

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837a
2017 Costa, Kellen Cristina Torres, 1991
Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos por uma fosfolipase A₂
isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* / Kellen Cristina
Torres Costa. - 2017.
56 p. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.
Coorientadora: Carla Cristine Neves Mamede.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Bothrops* - Teses. 3. Fosfolipase - Teses. 4.
Serpente peçonhenta - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Mamede, Carla
Cristine Neves, 1986. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV.
Título.

CDU: 576.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

KELLEN CRISTINA TORRES COSTA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR UMA
FOSFOLIPASE A₂ ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops*
moojeni

UBERLÂNDIA – MG

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS**

KELLEN CRISTINA TORRES COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR UMA
FOSFOLIPASE A₂ ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops
moojeni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede

UBERLÂNDIA – MG

2017

*Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me
deixaram livre para escolher meu próprio caminho.*

AGRADECIMENTOS

Jamais poderia iniciar qualquer agradecimento sem antes mencionar Deus, o centro de tudo. Agradeço ao Senhor, pois foi Ele quem me deu a vida e a família que tenho.

Agradeço aos meus pais, Eder e Creusa, por todo incentivo, apoio e oportunidades que me deram ao longo da minha vida. Sem a ajuda e amor deles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos Arthur e Thalita, pois sei que, independente de qualquer coisa, estarão sempre ao meu lado.

Ao Célio Filho, pelo amor, paciência e companheirismo ao longo de toda essa jornada.

As minhas amigas de muitos anos pela força, conversas e risadas que foram fundamentais em momentos de desânimo.

Ao professor Fábio, que mesmo sem me conhecer, abriu as portas do laboratório e me deu oportunidade de aprender com ele. Desde o dia que o conheci passou a ser um grande exemplo de profissional e de ser humano, com um coração enorme. A você, professor, meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas do laboratório, Mari, Déborah, Bruna, Edigar e Thalita que desde o início me ajudaram, sempre com muita boa vontade.

À professora Júnia, que se mostrou à disposição todo o tempo. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também ao professor Luiz Fernando, sempre muito disposto a nos ajudar. Sou muito grata a vocês dois por terem aceitado fazer parte da minha banca. A contribuição de vocês é de extrema importância para o enriquecimento do meu trabalho.

Agradeço à professora Carla por todo o auxílio me dado.

Ao professor Antônio Mundim e ao Wilson que juntamente com o hospital veterinário (UFU) nos ajudaram com os testes clínicos.

Aos mestres que passaram pela minha vida acadêmica que também contribuíram para minha formação. À Universidade Federal de Uberlândia por ser minha segunda casa e pela oportunidade de tanto aprendizado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia N-Biofar (INCT-NBiofar), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Enfim, todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram nesta etapa: muito obrigada!

“Quem acredita sempre alcança.”

(Renato Russo)

RESUMO

A peçonha das serpentes é considerada a mais complexa dentre as peçonhas do reino animal com uma grande mistura de componentes e propriedades tóxicas. Dentro deste conjunto de compostos orgânicos e inorgânicos destacam-se as fosfolipases A₂ (PLA₂s), uma superfamília de enzimas que catalisa a hidrólise de fosfolipídeos, liberando diversos produtos de acordo com o sítio de ação no substrato. Por despertar grande interesse clínico, diversos estudos retrataram a caracterização estrutural e funcional de PLA₂s isoladas da peçonha de serpentes botrópicas. O presente trabalho teve como objetivo descrever a purificação de uma PLA₂ da serpente *Bothrops moojeni*, denominada BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008), e avaliar os efeitos sistêmicos induzidos pela enzima em animais experimentais. A toxina foi purificada utilizando colunas de cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel) e de exclusão molecular (Sephadex G-75). A análise por SDS-PAGE mostrou que a BmooTX-I apresenta massa molecular aparente de 15 kDa. A atividade catalítica da toxina foi significativamente alta quando comparada com a peçonha bruta de *B. moojeni*. A BmooTX-I alterou parâmetros físico-químicos na urina dos animais, e ainda, provocou importantes alterações sistêmicas relacionadas ao fígado, músculo, rins e pâncreas. Sendo assim, este trabalho pode contribuir sobremaneira para área médico-científica, uma vez que agrega informações para possíveis descobertas de terapias mais específicas para acidentes botrópicos, e ainda, pelo fato das fosfolipases A₂ estarem diretamente relacionadas a diversas patologias.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, fosfolipase A₂, efeitos sistêmicos.

ABSTRACT

Snakes venom is considered the most complex venom of the animal kingdom with a great mixture of components and toxic properties. Within this group of organic and inorganic compounds are the phospholipases A₂ (PLA₂s), a superfamily of enzymes that catalyzes the hydrolysis of phospholipids releasing several products according to the site of action on the substrate. Due to great clinical interest, several studies have portrayed the structural and functional characterization of PLA₂s isolated from the venom of bothropic snakes. The present work aimed to describe the purification of a PLA₂ isolated from *Bothrops moojeni*, called BmooTX-I, and evaluate the enzyme-induced systemic effects in experimental animals. The toxin was purified using size ion-exchange (DEAE-Sephacel) and molecular exclusion (Sephadex G-75) columns. SDS-PAGE showed that BmooTX-I has an apparent molecular mass of 15 kDa. Its catalytic activity was significantly high when compared to the crude venom of B. moojeni. BmooTX-I altered physical-chemical parameters in the urine of animals and also caused important systemic changes related to the liver, muscle, kidneys and pancreas. Therefore, this work can contribute greatly to the medical-scientific area since it aggregates information for possible discoveries of more specific therapies for bothropic accidents, and also, because phospholipases A₂ are directly related to various pathologies.

Keywords: *Bothrops moojeni*, phospholipase A₂, systemic effects.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	16
FIGURA 2: Exemplar da espécie <i>Crotalus durissus</i>	16
FIGURA 3: Exemplar da espécie <i>Lachesis muta</i>	17
FIGURA 4: Exemplar da espécie <i>Micrurus corallinus</i>	18
FIGURA 5: Acidentes ofídicos notificados no Brasil em 2015.....	19
FIGURA 6: Sítio de ação das fosfolipases.....	22
FIGURA 7: Hidrólise de um fosfolípido por PLA ₂	22
FIGURA 8: Perfil cromatográfico obtido a partir do fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em coluna de DEAE SEPHACEL.....	32
FIGURA 9: Perfil cromatográfico obtido da fração P4 em coluna SEPHADEX G-75.....	33
FIGURA 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%.....	33
FIGURA 11: Atividade Hemolítica Indireta da BMOOTX-I.....	34
FIGURA 12: Parâmetros bioquímicos relacionados à Função Renal.....	35
FIGURA 13: Parâmetros bioquímicos relacionados à Função Hepática.....	38
FIGURA 14: Parâmetros bioquímicos relacionados ao Dano Muscular.....	39
FIGURA 15: Parâmetros bioquímicos relacionados à Função Pancreática.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros físicos da urina dos camundongos.....	36
TABELA 2: Parâmetros químicos da urina dos camundongos.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdPLA₂: fosfolipases A₂ de adipócitos específicos

FAL: fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

AMBIC: bicarbonato de amônio

AST: Aspartato aminotransferase

Bis-acrilamida: N, N' metileno-bis-acrilamida

BSA: albumina bovina DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Ca²⁺: íons cálcio

cPLA₂: fosfolipases A₂ citosólicas

DEAE : dietilaminoetil

iPLA₂: fosfolipases A₂ cálcio independentes

IRA Insuficiência Renal Aguda

LyPLA₂: fosfolipases A₂ lisossomais

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAF-AH: fator de plaquetas ativador de acetilhidrolases

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: tampão fosfato

PLA_s: fosfolipases A₂

SDS: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

sPLA₂: fosfolipases A₂ secretadas

Tris: tris (hidroximetil) amino metano

TFG: taxa de filtração glomerular

γ-GT: Gama-glutamyltranspeptidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Serpentes brasileiras	14
2.2. Acidentes ofídicos	18
2.3. Peçonhas de serpentes	20
2.3.1. Fosfolipases A ₂	21
2.4. Marcadores bioquímicos	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção da peçonha	27
4.2. Animais	27
4.3. Determinação quantitativa de proteínas	27
4.4. Purificação da fosfolipase A ₂	27
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	28
4.6. Atividade Hemolítica Indireta	28
4.7. Tratamento dos animais e obtenção da urina e plasma	29
4.8. Obtenção dos parâmetros bioquímicos	29
4.9. Função Renal	30
4.9.1. Concentração de marcadores bioquímicos renais no plasma	30
4.9.2. Análise da urina	30
4.9.2.1. Obtenção dos parâmetros físico-químicos	30
4.10. Função Hepática	31
4.11. Dano Muscular	31
4.12. Função Pancreática	31
4.13. Análises estatísticas	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Purificação e caracterização enzimática da PLA ₂	32
5.1.1. Atividade Hemolítica Indireta	34
5.2. Função Renal	34

5.2.1. Concentração de marcadores bioquímicos renais no plasma.....	34
5.2.2. Parâmetros físico-químicos da urina.....	36
5.3. Função Hepática.....	37
5.4. Dano Muscular.....	39
5.5. Função Pancreática.....	40
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa acerca das peçonhas de serpentes é fundamental em diversos pontos. Uma das principais importâncias se dá no isolamento de uma ou mais substâncias ativas da peçonha que podem apresentar efeitos farmacológicos de grande interesse para a medicina. Outra questão de expressiva relevância está na compreensão da função das substâncias isoladas da peçonha com consequente avaliação da existência de princípios ativos, sintéticos ou naturais, que possam inibi-las.

A peçonha das serpentes é considerada a mais complexa dentre as peçonhas do reino animal, devido à sua rica composição e propriedades tóxicas. Dentro deste grande conjunto de compostos orgânicos e inorgânicos encontram-se as fosfolipases A_2 (PLA₂s), uma superfamília de enzimas que catalisa a hidrólise de fosfolipídeos, liberando diversos produtos de acordo com o sítio de ação no substrato.

Diversos estudos relataram a caracterização estrutural e funcional de PLA₂s isoladas da peçonha de serpentes *Bothrops*, demonstrando suas várias atividades biológicas. O presente trabalho descreve a purificação de uma PLA₂ isolada da serpente *Bothrops moojeni*, denominada BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008), com o foco na avaliação de seus efeitos sistêmicos.

A serpente *Bothrops moojeni* ou caíçaca, como é conhecida popularmente, é encontrada principalmente nas regiões Sudeste e Central do Brasil, e sua peçonha foi utilizada neste trabalho por ser de ampla relevância para a saúde pública, uma vez que essa serpente é responsável por grande parte dos envenenamentos ofídicos notificados em Minas Gerais.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob a orientação do Prof. Dr. Fábio de Oliveira e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Neves Mamede. O trabalho contou com a colaboração do Hospital Veterinário - UFU onde foram realizados os testes clínicos para avaliação dos efeitos sistêmicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Serpentes brasileiras

As serpentes são vertebrados pertencentes à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes (POUGH et al., 2004). São répteis tetrápodes com ausência de apêndices locomotores e cintura escapular (BRASIL, 2014), possuem olhos redondos com pupila vertical ou circular sem pálpebras móveis, e ainda, são designados como amniotas - nascem de ovos amnióticos (BRASIL, 2014; CARDOSO et al., 2003). São animais desprovidos de ouvido externo, possuem duas narinas localizadas de cada lado da cabeça e à frente dos olhos, e língua bífida, local onde as informações químicas são transportadas até o órgão de Jacobson, análogo ao sistema olfativo (FRANCO, 1986).

As serpentes podem ser encontradas em grande parte do globo terrestre, e são consideradas animais abundantes com boa adaptação, somando aproximadamente 3000 espécies no mundo, distribuídas em cerca de 470 gêneros e 20 famílias (HICKMAN, 2004).

O Brasil possui uma das mais abundantes faunas de serpentes do planeta. Segundo Bérnills e Costa (2012), no Brasil existem 371 espécies registradas, sendo que 55 são pertencentes às famílias Viperidae (28 espécies) e Elapidae (27 espécies), as quais são consideradas peçonhentas e podem provocar envenenamentos em seres humanos.

Para diferenciar serpentes peçonhentas das não peçonhentas alguns autores recorrem a algumas características anatômicas e aos hábitos das serpentes. As peçonhentas possuem cabeça triangular bem destacada do corpo e coberta com escamas pequenas; olhos com pupila em fenda vertical; presença de fosseta loreal, órgão termorreceptor situado entre o olho e a narina (PINHO e PEREIRA, 2001); cauda curta e que afina abruptamente; presença de escamas ásperas com nervura central; desenhos na pele; hábitos noturnos e geralmente atacam quando ameaçadas. Já as serpentes não peçonhentas apresentam cabeça arredondada pouco destacada do corpo; ausência de fosseta loreal; cauda longa e que afina gradualmente; escamas lisas sem nervura central; pele com colorido uniforme; hábitos diurnos e, no geral, fogem ao se sentirem ameaçadas (SOARES, 1998; CADOSO, 1996; PUORTO, 1992). Entretanto, tais modos de diferenciação não são adequados à diversidade de serpentes brasileiras, pois existem serpentes não peçonhentas com a cabeça que se destaca do corpo, como as conhecidas popularmente como jiboias e sucuri. Há, também, serpentes peçonhentas com a cabeça arredondada, como as corais (SANDRIM; PUORTO; NARDI, 2005).

