis**, vol 5, n<sup>o</sup>9, 2011.

GASANOV, Sardar. E. et al. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A2s, and Zn<sup>2+</sup>-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. **J Clin Toxicol**. Vol. 4(1), 2014.

GERARD C., ROLLINS B.J. Chemokines and disease. **Nat. Immunol.**, v.2, p.108-115, 2001.  
GOMES, R.T et al. Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in mice. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v.131(3), pp. 295-301, 2002.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, Vol. 22, No. 1, pp. 85 – 98, 1984.

GRAHAM, K. L. et al. Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease. **Journal of immunology**, vol 183, pp 6717-6723, 2009.

GUIMARÃES, A. Q. et al. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflammation. res**. Vol 53, pp 284–291, 2004.

GUTIERREZ JM, BOLANOS, R. El problema de los efectos hemorragico y mionecrotico por mordeduras de serpiente en el continente americano. **Bol Of Sanit Panm**, vol 89,1980

GUTIÉRREZ, José Maria. Revisión: Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em América Latina. **Ver. Biol. Trop**. Vol 50 (2), pp 377-394, 2002.

GUTIERREZ JM, OWNBY CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon** 42:915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, Vol. 51, pp. 80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, Vol. 54, pp. 958–975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. **Toxicon**, 2010.

GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, vol 62, pp 27–39, 2013.

GUTIÉRREZ, José María et al. Snakebite envenoming. **Disease primers**. v 3, n.17063, 2017.

HAAPANEN, E. et al. Acute renal failure following nontraumatic rhabdomyolysis. **Scand J Urol Nephrol**, vol 22, pp 305-308, 1988.

HAMASAKI, Alessandra EMY. **Avaliação da atividade nefrotóxica das toxinas recombinantes dermonecróticas LiRecDT1 do veneno da aranha-marrom *L. intermedia* e LgRec1 do veneno de *L. gaúcho***. Dissertação de mestrado (2015). Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HAN, W. K. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, Vol. 62, pp. 237–244, 2002.

HOFSTRA, C.L. et al. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p. 1212–1221, 2003.

HUNG, CC. et al. Upregulation of chemokine CXCL1/KC by leptospiral membrane lipoprotein preparation in renal tubule epithelial cells. **Kidney International**, vol 69, pp 1814–1822, 2006.

JUSTIZ-VAILLANT, A.A; QURIE, A. Interleukin. **StatPearls**, 2018.

KADKHODAEI, Mehri et al. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **International Journal of Surgery** xxx (2014) 1-5.

KASTURIRATNE A., *et al.*. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med**, vol 5, pp 218, 2008.

KINI, R. Manjunatha; EVANS, J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon** Vol . 27, No. 6. pp. 613-033, 1989 .

KINI, R. Manjunatha. Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism. **John Wiley & Sons Ltd**, 1997.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 63, pp. 3030–3041, 2006.

KNOCHEL, J. P. Rhabdomyolysis and myoglobinuria. **Ann. Rev. Med.** Vol 33, pp 435-443, 1982.

KUBES, Paul. Introduction: The complexities of leukocyte recruitment. *Seminars in Immunology*, Vol. 14, pp. 65–72, 2002.

LIANGOS, O. Urinary -N-Acetyl- (D)-Glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, vol 18, pp 904–912, 2007.

LIMA, C. et al. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*, v. 24, p. 499-507, 2003.

LIVAK, K. J; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Method*. V. 25 (4), pp. 402-408, 2001.

LOMEO, Rosangela da Silva et al., Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. *Toxicon*. Vol. 85, pp: 5–16, 2014.

LOMONTE, Bruno. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and central american rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, Vol . 23, nº. 1, pp . 173-176, 1985.

LOMONTE, B. al. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon*. v. 32, p. 505-510, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxin from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, v. 42, p. 885-901, 2003.

LOPES-FERREIRA, M. et al. First report of interruption of mast cell degranulation and endothelial cells activation by anti-inflammatory drugs controlling the acute response provoked by *Pseudoplatystoma fasciatum* fish venom. *Toxicon*, vol 90, pp 237-248, 2014.

