André Lisboa Rennó

“PERFIL DA HEME-OXIGENASE, CICLO-OXIGENASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RINS DE RATOS TRATADOS COM PEÇONHA DE *Bothrops alternatus*”

CAMPINAS

UNICAMP

2010

André Lisboa Rennó

“PERFIL DA HEME-OXIGENASE, CICLO-OXIGENASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RINS DE RATOS TRATADOS COM PEÇONHA DE *Bothrops alternatus”*

Tese de mestrado apresentado à Pós-Graduação da Faculdades de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

UNICAMP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Rennó, André Lisboa

R295p "Perfil da heme-oxigenase, ciclo-oxigenase e superóxido dismutase em rins de ratos tratados com peçonha de ***Bothrops alternatus***" / André Lisboa Rennó. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Stephen Hyslop

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

Título em inglês : "Changes of Heme-oxygenase, cyclooxygenase and superoxide dismutase on kidney of rats treated by Bothrops alternatus"

Keywords:
- Bothrops
- Evenoming
- Renal acute faillure
- Enzymes

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Prof. Dr. José Francisco Figueiredo
Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Data da defesa: 16-08-2010

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

André Lisboa Rennó

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop
Professor (a) Doutor (a) José Francisco Figueiredo
Professor (a) Doutor (a) Paulo Pinto Joazeiro

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/08/2010

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo César e Virgínia, por sempre me incentivarem, educarem e por me darem todas as condições possíveis por estar onde estou.

À Claudia, por toda sua paciência, carinho e todo amor que tem me dado ao longo destes anos.

A toda minha família, principalmente aos meus avôs Elzo e César, e minhas avós Mirian e Joséfina.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

por me mostrar o caminho certo e por me dar força e sabedoria para concluir mais uma etapa e vitória em minha vida.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop,

pela oportunidade de realizar esse trabalho e por toda orientação neste projeto, sempre contribuindo com seu conhecimento científico. Sem sua orientação, nada disso seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em

Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, bem como ao coordenador Prof. Dr. Edson Antunes, pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos amigos Igor e Rafael por toda amizade e companheirismo conquistados ao longo desta jornada.

Aos amigos Ademir, Adriana, Alessandra, Bruna, Christiane, Daniel, Delano, Elionai, Lordes, as Marianas, Norma, Kiara, Raquel, Rafael, Sandro, Sam e Sueli, pelo companheirismo e pelas risadas nos momentos de folga.

A Carla, Gilberto e Fernando pela valiosa contribuição em alguns experimentos e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao José Ilton dos Santos, técnico do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Farmacologia, pela grandiosa ajuda em meus experimentos e por toda a nossa amizade e risadas.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Farmacologia, principalmente ao Miguel e a Denise, pelo cuidado e dedicação aos animais.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos animais que cederam suas vidas em benefício da pesquisa científica. Meu mais sincero respeito.

“Sabemos tão pouco do que estamos a fazer neste mundo, que eu me pergunto a mim próprio se a própria dúvida não está em dúvida”

Lord Byron

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas.....xv

Lista de figuras.....xvii

Lista de tabelas.....xx

RESUMO.....xxii

ABSTRACT.....xxiv

1- INTRODUÇÃO.....26

1.1- Acidente botrópico e peçonha de *Bothrops alternatus*.....27

1.1.1- Lesões locais e sistêmicas causadas pela peçonha botrópica.....28

1.1.2- Lesões renais causadas pela peçonha botrópica.....29

1.1.3- Peçonha de *Bothrops alternatus*.....30

1.2- Ciclo-oxigenase.....30

1.3- Heme-oxigenase.....34

1.4- Superóxido dismutase.....36

2- OBJETIVOS.....39

3- MATERIAIS e MÉTODOS.....41

3.1- Reagentes.....42

3.2- Animais.....42

3.3- Tratamento com a peçonha de *B. alternatus*.....42

3.4- Análise urinária.....43

3.4.1- Exame de urina I.....43

3.4.2- Quantificação protéica e perfil eletroforético.....43

3.4.3- Quantificação de creatinina.....44

3.5- Análise sangüínea.....44

3.5.1- Micro-hematócrito.....44

3.5.2- Atividade de transaminase pirúvica (ALT) e transaminase oxalacética (AST).....44

3.5.3- Atividade creatinoquinase-MB (CK-MB).....45

3.5.4- Creatinina sérica.....45

3.6- Medida de depuração renal.....45

3.7- Análise histopatológica.....45

3.7.1- Coloração com hematoxilina e eosina (HE).....46

3.7.2- Imuno-histoquímica.....46

3.8- Western blotting.....47

3.9- Atividades enzimáticas.....48

3.9.1- Heme-oxigenase.....48

3.9.2- Superóxido dismutase.....49

3.9.3- Catalase.....49

3.10- Avaliação da expressão gênica da HO e COX.....49

3.10.1- Preparo das amostras.....50

3.10.2- Desenho dos primers.....50

3.10.3- PCR-real time.....51

3.10.4- Análise dos dados do PCR-real time.....51

3.11- Análise estatística.....52

4- RESULTADOS.....53

4.1- Avaliação de alguns parâmetros sistêmicos.....54

4.2- Avaliação renal e urinária.....54

4.3- Análises histológicas.....58

4.4- Heme-oxigenase.....62

4.4.1- Expressão gênica.....62

4.4.2- Atividade enzimática.....63

4.4.3- Imuno-histoquímica.....64

4.5- Cu/Zn SOD e catalase.....64

4.5.1- Atividade enzimática.....64

4.6- Ciclo-oxigenase.....64

4.6.1- Expressão gênica da COX-1 e COX-2.....64

4.6.2- Expressão protéica da COX-2.....70

5- DISCUSSÃO.....76

5.1- Alterações morfológicas.....77

5.2- Alterações funcionais.....78

5.3- Alterações na expressão e/ou na atividade de enzimas chaves.....79

6- CONCLUSÕES.....82

7- REFERÊNCIAS.....84

8- APÊNDICE 1.....99

9- APÊNDICE 2.....109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	absorbância
ALT	transaminase pirúrica
AMPc	adenosina 5´-monofosfato cíclica
ANOVA	análise de variância
AST	transaminase oxalacética
CAT	catalase
CK-MB	creatinoquinase (isoforma cardíaca)
CO	monóxido de carbono
COX	ciclo-oxigenase
CrCl	depuração (*clearance*) de creatinina
DAB	diaminobenzidina
DP	D-prostanóides
EP	E-prostanóides
FP	F-prostanóides
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HE	hematoxilina e eosina
HO	heme-oxigenase
IP	I-prostanóides
IRA	insuficiência renal aguda
PGD	prostaglandina D
PGE	prostaglandina E
PGF	prostaglandina F
PGI_2	prostaciclina
SOD	superóxido dismutase
TBS	salina tamponada com Tris (*Tris-buffered saline*)
TBX	tromboxano
TP	T-prostanóides
U	unidade arbritária
Vu	volume urinário

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Principais mecanismos de lesões renais por envenenamento botrópico.....29

FIGURA 2 Mecanismo da produção de prostanóides mostrando o papel chave da COX.....32

FIGURA 3 Reação enzimática da heme com a HO e seus produtos.....33

FIGURA 4 Atividade plasmática de ALT, AST e CK-MB e a porcentagem do micro-hematócrito em ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....55

FIGURA 5 Perfil urinário de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....56

FIGURA 6 Perfil eletroforético da urina de rato controle e de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....57

FIGURA 7 Fotomicrografias de regiões corticais e medulares renais de ratos controles e de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....59

FIGURA 8 Expressão gênica da HO-1 e HO-2 em rins de ratos controles e tratados com peçonha de *B. alternatus*.....62

FIGURA 9 Atividade da HO em rim, córtex e medula de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....63

FIGURA 10 Detecção de HO-1 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....65

FIGURA 11 Atividade da Cu/Zn-SOD no rim, córtex e medula de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....67

FIGURA 12 Atividade da catalase no rim, córtex e medula de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....68

FIGURA 13 Expressão gênica da COX-1 e COX-2 em rins de ratos controles e tratados com peçonha de *B. alternatus*.....69

FIGURA 14 Expressão protéica da COX-2 renal em ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....70

FIGURA 15 Expressão de COX-1 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....72

FIGURA 16 Expressão de COX-2 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....73

FIGURA 17 Expressão de COX-2 por imuno-histoquímica em vasos renais de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....75

FIGURA S1 Análise histopatológica do tecido pulmonar de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....101

FIGURA S2 Análise histopatológica de bronquios de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....103

FIGURA S3 Análise histopatológica de coração de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....105

FIGURA S4 Análise histopatológica de fígado de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus*.....107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Seqüências dos primers utilizados na amplificação de genes pela técnica de PCR-real time.....51

TABELA 2 Exame de Urina I de ratos controles e tratados com peçonha de *B. alternatus*.....57

RESUMO

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* pode resultar em manifestações sitemicas que incluem coagulopatias, hemorragias internas, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda, sendo esta última a mais importante causa de morte após a picada. Neste trabalho, analisamos os aspectos morfofuncionais renais, além da expressão e/ou atividades da heme-oxigenase (HO), ciclo-oxigenase (COX) e superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) em ratos. Foi administrada uma dose única da peçonha *Bothrops alternatus* em ratos Wistar, e após diversos intervalos (1, 3, 6, 24, 48, 72 h e 7 e 15 dias pós-peçonha), foram coletados amostras de urina e os animais eutanasiados, com a coleta do tecido renal para os ensaios enzimáticos, análises de expressão gênica por PCR-real time e imunohistoquímica. A peçonha de *B. alternatus* causou oligúria, proteinúria, acidificação urinária, aumento da densidade e diminuição da depuração de creatinina; estas alterações foram proeminentes nas primeiras 24 horas pós-peçonha. Análises histológicas reveleram alterações morfológicas, como descamação tubular epitelial e microaneurismas glomerulares. Houve um aumento significativo da expressão gênica da COX-2 em 3 horas pós-peçonha, o que causou no aumento dos níveis de proteínas COX-2 observados no western blot e na imunohistoquímica; não houve mudanças significativas na expressão gênica da COX-1. A HO teve aumento em sua atividade no córtex e medula renal, sendo atribuída este aumento ao aumento da expressão da forma induzível HO-1, com pequenas mudanças da isoforma constitutiva HO-2. A Cu/Zn-SOD demonstrou um aumento da atividade no córtex renal. Estes resultados revelam que a peçonha *B. alternatus* afeta a função renal com mudanças na expressão/atividade de enzimas renais específicas. O aumento da expressão da HO-1 e da Cu/Zn-SOD pode estar associado a mecanismos de citoproteção no tecido renal, enquanto que o aumento da expressão da COX-2 pode estar ligado a respostas inflamatórias. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que os produtos da COX-2 poderiam ajudar também na manutenção do fluxo sanguíneo renal.

ABSTRACT

Envenoming by *Bothrops* snakes can result in systemic manifestations that include coagulopathy, internal hemorrhage, cardiovascular shock and acute renal failure, with the latter being the most important cause of death after such bites. In this work, we examined the changes in renal function and histology and the expression and/or activity of heme-oxygenase (HO), cyclooxygenase (COX) and superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) in rats. Male Wistar rats were injected with a single dose (0.8 mg/kg, i.v.) of *Bothrops alternatus* venom and at various intervals thereafter (1, 3, 6, 24, 48, and 72 h and 7 and 15 days post-venom) urine samples were collected and the rats then killed to provide renal tissue for enzymatic assays, analysis of gene expression by real time-PCR and immunohistochemistry. *Bothrops alternatus* venom caused oliguria, proteinuria, urine acidification, an increase in urine specific gravity and a decrease in creatinine clearance; these alterations were most pronounced in the first 24 h post-venom. Histological analysis revealed morphological alterations that included tubule desquamation and glomerular microaneurysms. There was a significant increase in the gene expression of COX-2 at 3 h post-venom that subsequently reflected in enhanced COX-2 protein levels seen in western blots and immunohistochemistry; there were no significant changes in COX-1 gene expression. HO showed high levels of activity in renal cortex and medulla that was attributable to enhanced expression of the inducible isoform HO-1, with little change in the constitutive isoform HO-2. There was a significant increase in Cu/Zn-SOD activity and expression in the renal cortex. These results show that *B. alternatus* venom adversely affects renal function in rats and alters the expression and/or activity of selected renal enzymes. The enhanced expression and activity of HO-1 and Cu/Zn-SOD may reflect their involvement in a cytoprotective action in renal tissue, whereas increased COX-2 expression may be related to venom-mediated inflammatory responses, although a role for cyclooxygenase products in the regulation of renal blood flow cannot be excluded.

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1- Acidente botrópico e peçonha de *Bothrops alternatus*

O envenenamento decorrente de acidente ofídico é um problema para a saúde populacional, principalmente em regiões tropicais do mundo (1). Na América Latina, a maioria dos acidentes ofídicos envolve serpentes do gênero *Bothrops* (2). No Brasil cerca de 90% dos acidentes causados por serpentes peçonhentas são do gênero *Bothrops* (1,2,3), sendo que este gênero é encontrado em todo o território nacional e é formado por 32 espécies (3,5,6).

1.1.1- Lesões locais e sistêmicas causadas pela peçonha botrópica

O acidente botrópico é caracterizado por lesões locais e alterações sistêmicas (1,2). As lesões locais envolvem dor, edema, reações inflamatórias, hemorragia e necrose (1,3,4). Estas lesões são em grande parte, resultado da ação de metaloproteinases (7,8) e PLA_2 (9,10) das peçonhas.

As metaloproteases são capazes de inibirem a adesão celular, causando edemas e respostas inflamatórias, alem de processos hemorrágicos, já que podem degradar colágeno do tipo IV e substâncias proteoglicanas da membrana basal endotelial; também podem inibir a agregação plaquetária, facilitando a hemorragia (7,8).

Já as PLA_2, muitas das quais são miotóxicas, neurotóxicas e anticoagulantes, podem induzir a liberação de citocinas, ativação de macrófagos, influxo de leucócitos e aumento da formação de prostaglandinas nos tecidos (9,10,11,12). A ação fosfolipásica nos fosfolipídeos da membrana celular pode aumentar a permeabilidade vascular, levando ao edema e processo inflamatório, com aumento da expressão da COX-2 (11,13).