Tendo em vista as dificuldades na distinção dos dois grupos, é recomendável a utilização da fosseta loreal como critério para a diferenciação (PUERTO, 1992). A identificação das serpentes é essencial para o reconhecimento das espécies de importância médica, pois é essencial para as estratégias de formulação da antipeçonha no tratamento dos pacientes (WUSTER, GOLAY e WARRELL, 1999). Os acidentes ofídicos são classificados de acordo com o gênero da serpente (BRASIL, 2014). A família Viperidae está relacionada com os acidentes botrópico, crotálico e laquético, enquanto a Elapidae é referente ao acidente com as corais verdadeiras (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003).

As serpentes da família Viperidae compõem o grupo de maior relevância para a saúde pública sendo responsabilizadas pela maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (BRASIL, 2014; AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HENRING, 2003). Essas serpentes são identificadas pela cabeça triangular (BRASIL, 2014; BÉRNILS e COSTA, 2012), dentição solenóglifa, o que indica a presença de dentes inoculadores de peçonha bem desenvolvidos situando-se na parte anterior do maxilar (BRASIL, 2014) e presença de fosseta loreal (PINHO e PEREIRA, 2001).

O gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrocophias*, configura o grupo mais importante de serpentes peçonhentas do Brasil, com aproximadamente 30 espécies e subespécies, encontradas em todo território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012). São popularmente conhecidos como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, comboia ou caiçara (FUNASA, 2001). As serpentes desse gênero habitam, principalmente, zonas rurais e periferias de grandes cidades, geralmente preferindo ambientes úmidos como matas e locais que possuem uma maior facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Possuem hábitos predominantemente noturnos, apresentam comportamento agressivo se ameaçadas e conseguem atacar sem provocar ruídos (FUNASA, 2001).

A serpente utilizada no presente trabalho, *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caiçaca ou jararacão (Fig. 1), é encontrada, principalmente, nas regiões Sudeste e Central do Brasil. É responsável por grande parte dos envenenamentos ofídicos notificados em Minas Gerais, destacando os registros no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG (SILVA et al., 2003).



Figura 1: Exemplar da espécie *Bothrops moojeni*.

Fonte: <http://www.herpetofauna.com.br/AcidentesOfidicos.htm>

O gênero *Crotalus* possui apenas uma espécie que o representa, a *Crotalus durissus* (Fig. 2). Com relação às subespécies, as serpentes deste gênero se enquadram em cinco tipos: *C. durissus terrificus*, observada nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional; *C. durissus collilineatus*, encontrada nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *C. durissus cascavella*, distribuída nas áreas da caatinga do nordeste; *C. durissus ruruima*, localizada na região norte do país; e por fim a *C. durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó (JORGE e RIBEIRO, 1990). De forma popular, são conhecidas como cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, dentre outras (FUNASA, 2001; CUPO; AZEVEDO; HERING, 1988). Estas serpentes são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, e dificilmente na faixa litorânea. Não costumam atacar e, uma vez ameaçadas, são percebidas pelo ruído característico do guizo ou chocalho, presente na cauda (FUNASA, 2001; JORGE e RIBEIRO, 1990).



Figura 2: Exemplar da espécie *Crotalus durissus*.

Fonte: COSTA et al., 2010.

No gênero *Lachesis* há apenas uma espécie representativa, a *L. muta* (Fig. 3) (BRASIL, 2014), com o predomínio de duas subespécies: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata* (ZAMUDIO e GREENE, 1997). Popularmente, estas serpentes são conhecidas como surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga, malha-de-fogo. São as maiores serpentes peçonhentas das Américas, podendo atingir até 3,5m. Habitam áreas de florestas como Amazônia e Mata Atlântica (FUNASA, 2001).



Figura 3: Exemplar da espécie *Lachesis muta*.
Fonte: ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002.

A família Elapidae agrupa 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus* (Fig. 4), principal representante de importância médica, com aproximadamente 40 espécies e subespécies distribuídas pelo território nacional (BUCARETCHI et al., 2006). As espécies mais comuns são a *M. corallinus*, encontrada na região sul e litoral da região sudeste; *M. frontalis*, também vista nas regiões sul, sudeste e parte do centro-oeste e *M. lemniscatus*, localizada nas regiões norte e centro-oeste (PINHO e PEREIRA, 2001). Possui o nome de coral verdadeira ou boicorá na linguagem popular e são considerados animais de pequeno porte, em torno de 1 metro. Fisicamente, tem como característica as cores vermelho, branco e preto combinadas em anéis (FUNASA; PINHO E PEREIRA, 2001). Possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos e pequena abertura bucal (FUNASA, 2001). Estas serpentes são menos agressivas, possuem habitat subterrâneo e causam acidentes com baixíssima frequência (JORGE e RIBEIRO, 1990).



Figura 4: Exemplar da espécie *Micrurus corallinus*.
Fonte: FUNASA, 2001.

2.2. Acidentes ofídicos

Acidente ofídico ou ofidismo é referente ao quadro de envenenamento decorrente da inoculação de toxinas através das presas de serpentes, podendo ocasionar alterações locais e sistêmicas (BRASIL, 2009). Esses acidentes retratam um problema grave de saúde pública possuindo maior incidência em países tropicais e podem ocasionar morbimortalidade em suas vítimas (PINHO e PEREIRA, 2001).

Os fatores climáticos e o aumento da atividade de trabalhadores no campo, no geral, têm influência na ocorrência dos acidentes. Em épocas quentes e chuvosas, que coincidem com o período de maior atividade no campo, percebe-se um aumento do número de casos (BOCHNER e STRUCHINER, 2003). Há maior incidência no sexo masculino, na faixa etária de 15 a 49 anos, sendo os membros inferiores os mais atingidos (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003).

Dos acidentes ofídicos notificados no país no ano de 2015, 81,74% foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 8,71% por serpentes do gênero *Crotalus*, 0,84% por serpentes do gênero *Micrurus*, 3,21% por serpentes do gênero *Lachesis*, e 5,50% por serpentes não peçonhentas (Fig. 5). Dentre esses acidentes, 0,48% evoluíram para óbito, sendo que o maior índice de letalidade corresponde ao gênero *Crotalus* com 0,57%, e o menor, é referente ao gênero *Bothrops*, correspondendo a 0,44% (SINAN, 2015).

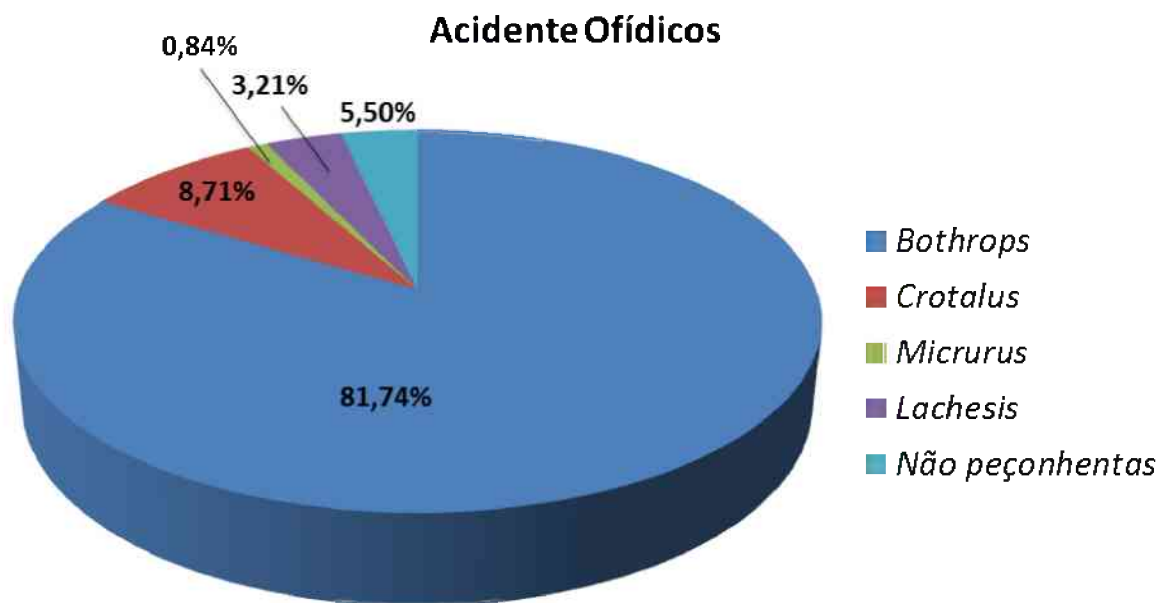


Figura 5: Acidentes ofídicos notificados no Brasil em 2015

Fonte: Adaptado SINAN

As manifestações locais causadas pelo envenenamento botrópico comumente se evidenciam com a presença de edema devido ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas e líquido; dor, induzida pela liberação de substâncias como a bradicinina e histamina; e hemorragia local. Bolhas com conteúdo seroso ou serohemorrágico podem surgir na evolução e dar origem à necrose tecidual provocada pela ação proteolítica da peçonha, associada à lesão vascular que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro (BRASIL, 2009; GUTIÉRREZ, 2009; CARDOSO, 2003).

Com relação aos efeitos sistêmicos, segundo Warrel (2004), os acidentes botrópicos podem causar distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria. A hipotensão pode ser decorrente de sequestro de líquido no membro picado ou hipovolemia consequente de sangramentos, que podem contribuir para a instalação de insuficiência renal aguda (IRA), que juntamente com sangramentos em órgãos vitais e choque, compõem uma das principais causas de óbito (BRASIL, 2009). Estudos relacionados às alterações sistêmicas induzidas por peçonha de serpentes são fundamentais para a compreensão da fisiopatologia e mecanismos de lesão celular e tecidual associados a toxinas nesse tipo de secreção (MELO et al., 2010).

No envenenamento por serpentes, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) influenciam direta ou indiretamente em seu efeito fisiopatológico. Essas enzimas auxiliam no processo de digestão da presa. Elas também estão envolvidas em uma gama de efeitos farmacológicos, tais como

neurotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, hemorragia, hipotensão, inibição da agregação plaquetária, anticoagulação e inflamação (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; OLIVEIRA et al, 2008). O efeito de mionecrose pode ser causado pela ação direta de PLA₂s miotóxicas na membrana de células musculares ou por alterações causadas por metaloproteases, proteínas também encontradas na peçonha de serpentes botrópicas capazes de ocasionar degeneração e isquemia (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

A atividade catalítica sobre membranas propõe um papel fundamental das PLA₂s de peçonhas de serpente, quando se refere à toxicidade. O desarranjo dos componentes fosfolipídicos está associado a alterações na integridade estrutural e funcional das membranas celulares com consequente influxo de íons cálcio acarretando na liberação de proteases cálcio dependentes, ativação de PLA₂ endógenas e colapso mitocondrial (GUTIÉRREZ et al, 1989; TRUMP, 1996). Levando-se em conta todos esses fatores, há possibilidade de morte celular (RUEDA, 2009).

2.3. Peçonhas de serpentes

Segundo Gutiérrez et al. (2009), a peçonha de serpente é uma fonte rica em princípios fisiologicamente ativos que induzem uma gama variável de efeitos tóxicos e farmacológicos. É secretada por glândulas especializadas, formando uma mistura heterogênea de substâncias biologicamente ativas (MENEZES et al., 2006). Compostos orgânicos e inorgânicos compõem as inúmeras substâncias encontradas em peçonhas de serpentes. Entre os componentes orgânicos, destacam-se as proteínas (algumas das quais são enzimas), carboidratos, lipídeos, amins biologicamente ativas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos. Com relação às substâncias inorgânicas, têm-se cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, sódio, fósforo, cobalto e zinco (SANTOS et al., 1995). A composição da peçonha é variável, diferenciando-se entre as espécies. Também podem ocorrer variações intraespecíficas decorrentes de variações sazonais, sexuais, dietéticas, de habitat e idade da serpente (CHIPPAUX, 1991).

As funções primárias da peçonha são a captura de alimento, auxiliando na imobilização e início da digestão da presa (MENEZES et al., 2006; SANTOS et al., 1995). Além disso, também é importante para a defesa contra agressores (MENEZES et al., 2006).

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. O efeito proteolítico acarreta lesões locais e destruição tecidual, enquanto o

coagulante faz com que haja a ativação da cascata da coagulação, que pode induzir a incoagulabilidade sanguínea através do consumo de fibrinogênio. A ação hemorrágica é devido à liberação de substâncias hipotensoras e lesões na membrana basal dos capilares por ação das hemorraginas (PINHO e PEREIRA, 2001). Além dessas atividades biológicas acima citadas, sabe-se que peçonhas de serpentes também causam edema. Segundo Santos et al. (1995), a atividade edematogênica se origina de ações combinadas de toxinas que atuam diretamente sobre os vasos sanguíneos com outras que liberam autacóides, tais como prostaglandinas, histamina e bradicinina. Enzimas como a fosfolipase A₂, presentes na maioria das peçonhas, podem estar envolvidas na formação do edema (MAMEDE et al., 2016).