LOPES, P. H et al. Edema and Nociception Induced by *Philodryas patagoniensis* Venom in Mice: A Pharmacological Evaluation with Implications for the Accident Treatment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2017.

LUCIANO, Melissa N., et al. Experimental Evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) venom in renal tissue. *J Histochem Cytochem*, 2004 52: 455.

MACEDO, E. et al. Renal recovery following acute kidney injury. *Wolters Kluwer Health*, 2008.

MACHADO C, BOCHNER R. A informação dos acidentes crotálicos no Estado do Rio de Janeiro, 2001 a 2010. *Gaz Med Bahia*. 8 (supl. 1): p.78-84, 2012.

MACIEL, A. T. et al. Fração de excreção de potássio na evolução da lesão renal aguda em pacientes graves: um potencial marcador a ser monitorizado? *Rev Bras Ter Intensiva*. Vol 26(2):pp 143-147, 2014.

MAFRA, D. et al. Lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. **Rev. Nutr.**, Campinas, vol 12, nº3, pp 205-212, 1999.

MAGALHÃES RA, Ribeiro MMF, Rezende NA, Amaral CF. Rbdomiolise secundária ao acidente ofídico crotálico. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, vol 28, pp 228-233, 1986.

MALAGRINO, Pamella Araújo. **Alterações no perfil metabólico em resposta a isquemia/reperfusão renal em modelo suíno de lesão renal aguda**. Dissertação (Mestrado). Departamento de saúde da Universidade de São Paulo. 2014.

MAMEDE, C. C. N. et al. Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Protein & Peptide Letters**, vol 20, pp 192-199, 2013.

MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, D. Ability of a small, basic protein isolated from Russell's viper venom (*Daboia russelli russelli*) to induce renal tubular necrosis in mice. **Toxicon**, vol 50, pp 236–250, 2007.

MARINHO, Aline D. et al. *Bothropoides pauloensis* venom effects on isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelial cells **Toxicon**, (5201), 2015.

MARTIN, M.U.; WESCHE, H., Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor Family. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1592 (2002) 265–280

MARTINES, Monique Silva, et al. Effects of *Schizolobium parahyba* extract on experimental *Bothrops* venom-Induced acute kidney injury. **PLoS ONE** 9(2): e86828, 2014.

MARTÍNEZ-ROMERO, Gerardo et al. Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *C. l. klauberi* and *C. l. morulus* from Mexico. **Toxicon**, 2013.

MARTINS, A. M. C. et al., Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon** Vol. 36, No. 10, pp. 1441-1450, 1998.

MARTINS, A. M. C. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidney. **Toxicon** Vol. 40. pp1165-1171, 2002.

MARTINS, A. M. C. et al. Renal Effects of Supernatant from Macrophages Activated by *Crotalus durissus cascavella* Venom: The Role of Phospholipase A2 and Cyclooxygenase. **Pharmacology & Toxicology**, vol , 92, pp 14–20, 2003.

MEHRI, Kadkhodae, et al. Classical and remote post-conditioning effects on ischemia/reperfusion-induced acute oxidant kidney injury. **International Journal of Surgery** xxx (2014) 1e5.

MELLO. S. M. et al. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, vol 55, pp 470–480, 2010.

MELLO, C. P et al. Bothropoides insularis venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon** xxx, pp 1-8, 2014.

MENALDO, D. L et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. **Molecular Immunology**, vol. 85, pp 238–247, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos – **Notificações registradas no sistema de Informação de Agravos de Notificação** – SINAN Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 07 de março de 2018.

MONTEIRO, H. S. A et al. Action of actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Brasilian Journal of Medical and Biological Researche**, vol 34, pp. 1347-1357, 2001.

NASCIMENTO, N. G. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, vol 55, pp 343–352, 2010.

NASCIMENTO, H. F. M. **Novos Marcadores de Lesão Renal Aguda**. [s.l.] Universidade do porto, 2012.

NASIM, F. et al. Hematological alterations and splenic T lymphocyte polarization at the crest of snake venom induced acute kidney injury in adult male mice. **Toxicon**, vol 134, pp 57-63, 2017.