É comum a presença de inflamação no envenenamento botrópico, com a PLA_2 e metaloproteases participando na geração da inflamação, da hiperalgesia, do edema e do influxo leucocitário (11,14). O edema no sítio da picada que pode causar isquemia com compressão de estruturas neurais e conseqüente perda de tecido (14,15). Já na infiltração de leucócitos, há principalmente células polimorfonucleados nas primeiras horas e células mononucleares 48 h e 72 h depois da picada, com conseqüente aumento de espécies oxidativas como EROs e espécies reativas do nitrogênio (como peroxidonitritos), que podem potencializar o dano tecidual (15). A resposta inflamatória é facilitada pelo aumento nos

níveis locais de IL-1, IL-6, TNFα, leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas, como PGE_2 e PGD_2, mediado pelas PLA_2 (15). Sugere-se que as prostaglandinas produzidas são provenientes da COX-2 e não da COX-1 (11,14,15).

As lesões sistêmicas causadas pela peçonha incluem hipotensão, hemorragias interna, coagulação intravascular, reações de hipersensibilidade à peçonha e insuficiência renal aguda (IRA) (3,16,17), esta última acompanhada por necroses tubulares e glomerulonefrites, e às vezes com hematúria (1) e proteinúria (1). A patogênese dos efeitos sistêmicos é complexa, envolvendo tanto a ação direta da peçonha, como mediadores endógenos (12,16).

1.1.2- Lesões renais causadas pela peçonha botrópica

O rim é um órgão vulnerável à ação de toxinas e peçonhas devido ao fluxo sanguíneo elevado e à capacidade e função de concentrar substâncias na urina (17,18). A IRA é a causa mais comum de morte em acidentes botrópicos (19).

A IRA causada pela peçonha botrópica pode ser explicada pela nefrotoxicidade direta, conforme demonstrado em tubulos renais isolados (20) e células em cultura (21, 22); esta ação direta é mediada em grande parte por metaloproteases e PLA_2. As causas indiretas incluem a coagulação disseminada intravascular (que pode levar à isquemia), a mioglobinúria e a ação de mediadores endógenos (aminas biogênicas, cininas, citocinas, óxido nítrico, prostaglandinas, etc.) liberados por enzimas da peçonha (17,23) (Fig. 1).

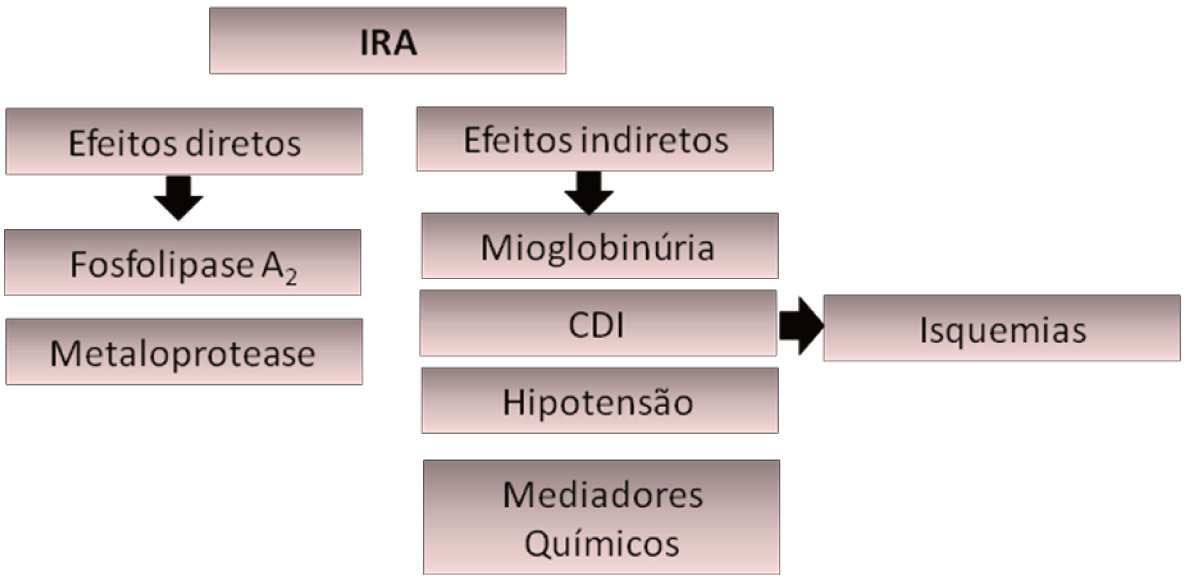

Figura 1. Principais mecanismos de lesões renais por envenenamento botrópico. CDI – coagulação disseminada intravascular. Fonte: (18).

Em animais experimentais, as alterações morfológicas causadas pelas peçonhas botrópicas incluem lesão das células tubulares e glomerulares, congestão e deposição de fibrina glomerular, degeneração hialina, necrose cortical, proliferação da matriz mesangial e glomerulonefrite (1,23,25), com alterações semelhantes sendo observadas na clínica (16,23,26). Já em células epiteliais renais da linhagem MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) as peçonhas de *Bothrops moojeni* (21) *e Bothrops alternatus* (22) exercem uma citotoxicidade direta que envolve desorganização do citoesqueleto com destruição da matrix celular, podendo levar a quadros de necrose.

Sintomas como proteinúria e hematúria são comuns no envenenamento (18). Tanto os quadros de proteínúria ou de hematúria (microscópica ou severa), são observados juntos com glomerulonefrites, diminuição da função renal e/ou com necroses tubulares (18).

Os componentes da peçonha envolvidos nestas alterações morfológicas e funcionais provavelmente incluem PLA_2 (miotóxicas) (9) e metaloproteases (hemorrágicas) (7,8) presentes em diversas peçonhas botrópicas, incluindo a de *B. alternatus* (27,28). Estudos *in vitro* mostram que as peçonhas de *Bothrops* contêm L-aminoácido oxidase (29), lectinas do tipo C (30,31), PLA_2 (32,33,34,35), e enzimas trombina-símile (36) que podem alterar a pressão de perfusão, resistência vascular e filtração glomerular em rim isolado de rato. Algumas destas proteínas também causam danos teciduais, tais como descontinuidade do *brush border* epitelial do tubulo proximal, com destacamento das células epiteliais

(descamação), levando à deposição de proteína nos túbulos proximais e distais e um aumento na permeabilidade dos capilares glomerulares. Entranto, a contribuição real destas toxinas ao dano renal *in vivo* ainda precisa ser determinada.

1.1.3- Peçonha de *Bothrops alternatus*

A serpente *Bothrops alternatus* é encontrada na América do Sul, no norte da Argentina, Paraguai, Uruguai e no Brasil, onde ocorre no sudeste (Minas Gerais, São Paulo), sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e parte do centro-oeste (sul de Goiás, Mato Grosso do Sul) (6). Esta serpente atinge entre 1 e 2 metros de cumprimento, sendo caracterizada pela sua alta agressividade e elevada quantidade de peçonha que dispõe (37,38).

A peçonha de *Bothrops alternatus* contém várias enzimas e proteínas (4,39) algumas das quais já foram isoladas, entre elas PLA_2 (27,40), balterobina (enzima tipo-trombina) (41), botroalternina (inibidora da trombina) (42), diversas metaloproteases e desintegrinas (28,43,44,45,46), L-aminácido oxidase (47) e fosfodiesterase (48) e serino-proteases (49).

Os sintomas clínicos locais e sistêmicos do envenenamento por *B. alternatus* em humanos (50) são semelhantes àqueles vistos em envenenamentos por outras espécies do gênero *Bothrops* (3), e incluem edema, bolhas, hemorragias e necrose no local da picada, além de coagulopatia, hemorragia interna e eventualmente IRA como manifestações sistêmicas.

1.2- Ciclo-oxigenase

A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima chave na produção de prostanóides (51,52), que são mediadores lipídicos com vinte carbonos na sua estrutura química (53) e que são amplamente produzidos em mamíferos. A ciclo-oxigenase é uma heme-proteína com duas isoformas já caracterizadas, a COX-1 e a COX-2 (53,54), de 71 e 72 kDa respectivamente (55). A COX-1 é a forma constitutiva, sendo que esta gera prostaglandinas envolvidas em funções fisiológicas como citoproteção das células da mucosa gástrica, modulação da agregação plaquetária e regulação do fluxo sanguíneo renal (52,56). A COX-2 é apenas constitutiva nos tecidos do cérebro e no rim (56,57,58) enquanto em outros tecidos ela é a isoforma induzível, sendo rapidamente expressa em resposta a diversos estímulos tais como

citocinas pró-inflamatórias, hormônios, fatores de crescimento, e fatores mitogênicos (51,54,57).

A formação dos prostanóides envolve duas etapas. A primeira etapa é a interação do ácido araquidônico livre com a COX, sendo que o ácido araquidônico é produzido a partir da ação da enzima PLA_2 sobre o substrato fosfato-inositol-bisfosfato (PIP_2), componente lipídico da face interna da membrana plasmática célular (51). A reação do ácido araquidônico com a COX resulta na formação da prostaglandina H_2 (PGH_2), um intermediário na biossíntese dos prostanóides, e esta logo é convertida em formas biologicamente ativas, como prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (51,59) (Fig. 2).

Os prostanóides derivados da COX possuem funções importantes na proliferação e diferenciação celulares, na apoptose e no controle da homeostasia do corpo (51). Além destes, os prostanóides participam da patofisiologia da inflamação (51,60), em processos neoplásicos e na hipertensão (51). Os prostanóides atuam localmente se ligando a receptores específicos (52).

Entre os receptores específicos, estão os de D-prostanóides (DP), E-prostanóides (EP) (sendo que este tem quatro subtipos: EP1 a EP4), F-prostanóides (FP), I-prostanóides (IP), T-prostanóides (TP), os quais são ativados pela prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandinas E (PGE_1, PGE_2), prostaglandina F_2 (PGF_2), prostaciclina I_2 (PGI_2) e tromboxano A_2 (TXA_2), respectivamente (51). Estes receptores são acoplados a proteínas G que são responsáveis pela ativação de diversas respostas fisiológicas ou patológicas (52). Os receptores DP, EP2 e EP4 aumentam os níveis intracelulares de AMPc, enquanto o EP3 os diminui. Já a ativação dos receptores TP, FP e EP1 leva à mobilização intracelular de cálcio (51).

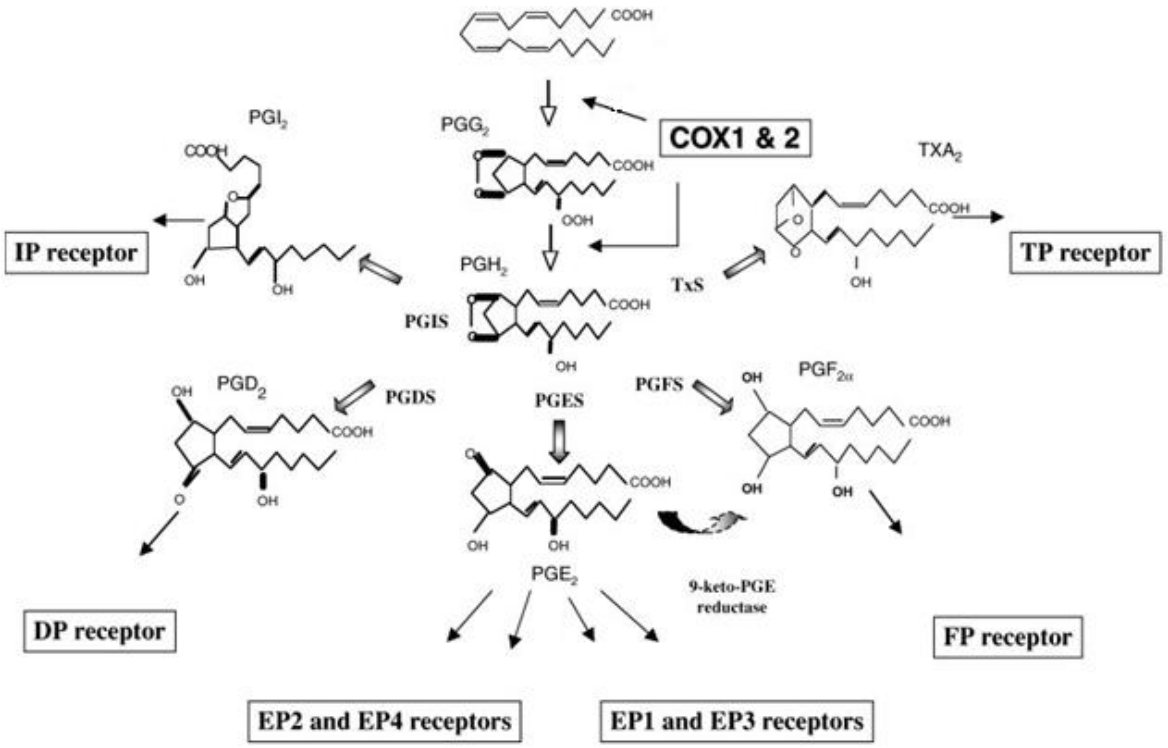

Figura 2. Mecanismo da produção de prostanóides mostrando o papel chave da COX. COX = ciclo-oxigenase, DP = D-prostanóides, EP = E-prostanóides, FP = F-prostanóides, IP = I-prostanóides, PGD_2 = prostaglandina D_2, PGE_2 = prostaglandina E_2, PGG_2 = prostaglandina G_2, PGH_2 = prostaglandina H_2, PGI_2 = prostaciclina, TP = T-prostanóides e TXA_2 = tromboxano A_2. Fonte: (65).

O receptor TP é um potente ativador de agregação plaquetária e atua na constrição músculo liso vascular, enquanto o receptor IP tem atividades antitrombóticas e vasodilatadoras no músculo liso vascular. Os receptores EP1 e EP3 têm ações vasoconstritoras e o EP2 e EP4 têm ações vasodilatadoras na musculatura lisa. O receptor EP1 também está ligado à percepção da dor e o EP3 ao estado febril em resposta a pirogênios (51). Inibidores da COX são amplamente utilizados como analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios.

O tecido renal possui as duas isoformas da COX (61). A COX-1 é expressa nos túbulos coletores, nas células intersticiais, células mesangiais e nas células endoteliais (51,62) enquanto a COX-2 é encontrada nos túbulos distais, ramo ascendente da alça de Henle e na macula densa (51,55). A COX-2 pode ser induzida através de estresse fisiológico,

sendo encontrada nos túbulos proximais em casos de nefropatias; esta isoforma também regula o tônus das arteríolas glomerulares e atua na síntese de renina (55).