2.3.1. Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ constituem uma superfamília de enzimas amplamente distribuídas na natureza (KINI, 2003). Elas catalisam especificamente a hidrólise de fosfolípidios na ligação éster do carbono 2 (Fig. 07), e como subprodutos liberam ácidos graxos livres, dentre eles os poli-insaturados como o ácido araquidônico e os lisofosfolípidos (KUDO e MURAKAMI, 2002). O ácido araquidônico é um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que atuam em diversas funções biológicas, como resposta imune, inflamação e percepção da dor. Além disso, as PLA₂s também estão relacionadas com o metabolismo, reprodução, remodelamento da membrana para a sinalização e defesa antimicrobiana (LOMONTE e RANGEL, 2012; DENNIS, 2011).

Dependendo do local onde ocorre a hidrólise (Fig. 06), as PLA₂ são classificadas em cinco famílias, sendo elas: A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) (DENNIS, 1994). As PLA₁ e A₂ hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolípidos intactas nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente, já as PL C e D hidrolisam as ligações fosfodiéster (Lehninger, 2011).

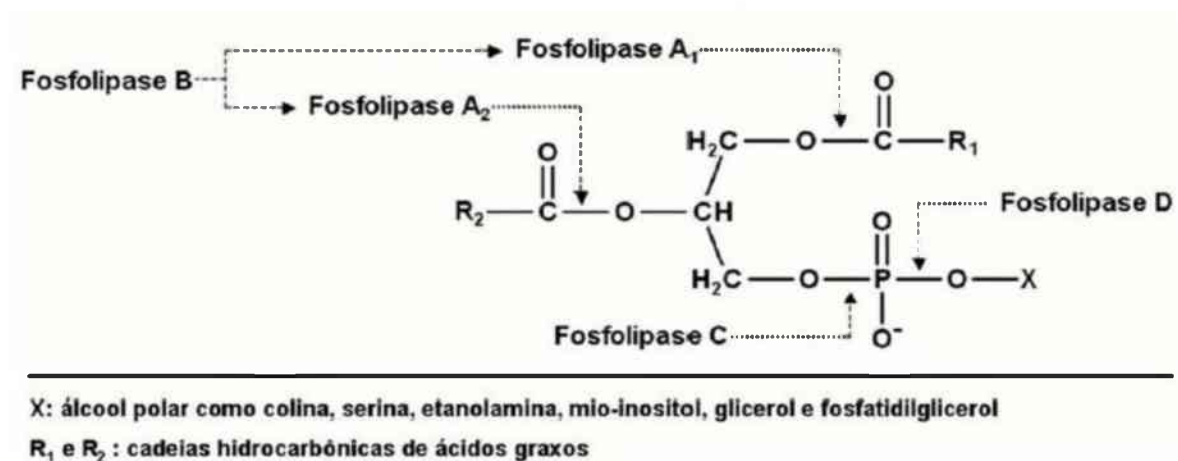


Figura 6: Sítio de ação das fosfolipases.

Fonte: Araújo, 2014

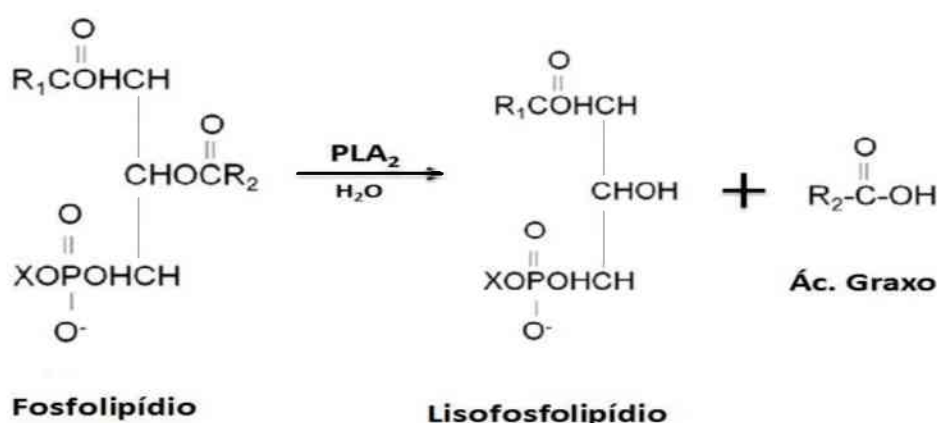


Figura 7: Hidrólise de um fosfolípido por PLA_2 . Quebra da ligação sn-2 do fosfolípido e consequente liberação do lisofosfolípido e ácido graxo (Fonte: Adaptado de KINI, 1997).

As fosfolipases A_2 , ainda, são divididas em seis grupos: $\text{PLA}_{2\text{s}}$ secretadas (sPLA_2); $\text{PLA}_{2\text{s}}$ citosólicas (cPLA_2); $\text{PLA}_{2\text{s}}$ Ca^{2+} independentes (iPLA_2); $\text{PLA}_{2\text{s}}$ fator de plaquetas ativador de acetilhidrolases (PAF-AH); $\text{PLA}_{2\text{s}}$ lisossomais (LyPLA_2) e $\text{PLA}_{2\text{s}}$ de adipócitos específicos (AdPLA_2) (QUACH et al., 2014). As PLA_2 secretadas são encontradas em secreções de vertebrados e invertebrados, possuem massa molecular entre 13-19 kDa, apresentam um resíduo de histidina junto ao de aspartato no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca^{2+} para a catálise (DENNIS et al., 2011). As PLA_2 citosólicas têm massa molecular entre 60-114 kDa e possuem um resíduo de serina junto ao de aspartato no sítio catalítico. As PLA_2 Ca^{2+} independentes, como o próprio nome sugere, não dependem do cálcio para sua catálise. Possuem massa molecular entre 84-90 kDa e também possuem um resíduo de serina junto ao de aspartato em seu sítio catalítico. As PAF-AH possuem massa molecular entre 26-

45 kDa e apresentam resíduos de serina e histidina junto ao do Aspartato no sítio catalítico. As PLA₂ lisossomais possuem massa molecular aproximadamente de 45 kDa. Também possuem resíduos de serina e histidina junto ao de aspartato no sítio catalítico, e apresentam pH ótimo próximo a 4,5. Por fim, as AdPLA possuem massa molecular em torno de 18 kDa, possuem resíduos de histidina e cisteína no sítio catalítico, sendo independentes de Ca²⁺ (DENNIS et al., 2011).

As PLA₂ de peçonhas de serpentes são do tipo secretada e pertencentes aos grupos I (Elapidae/Hydrophiidae) e II (Crotalidae/Viperidae), dependendo de sua estrutura primária e padrão de pontes dissulfeto (SIX e DENNIS, 200). As PLA₂ do grupo II foram classificadas como Asp49 e Lys49, sendo a primeira cataliticamente ativa. Ao longo da evolução, as PLA₂ Lys49 (SOARES et al., 2003) perderam a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos, em razão da substituição do resíduo de Aspartato por um resíduo de Lisina na posição 49. Mesmo sendo cataliticamente inativas, as PLA₂s Lys49 demonstram toxicidade sobre membranas através de um mecanismo independente de cálcio. Entretanto, tal mecanismo de ação destas toxinas não é bem elucidado (ÂNGULO et al., 2005; LOMONTE et al., 2003). Já as PLA₂s Asp49 possuem em seu sítio catalítico um ácido aspártico altamente conservado na posição 49 que está totalmente envolvido na ligação do cofator essencial, o íon Ca²⁺ (WARD; AZEVEDO-JR; ARNI, 1998).

2.4. Marcadores bioquímicos

A doença no fígado é a causa mais relevante do aumento da atividade de transaminases (aminotransferases) no soro. A ALT (alanina-aminotransferase) e AST (aspartato-aminotransferase) são enzimas de interesse clínico que catalisam a interconversão de aminoácidos a 2-oxiácidos pela transferência de grupos amino. Apesar das atividades séricas de ambas tornarem-se elevadas durante um processo patológico que afeta a integridade da célula hepática, a ALT é a enzima com maior especificidade para o fígado (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

A γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil de um peptídeo para outro peptídeo ou para um aminoácido, resultando em aminoácidos γ -glutamil e cistenil-glicina. Esta enzima está relacionada com o transporte de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, regulação dos níveis de glutatona nos tecidos e síntese proteica. O principal valor clínico da dosagem da γ -GT é no estudo das desordens

hepatobiliares, o que é importante para o diagnóstico diferencial entre disfunções hepáticas e do trato biliar.

A fosfatase alcalina (FAL) realiza a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Está associada a membranas e superfícies celulares na mucosa do intestino delgado, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos, entre outros (MOTTA, 2009). O aumento da atividade da ALP sérica geralmente tem origem no fígado e ossos. Assim, a dosagem sérica de ALP é importante na investigação de doenças hepatobiliares e patologia óssea associada à atividade osteoblástica elevada (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

As enzimas musculares incluem a creatinaquinase (CK) e a lactato desidrogenase (LDH). A primeira é uma enzima dimérica que catalisa reversivelmente a fosforilação da creatina pela adenosina trifosfato (ATP). A atividade de CK é maior no tecido muscular estriado e no tecido cardíaco, enquanto nos tecidos como cérebro, trato gastrointestinal e bexiga urinária sua atividade é relativamente menor. Já o fígado e eritrócitos são desprovidos da atividade de CK. O nível sérico de CK é muito elevado em todos os tipos de distrofia do músculo (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008), portanto essa enzima é descrita, no geral, como o melhor marcador indireto de dano ao tecido muscular (FOSCHINI et al., 2007). A LDH atua na transferência de hidrogênio que catalisa a oxidação do L-lactato a piruvato com a mediação de NAD^+ como aceptor de hidrogênio. Esta enzima está amplamente distribuída em todos os tecidos, sua elevação sérica pode ocorrer em condições clínicas variáveis como infarto do miocárdio, hemólise, desordens do fígado, rins, pulmão e músculo (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

Além da quantificação da LDH, existem métodos enzimáticos (Lactato Enzimático – Labtest Diagnostica®) que utilizam a lactato oxidase na determinação da concentração de lactato presente em uma amostra. Tal enzima é responsável por catalisar a oxidação do ácido láctico, levando a formação de piruvato e peróxido de hidrogênio, que reage com um cromogênio para formar um produto colorido. A intensidade da cor do produto (quinoneimina) é diretamente proporcional à concentração do lactato. O lactato é um produto final da via glicolítica anaeróbica que acontece em tecidos hipóxicos. Entretanto, em determinadas condições, tecidos oxigenados podem gerar lactato através da glicólise aeróbica. Níveis de lactato superiores a 5 mmol/L e pH sanguíneo menor que 7,25 indicam acidose láctica (MOTTA, 2009).

A creatinina, a ureia e ácido úrico são indicadores diagnósticos da função renal. A creatinina é o anidrido cíclico da creatina que é gerado como produto final da decomposição da fosfocreatina. Ela é excretada na urina e tanto sua concentração plasmática quanto a sua

depuração renal são utilizadas como marcadores da taxa de filtração glomerular (TFG). Já o catabolismo das proteínas e aminoácidos resulta na formação da ureia, que é eliminada predominantemente pelos rins. Há anos que a dosagem da ureia sanguínea e plasmática tem sido utilizada como indicador da função dos rins. Entretanto, já é aceito que a dosagem de creatinina fornece melhores informações para tal. De qualquer forma, a ureia traz informações clínicas bastante úteis em determinadas situações como sua dosagem em líquidos da diálise para avaliação da adequação da terapia de substituição renal (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008). Por fim, o ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas – adenina e guanina – nos seres humanos. Sua formação ocorre principalmente no fígado pela ação da enzima xantina-oxidase. Quase todo o ácido úrico no plasma esta na forma de urato monossódico (MOTTA, 2009). Distúrbios herdados do metabolismo das purinas originam tanto a hiperucemia (aumento do teor de ácido úrico no plasma) quanto a hipourechemia (teores reduzidos do ácido úrico) (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

A amilase é pertencente à classe das hidrolases e atua extracelularmente para clivar o amido e o glicogênio presentes na dieta (MOTTA, 2009). Sua atividade no sangue é fisiologicamente baixa e constante aumentando de forma exacerbada na pancreatite aguda e na inflamação da glândula salivar (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Obetivo geral

Avaliar os efeitos sistêmicos induzidos por uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha da serpente *B. moojeni*.

3.2. Objetivos específicos

- Purificar a fosfolipase A₂ BmooTX-I;
- Avaliar os efeitos sistêmicos induzidos pela toxina purificada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da peçonha

A peçonha de *B. moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, Batatais/SP. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo, em temperatura ambiente, e conservada a -20°C até o momento do uso.

4.2. Animais

Camundongos machos Swiss (20-25g) foram gentilmente doados pela Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda e mantidos no depositário de animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo automático claro/escuro (12 horas) e com livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para os cuidados de animais de laboratório e as orientações éticas para investigações com consciência animal, estabelecidas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo nº037/16).