NICASTRO, G.; Franzoni, L.; de Chiara, C.; Mancin, A. C.; Giglio, J. R. and Spisni, A.; Solution structure of crotoamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom; **Eur. J. Biochem.** vol 270 (9), pp 1969-1979, 2003.

NISHIOKA, Sergio de Andrade; SILVEIRA, Paulo Vitor Portella. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. **Transactionsof the royals ocietyo f tropicaml edicinea nd hygiene**, vol 86, pp 562-564, 1992.

NUNES, Tiago F. et al. Acute renal failure. In: **Simpósio: Condutas em enfermaria de clínica médica de hospital de média complexidade** - Parte 2. Capítulo VI. Medicina (Ribeirão Preto); vol 43(3): 272-82, 2010.

NUNES, D. C. O et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 154, pp 226–233, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thyobarbituric Acid Reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C. F et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, vol 53, pp 560–569, 2009.

ORTEGA, Luis M; FORNONI, Alessia. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*. Vol 2, pp 49–62, 2010.

PERES, L. A. B. et al. **Biomarkers of acute kidney injury**. Review Article, 2013.

PINHO, Fábila O; VIDAL, Edivaldo C; BURDMANN, Emmanuel A. Atualização em insuficiência renal aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. *J Bras Nefrol.*; 22 (3): 162-8, 2000.

PINHO, FABIA M.O. et al. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: A prospective survey on 100 patients. *Kidney International*, Vol. 67, pp. 659–667, 2005.

PINHO, Fábila M. Oliveira et al. Snakebite-Induced Acute Kidney Injury in Latin America. *Seminars in Nephrology*, Vol 28, No 4, pp 354-362, 2008.

PLACE A. J., ABRAMSON, C. L. A quantitative analysis of the ancestral area of the rattlesnakes. *Journal of Herpetology*, v. 38, p. 261-273, 2004.

PRADO-FRANCESCHI, J, et al. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, v. 19, n.6, p. 875-887, 1981.

RANGEL-SANTOS A., LIMA C., LOPES-FERREIRA M. & CARDOSO D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v.44, p.609-616. 2004

RATCLIFFE, J. P et al. Direct nephrotoxicity of Russell's viper venom demonstrated in the isolated perfused rat kidney. **World congresso on animal, plant and microbial toxins**, 1989.

REN, Ke; TORRES, Richard. Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. **Brain research reviews**, vol 60, pp 57–64, 2009.

REPTARIUM. Disponível em:< <http://www.reptarium.cz/en/taxonomy>> Acesso em: 10 dezembro 2017.

RIBEIRO, R.C.H.M. et al. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. *Acta Paul. Enferm*; vol 21 (Número Especial): 207-11, 2008.

ROODT, Adolfo Rafael de. et al. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon* 59 (2012) 356–364.

ROSA, N. G. Rabdomiólise. *Acta Méd Port*, vol18, pp271-282, 2005.

SALVINI, T.F et al. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, vol 39, pp1141- 1149, 2001.

SANO-MARTINS, I.S et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *Q J Med*. Vol. 94: pp 551-559, 2001,

SANCHES, E. F et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, vol. 30. No . 1, pp 95-103, 1992.

SANTORO, M. L et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascabela* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, vol 122, pp 61–73, 1999.

SANTOS, M. C. Dos et al. Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, Vol. 26, No. 2, PP. 207-213, 1988.

SANTOS, M. F. L. et al. Acute kidney injury in Bothrops sp. and Crotalus sp. envenomation: critical review of the literature. **J Bras Nefrol.** Vol 31(2), pp132-138, 2009.

SANTOS, A. S. Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A2 myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom: *in vivo* and *in vitro* evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

SANTHOSH, M.S., et al. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflamm. Res.** 62, 721e731, 2013.

SCHEZARO-RAMOS, R. et al. *In vitro* effects of *Crotalus atrox* snake venom on chick and mouse neuromuscular preparations. **Toxicology and pharmacology**, vol 18, 2018.