Os prostanóides provenientes da COX renal participam da modulação do fluxo de sangue renal, da taxa de filtração glomerular, e na excreção de sal e água (51,55,63,64). Na síndrome nefrótica ou em condições em que o fluxo renal está comprometido, aumentam-se os níveis da COX induzível e conseqüentemente dos prostanóides, o que ajuda a manter o funcionamento normal do rim (51,64). Em casos onde há diminuição dos níveis da COX, ocorre diminuição da produção de prostanóides, podendo levar à IRA (65).

Entre os prostanóides produzidos no rim, a PGE é o prostanóide mais encontrado, com maiores concentrações nos túbulos coletores (65). A PGE renal é importante para o funcionamento renal, com ações vasodilatadoras na microcirculação dos glomérulos e da vasa recta, participando do fluxo sanguíneo da região medular além de modular o transporte de água e sal nos túbulos distais. A PGE também pode estimular a produção de renina, aumentando a produção então de angiotensina II, um potente vasoconstritor, resultando em hipertensão sistêmica (65). Em casos de desidratação, há um aumento de produção de PGE na área medular, com a possibilidade de que as prostaglandinas atuem também na concentração de urina (68).

Os receptores das prostaglandinas se encontram ao longo de todo o nefron onde exercem ações diferentes. O receptor EP1 é encontrado nos túbulos coletores e exerce um efeito natriurético; o EP2 participa na função de excreção de sal, porém sua localização ainda é incerta; o EP3 participa na concentração de urina, com expressão nos túbulos coletores da área cortical e medular e na alça de henle; o EP4 é expresso nos glomérulos, atuando na regulação da hemodinâmica; o IP é encontrado nas arteríolas aferentes, tendo ações vasodilatadoras além de estimular a produção de renina; e o TP encontra-se nos glomérulos onde é um potente vasoconstritor que pode diminuir a taxa de filtração glomerular (51,65).

Em casos de lesão renal acompanhada com inflamação, há um aumento dos níveis da COX, sendo que os prostanóides, principalmente a PGE pode exercer efeitos imunomoduladores, sendo um importante vasodilatador, com participação na formação de edema e na sensibilidade à dor (61). A PGE também pode estimular a produção de citocinas inflamatórias como TNFα e IL-1β, a ação fagocítica de macrófagos e a proliferação de células T (61).

1.3- Heme-oxigenase

A enzima microssomal heme-oxigenase (HO) é encontrada em mamíferos, onde cataliza a degradação inicial da ferroprotoporfirina IX (heme) (67,68). A heme em sua forma livre pode causar efeitos citotóxicos aos tecidos, principalmente pela formação de radicais livres de oxigênio e pela peroxidação de lipídeos. Alguns órgãos são mais sensíveis à heme livre, como o rim, onde grande acúmulo desta proteína livre pode causar nefrotoxicidade, isquemias e falência renal aguda (67,69).

A ferroprotoporfirina IX, ao ser degrada pela HO, forma-se em quantidades equimolares moléculas de ferro livre (Fe^{2+}), biliverdina IX e monóxido de carbono (CO) (67,70,71) (Fig. 3). Para que ocorra esta reação é necessária a presença de três moléculas de oxigênio para cada molécula de heme, além de NADPH-citocromo P-450 redutase (67, 68, 72).

A HO encontra-se em duas isoformas, a HO-1 e a HO-2, com de 32 kDa e 34 kDa, respectivamente (73,74,75). Estas se encontram intracelularmente, associadas ao retículo endoplasmático, ao núcleo e à membrana plasmática da célula (76).

A isoforma HO-1 é encontrada no baço, fígado medula óssea, endotélio, músculo liso da vasculatura, músculo esquelético e rim (75,77,78). Esta enzima é caracterizada por ser induzível, sendo estimulada a partir de estresse oxidativo, quando há altas concentrações de heme e de peróxido de hidrogênio, radiação UV, metais pesados, situações de hipóxias teciduais, óxido nítrico, endotoxinas, agentes químicos e citocinas (67,68,70,71,72,79,80). A HO-1 também é expressa em condições patológicas, porém, sugere-se que ela proporciona efeitos benéficos, como na aterosclerose, isquemias do miocárdio, IRA, hipertensão, anemia ferropriva e doença de Alzheimer (81,82).

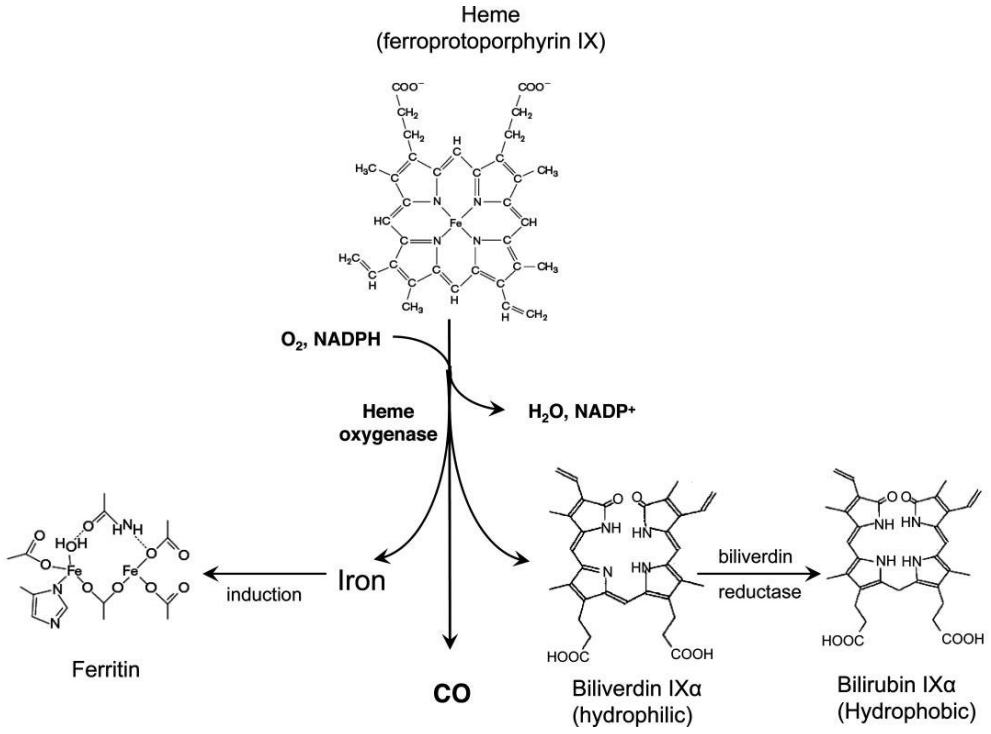

Figura 3. Reação enzimática da heme com a HO, monstrando seus produtos formados. CO = monóxido de carbono. Fonte: (67)**.**

Ao contrário da isoforma HO-1, a isoforma HO-2 é constitutiva, sendo expressa em tecido hepático, músculo esquelético, rim, intestino, no sistema nervoso central e no cérebro (66,67,68,79,80). A HO-2 tem papel regulador em diversas funções celulares (28), como também em processos inflamatórios, sendo que a ausência desta isoforma resulta em um influxo contínuo de células inflamatórias (83).

Os produtos liberados pela ação da HO (Fe^{2+}, biliverdina IX e CO) exercem diversos efeitos sobre os tecidos. O ferro livre (Fe^{2+}) resultante aumenta a síntese de ferratina, sendo que esta possui atividades antioxidantes e antiinflamatórias (67,84). Já o acúmulo de ferro livre no tecido pode levar a efeitos prejudiciais, como causar estresse oxidativo (86). A biliverdina IX é um composto solúvel e não tóxico, sendo este logo convertida em bilirrubina através da enzima biliverdina redutase (67). Tanto a biliverdina IX e a bilirrubina possuem propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (86). Já o CO em baixas concentrações pode exercer efeitos benéficos ao organismo (74), principalmente por ativação da guanilato ciclase solúvel, o que leva à formação de GMPc (74). Através da formação do GMPc, o CO pode funcionar como vasodilatador, além de exercer efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios,

anti-proliferativos e anti-trombóticos (67,80). Altas concentrações do CO podem levar à formação de carboxihemoglobina, o que reduz transporte de O_2 nos tecidos, além de poder levar à geração de radicais livres (75,87).

No sistema renal, ambas as isoformas, HO-1 e HO-2, estão presentes, sendo estas expressas em maior quantidade nos túbulos da zona medular do que cortical, além de estarem presentes também na vasculatura renal (71,88,89,90). A isoforma HO-1 encontra-se principalmente nos túbulos distais (77), enquanto a HO-2 encontra-se nos túbulos distais, coletores e na alça de Henle (88).

Os produtos gerados da degradação da heme pela HO (Fe^{2+}, biliverdina IX e CO) exercem algumas atividades fisiológicas importantes no sistema renal, como no controle da circulação sanguínea, na capacidade de alterar a diurese e natriurese, além de uma ação citoprotetora (71,89,91). O CO possui atividades vasodilatadoras, afetando a circulação da região medular, resultando em um aumento da excreção de sódio e um efeito anti hipertensor; o CO também inibe diretamente a reabsorção tubular e tem uma ação reguladora na alça de Henle (71).

A expressão da HO-1 está associada com algumas condições patológicas onde exerce um efeito citoprotetor na IRA, nas glomerulonefrites agudas, nefropatias tóxicas, isquemias, doença policística do rim e em casos onde há lesões oxidativas (72,77,82). O efeito citoprotetor da HO-1 em tecido renal é resultante da ação sinérgica do CO e da biliverdina em diminuir a formação de moléculas proinflamatórias e a peroxidação lipídica (91,92).

A deficiência hereditária desta isoforma pré-dispõe a lesões oxidativas e inflamações no sistema renal, proteinúria e hematúria, além de lesão das células tubulares renais; já a indução da expressão da HO-1 por tratamento farmacológico previne a lesão tecidual (72).

1.4- Superóxido dismutase

A superóxide dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante responsável por dismutar os ânions superóxidos (O_2^-) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (93,94), conforme o esquema: $2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$. Os ânions superóxidos são radicais livres que, juntos com o radical hidroxil (OH^-) e íon peróxido protonado, são também conhecidos com espécies reativas de oxigênio (ERO) (46,47).

Os radicais de ânion superóxido são formados por uma redução de elétron de dióxido (O_2) e estão envolvidos em diversos processos patológicos devido à capacidade desta de causar danos ou estresses oxidativos em biomoléculas, promovendo a perda de funcionalidade (97,98). Esses radicais são produzidos por células e tecidos, tendo a participação da enzima xantino oxidase (99). Sob condições fisiológicas, a SOD dismuta estes radicais, sendo uma importante linha de defesa para o organismo (100).

Os EROs estão aumentados nos tecidos quando há ativação de fagócitos (como neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos), em casos de hiperoxidação, contaminação por xenobióticos, radiação ionizantes e em isquemias seguidas de reperfusão (95,96). Quando o organismo é exposto em altas concentrações de EROs há um aumento das sintetização de enzimas ou substâncias antioxidantes, como a SOD, catalase e glutationa redutase (95,96).

Três isoformas da SOD já forma descritas: a SOD dependente de cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), a SOD mitocondrial dependente de magnésio (Mn-SOD) e a SOD extracelular (EC-SOD). A Cu/Zn-SOD é uma enzima dímera de 32 kDa encontrada no citoplasma e núcleo, enquanto a Mn-SOD de 89 kDa localiza-se na mitocôndria; a SOD extracelular de 135 kDa é uma glicoproteína tetramérica (101).

A Cu/Zn-SOD e Mn-SOD ocorrem em grande quantidade em hepatócitos, no rim, nas células do músculo estriado, na área das células da glia no sistema nervoso central, ilhotas de Langerhans e nos brônquios; há também presença destas enzimas em ductos pancreáticos e nas células do miocárdio (104,105). Já a EC-SOD é localizada em áreas com altas concentrações de colágeno tipo I, nos fibroblastos, nas células da glia e no pulmão (98).

A SOD está ativa em todos os tecidos, com maior atividade no fígado e no rim (98). A ação da SOD leva à formação do peróxido de hidrogênio, que por sua vez é degradada pela catalase (93). A catalase é uma hemeproteína citoplasmática tetramérica com atividade antioxidante, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, conforme o esquema: $2H_2O \longrightarrow 2H_2O + O_2$. Esta reação é uma etapa importante no sistema antioxidante celular e na adaptação da célula a situações de estresse oxidativo (94,95). A expressão da catalase é regulada pela formação de H_2O_2 (1-6,94).

Em diversas patologias, como na hipertensão essencial, IRA, isquemia seguida de reperfusão, diabetes, epilepsia e doença da Parkinson, há um aumento da formação de

EROs e uma redução nos níveis de enzimas antioxidantes como a SOD e catalase (100,102,105,107).

No rim, as duas isoformas Cu/Zn-SOD e Mg-SOD são encontradas e se localizam ao longo do nefron, com maior presença nos túbulos proximais, porém com expressão também nos túbulos distais e coletores (107). Como nos outros tecidos, a SOD desempenha no rim mecanismos citoprotetores contra agentes oxidantes, diminuindo os níveis de O_2^- (102). O aumento da concentração de EROs no tecido renal durante a IRA acarreta em peroxidação lipídica, quebra de citoesqueletos e do DNA, alteração da integridade celular e ativação leucocitária com produção de citocinas (107). Na maioria dos casos, quando há lesões do gênero oxidativo, a região cortical é mais afetada que a região medular (102). Nestas situações, um aumento nas atividades da SOD e catalase pode ser benéfica ao rim por combater a produção excessiva de EROs envolvidas na peroxidação lipídica.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

1. Investigar as alterações morfofuncionais renais causadas pela peçonha de *B. alternatus* em ratos.

2. Avaliar o perfil de expressão e/ou atividade enzimática da HO, COX e SOD em rins de ratos tratados com a peçonha de *B. alternatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- Materiais e Métodos

3.1- Reagentes

Os reagentes para ensaios bioquímicos, expressão gênica, biológicos, *western blotting* e a análise histológica foram obtidos da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EUA), Sigma (St. Louis, MO, EUA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Leica (Nussloch, Alemanha), Merck (Darmstadt, Alemanha), e fornecedores locais.