4.3. Determinação quantitativa de proteínas

Para determinação quantitativa de proteínas, alíquotas de 1mL da solução contendo a amostra foram submetidas à dosagem em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão) através do método de análise de proteínas. Nesse método, as amostras são lidas a um comprimento de onda Ultra Violeta (U.V) de 280nm e comparadas a uma solução branca (sem proteínas). O software desse equipamento mostra a quantidade de proteínas na amostra em mg/mL.

4.4. Purificação da fosfolipase A₂

O fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* foi realizado conforme as técnicas descritas por Santos-Filho et al. (2008), com algumas modificações. Cerca de 400 mg da peçonha bruta foram dissolvidos em 4,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05

M, pH=7,8, e aplicados a uma coluna de cromatografia (2,5 x 20 cm) contendo a resina DEAE Sephacel. A quarta fração, denominada P4, foi liofilizada e submetida a um segundo passo de purificação em coluna de Sephadex G-75 (1,0 x 100 cm), previamente equilibrada com AMBIC 0,05 M.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 14%, foi realizada segundo Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH=6,8, contendo Tris-HCl 0,125M e SDS 0,1% e um gel de separação a 14% em pH=8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m). Amostras de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β -mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. As amostras preparadas foram aquecidas por 5 minutos em água fervente. Em seguida, cerca de 20 μ L de amostra foram aplicados no gel. Também foi aplicado no gel o padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight) — fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa), dissolvido no mesmo tampão.

As proteínas e o gel foram corados por 15 minutos em uma solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v). Os géis foram descorados em uma solução contendo água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

4.6. Atividade Hemolítica Indireta

A avaliação da atividade fosfolipásica foi realizada pelo método de hemólise radial indireta, como descrito por Gutiérrez e colaboradores (1988). Para a execução do experimento, tem-se a elaboração de um gel (CaCl₂ 0,01M; PBS (Solução Salina Tamponada em Fosfato) pH 7,2; gema de ovo 1:3 diluído em PBS; eritrócitos 1:3 v/v PBS; agarose 1%; azida de Sódio 0,005%) sobre uma placa em uma temperatura entre 45-50°C. O sangue humano utilizado foi diluído em PBS e as células lavadas três vezes com centrifugação de 400 xg por 10 minutos. Depois de centrifugado, o plasma foi desprezado e os eritrócitos utilizados para composição do gel.

Após a solidificação do gel, foram feitos orifícios com aproximadamente 0,6 cm de diâmetro e aplicaram-se as amostras a um volume final de 50 µL de peçonha bruta de *B. moojeni*, da PLA₂ purificada e PBS. O gel contendo as amostras foi incubado a 37°C por 12 horas. A PLA₂ hidrolisa os fosfolípidios presentes na gema do ovo promovendo a liberação de ácido graxo com redução do pH, o que leva a lise dos eritrócitos e formação de um halo ao redor dos orifícios. Os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica A₂. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7. Tratamento dos animais e obtenção da urina e plasma

Camundongos machos Swiss (n = 3) receberam injeção intraperitoneal de 10 µg da BmooTX-I diluída em 100 µL de solução salina 0,9% e alojados em gaiolas metabólicas com livre acesso à água e comida durante os experimentos. Os animais, denominados controle negativo, receberam 100 µL de solução salina 0,9% e foram mantidos sob as mesmas condições.

Após a administração das amostras, os diferentes grupos de animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada (3, 6, 12 e 24 horas) em tubos especializados para posterior análise. As fezes foram descartadas.

Para obtenção do plasma, os animais foram anestesiados com 100 µL de tiopental de sódio e o sangue foi coletado por punção cardíaca, usando heparina como anticoagulante. O plasma foi obtido por centrifugação a 900 xg por 6 minutos em temperatura ambiente. O plasma e a urina foram usados para análise qualitativa/quantitativa de enzimas alvo e metabólitos por kits específicos (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os procedimentos técnicos de todos os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Após a obtenção das amostras foi feito deslocamento cervical nos animais para posterior descarte.

4.8. Obtenção dos parâmetros bioquímicos

Todos os parâmetros bioquímicos no plasma foram determinados a 37°C em um analisador automático Chemwell previamente calibrado com calibra H e aferido com soro controle universal Qualitrol usando os kits da Labtest Diagnostica®. Todos os parâmetros sistêmicos avaliados foram comparados com os resultados obtidos pelos animais controle.

4.9. Função Renal

4.9.1. Concentração de marcadores bioquímicos renais no plasma

A função renal dos animais tratados foi avaliada pela mensuração das concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico no plasma, que são considerados marcadores da função renal. As concentrações plasmáticas de creatinina e ácido úrico foram determinadas por método colorimétrico (picrato alcalino – Jaffé e enzimático Trinder, respectivamente). Já a concentração plasmática da ureia foi medida pela cinética enzimática em um sistema de fotometria ultravioleta.

4.9.2. Análise da urina

Para analisar a urina dos animais tratados foram realizadas etapas com base nas características físicas e parâmetros químicos. As alterações físicas se restringiram somente ao campo observacional, já as condições químicas da urina foram avaliadas com auxílio de um kit comercial Uriquest® Plus I (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as instruções de uso do fabricante.

4.9.2.1. Obtenção dos parâmetros físico-químicos

Ao final de cada tempo (3, 6, 12 e 24 horas), a urina de cada grupo foi transferida para um tubo falcon graduado, de modo que os parâmetros cor e volume foram analisados.

As amostras de urina recém-coletadas foram transferidas para um tubo de ensaio e com auxílio de uma fita plástica contendo 10 áreas distintas com papel de filtro colorido e impregnado com reagente químico específico, foram estimados os valores do pH e densidade, bem como detecção qualitativa/quantitativa de bilirrubina, corpos cetônicos, glicose, leucócitos, nitrito, proteína, sangue e urobilinogênio. A reação química para cada parâmetro foi considerada positiva, quando a fita era mergulhada na urina e imediatamente a área colorida reconhecia o analito na urina. Para cada padrão de cor obtido, inferia uma quantidade do metabólito na solução. As tiras foram mantidas em ambiente seco e livre de poeira e totalmente mergulhadas na urina, por, aproximadamente, 2 segundos, de forma que todas as áreas reativas foram imersas quase que simultaneamente, e em seguida, retiradas imediatamente do fluido. Com auxílio de papel absorvente, o excesso de líquido foi removido

e, após 60 segundos, a leitura do resultado foi processada a partir da comparação entre a cor do produto reativo com a escala de cores, relacionando cor-quantidade, apresentada no invólucro do kit. Alterações de cores após 120 segundos foram desconsideradas, segundo orientações do fabricante.

4.10. Função Hepática

A função hepática foi avaliada pela presença excessiva de enzimas intracelulares obrigatórias no plasma dos animais inoculados com a BmooTX-I. As enzimas γ -glutamiltanspeptidase (γ -GT), fosfatase alcalina (ALP) e alanina-aminotransferase (ALT) foram mensuradas usando a metodologia Szasz modificado, método colorimétrico e método cinético UV – IFCC, respectivamente.

4.11. Dano Muscular

O dano muscular foi determinado pela dosagem da enzima creatinoquinase (CK) e lactato enzimático no plasma dos animais tratados, usando os métodos cinético UV – IFCC e Enzimático-Trinder, respectivamente

4.12. Função Pancreática

A função pancreática dos animais tratados foi avaliada através da dosagem da concentração da glicose e amilase no plasma usando a metodologia UV (Bonder e Mead modificado) e método colorimétrico, respectivamente.

4.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA seguidas pelo teste de Bonferroni no programa GraphPad Prism, versão 5.01. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação e caracterização enzimática da PLA₂

No presente trabalho, uma toxina da serpente *B. moojeni*, denominada BmooTX-I, foi purificada de acordo com Santos-Filho et al. (2008) com algumas modificações. Inicialmente 400 mg da peçonha bruta foi aplicada em uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel), seguida por uma cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). O fracionamento da peçonha bruta em resina de troca iônica resultou em quatro frações principais, denominadas de P1 a P4. O perfil cromatográfico está mostrado na Fig. 8.

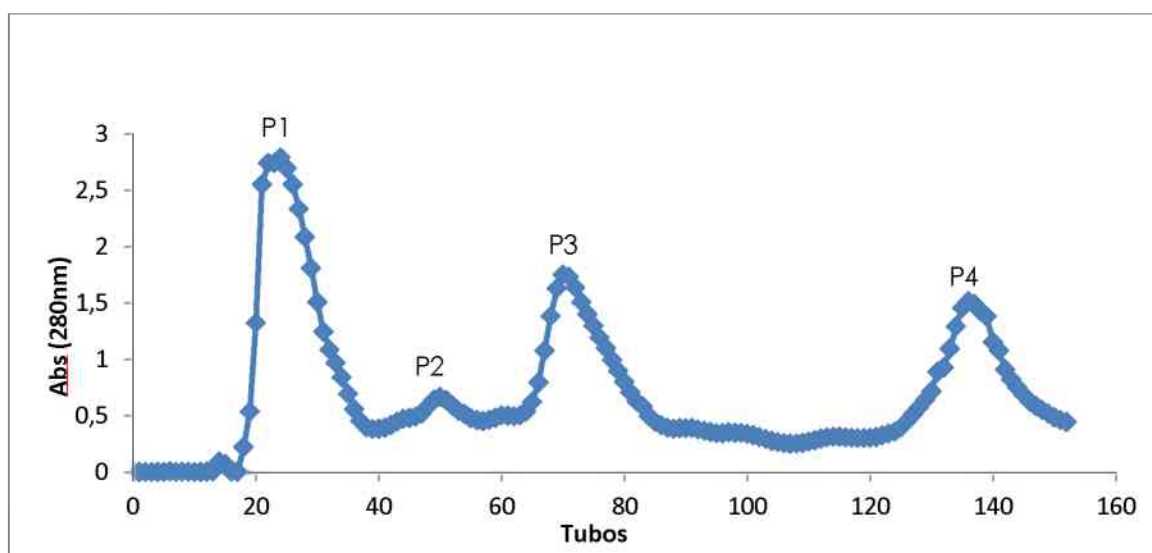


Figura 8: Perfil cromatográfico obtido a partir do fracionamento de 400mg da peçonha bruta de *B. moojeni* em coluna de DEAE Sephacel (2,5 X 20 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05M – 0,6M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente.

As frações obtidas a partir dessa cromatografia foram submetidas a eletroforese em gel de Poliacrilamida a 14% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A análise do perfil eletroforético mostrou que as frações apresentam várias bandas proteicas com massas moleculares variando entre 14.000 e 100.000 Da (resultados não mostrados). A fração P4 apresentou uma elevada atividade fosfolipásica e foi submetida a um novo passo de cromatografia em uma coluna de exclusão molecular, a qual resultou em quatro picos principais, denominados de P4G1 a P4G4 (Fig. 9).

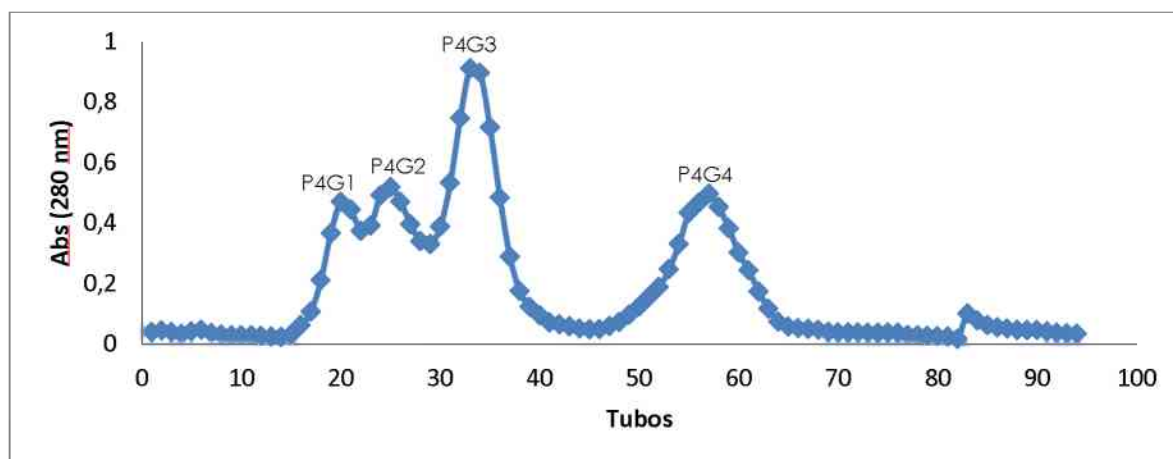


Figura 9: Perfil cromatográfico obtido da fração P4 em resina Sephadex G-75 (1,0 x 100 cm), equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente.

A terceira subfração, resultante do segundo passo cromatográfico, quando analisada por SDS-PAGE a 14%, mostrou uma proteína com elevado grau de pureza com massa molecular aparente de 15KDa, na presença ou ausência de agentes redutores (Fig. 10). Esta subfração foi denominada de BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008) e foi utilizada para atingir os objetivos do presente trabalho.