SEGEV, G. et al. Glomerular filtration rate, urine production, and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. **Journal veterinary internal medicine**, vol 29, pp 28–34, 2015.

SEKI, C. et al. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, p. 235-247, 1980.

SGRIGNOLLI, L. R. et al. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron Clin Pract**, vol 119, pp 131-137, 2011.

SHERWOOD, E. R. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Vol. 18, No. 3, pp. 385–405, 2004.

SIMSEK, A. et al. New Biomarkers for the Quick Detection of Acute Kidney Injury. Hindawi Publishing Corporation, ISRN Nephrology, 2013.

SILVA, José Alberto Alves da. **Aspectos estruturais e de atividade biológica da giroxina (enzima trombina símile) do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus***. Dissertação de mestrado. São Paulo, 2004.

SILVA, Nathalia A., et al. Effects of *Tityus stigmurus* (Thorell 1876) (Scorpiones: *Buthidae*) venom in isolated perfused rat kidneys. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** (2016) 88(1 Suppl.): 665-675.



- SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, n.5, p. 442–448, 2006.
- SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nephrology**, vol 4, n°11, 2008.
- SITPRIJA, Visith; SITPRIJA, Siravit. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, vol 60, pp 943–953, 2012.
- SOUZA-E-SILVA, MCC et al. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terri.cus* snake venom in dogs Human & Experimental **Toxicology**. Vol. 22, pp 491-500, 2003.
- SUNITHA, K et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. **Toxicon** xxx (2015) 1-9.
- TEIXEIRA, C. F. P et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle Nerve**, vol 28, pp 449–459, 2003.
- TEIXEIRA, C. F. P et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, vol 42, pp 947–962, 2003a
- TEIXEIRA, Catarina et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon** vol 54, pp 988–997, 2009.
- TIN-NU-SWE, et al. Renal ischaemia, transient glomerular leak and acute renal tubular damage in patients envenomed by Russell's vipers (*Daboia russeliisiamensis*) in Myanmar. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene** (1993) 87, 678-681.
- TOLEDO, M. A. et al. Physicochemical analysis of blood and urine in the course of acute kidney injury in critically ill patients: a prospective, observational study. **BMC anesthesiology**, v. 13, n. 1, p. 31, 2013.
- UETZ, Peter. FREED, P. HOSEK, Jirí. **A réptil database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 29 de dezembro de 2017.
- VAIDYA, Vishal S; BONVENTRE, Joseph V. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* Vol 2(5), pp:697-713, 2006.
- VANHOLDER, R. et al. Rhabdomyolysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol 11, pp 1553–1561, 2000.
- VANZOLINI, P. E.; HEYER, R. W. The American herpetofauna and the Interchange. p. 475-487. 1985. *In: F. G. Stehli and S. D. Webb* (Eds.), *The Great American Biotic Interchange*. Plenum press, New York.
- VORONOV, E.; APTE, R.N.; SOLER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 5, p. 5–33, 1999.
- VORONOV, E. et al. Effects of IL-1 molecules on growth patterns of 3-MCA-induced cell lines: An interplay between immunogenicity and invasive potential. **Journal of Immunotoxicology**, vol 7(1), pp 27–38, 2010.

WEERAKKODY, R. M. et al. Transient distal renal tubular acidosis following hump nosed viper bite: Two cases from Sri Lanka. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, vol 25, n°5, pp 1018-1020, 2016.

WHITE, Julian. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**. Vol. 45. 1-17, 2005.

WIESLANDER, G. et al. Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: a double blind crossover study in day-care centre staffs. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine** vol 225, n°2, pp123-30, 2011.

WUSTER, W. et al. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnakes (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissu*) Blackell Publishing Ltd, **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1095-1108, 2005.

YAMASAKI, S. C. et al. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, vol 52, pp 445–454, 2008.

YANG, Li. et al. KIM-1–mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **J Clin Invest**. Vol 125, n°4, pp 1620-1636, 2015.

ZHANG, Y. et al. Kidney injury molecule-1 level is associated with the severity of renal interstitial injury and prognosis in adult. **Archives of Medical Research** - (2017).