O anticorpo anti-coelho HO-1 foi obtido da Stressgen (Victória, DC, Canadá), os anticorpos anti-camundongos COX-1 e COX-2 eram da NeoMarkers (Fremont, CA, EUA), os anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo foram adquiridos da KPL (Gaithersburg, MD, EUA) e o anticorpo anti-camundongo β-actina foi obtido da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

A peçonha *B. alternatus* (lote: 11/6), obtida por estimulação elétrica de exemplares adulta de ambos os sexos, foi fornecida pelo Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) em forma liofilizada e foi armazenada a -20ºC até o uso.

3.2- Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (200-250 g) obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP). Estes foram mantidos em gaiolas plásticas (5/gaiola), a 22ºC, sob um ciclo de luz/escuro de 12 horas com acesso livre à água e ração (Nuvital®). Os protocolos realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP, protocolo nº 1740-1) e realizadas seguindo as recomendações éticas gerais da Sociedade Brasileira para Ciência de Animais de Laboratório – SBCAL (antigo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal - COBEA).

3.3- Tratamento com a peçonha de *B. alternatus*

A peçonha liofilizada foi diluída com NaCl 0,9% (concentração final: 1 mg/mL) na hora do uso. Os ratos foram levemente anestesiados com isoflurano (Abbott, Buenos Aires, Argentina), e uma vez atingindo o nível de sedação adequado, a peçonha de *B. alternatus* foi administrada por via intravenosa (veia caudal), na dose de 0,8 mg/kg. Nos ratos controles foi injetada apenas solução salina. Nos tempos de 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas e 7 e 15 dias

depois da administração da peçonha, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas, conforme descrito abaixo. Foram usados seis ratos para cada grupo.

3.4- Análise urinária

Três horas antes de sofrerem eutanásia, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina deles foi coletada neste período, em frascos âmbar. Antes do tratamento, os ratos foram familiarizados com a gaiola metabólica durante três dias para minimizar o estresse. Terminada a coleta, o volume urinário final foi verificado e a urina analisada conforme descrito abaixo.

3.4.1- Exame de urina I

O exame de urina I foi realizado usando tiras reagentes da Sensi 10 (Cotia, São Paulo). Os parâmetros avaliados foram a presença de leucócitos (cel/µL), urobilinogênio (µmol/L), bilirrubina (µmol/L), sangue oculto (cel/µL), glicose (mg/dL) e cetonas (mg/dL), além da avaliação de pH e da densidade específica. Para complementar o teste de sangue oculto, alíquotas das amostras foram centrifugadas em tubos capilares (Perfecta, São Paulo, São Paulo) em centrífuga para hematócrito (Centrimicro, Fanem, São Paulo), para avaliar a presença de hemólise ou de eritrócitos intactos.

3.4.2- Quantificação protéica e análise eletroforética

A concentração de proteínas (mg/mL) na amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (108) usando-se 50 µL da amostra. As leituras foram realizadas a 750 nm em leitor de ELISA (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), sendo que em cada dosagem, realizou-se uma curva padrão com albumina bovina.

Para determinar o perfil eletroforético das proteínas urinárias,ajustou-se a concentração de 25 µg de proteínas por amostra. Para a eletroforese, utilizou-se o método SDS-PAGE de Laemmli modificado (109), com gel de acrilamida de 10%, e voltagem constante de 100 V por gel por 3 h. As bandas protéicas foram detectadas corando-se o gel com nitrato de prata. Foram incluídas em todos os géis proteínas marcadoras de massas moleculares conhecidas.

3.4.3- Quantificação de creatinina

A quantificação de creatinina na urina (mg/dL) foi realizada usando um kit comercial da Bioclin (Belo Horizonte, MG). As amostras foram centrifugadas (centrifuga Eppendorf modelo 5415 R, Eppendorf, Alemanha) em temperatura de 20ºC com velocidade de 14.000 *g* por 20 min. O sobrenadante foi coletado e diluída a 1:25 com água destilada e procedeu-se o método de acordo com a bula do fabricante. A leitura da reação colorimétrica foi feita a 510 nm em espectrofotômetro DU 800 (Beckman Coulter).

3.5- Análise sangüínea

Instante antes de sacrificar os rats procedeu-se à coleta de amostras de sangue destes (já anestesiados), através de punção cardíaca. Para testes que utilizaram plasma, o sangue foi depositado em tubos Eppendorf de plástico e logo centrifugado a 12.000 *g* por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e armazenado a 4ºC até a realização dos testes bioquímicos.

3.5.1- Micro-hematócrito

Após a coleta do sangue, capilares com heparina (Perfecta, São Paulo) foram preenchidos com amostra e centrifugados em temperatura ambeinte por 10 min em centrífuga de microhematócrito (Centrimicro). O hematócrito foi calculado com auxílio de uma régua, comparando em porcentagem a série vermelha com o total da amostra.

3.5.2- Atividade de transaminase pirúvica (ALT) e transaminase oxalacética (AST)

A atividade de ALT (transaminase pirúvica) e AST (transaminase oxalacética) foi determinada em amostras de plasma usando kits comerciais Bioclin conforme descrito na bula do fabricante. A absorbância final foi lida em 505 nm em espectrofotômetro DU 800. Os valores foram comparados com curvas de calibração constriuidas usando os padrões fornecidos nos kits. As atividades foram expressas em unidades por mL (U/mL).

3.5.3- Atividade de creatinoquinase-MB (CK-MB)

A atividade de CK-MB foi quantificada usando um kit comercial da LaborLab (São Paulo, SP). Foram usadas alíquotas de plasma e os resultados expressos em unidades por mL (U/mL). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, e as leituras realizadas cineticamente em comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro DU 800, em intervalos de 1 min durante os primeiros 5 min da reação.

3.5.4- Creatinina sérica

Para quantificar a creatinina sérica (mg/dL), amostras de plasma foram coletadas e procedeu-se à dosagem colorimétrica conforme a bula do fornecedor do kit (Bioclin). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro DU 800.

3.6- Medida de depuração renal

Para o cálculo da depuração (*clearance*) renal (CCr, µl/min/100 g), foi utilizado a formula (1;110):

$$CCr = \frac{\text{Creatinina urina X volume urinário}}{\text{Creatinina plasmática}}$$

sendo que o volume urinário (Vu) foi expresso por 100 gramas de peso corpóreo do animal:

$$Vu = \frac{\text{volume coletado em 180 min}}{(\text{peso (em g)} /100) \times 180} \times 1000$$

3.7- Análise histopatológica

Para a coleta dos tecidos, os ratos foram anestesiados com isoflurano e perfundidos via aorta com salina heparinizada para retirar o sangue dos tecidos. Após o sacrifício dos mesmos, foram coletados amostras do tecido cardíaco, hepático, renal e pulmonar para análise histológica. Os tecidos foram fixados em paraformoldeído 10% (preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) durante 12 h e processados para a microscopia de luz. Após desidratação em gradientes decrescentes de álcool e diafanização com xilol, os tecidos

foram embebidos e incluídos em parafina (Histosec, Merck). Os blocos de parafinas foram secionados em microtomo (Leica RM 2245, Alemanha) com espessura de 5 µm.

3.7.1- Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

As secções preparadas conforme descrito acima foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz usando um microscópio Leica DM 5000 B. As imagens foram capturadas e analisadas usando câmera CCD LEICA CTR 5000 e software da imagem LEICA Q Win Plus v. 3.2.0, respectivamente.

3.7.2- Imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica os cortes de 5 µm foram preparados conforme descrito acima e fixados em lâminas silanizadas (Star Frost, Braunschweig, Alemanha). As lâminas foram desparanifizadas com xilol e hidratadas com gradientes decrescentes de alcoóis. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol contendo 3% de peróxido de hidrogênio por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão TBS (pH 7,4) e após adicionou-se solução TBS contendo 0,1% Triton-X 100. As lâminas foram lavadas novamente com TBS e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de 5% de BSA (albumina bovina) por 1 h.

Em seguida, procedeu-se à incubação com anticorpos primários nas diluições de 1:200 para HO-1 e 1:300 para COX-1 e COX-2 *overnight* à temperatura 2-8ºC. Terminada a incubação, as lâminas foram lavadas com tampão para remover os anticorpos e então foi adicionado o anticorpo secundário (IgG anti-coelho biotinilado, diluído 1:600) por 1 h. As lâminas foram novamente lavadas, e deixadas 1 hora com estreptovidina (1:300) no escuro. Após outra série de lavagens, realizou-se a reação com diaminobenzidina (DAB) com interrupção da reação com água destilada. O progresso da reação foi monitorado com auxílio de microscópio de luz. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e diferenciadas com solução saturada de carbonato de lítio. Por fim, as lâminas foram desidratadas e montadas.

3.8- *Western blotting*

A expressão protéica da COX-2 também foi avaliada por *western blotting*. Para isto, as amostras de rim foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) com quatro volumes de Tris-HCl 10 mM contendo 250 mM sucrose, 1 mM EDTA e 1% do coquetel de inibidores de proteases e Triton X-100. Os homogenatos foram centrifugados (1000 *g*, 4ºC, 10 min) em centrífuga Avanti J-20 XPI (Beckman Coulter) e o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente (10.000 *g*, 4ºC, 10 min). O sobrenadante resultante foi ultra-centrifugado (105.000 *g*, 4ºC, 60 min) e o sobrenadante descartado e o precipitado conservado. O precipitado foi resuspendido com 1 mL de tampão Tris, sonicado, aliquotado e armazenado a -80ºC até o uso.

Para a eletroforese, alíquotas de 30 µg de proteína foram utilizadas. A eletroforese foi realizada em sistema eletroforético Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia), com gel de acrilamida de 10% contendo SDS e 100 V constantes. Os marcadores de massa molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad) foram incluídos em cada corrida. Terminada a corrida as proteínas no gel foram transferidas para membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Bioscience) (111) com auxílio de tampão de Towbin, a 4ºC, em cuba de transferência Mighty Small TE22 (Hoefer-Pharmacia) com amperagem de 200 mA e voltagem 140 mV por 2 h. A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana com Ponceau S.

Após lavagem da membrana com água destilada e tampão de solução basal (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e 0,5% Tween 20), os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de leite 5% *overnight* em câmera fria. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-camundongo COX-2 (1:400). Anticorpo anti-β-actina (diluído 1:1000) foi utilizado como controle interno para analisar a quantidade de proteína aplicada aos poços. Os anticorpos foram diluídos em solução basal contendo 3% de albumina e incubados com as membranas por 2 horas em temperatura ambiente.

Terminada este intervalo, as membranas foram expostas a conjugado IgG-peroxidase anti-camundongo diluído 1:1200 em solução basal. Após 2 h, as membranas foram lavadas e as bandas imunoreativas foram detectadas utilizando kits de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) e documentandas com filme fotográfico (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil). As imagens foram capturadas (câmera Sony, Japão) e as bandas analisadas por densitometria óptica usando o

software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Gel & Graph Digitizing Software, Version 6.1, Silk Corporation, UT, EUA).

3.9- Atividades enzimáticas

Momentos antes da eutanásia dos animais, estes foram perfundidos com NaCl 0,9% gelada e estéril e os rins foram coletados**.** Todas as avaliações enzimáticas foram realizadas com amostras do rim total, além do córtex e medula separados. A separação do córtex e da medula foi realizada com auxílio de lupa e navalhas (112).

3.9.1- Heme-oxigenase

A atividade da HO (atividade total) em homogenatos de rim foi determinada baseada na formação de bilirrubina, conforme descrito por Bifaroni (112). As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris- HCl 30 mM, pH 7,5 contendo sucrose 0,25 M, NaCl 0,15 M, e centrifugados (10.000 *g*, 4ºC, 15 min; Avanti J-20 XPI). O sobrenadante foi coletado, e procedeu-se à ultra-centrifugação (105.000 *g*, 4ºC, 1 h) para isolar microssomos. O precipitado resultante da ultra-centrifugação foi resuspendendo com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (KPBS - *potassium phosphate-buffered saline*).

A reação do ensaio (volume final de 500 µl) continha tampão KPBS pH 7,4, 400 µg de proteína do rim, 25 µM do hemin, 0,4 mM de NADPH e 1,5 mg de citosol de fígado de rato/mL (fonte de biliverdina redutase). O branco do ensaio continha todos os componentes menos o NADPH, que foi substituído por tampão KPBS. A diluição de hemin e NADPH e a obtenção a biliverdina redutase foram feitas conforme descrito anteriormente (112).

Para a reação, as amostras foram colocadas em banho sob agitação a 37ºC e protegidas da luz por 30 min. A reação foi interrompida colocando as amostras em gelo por 3 min. A quantidade de bilirrubina final foi avaliada em 464 nm usando cubetas de quartz em espectrofotômetro Beckman DU 800. A quantidade de bilirrubina formada foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 40 mM^{-1} cm^{-2}, e a atividade enzimática foi expressa em picomoles de bilirrubina formada/mg de proteína/h (112).

3.9.2- Superóxido dismutase

Amostras de rim, córtex e medula foram homogeneizados com quatro volumes de tampão (30 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,25 M sucrose, 0,15 M NaCl e 1 mM EDTA) e processadas conforme descrito para a HO acima, exceto que foi usado o sobrenadante (citosol) da ultra-centrifugação em vez do precipitado. O ensaio consistiu em três leituras, nos tempos 0, 1 e 2 min, em 480 nm. Adicionou-se à cubeta tampão glicina pH 10 e 10% de epinefrina 1 mM e após a leitura de 1 min, acrescentou-se amostra do rim (0,25 mg de proteína/mL). O espectrofotômetro foi zerado com tampão de glicina. A atividade de SOD foi expressa em unidades/mg de proteína onde (114):

$$U/mg = \frac{1 - (Abs\ 2'/Abs\ 1')}{0{,}5 \times \text{conc. de proteína}}$$

3.9.3- Catalase

Para quantificação da atividade da catalase foram usadas amostras preparadas da mesma forma que para SOD, exceto pelo acréscimo de 1% de Triton X-100 na hora da homogeneização do tecido. Para o ensaio, o espectrofotômetro foi zerado com Tris-HCl 1 mM pH 7,5 contendo EDTA 1 mM mais amostra de rim (0,25 mg/mL). Em seguida, adicionou-se à cubeta 10 µL de peróxido de hidrogênio e procedeu à leitura em 240 nm nos tempos de 0 e 15 segundos. Para o cálculo da atividade de catalase foi utilizado como parâmetro o constante K/mg, onde (115):

$$K/mg = \frac{2{,}3 \times Log\ (Abs\ 15''/Abs\ 0'')}{\text{Concentração de proteína}}$$

3.10- Avaliação da expressão gênica da HO e COX

Para avaliar a expressão gênica foi usada a reação em cadeia de polimerase que permite detectar e quantificar a amplificação de DNA (ácido desoxirribonucléico) em tempo real (PCR real time).