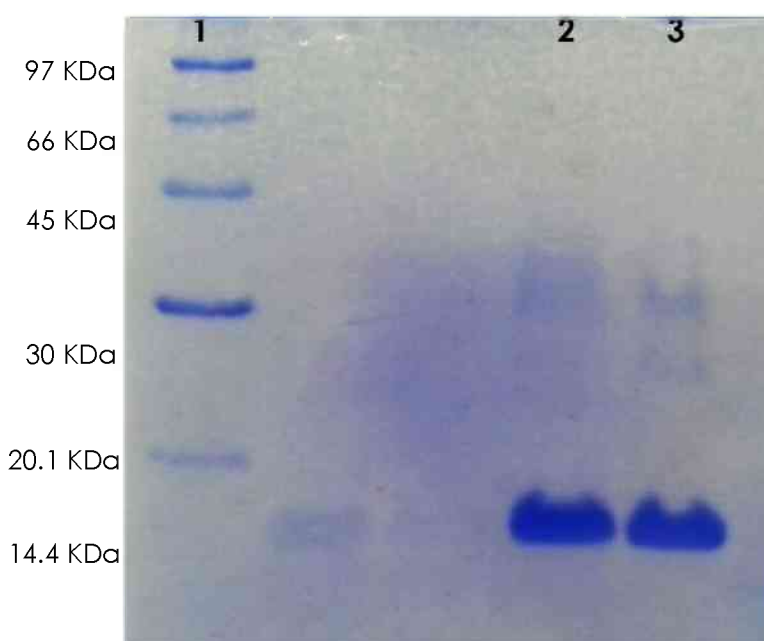
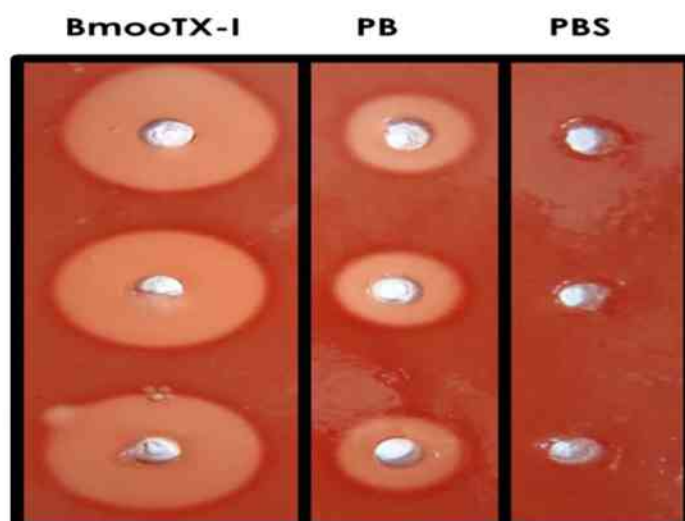


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes para a estimativa da massa molecular da BmooTX-I. 1 – Padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000 Da), albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da) e α -lactoalbumina (14.400 Da); 2 – BmooTX-I reduzida; 3- BmooTX-I não reduzida.

5.1.1. Atividade Hemolítica Indireta

A BmooTX-I demonstrou claramente uma atividade fosfolipásica A_2 superior a peçonha bruta (Fig. 11A e 11B).

A



B

BmooTX-I	PB	PBS
21 mm	15 mm	0
21 mm	15 mm	0
23 mm	14 mm	0

Figura 11: Atividade hemolítica indireta da peçonha bruta e da enzima BmooTX-I. (A) Halos formados ao redor dos orifícios relacionados às amostras de BmooTX-I, Peçonha Bruta e PBS. (B) Tamanho dos halos formados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2. Função Renal

5.2.1. Concentração de marcadores bioquímicos renais no plasma

Os danos renais causados pela administração de 10 µg de BmooTX-I foram avaliados pela determinação da concentração plasmática de ureia, creatinina e ácido úrico nos animais testes após a injeção intraperitoneal da enzima. Os resultados mostraram que a concentração de ureia no plasma reduziu após 6 horas e se elevou 24 horas após a administração da

BmooTX-I (Fig. 12A), enquanto que a concentração de creatinina foi reduzida após 6 horas (Fig. 12B). Já a concentração do ácido úrico no plasma elevou-se após 24 horas da injeção da enzima (Fig. 12C).

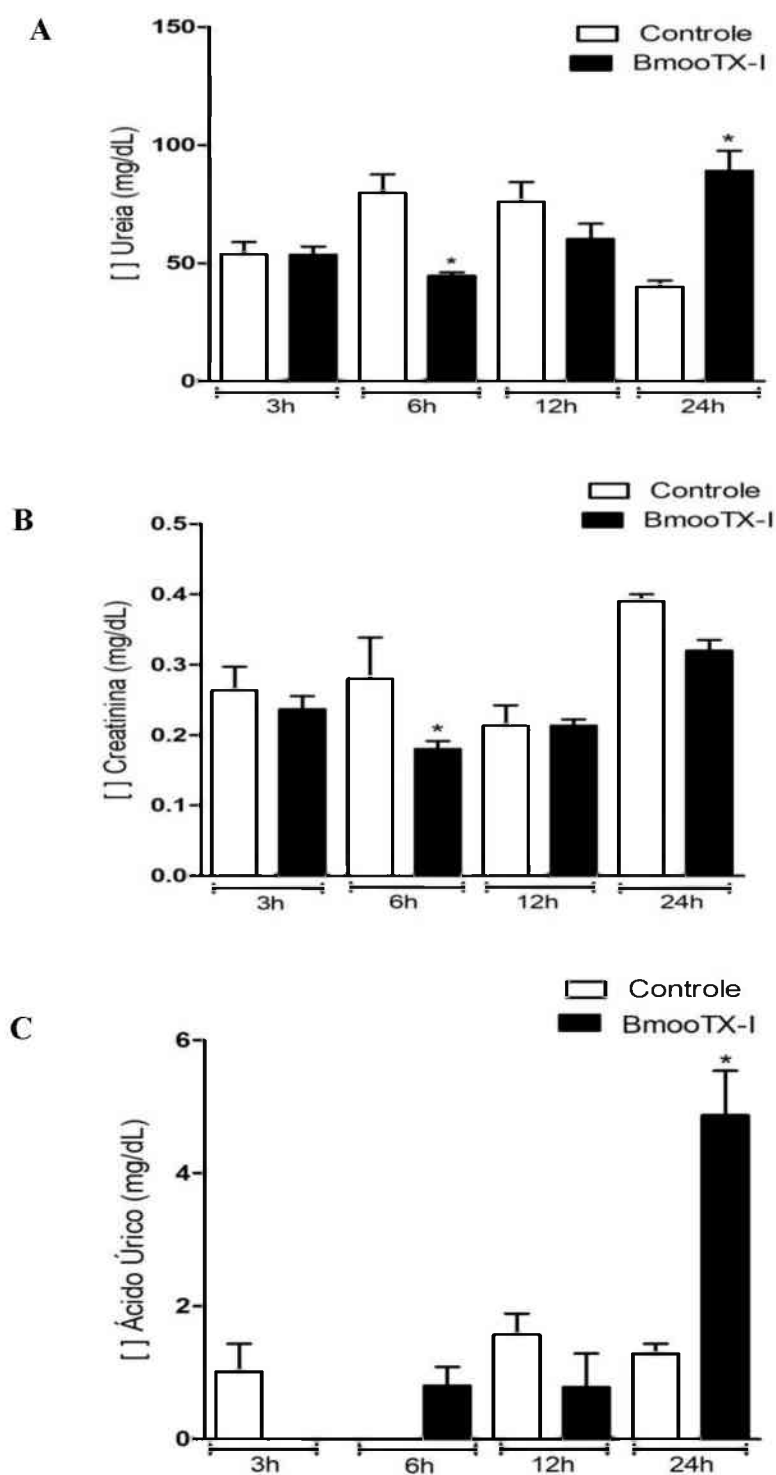


Figura 12: Parâmetros bioquímicos relacionados à função renal. Variação da concentração plasmática da ureia (A), creatinina (B) e ácido úrico (C) expressas em mg/dL.

* Variação estatisticamente significativa.

5.2.2. Parâmetros físico-químicos da urina

As tabelas 1 e 2 mostram os parâmetros urinários físicos e químicos depois da injeção nos camundongos com 100 μ L de solução salina (controle) ou com 10 μ g (diluídas em 100 μ L) de BmooTX-I, respectivamente. Após 24 horas, foi observada poliúria nos animais que receberam a enzima quando comparados aos animais controle (Tab. 1). Entretanto, a densidade da urina em ambos os grupos, em todos os tempos, não apresentou alteração significativa (Tab. 1). Em contraste, ao longo do tempo, a cor da urina dos animais que receberam a enzima assumiu um padrão que variou de amarelo escuro a âmbar (Tab. 1), quando comparado à cor da urina dos animais controle.

Tabela 1. Parâmetros físicos da urina dos camundongos.

Parâmetros	Controle				BmooTX-I			
	3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo escuro	Amarelo	Amarelo	Amarelo escuro	Âmbar
Volume (mL)	4,4	2,1	7,2	7,4	10	3,5	5,5	17,7
Volume final (mL)			21,1				36,5	
Densidade	1,010	1,030	1,025	1,030	1,010	1,030	1,025	1,015

Os resultados semiquantitativos dos parâmetros químicos: sangue, glicose, proteína, urobilinogênio, bilirrubina, corpos cetônicos, nitrito, leucócitos e pH, após a administração da BmooTX-I e/ou solução salina, estão apresentados na tabela 2.

Ao comparar os resultados do controle negativo com os resultados dos testes é observado um quadro de hematúria. Essa condição de sangue na urina foi vista em todos os tempos de tratamento com a enzima (3, 6, 12 e 24 horas) (Tab. 2).

Com relação ao parâmetro glicose, detectou-se a presença dessa biomolécula na urina com 50 mg/dL nos tempos de 3 e 12 horas e 100 mg/dL após 24 horas da administração da PLA₂. Já no tempo de 6 horas, a concentração de glicose permaneceu normal.

Proteína foi outro parâmetro analisado. A proteinúria foi observada nos tempos de 6 e 12 horas após injeção da enzima elevando-se até o final do experimento (100 mg/dL) (Tab. 2).

Tabela 2. Parâmetros químicos da urina dos camundongos

Parâmetros	Controle				BmooTX-I			
	3h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24h
Sangue	-	-	-	-	+	+	+	+
Glicose (mg/dL)	-	-	-	-	50	N	50	100
Proteína (mg/dL)	T	T	T	T	T	30	30	100
Urobilinogênio (U/L)	N	N	N	N	N	N	N	N
Bilirrubina	-	-	-	-	-	+	++	+
Corpos cetônicos	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito	-	-	-	-	+	+	+	+
Leucócitos	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,0	6,0	6,5

T = traços; N = normal

O metabólito bilirrubina foi detectado no grupo tratado após 6, 12 e 24 horas da inoculação da enzima. No tempo de 12 horas, a presença de bilirrubina foi mais intensa (++), enquanto que nos tempos de 6 e 24 horas sua presença foi um pouco menor (-) (tabela 2).

A presença de nitrito foi observada em todos os tempos após a administração da BmooTX-I (Tab. 2). Para o valor de pH, foi observada no grupo tratado pequena redução da concentração de íons H^+ , 3 e 24 horas após a injeção (Tab. 2).

Os demais parâmetros como urobilinogênio, corpos cetônicos e leucócitos não sofreram modificação pela fita reativa (Tab. 2).

5.4. Função Hepática

Os seguintes parâmetros hepáticos ALT, FAL e γ -GT foram avaliados no plasma dos animais inoculados com 10 μ g de BmooTX-I. Foi observado uma redução plasmática de ALT após 6 e 12 horas da injeção intraperitoneal da enzima (Fig. 13A). Em contrapartida, a concentração de γ -GT não foi alterada significativamente, quando comparada aos controles (Fig. 13B). A FAL elevou-se após 6 e 24 horas da injeção de BmooTX-I (Fig. 13C).