3.10.1- Preparo das amostras

O RNA de tecido renal estocado a -80°C foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Este RNA serviu de molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando kits Superscript III RT (Invitrogen). A síntese adequada do cDNA foi avaliada amplificando-se o gene para a proteína GAPDH. Para esta reação foram utilizados: 5 µl de tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µl de 50 mM $MgCl_2$, 1 µl de 10 mM dNTPs, 1 µl de uma solução de 10 mM do primer GAPDH-F, 1 µl de uma solução de 10 mM do primer GAPDH-R, 1 µl de *Taq* DNA polimerase e 39,5 µl de água estéril. A amplificação foi desenvolvida usando um ciclo de 94ºC por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94ºC por 30 seg, 58ºC por 45 seg e 72ºC por 40 seg, sendo finalizada por um ciclo de 72ºC por 7 min. A qualidade do cDNA e dos produtos da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose de 1%.

3.10.2- Desenho dos primers

Os primers utilizados foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems) e o programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). O progama Blast foi utilizado para verificar as condições da formação de estruturas como dímeros e *hairpins*. Os primers utilizados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüências dos primers utilizados na amplificação de genes por PCR-real time.

GENE	SEQUENCIA DO PRIMER 5'→3'
HO-1 sense	AGAGCGGAGCCAGCCTGA
HO-1 anti-sense	TTCAAGGCCTCGGACAAATC
HO-2 sense	GGAGGGCGTCGATGAGTCA
HO-2 anti-sense	GCCCGGTCATGTGCTTCC
COX-1 sense	TATCCATGCCAGAACCAGGG
COX-1 anti-sense	CTCCGAAGCCAGGTCCAGA
COX-2 sense	GACAGATCAGAAGCGAGGACCT
COX-2 anti-sense	CCTCTCCACCGATGACCTGA
GADPH sense	CCTGCCAAGTATGATGACATCAA
GADPH anti-sense	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT
β-actina sense	GCAATGAGCGGTTCCGAT
β-actina anti-sense	TAGTTTCATGGATGCCACAGGAT

3.10.3- PCR-real time

As reações foram realizadas em duplicata, utilizando reagentes da Syber Green PCR Master Mix (Invitrogen). Os ensaios foram feitos no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) com o progresso da reação sendo visualizado em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos.

As reações continham 6 µl do reagente de Syber Green, 5 ng de amostra de cDNA e primer apropriado (150 nM) num volume final de 12 µl. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc.) com tampas plásticas usando um ciclo de 95ºC por 10 min seguido de 45 ciclos de 95ºC por 15 seg e 60ºC por 1 min.

3.10.4- Análise dos dados do PCR-real time

As amostras foram normalizadas com genes calibradores, como a GAPDH e a β-actina, sabendo que estes são expressos de forma constitutiva nos tecidos biológicos. Para o cálculo de expressão (Q) foi utilizado a formula $Q= E^{\Delta Ct}$ onde E é a eficiência da reação e Ct são os valores do ciclo de *threshold* (limiar) sendo ΔCt = o menor Ct observado menos o Ct

da amostra. Sabe-se que quanto maior a expressão de um gene específico, ou seja, quanto maior o número de cópias deste no início da reação, mais precocemente ocorre uma amplificação e, conseqüentemente, menor será o Ct. Como foram realizadas duplicatas, a média aritmética dos Cts foi calculada. Os valores dos genes calibradores (β-actina e GAPDH) de cada amostra foram submetidos ao programa Gnorm (116) que calculou a média geométrica entre eles, um valor denominado como *fator de normalização da amostra*. A expressão normalizada de um dado gene foi dada pela razão entre o valor Q e o fator de normalização, sendo que estes foram expressos em unidades arbitrárias de expressão.

3.11- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). As comparações estatísticas foram analisadas por análise de variância (ANOVA) seguida por testes de Bonferroni usando o software Prism v. 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA). Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1- Avaliação de alguns parâmetros sistêmicos

A Figura 4 mostra as atividades séricas de ALT, AST e CK-MB, e a porcentagem do hematócrito de ratos tratados com a peçonha *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.) e ratos controles tratados com salina (0,2 mL, i.v.). Três horas após a administração da peçonha, as atividades das enzimas ALT, AST e CK-MB estava significativamente aumentadas, com retorno para valores basais no tempo de 6 h. Já o micro-hematócrito encontrou-se alterado em 48 h após a administração da peçonha, com valor abaixo do basal, normalizando em 72 h.

4.2- Avaliação renal e urinária

A Figura 5 mostra o perfil urinário de ratos tratados com a peçonha, bem como a depuração (clearance) de creatinina, um parâmetro para avaliar a função renal. Em ratos tratados com a peçonha, o volume urinário diminuiu de 3 h até 7 dias, sendo que este normalizou aos níveis basais apenas no décimo quinto dia (Fig. 5A). Nos tempos de 3 h e 6 h, observou-se uma queda do pH (Fig. 5B) e um aumento da densidade (Fig. 5C) urinário destes animais. Até 24 h após a administração da peçonha, houve proteinúria (aumento da concentração de proteínas na urina) (Fig. 5D). Já no caso do clearance de creatinina, houve um decaimento progressivo no valor deste parâmetro após inoculação da peçonha, com valores mais baixos em 24 h e 48 h; em 72 h retorno para valores basais (Fig. 5E).

A Figura 6 ilustra o perfil eletroforético da urina dos ratos controles e tratados. Em ratos controles e em todos os tempos com ratos tratados foi observada a proteína albumina sérica (~66 kDa). Porém, em até 3 h, houve um aumento da secreção de albumina sérica, além da presença de outras proteínas, com massas moleculares de 66 kDa, ~45 kDa e <25 kDa.

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de urina I. Todos os testes realizados com ratos controles mostraram-se negativos. O urobilinogênio não foi detectado em nenhum rato tratado com peçonha, porém em 6, 24 e 48 h presenciou-se bilirrubina na urina destes. Leucócitos foram detectados até 48 h e a presença de sangue oculto prolongou-se até 72 h.

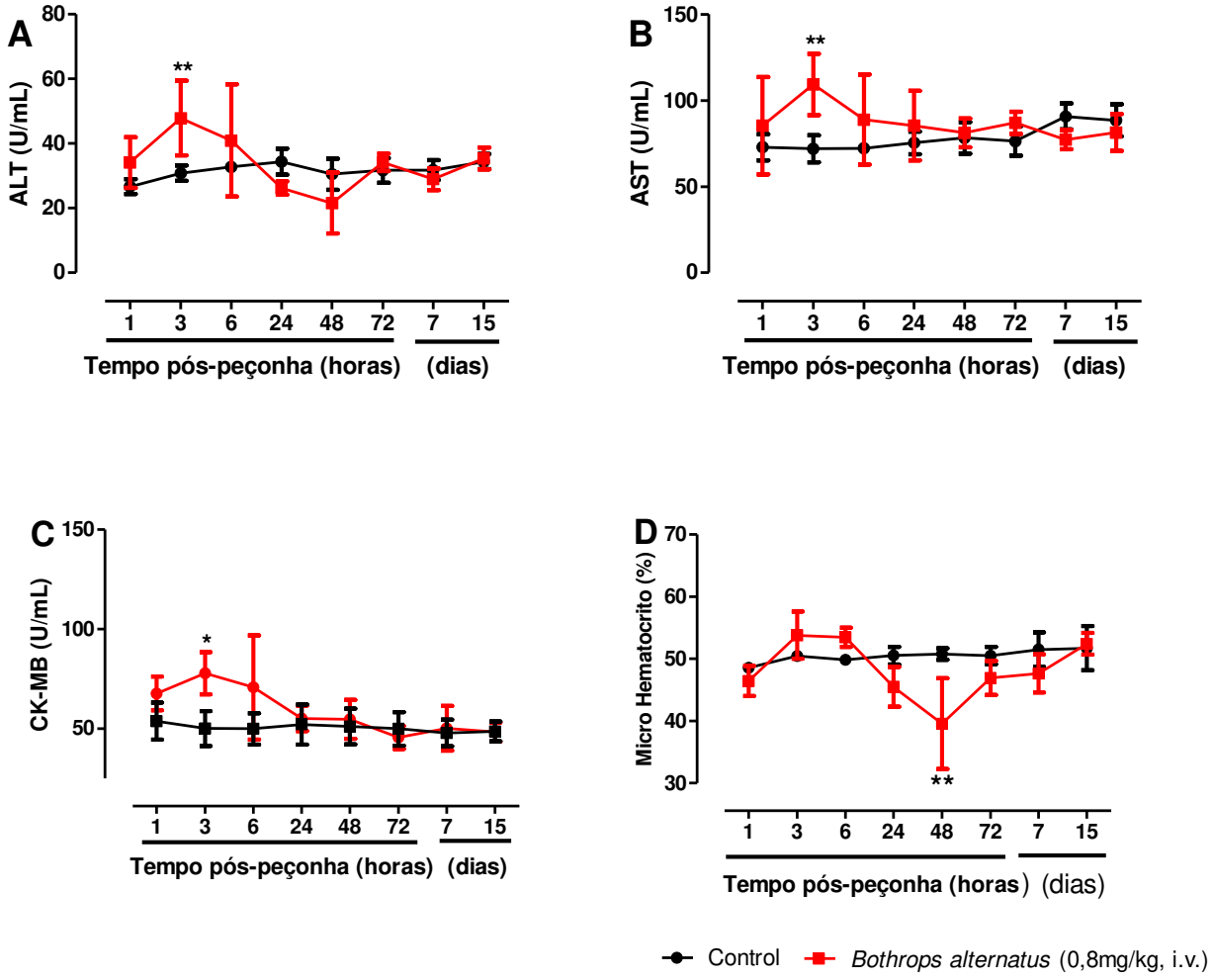

Figura 4. Atividade plasmática de ALT (**A**), AST (**B**) e CK-MB (**C**) e a porcentagem do micro-hematócrito (**D**) em ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Os pontos representam a média ± DP (n=6). *p<0,05 e **p<0,01 comparados com o grupo controle injetado com 0,2 mL de salina (i.v.). (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

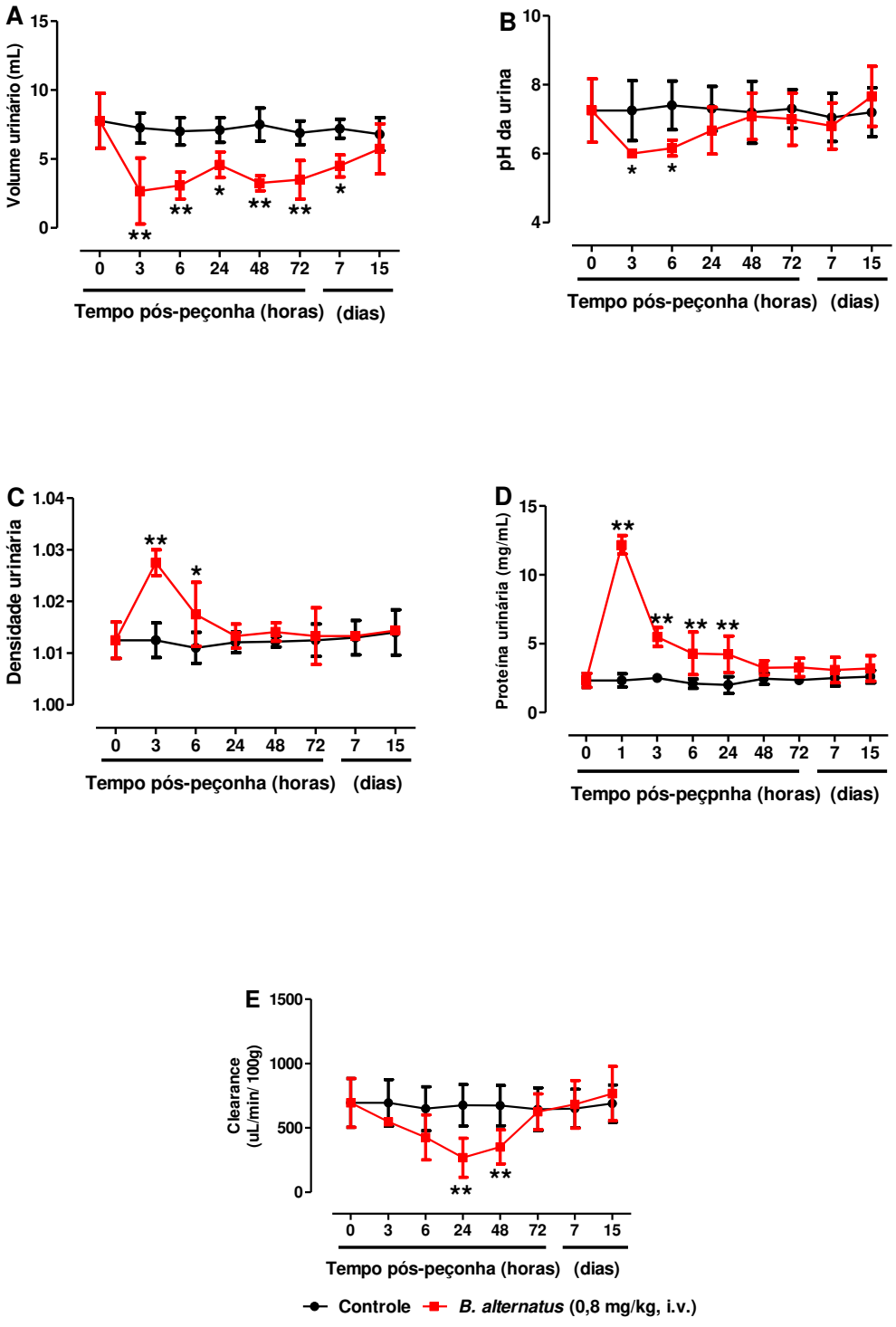

Figura 5. Perfil urinário de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.) em diferentes intervalos de tempo. Os pontos representam a média± DP (n=6). *p<0,05 e **p<0,01 comparados com o grupo controle injetado com 0,2 mL de salina (i.v.). (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

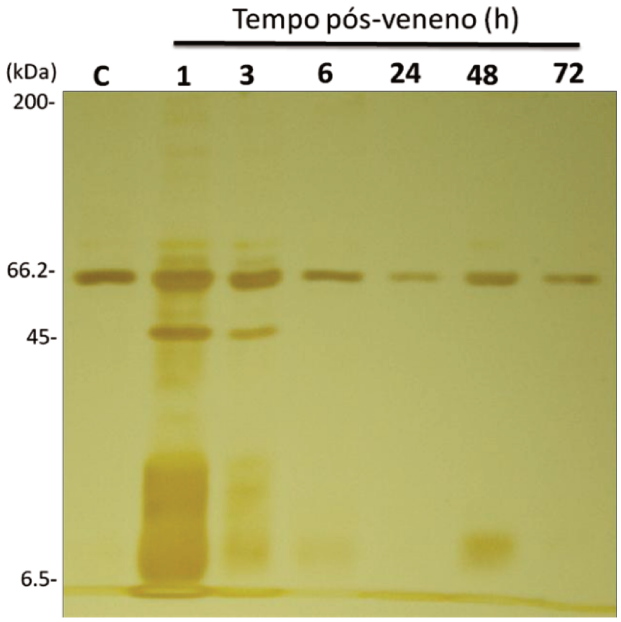

Figura 6. Perfil eletroforético da urina de rato controle (**C**) e de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Aliquotas da urina foram corridas em gel de poliacrilamida 10% a 100 V por 3 h e detectadas por coloração com nitrato de prata. Ao lado esquerdo encontram-se as posições dos marcadores de massa molecular (em kDa).

Tabela 2. Exame de urina I de ratos controles e tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Os resultados são expressos em número de casos positivos por número total de ratos de cada grupo.

	Controle	**3 h**	**6 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**7 dias**	**15 dias**
Urobilonogênio	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Bilirrubina	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Sangue oculto	0/6	6/6	5/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Leucócitos	0/6	6/6	3/5	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Glicose	0/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Nitrito	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Cetonas	0/6	4/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Nos intervalos de 1 h a 6 h pós-peçonha houve alteração macroscópica da cor da urina, tendo uma coloração avermelhada mais intensa. As urinas destes ratos deram teste positivo para o sangue oculto. Entretanto, a ultra-centrifugação de amostras desta urina não revelou sedimentação da séria vermelha, indicando que o sangue oculto é proveniente de hemólise.

4.3- Análises histológicas

A Figura 7 mostra o perfil histopatológico do tecido renal. Na região cortical, foram observadas alterações nos glomérulos em até 72 h após a administração da peçonha. Os glomérulos apresentaram micro-aneurismas e aumento do espaço da cápsula de Bowman (Fig. 7 C, G, J). Nos tempos de 1 h (Fig. 7 D), 3 h (Fig. 7 I) e 6 h (Fig. 7 M) foi observada deposição de material protéico na luz dos túbulos do córtex e da medula. No grupo de 1 h, foram vistos pequenos focos de infiltrados inflamatórios entre os túbulos (Fig. 7 F). Já no grupo de 3 h, foram detectadas células com aspecto de inchação turva (Fig. 7 H), e nos ratos do grupo de 6 h, observou-se destruição maciça dos túbulos (Fig. 7 L). Vinte e quatro horas após a administração da peçonha, os tecidos renais dos ratos apresentaram um maior foco de infiltrado inflamatório (Fig. 7 N), já sendo menos intenso no grupo de 48 h (Fig. 7 Q). Nas células tubulares do grupo de 48 h, encontrou-se presença de figuras mitóticas (Fig. 7 R).

Nos ratos controles, não foram observados lesões celulares tanto no córtex (Fig. 7 A) como na medula (Fig. 7 B).

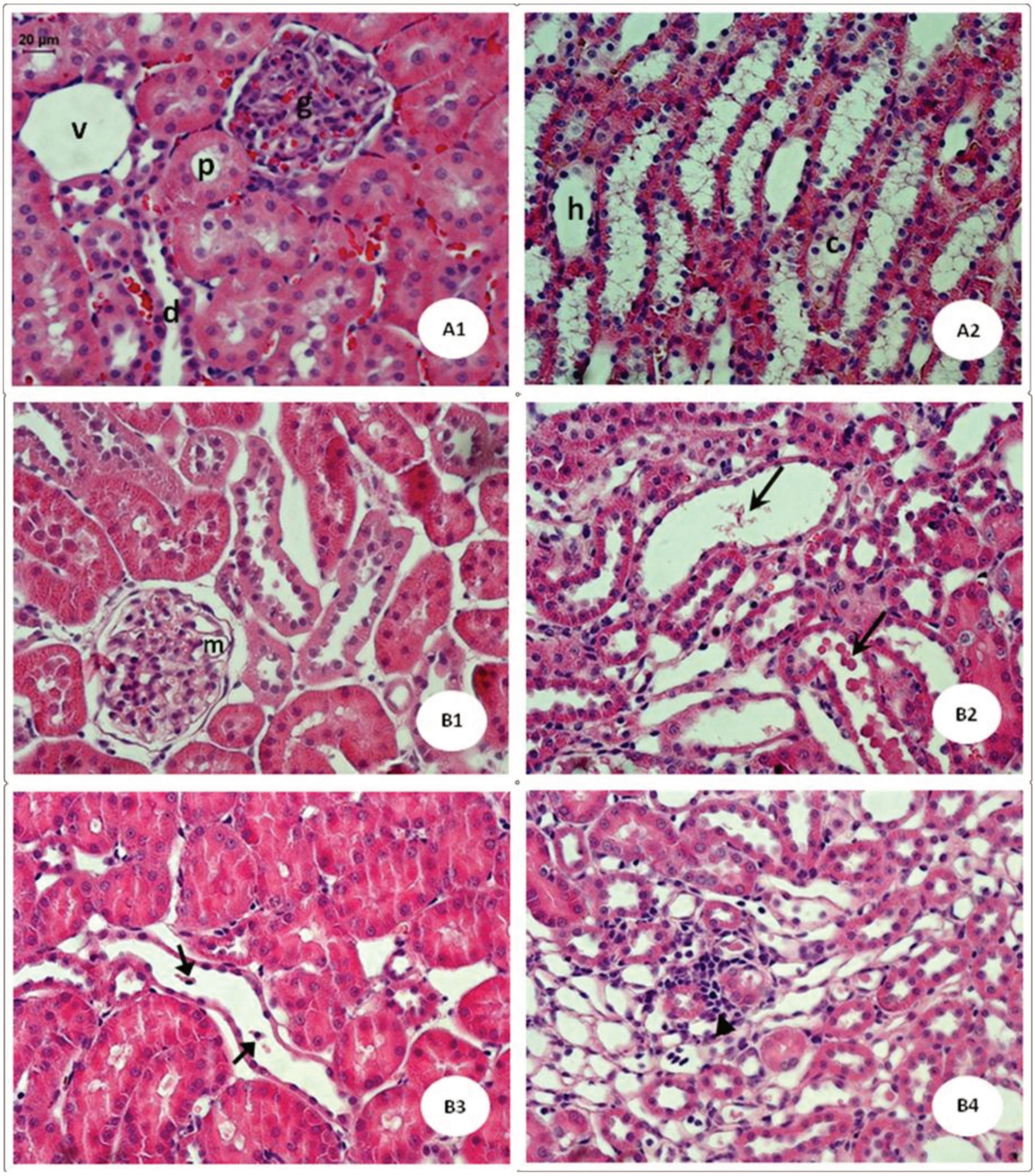

Figura 7. Legenda duas páginas para frente.

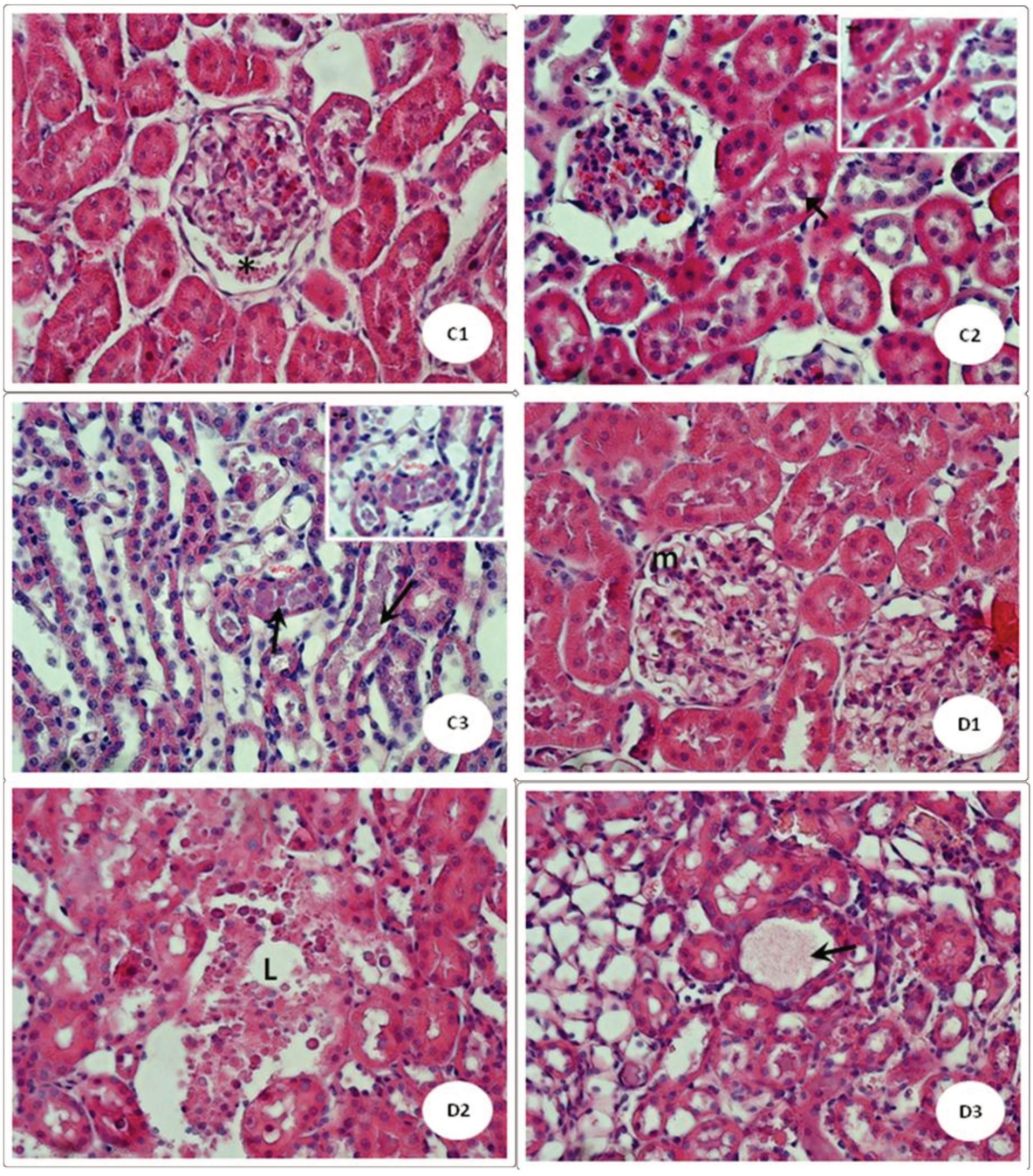

Figura 7. Legenda na próxima página.

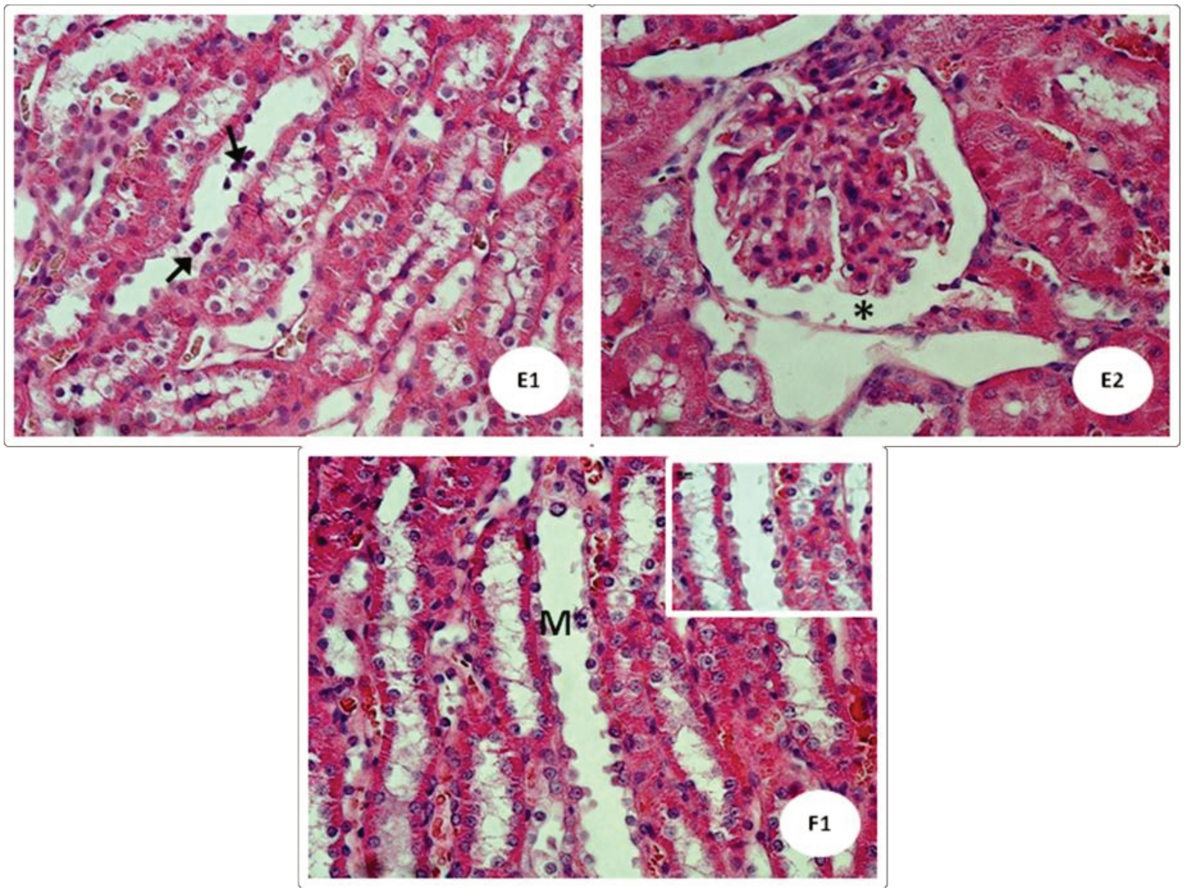

Figura 7. Fotomicrografias de regiões corticais e medulares renais de ratos controles e tratados com peçonha de B. *alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A1-2 –** grupo controle, **B1-4 –** 1 h, **C1-3 –** 3 h, **D1-3 –** 6 h, **E1-2 –** 24 h e **F1 –** 48 h. **c** = túbulo coletor, **d** = túbulo distal, **g** = glomérulo, **h** = alça de Henle, **L** = lesão tecidual, **m** = microaneurisma, **M** = presença de mitoses, **p** = túbulo proximal, **v** = vaso sanguíneo, **setas maiores** = deposição protéica na luz dos túbulos, **setas menores** = descamação de células tubulares, **Δ** = infiltrado inflamatório, * = aumento do espaço da cápsula de Bowman. Coloração HE. Barras = 20 µm (em A e todos os painéis maiores); painéis menores (*insets*) = 10 µm.