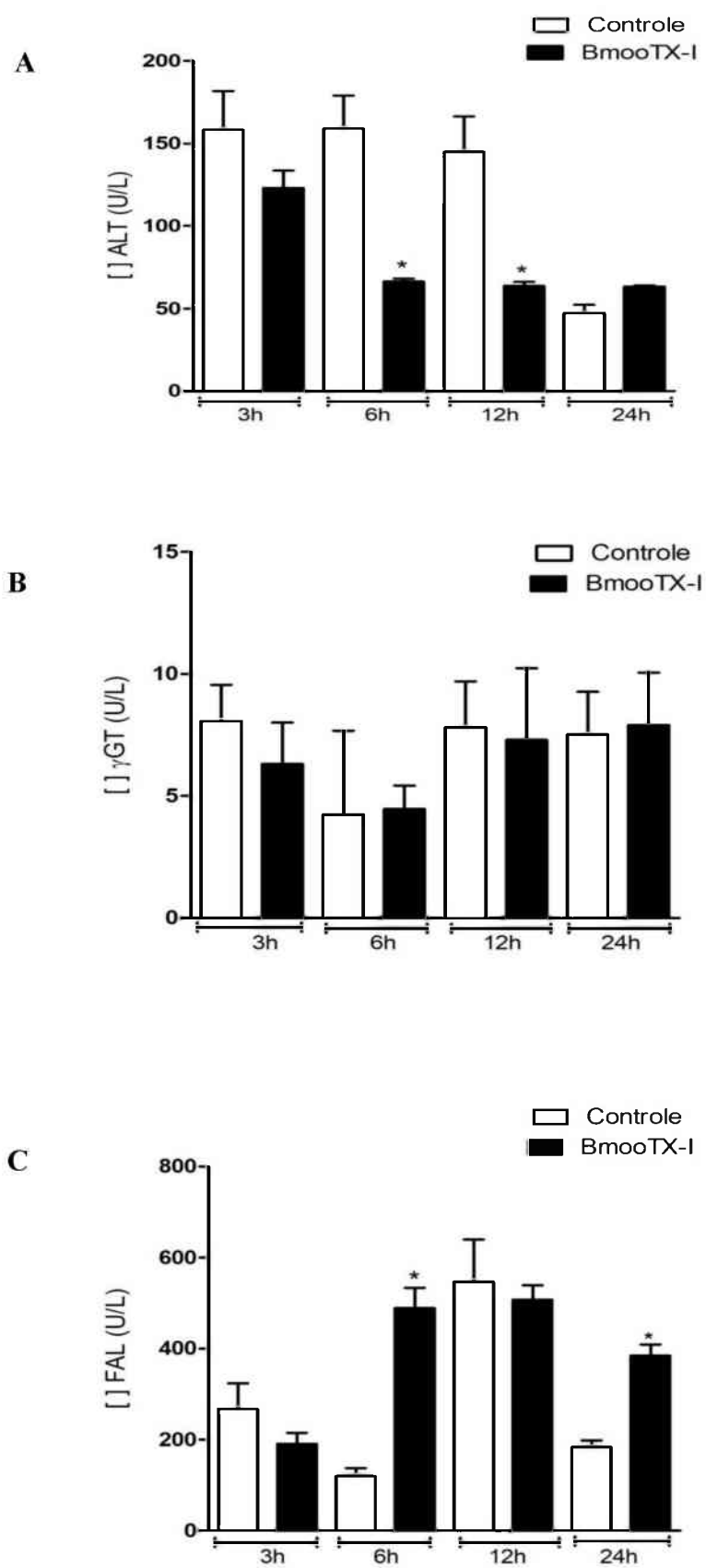


Figura 13: Parâmetros bioquímicos relacionados à função hepática. Variação da ALT (A), γ -GT (B) e FAL (C) expressas em U/L.

* Variação estatisticamente significativa.

5.5. Dano Muscular

As concentrações de CK e lactato enzimático foram usadas como marcadores de dano muscular. A concentração plasmática de CK aumentou nos animais após 3 horas da injeção com 10 μg de BmooTX-I (Fig. 14A), enquanto que a concentração de lactato diminuiu após 24 horas da administração com a mesma quantidade da enzima (Fig. 14B).

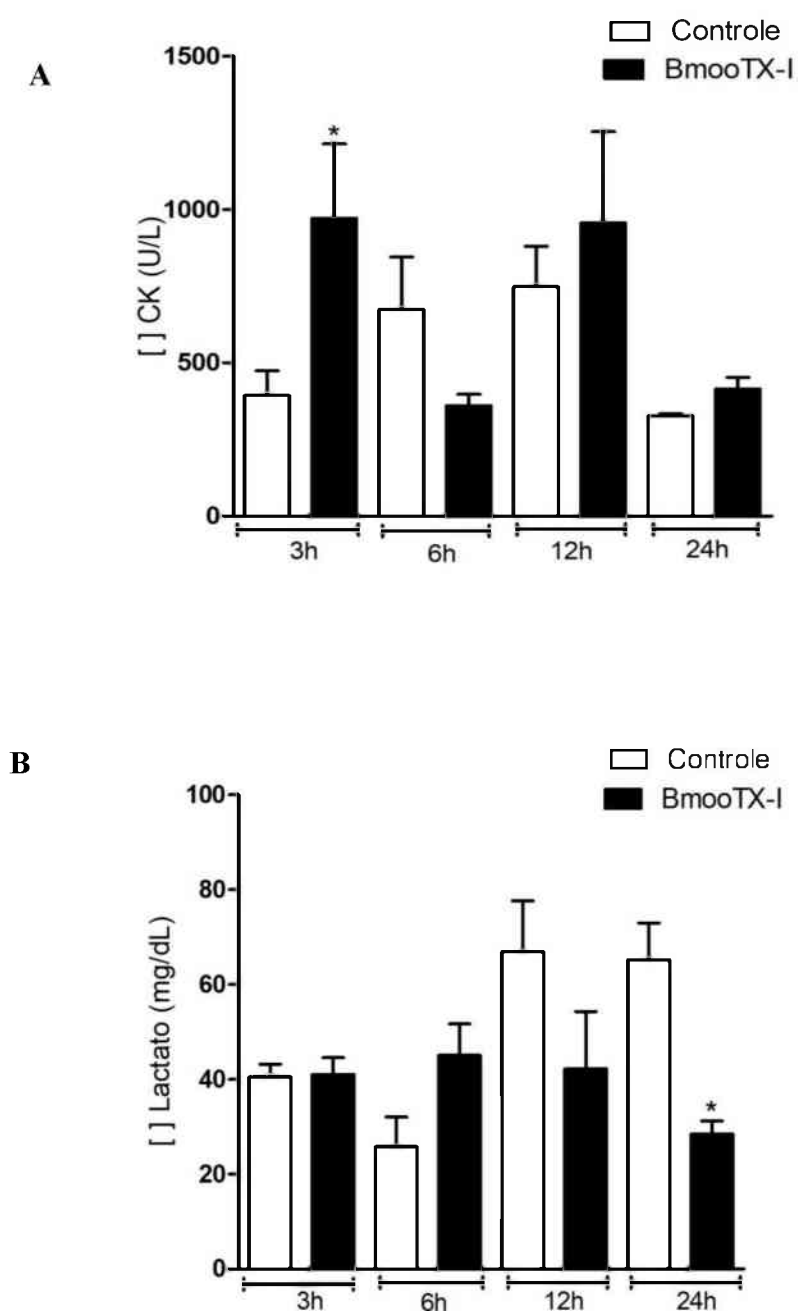


Figura 14: Parâmetros bioquímicos relacionados ao dano muscular. Variação da concentração plasmática da CK (A) e do lactato (B) expressas em mg/dL.

* Variação estatisticamente significativa.

5.6. Função Pancreática

A análise das concentrações plasmáticas da amilase e glicose foi usada como indicadores de dano pancreático. A concentração de amilase não sofreu alteração significativa no plasma dos camundongos que receberam a injeção de 10 μ g da enzima (Fig. 15A). Por outro lado, a concentração de glicose sofreu um aumento após 6 horas da injeção, quando comparado com os animais controle (Fig. 15B).

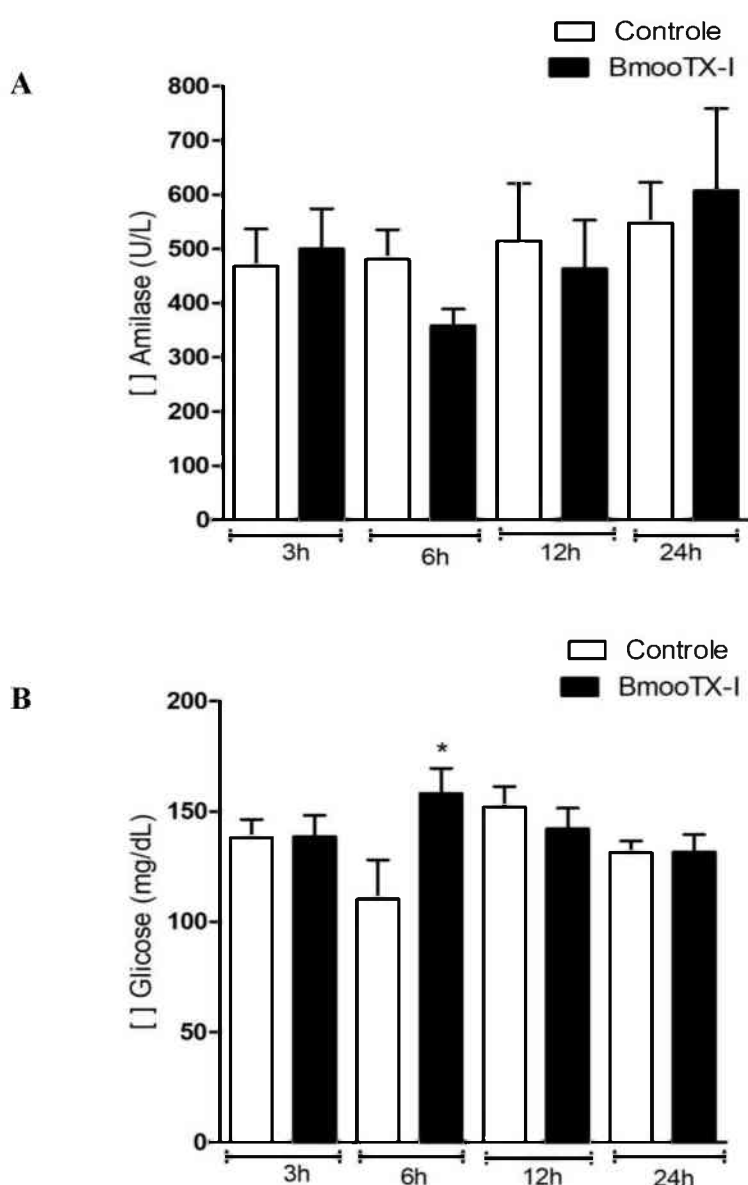


Figura 15: Parâmetros bioquímicos relacionados à função pancreática. Variação da concentração plasmática da amilase (A) e da glicose (B) expressas em mg/dL.

* Variação estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

A serpente *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caíçaca, é encontrada principalmente nas regiões Sudeste e Central do Brasil, sendo responsável pela maioria dos envenenamentos ofídicos notificados em Minas Gerais (SILVA et al., 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações sistêmicas induzidas por uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha da serpente *B. moojeni*.

A PLA₂, denominada BmooTX-I, foi purificada de acordo com Santos-Filho et al. (2008), com algumas modificações. Cerca de 400 mg da peçonha bruta foram aplicados em uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel), seguida por uma cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). Quando analisada por SDS-PAGE, a enzima BmooTX-I apresentou banda única com massa molecular aparente de 15kDa, tanto na presença como na ausência de agentes redutores (Fig. 10).

A atividade fosfolipásica A₂ da enzima BmooTX-I foi testada pelo método da atividade hemolítica indireta, onde a formação de um halo é o indicativo de atividade. Comparando-se o diâmetro dos halos formados (BmooTX-I e peçonha bruta) com o controle conclui-se com clareza que a enzima possui uma elevada atividade fosfolipásica (Fig. 11), corroborando com os resultados de Santos-Filho et al. (2008).

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados clinicamente por efeitos locais e sistêmicos (GUTIÉRREZ et al., 2009a, 2009b; WARRELL, 2004). No envenenamento por essas serpentes, as PLA₂s influenciam direta ou indiretamente em seu efeito fisiopatológico. Sabe-se que além do processo de digestão da presa, essas enzimas também estão envolvidas em diversos efeitos farmacológicos, tais como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, hemorragia, hipotensão, inibição da agregação plaquetária, incoagulabilidade sanguínea e inflamação (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; OLIVEIRA et al, 2008).

Para a avaliação dos efeitos sistêmicos causados pela enzima BmooTX-I, foram utilizados camundongos machos *Swiss* que foram divididos em dois grupos (grupo teste e grupo controle) em quatro tempos (3, 6, 12 e 24 horas). No grupo teste, foram inoculados 10 µg da enzima diluída em 100 µL de solução salina, enquanto os animais controle receberam o mesmo volume (100 µL) de salina estéril.

A toxicidade renal é uma condição comum em envenenamentos por serpentes botrópicas (BARBOSA et al., 2002; BOER-LIMA et al., 2002; LINARDI et al., 2011). O exame de urina é fundamental para a determinação de caracteres físicos e químicos presentes

nesta solução. A urinálise é um método muito eficiente para a detecção da presença de hemácia, proteína, glicose, bilirrubina, leucócitos, corpos cetônicos, além da análise da coloração e do pH (AMARAL, 1986; MOTTA, 2009).

No geral, a presença de proteínas e eritrócitos é frequente em acidentes ofídicos (SITPRIJA, 2006). Nossos resultados mostraram que os animais tratados com a enzima BmooTX-I apresentaram um quadro de hematúria e proteinúria. Este fato corrobora com a hipótese de que as peçonhas de serpentes são capazes de causar danos à cápsula glomerular (cápsula de *Bowman*), no néfron. Esta estrutura é responsável pela ultrafiltração, ou seja, pela passagem seletiva de pequenas moléculas, água ou íons (MOTTA, 2009). Tal fato poderia explicar a presença anormal de moléculas maiores como, proteína e sangue na urina.