4.4- Heme-oxigenase

4.4.1- Expressão gênica

A Figura 8 mostra a expressão gênica da HO-1 e HO-2 em rins de ratos nos diferentes intervalos de tempo após injeção da peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Houve aumento significativo da expressão gênica da HO-1 (isoforma induzível) em 3 h e 6 h pós-peçonha, com retorno aos níveis normais em 24 h. Já com a HO-2 (isoforma constitutiva) não foram observadas alterações significativas da expressão em relação ao ratos controles, embora houvesse flutuações ao longo dos intervalos investigados.

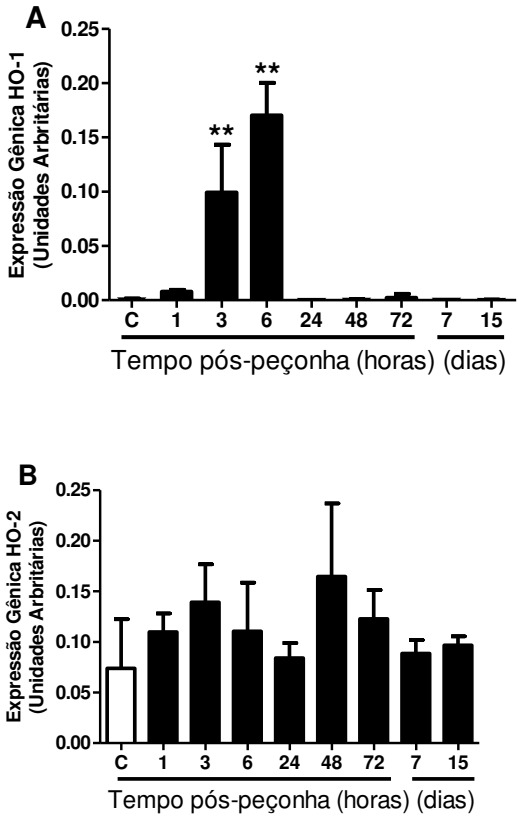

Figura 8. Expressão gênica da HO-1 (**A**) e HO-2 (**B**) em rins de ratos controles (coluna C) e tratados com peçonha *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A expressão gênica foi analisada por PCR-*real time* e os resultados expressos em unidades arbitrárias. As colunas representam a média ± DP (n=6). *p<0,05 comparados com o grupo controle (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).

4.4.2- Atividade enzimática

A Figura 9A mostra a atividade enzimática da HO de rins de ratos tratados com peçonha *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A Fig. 9B e C mostra a atividade da HO no córtex e medula, respectivamente. No rim e no córtex isolado, observou-se um aumento da atividade da HO nos tempos de 3 h e 6 h. Já na medula, houve aumento da atividade nos tempos de 1 h, 3 h e 6 h.

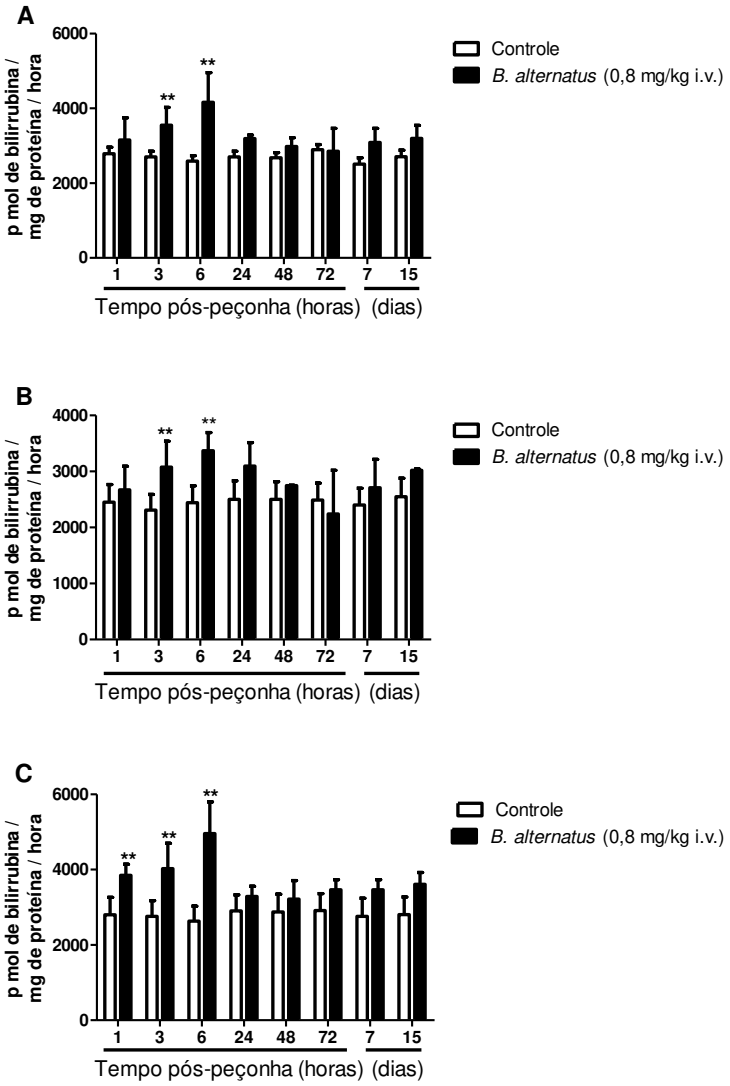

Figura 9. Atividade da HO em rim (**A**), córtex (**B**) e medula (**C**) de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A atividade da HO foi avaliada pela formação da bilirrubina. As colunas representam a média ± DP (n=6). **p<0,01 comparado com o grupo controle correspondente (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.4.3- Imuno-histoquímica

A Figura 10 mostra a localização e expressão da HO-1 em rins de ratos tratados com a peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Após 1 h, houve pequena expressão da HO-1 na área medular, principalmente nos túbulos coletores. Em 3 h e 6 h, observou-se aumento da expressão da HO-1 tanto na região cortical e nos túbulos proximais e distais, como na região medular, nos túbulos coletores e na alça de Henle. Em 24 h houve diminuição da expressão da HO-1 com ausência no córtex e pequena expressão nos túbulos coletores da região medular. A HO-1 não foi detectada nos vasos ou glomérulos.

4.5- Cu/Zn-SOD e catalase

4.5.1- Atividade enzimática

A Figura 11 ilustra a atividade da Cu/Zn-SOD no rim (Fig. 11A), no córtex renal (Fig. 11B) e na medula (Fig. 11C) de ratos tratados com a peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Na primeira hora, houve aumento significativo da atividade da Cu/Zn-SOD. No córtex, observou-se aumento da atividade em 1 h, sendo que na medula não houve mudanças significativas.

A Figura 12 mostra a atividade da catalase em rins (Fig. 12A), córtex (Fig. 12B) e medula (Fig. 12C) de ratos tratados com a peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Houve aumento nos rins de ratos tratados com a peçonha, porém os resultados não foram significativos. Na região cortical, houve aumento da atividade da catalase em 1 h enquanto que na região medular nenhuma alteração significativa foi observada.

4.6 Ciclo-oxigenase

4.6.1- Expressão gênica da COX-1 e COX-2

A Figura 13 mostra a expressão gênica da COX-1 e COX-2 em rins de ratos após tratamento com a peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A expressão de COX-1 nos ratos tratados com peçonha não foi significativamente diferente daquela observada no grupo controle. Já para a COX-2, ouve aumento na expressão 3 h pós-peçonha.

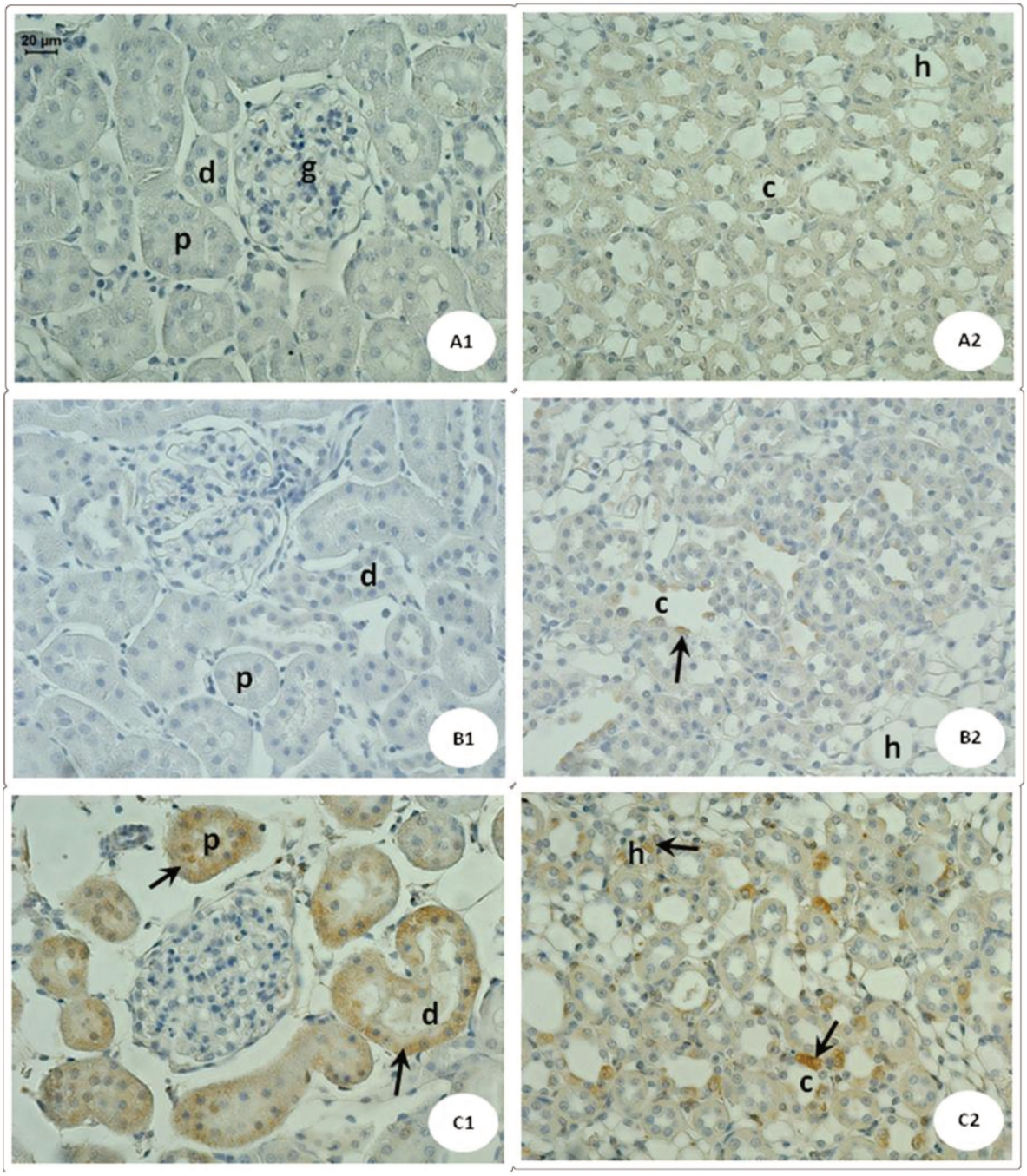

Figura 10. Legenda na próxima página.