De acordo com os resultados apresentados, foram estabelecidos quadros de poliúria e glicosúria nos animais inoculados com a enzima (Tab. 1 e Tab. 2). A BmooTX-I sendo uma PLA₂ Asp49, e por isso, capaz de hidrolisar fosfolipídios de membrana liberando ácido araquidônico, precursor de importantes mediadores da inflamação, como exemplo as prostaglandinas. Dessa forma, as prostaglandinas promovem vasodilatação, um efeito capaz de interferir com a hemodinâmica, podendo resultar em um aumento da taxa de filtração glomerular e fluxo sanguíneo nos rins (SANTOS; FARANI; ROCHA, 2009), com consequente poliúria. O aumento da quantidade de fluido eliminado pela urina pode estar relacionado com hiperglicemia e, consequentemente, com a glicosúria (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

Em termos de fisiologia, a presença de glicose na urina não é uma condição normal tendo em vista que este metabólito deve ser reabsorvido em uma porção do néfron, conhecida como túbulo contorcido proximal. A BmooTX-I possui ação miotóxica (SANTOS-FILHO et al., 2008) e existem vários estudos que relacionam miotoxinas de serpentes com nefropatia. A ação dessas toxinas ocorre diretamente em estruturas tubulares, o que pode prejudicar seu funcionamento (SITPRIJA, 2006). Outro fato que corrobora com a glicosúria nos animais deste estudo é a hiperglicemia. Uma vez que a alta concentração de glicose no plasma ultrapassou a capacidade de reabsorção, tal excesso é eliminado na urina (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

A modificação da coloração da urina foi outro resultado demonstrado no presente trabalho (Tab. 1). A cor amarela, observada inicialmente, passou de um amarelo escuro para âmbar ao longo do experimento. Podemos sugerir a relação do escurecimento da urina com o aparecimento da bilirrubina, pigmento fisiológico de coloração amarela, a partir de 6 horas após a administração da enzima (Tab. 2). A determinação deste metabólito é clinicamente

importante para o diagnóstico e tratamento de possíveis desordens hematológicas e hepatobiliares (FEVERY, 2008; HIGGINS et al., 2012; DEVGUN et al., 2015; DHUNGANA, MORRIS, KRASOWSKI, 2017).

O nitrito é um metabólito que geralmente está presente na urina de pacientes portadores de infecção urinária. Segundo Motta (2003), o nitrato oriundo da alimentação é excretado juntamente com a urina. Em quadros de infecção urinária ocasionada por bactérias Gram negativas, o nitrato é convertido em nitrito. Nossos resultados mostraram a presença de nitrito na urina dos animais inoculados com a enzima em todos os tempos de experimento (Tab. 2). É possível dizer que a presença de nitrito na urina é uma prova, mesmo que indireta, para o diagnóstico precoce de bacteriúria (SATO et al., 2005). Os demais parâmetros urinários analisados: urobilinogênio, corpos cetônicos e leucócitos não apresentaram alteração após a inoculação da enzima BmooTX-I (Tab. 2).

Dentro do contexto de função renal é possível a avaliação do funcionamento dos rins através da quantificação plasmática de compostos nitrogenados como ureia, creatinina e ácido úrico. A ureia é um composto nitrogenado sintetizado no fígado a partir da hidrólise de proteínas e catabolismo dos aminoácidos, de forma que o íon amônio formado a partir do grupo amino destes aminoácidos é convertido em ureia por um ciclo enzimático conhecido como Ciclo da Ureia. Dessa forma, a ureia é transportada via corrente sanguínea até os rins para ser excretada na urina em animais ureotélicos (SODRE et al., 2007; NELSON e COX, 2014), representados aqui por camundongos. Os resultados mostraram uma diminuição significativa de ureia após 6 horas da administração de BmooTX-I (Fig. 12A). No entanto, este parâmetro aumentou após 24 horas, o que nos leva a acreditar em um efeito tardio da toxina, dificultando a filtração glomerular que, por sua vez, compromete a excreção de ureia pelos rins. Outro parâmetro bioquímico utilizado como marcador da função renal é a creatinina, produto formado constantemente no organismo a partir da desidratação de (fosfo) creatina. De acordo com Sodre et al. (2007), o aumento da concentração plasmática de creatinina está associado a danos nos néfrons. No entanto, nossos resultados mostraram diminuição significativa de creatinina após 6h da administração da enzima BmooTX-I (Fig. 12B).

O ácido úrico é o produto do catabolismo de purinas. Níveis altos de ácido úrico no sangue (hiperuricemia) podem ser causados pela sua produção excessiva ou por eliminação deficiente. A maior parte do ácido úrico, originado a partir da degradação de purinas, é excretado na urina, portanto, a hiperuricemia pode estar relacionada a problemas na filtração glomerular, excretando menos ácido úrico e, portanto, aumentando os níveis plasmáticos

deste metabólito, o que pode estar associado à alterações renais e, até mesmo, à insuficiência renal (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008). Assim como a concentração de ureia, os resultados mostraram aumento significativo de ácido úrico após 24 horas da administração da enzima BmooTX-I (Fig. 12C). Esses achados corroboram com a hipótese de insuficiência renal aguda (IRA), a partir de 24 horas da administração da enzima.

A IRA é a principal responsável pela mortalidade nos envenenamentos, mesmo submetendo os pacientes à terapia antiofídica. Embora o soro antiofídico melhore o quadro clínico dos pacientes, não é capaz de prevenir uma possível condição de insuficiência renal (AMARAL et al., 1985). De acordo com a literatura, a IRA é iniciada, principalmente, pela ação de proteases e miotoxinas presentes nas peçonhas (BARBOSA et al., 2002; BOERLIMA; GONTIJO; CRUZ-HOFING, 2012). A IRA, muitas vezes reversível, é caracterizada por uma diminuição súbita da capacidade de filtração dos rins e, portanto, da função renal, acompanhada do aumento plasmático (horas, dias ou semanas) de compostos nitrogenados, como a ureia (SCHRIER et al., 2004; SITPRIJA, 2006; KONDA et al., 2016). Portanto, sabendo-se que a enzima BmooTX-I apresenta ação miotóxica e que houve uma elevação plasmática tardia de ureia, provavelmente, o quadro de IRA iniciou-se após 24 horas da administração da toxina.

A toxicidade hepática, com concomitante inflamação e necrose, está associada à liberação de marcadores enzimáticos para o sangue, devido a alterações nas células e à maior permeabilidade da membrana celular (TALWER; SCRIVASTAVA; MOUDGIL, 1989; SOUZA et al., 2012). Nesse contexto, a função hepática pode ser analisada pela determinação dos níveis plasmáticos de enzimas presentes nas células do fígado que são liberadas para o sangue em situações de injúria hepática (MATTOS e DANTAS, 2001).

Peçonhas ofídicas, inclusive do gênero *Bothrops*, podem causar sérios danos hepáticos, geralmente resultando na liberação de enzimas como alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT) (MOHAMED et al., 1981; SHASHIDHARAMURTHY et al., 2010; SOUZA et al., 2012) do meio intracelular para o plasma sanguíneo. ALT é um marcador de lesão hepática encontrado fundamentalmente nos hepatócitos. No dano hepático, a elevação desta transaminase no sangue está associada à maior permeabilidade da membrana ou à degradação celular (ABDEL MONEIM et al., 2013; TOHAMY et al., 2014). A ruptura membranar dos hepatócitos, muito provavelmente, está associada às fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas, pois estas hidrolisam glicerofosfolipídeos de membrana (MUKERJEE e MAITY, 1998). No entanto, de acordo com os resultados, houve diminuição significativa de ALT no plasma após 6 e 12 horas da

administração da enzima BmooTX-I (Fig. 13A). Esses resultados sugerem que a enzima BmooTX-I não causa dano aos hepatócitos via ALT. A enzima γ -GT é um marcador bioquímico de lesões hepáticas inflamatórias e, portanto, encontra-se em altas concentrações quando há danos obstrutivos da via biliar (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008). De acordo com nossos resultados, não houve alteração significativa nos níveis plasmáticos de γ -GT após a administração da enzima BmooTX-I (Fig. 13B). Por outro lado, houve aumento da concentração plasmática de fosfatase alcalina (FAL).

FAL é uma fosfomonohidrolase inespecífica que remove grupamentos fosfato de muitas moléculas em pH alcalino (HARRISON; RITCHIE, 1994). Tal enzima é sintetizada em vários tecidos, destacando os tecidos hepático e ósseo, sendo excretada pela bile. Nossos resultados mostraram que houve aumento significativo dos níveis plasmáticos de FAL após 6 e 24 horas da administração da enzima BmooTX-I (Fig. 13C). Sabendo-se que a FAL é marcador bioquímico de alterações hepatobiliares e que somente a sua concentração aumentou no plasma, quando comparada às concentrações de ALT e γ -GT, sugere-se que a BmooTX-I foi capaz de induzir disfunções hepatobiliares, com possível colestase, tendo em vista que a FAL está presente em altas concentrações nas membranas que envolvem o canalículo biliar (KANAAN et al., 2014). Portanto, provavelmente, houve comprometimento no transporte da bile entre os hepatócitos e o intestino, de forma que a bilirrubina, resultante da destruição de hemácias senis ou alteradas, concentra-se em níveis elevados no sangue e, consequentemente, aparece na urina (Tab. 2).

A creatina quinase (CK), cuja principal atividade é encontrada em tecidos musculares, é uma enzima que catalisa a reação reversível entre creatina e fosfocreatina, utilizando ou sintetizando ATP de acordo com as necessidades energéticas musculares. Desta forma, quando há demanda de energia no músculo, o grupamento fosfato da fosfocreatina é utilizado na síntese de ATP. Na situação inversa, o fosfato do ATP fosforila a creatina, resultando, portanto, na fosfocreatina (GONZÁLEZ e SILVA, 2006; NELSON e COX, 2014). No acidente botrópico, ocorre graves danos musculares, especialmente nas primeiras horas após o envenenamento. Muito provavelmente, as lesões no músculo estão relacionadas às atividades de proteases e PLA₂ miotóxicas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops* (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; GAY et al., 2005). A enzima CK é um importante marcador de injúria muscular, pois se encontra em níveis elevados no plasma nestas condições, tendo em vista o seu extravasamento do meio intracelular (células musculares) para o meio extracelular (sangue). Nossos resultados mostraram altas concentrações plasmáticas de CK nas primeiras horas (3 horas) (Fig. 14A) após a administração da BmooTX-I. Esses achados entram em

acordo com dados da literatura sobre os danos musculares causados pela peçonha de *B. moojeni* quando administrada em animais (QUEIROZ et al., 2014). Segundo Santos-Filho (2008), análises ópticas e de microscopia eletrônica revelaram que a BmooTX-I foi capaz de causar mionecrose severa acompanhada de infiltrado inflamatório. As fibras do músculo gastrocnêmio foram extensivamente destruídas apresentando diferentes estágios de degeneração e edema.

Por outro lado, houve diminuição dos níveis de lactato no plasma 24 horas após injeção da enzima BmooTX-I (Fig. 14B). O ácido láctico também é um marcador de lesões musculares (BAPTISTELLA, 2009). O músculo esquelético é um dos principais responsáveis pela formação de lactato. Este é formado a partir do piruvato (produto final da glicólise) na ausência de oxigênio (via anaeróbica). Neste contexto, os resultados mostraram o decréscimo plasmático de lactato, que nos leva a sugerir que a enzima BmooTX-I não foi capaz de desencadear hipóxia, ou seja, o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o aporte de oxigênio tecidual permaneceu dentro da normalidade. Corroborando com estes resultados, destaca-se a gliconeogênese, via anabólica pela qual o lactato é convertido em glicose no fígado, o que pode também explicar a diminuição deste metabólito no plasma.

Para a avaliação da função pancreática foram quantificadas as concentrações da amilase e glicose no plasma dos animais. Nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa de amilase (Fig. 15A). Entretanto, a glicose aumentou de forma significativa no plasma dos animais inoculados intraperitonealmente com a enzima após o tempo de 6 horas (Fig. 15B). A hiperglicemia pode ser explicada por uma possível interferência com a síntese ou secreção de insulina por meio do pâncreas ou, possivelmente, por falhas no reconhecimento deste hormônio pelos seus receptores. Em ambas as situações, a absorção de glicose pela célula é prejudicada, o que significa diminuição intracelular de glicose resultando em aumento da concentração plasmática deste metabólito. Nossos resultados entram em acordo com a glicosúria observada nos animais testes, uma vez que o aumento da concentração de glicose no sangue resulta em um aumento de glicose na urina (LERCO et al., 2003).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu a purificação de BmooTX-I, uma PLA₂ isolada da peçonha da serpente *B. moojeni*, a qual foi denominada de BmooTX-I. Os resultados demonstraram a capacidade dessa enzima de alterar parâmetros bioquímicos tanto da urina quanto do plasma de camundongos *Swiss*. Essas alterações corroboram com os efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e miotóxicos causados por acidentes botrópicos descritos na literatura. Sendo assim, esta toxina desperta interesse médico-científico, tendo em vista a possibilidade de síntese de inibidores específicos, cuja utilização pode ser uma ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para diversas patologias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A. E.; OTHMAN, M. S.; MOHMOUD, S. M.; EL-DEIB, K. M. Pomegranate peel attenuates aluminum-induced hepatorenal toxicity. **Toxicol Mech Methods**, v. 23 (8), p. 624–633, 2013.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Ver Inst Med Trop**, v. 28, p. 220-227, 1985.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 175-199, 2002.
- ÁNGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; SOARES, A. M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys 49 phospholipase A₂ homologues are reduced but not abolished, by a pH – induced dissociation. **Toxicon**, v. 46, p. 291-296, 2005.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTA-LÚCIA, M.; CABRAL, R. F. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HENRING, S. E. Envenomation caused by poisonous animals: Poisonous snakes. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BAPTISTELLA, M. F. **Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatinina e lactato desidrogenase em equinos submetidos a diferentes intensidades de exercícios**. Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente. Vol. XII, n.13, p. 33-42, 2009.
- BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACÓ, P. E.; SOUSA, T.; BEZERRA, I. S. A.; FONTELES, M.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, 40, p. 1427–1435, 2002.
- BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Assessment of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 583-593, 2003.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Brazilian reptiles – List of species. Version 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 28 abr. 2017.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 7-16, 2003.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, p. 217–222, 2002.

BUCARETCHI, F.; HYLOP, S.; VIEIRA, R. J.; TOLEDO, A. S.; MADUREIRA, P. R.; CAPITANI, E. M. B. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 48, p.141-145, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes por Animais Peçonhentos. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. v. 816 p. 39, 2009.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. Brasil 2014. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/animais-peconhentos-serpentes>> Acessado em: 20/09/2016.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Fundamentos de química clínica**. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CARDOSO, A. M. S. C.; GONÇALVES, H. A.; CARDOSO, M. A. B. **Ciências da escola para a vida**. Belo Horizonte: Editora Lê, p.123-5, 1996.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2003.

CAVALLI, V. L. L. O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; ROMAN-JÚNIOR, R. W. A. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). **Rev Bras Farmacogn**, v.17(1), p. 64-70, 2007.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2ª Edição. Porto Alegre: ARTMED, p. 53-66, 1996.

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

COSTA, H. C.; PANTOJA, D. L.; PONTES, J. L.; FEIO, R. N. Serpentes do Município de Viçosa, Mata Atlântica do Sudeste do Brasil. **Biota Neotrop**, v. 10(3), p. 353-377, 2010.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 924-929, 1988.

DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; SAMPEDRO, A. M.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54, p. 21-30, 1992.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SNATI-GADELHA, T.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B. S. Cristal structural of Bn IV in complex with myristic acid: A Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, p. 513-518, 2011.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, v. 269(18), p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.

DEVGUN, M.S.; CHAN, M.K.; EL-NUJUMI, A.M.; ABARA, R.; ARMBRUSTER, D.; ADELI, K. Clinical decision limits for interpretation of direct bilirubin--a CALIPER study of healthy multiethnic children and case report reviews. **Clin Biochem**, v. 48 (1–2), p. 93–96, 2015.

DHUNGANA, N.; MORRIS, C.; KRASOWSKI, M. D. Operational impact of using a vanadate oxidase method for direct bilirubin measurements at an academic medical center clinical laboratory. **Practical Laboratory Medicine**, v. 8, p. 77–85, 2017.

FEVERY, J. Bilirubin in clinical practice: a review. **Liver Int**, v. 28 (5), p. 592–605, 2008.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Revista Brasileira Cineantropom**, v. 9, n.1, p. 101-106, 2007.

FRANCO, F. L. **Serpentes da região de Botucatu**. Monografia (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 1986.

FREY-VOGEL, T. A.; PERRET, B. A. Notes on toxicology. **Experientia**, v. 29, p. 1137-1452, 1973.

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnostico e tratamento por animais peçonhentos**. Ministério da Saúde. p.120, 2001.

GAY, C. C.; LEIVA, L. C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. (2005) Proteolytic, Vedematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 546–554, 2005.

GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; DE OLIVEIRA, F.; DE ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 24-32, 2009.

GOMES, M. S. R.; DE QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; DE OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 153, p. 290-300, 2011.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Perfil Bioquímico no Exercício. In: **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

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

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

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: **Kini, R.M. (Ed.), Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function, and Mechanism.** John Wiley and Sons, England, p. 321–352, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antiveno produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411-413, 1988.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** 11ª Edição. São Paulo: Elsevier, 2006.

HARRISON, G. J.; RITCHIE, B. W. Making distinctions in the physical examination. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Ed). **Avian medicine: applications and principle.** Lake Worth: Wingers Publishing, p. 144-175, 1994.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia.** 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 28, p. 540-541, 2004.

HIGGINS, T.; ECKFELDT, J. H.; BARTON, J. C.; DOUMAS, B. T. Hemoglobin, iron, and bilirubin. C.A. BURTIS, E.R. ASHWOOD, D.E. BRUNS (Eds.), **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, p. 1016–1030, 2012.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Ass Med Bras**, v. 36, p. 66-77, 1990.

KANNAN, M.; MUTHUSAMY, P.; VENKATACHALAM, U. Response of synthetic pyrethroid cypermethrin (10% EC) induced stress in biochemical and hematological parameters of Indian major carp *Catla catla* (Hamilton, 1822). **World J Pharma Res**, v. 3(4), p. 1976-1996, 2014.

KNI, R. M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzie. In: **R. M. Kini (Ed), venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**, Wiley, Chichester, p. 1-28, 1997.

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

KONDA, V. R.; ARUNACHALAM, R.; EERIKE, M.; RAO-K, R.; ARUN KUMAR RADHAKRISHNAN, A. K.; RAGHURAMAN, L. P.; METI, V.; DEVI, S. Nephroprotective effect of ethanolic extract of *Azima tetraacantha* root in glycerol induced acute renal failure in Wistar albino rats. **J Tradit Complement Med**, v. 6, p. 347-354, 2016.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido por Aloxa em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18(2):132-42, 2003.

LINARDI, A.; ROCHA E SILVA, T. A.; MIYABARA, E. H.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; CARDOSO, K. C.; BOER, P. A.; et al. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta - Gen. Subj.** 1810, p. 895–906, 2011.

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

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520-30, 2012.

MAMEDE, C. C. N.; SOUSA, B. B.; PEREIRA, D. F. C.; , MATIAS, M. S.; QUEIROZ, M. R.; MORAIS, N. C. G.; et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37-55, 2016.

MATTOS, A.; DANTAS, W. **Compêndio de Hepatologia**. São Paulo: Fundação BYK, p. 919, 2001.

MELLO, S. M.; LINARDI, A.; RENNO, A. L.; TARSITANO, C. A.; PEREIRA, E. M.; HYSLOP, S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, v. 55, p. 470–480, 2010.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304-312, 2006.

MORALES, A. P.; MACIEL, R. N.; JORGE, F. S.; NETO, N. T. A.; CORDEIRO, D. C.; VIANA, M. A. S.; OLIVEIRA, C. J. L. Changes in serum creatinine, uric acid, creatine

kinase, and glomerular filtration rate in street runners. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 15(1), p. 71-78, 2013.

MOHAMED, A. H.; FOUAD, S.; EL-AASAR, S.; SALEM, A. M.; ABDEL-AAL, A.; HASSAN, A. A.; ZAHRAN, F.; ABBAS, N. Effects of several snake venoms on serum and tissue transaminases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase. **Toxicon**, v. 19, p. 605–609, 1981.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório – princípios e interpretações**. 4ª Edição. São Paulo: Robe Editorial, EDUCS e Editora Médica Missau, 2003.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MURAKAMI, M. T.; MELO, C. C.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ARNI, R. K. Structure of myotoxin-II, a catalytically inactive Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Atropoides nummifer* venom. **Acta Cryst**, v. 62, p. 423–426, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 5ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, C. Z.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M. An a type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, p. 1506–1514, 2008.

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistr**, v. 46, p. 12795-12809, 2007.

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

POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITSKY, A. H. & WELLS, K. D. **Herpetology**. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, p. 726, 2004.

PUORTO, G. Acidentes por cobras – I. Serpentes brasileiras de importância médica. In: **SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2ª Edição. São Paulo: Sarvier, p. 143-149, 1992.

QUACH, N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 90(4), p. 338-348, 2014.

QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; FONSECA, K. C.; DE MORAIS, N. C.; DE SOUSA, B. B.; SANTOS-FILHO, N. A.; BELETTI, M. E.; ARANTES, E. C.; STANZIOLA,

L.; DE OLIVEIRA, F. Rapid purification of a new PI class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity. **Biomed Res Int**, p. 1-12, 2014.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz**, v.13(1), p. 72-77, 2007.

RUEDA, A. Q. **Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A₂ isoladas da peçonha da serpente *Bothrops asper* do Panamá.** Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

SACHER, R. A.; MCPHERSON, R. A. **Widmann: Interpretação clínica dos exames laboratoriais.** 11ª Edição. São Paulo: Manole, p. 533-561, 2002.

SANDRIM, M. F. N.; PUORTO, G.; NARDI, R. Venomous snakes accidents: a study about conceptual mistakes in Science and Biology Brazilian textbooks. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 10(3), p. 281-298, 2005.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908–917, 2008.

SANTOS, M. F. L.; FARANI, M. C.; ROCHA, P. N. Acute kidney injury in *Bothrops* sp. and *Crotalus* sp. envenomation: critical review of the literature. **J Braz Nephrol**, v. 31(2), p. 132-138, 2009.

SANTOS, M. C.; MARTINS, M.; BOECHAT, A. L.; NETO, R. P. S.; OLIVEIRA, M. E. **Serpentes de Interesse Médico da Amazônia: Biologia, Venenos e Tratamento de Acidentes.** Manaus: UA/SESU, p. 70, 1995.

SATO, A. F.; SVIDZINSKI, A. E.; CONSOLARO, M. E. L.; BOER, C. G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 397-404, 2005.

SCHAEFFER, A. J. Infections of the urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr. ED, Wein AJ. **Campbell's Urology**, W.B.Saunders, 8ª Edição. p. 515-602, 2002.

SCHRIER, R.; WANG, W.; POOLE, B.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J Clin Invest**, v. 114, p. 5-14, 2004.

SHASHIDHARAMURTHY, R.; MAHADESWARASWAMY, Y. H.; RAGUPATHI, L.; VISHWANATH, B. S.; KEMPARAJU, K. Systemic pathological effects induced by cobra (*Naja naja*) venom from geographically distinct origins of Indian peninsula. **Exp Toxicol Pathol**, v. 62, p. 587-592, 2010.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A. et al. A prothrombin activator from *Bothrops*

erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369, p. 129-139, 2003.

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: < <http://www.portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animaispeconhentos>>. Acesso em: 31 mar. 2017.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy (review article). **Nephrology**, v. 11, p. 442–448, 2006.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; STÁBILI, R. G.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARANTES, E. C. Structural and funtional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from Bothrops moojeni snake plasma. **Europe PMC**, v. 302, p. 193–200, 2003.

SOARES, J. L. **Fundamentos de Biologia**. São Paulo: Scipione. v. 2, p. 332, 1998.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure – function relationship. **Curr Org Chem**, v. 8, p. 1677-1690, 2004a.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43(5), p. 329-337, 2007.

SOUZA, C. A. T.; KAYANO, A. M.; SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; KWASNIEWSKI, F. H.; ZAQUEO, K. D.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Local and systemic biochemical alterations induced by Bothrops atrox snake venom in mice. **J Venom Res**, v. 3, p. 28–34, 2012.

SWENSON, S.; MARKLAND JR., F. S. Snake venom fibrinogenolytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

TALWER, G. P.; SCRIVASTAVA, L. M.; MOUDGIL, K. D. **Textbook of Biochemistry and Human Biology**. 2ª Edição. Prentice Hall of Indian, New Delhi, 1989.

TICLI, F. K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L-aminoácido oxidase do veneno de Bothrops jararacussu e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida**. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

TOHAMY, A. A.; MOHAMED, A. F.; ABDEL-MONEIM, A. E.; DIAB, M. S. M. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 205–212, 2014.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys49 phospholipase A2 homologue from Bothrops pirajai venom. **Biochimie**, v. 82, p. 245–250, 2000.

TRUMP, B. F. Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of $[Ca^{2+}]$. **Mar Environ Res**, v. 42, p. 57-63, 1996.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 31, p. 59-70, 2000.

WARD, R. J.; AZEVEDO-JR, W. F.; ARNI, R. K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 36, p. 1623-1633, 1998.

WARREL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere Ithaca**, p. 709–761, 2004.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recente developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, v. 37, p. 1123-1129, 1999.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster *Lachesis muta*: (Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biol J Linnean Soc**, v. 62, p. 421-442, 1997.