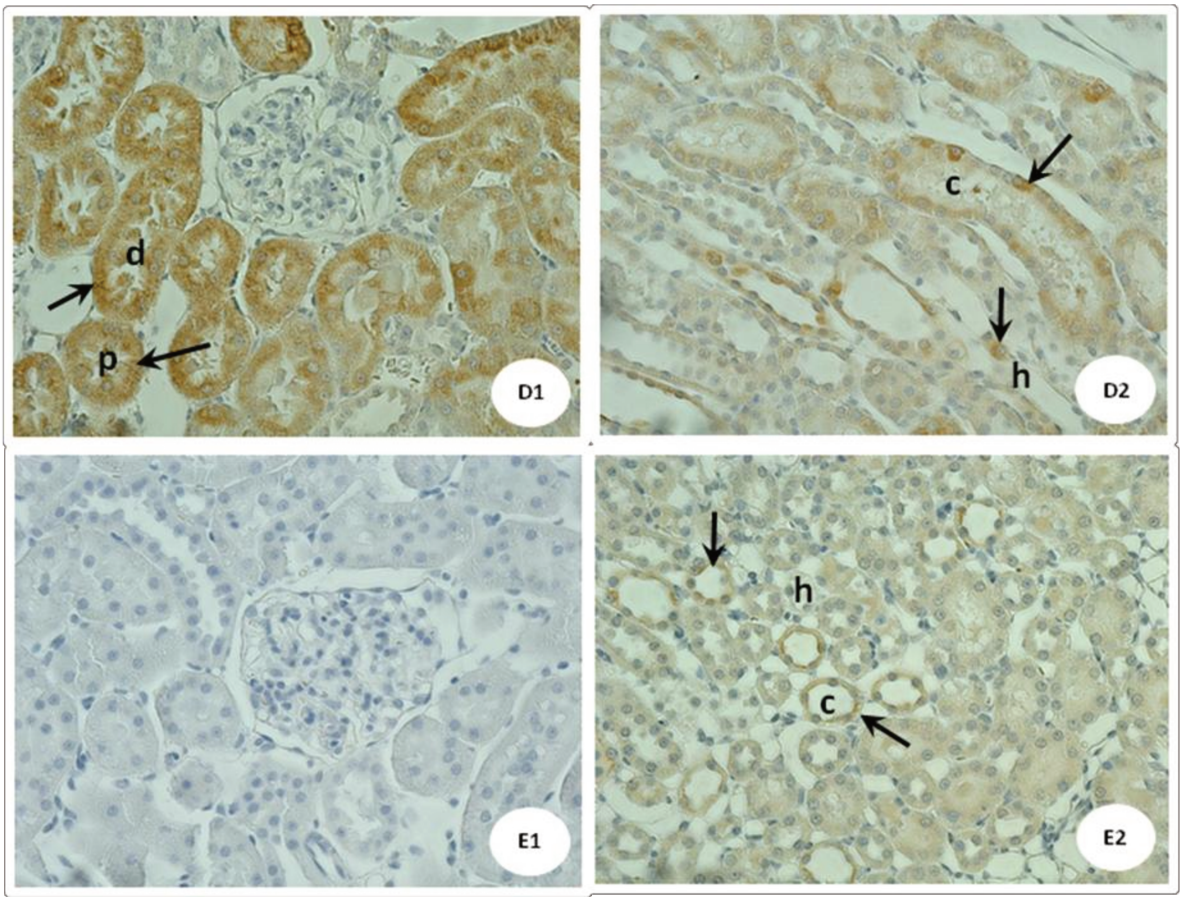

Figura 10. Detecção de HO-1 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A coluna 1 (lado esquerdo) representa a região cortical e a coluna 2 (lado direito) a região medular. **A –** grupo controle, **B –** 1 h, **C –** 3 h, **D –** 6 h e **E –** 24 h. Não foi observada a expressão da HO-1 nos controles. As setas indicam marcação positiva para HO-1. **c** = coletor, **d** = túbulo distal, **g** = glomérulo, **h** = alça de Henle, **p** = túbulo proximal. Marcação com anticorpos específicos para HO-1 e contra-coloração com hematoxilina. Barra = 20 µm.

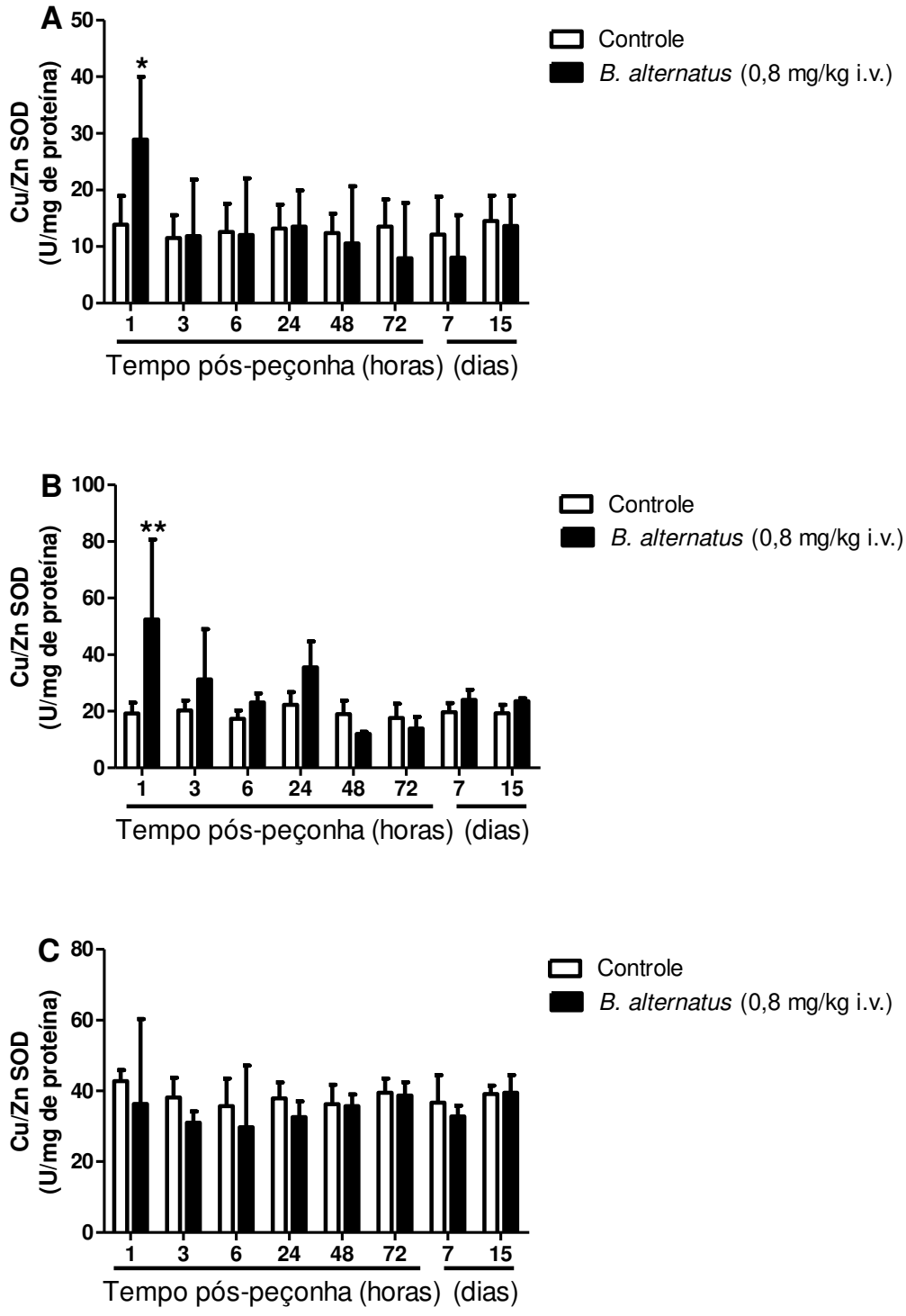

Figura 11. Atividade da Cu/Zn-SOD no rim (**A**), córtex (**B**) e medula (**C**) de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). As colunas representam a média ± DP (n=6). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ comparado com o grupo controle correspondente (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

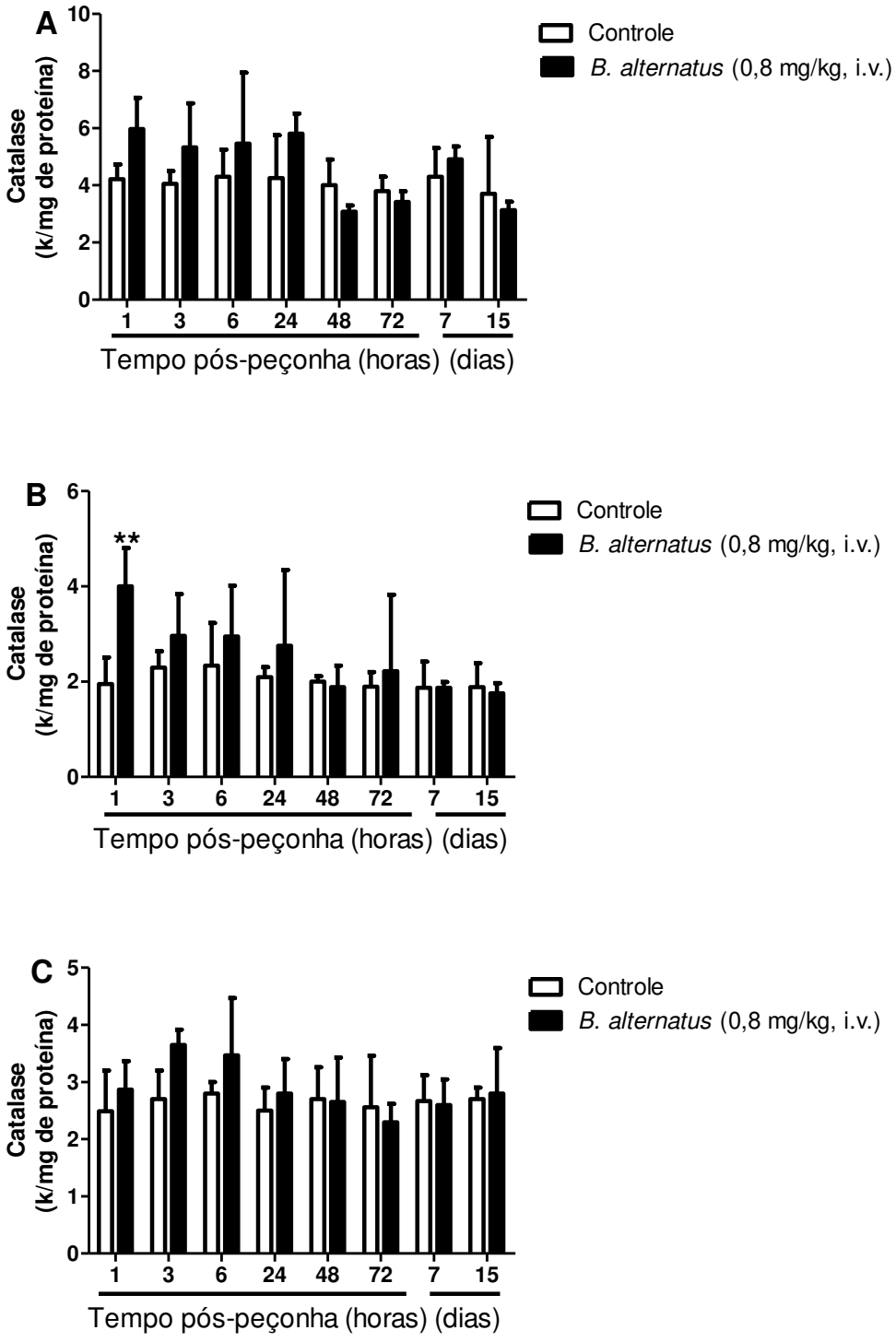

Figura 12. Atividade da catalase no rim (**A**), córtex (**B**) e medula (**C**) de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). As colunas representam média ± DP (n=6). **p<0,01 comparando com o grupo controle correspondente (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

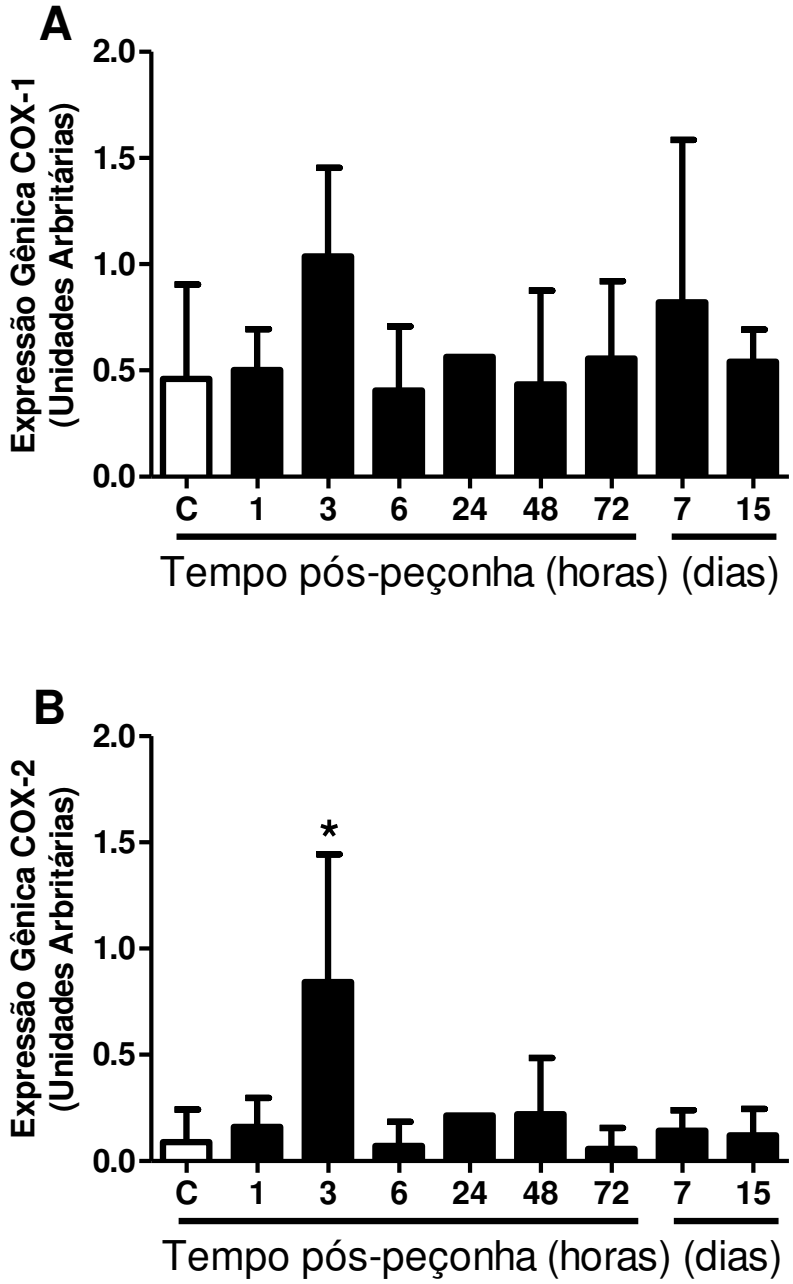

Figura 13. Expressão gênica da COX-1 (**A**) e COX-2 (**B**) em rins de ratos controles (coluna C) e tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A expressão gênica foi avaliada por PCR-*real time* e os resultados expressos em unidades arbitrárias. As colunas representam a média ± DP (n=6). *p<0,05 comparados com o grupo controle (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).

4.6.2- Expressão protéica da COX-2

A Figura 14 ilustra a expressão protéica da COX-2 em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). Nos tempos de 3 h até 24 h houve aumento da expressão protéica da COX-2 renal, com retorno aos valores basais em 48 h.

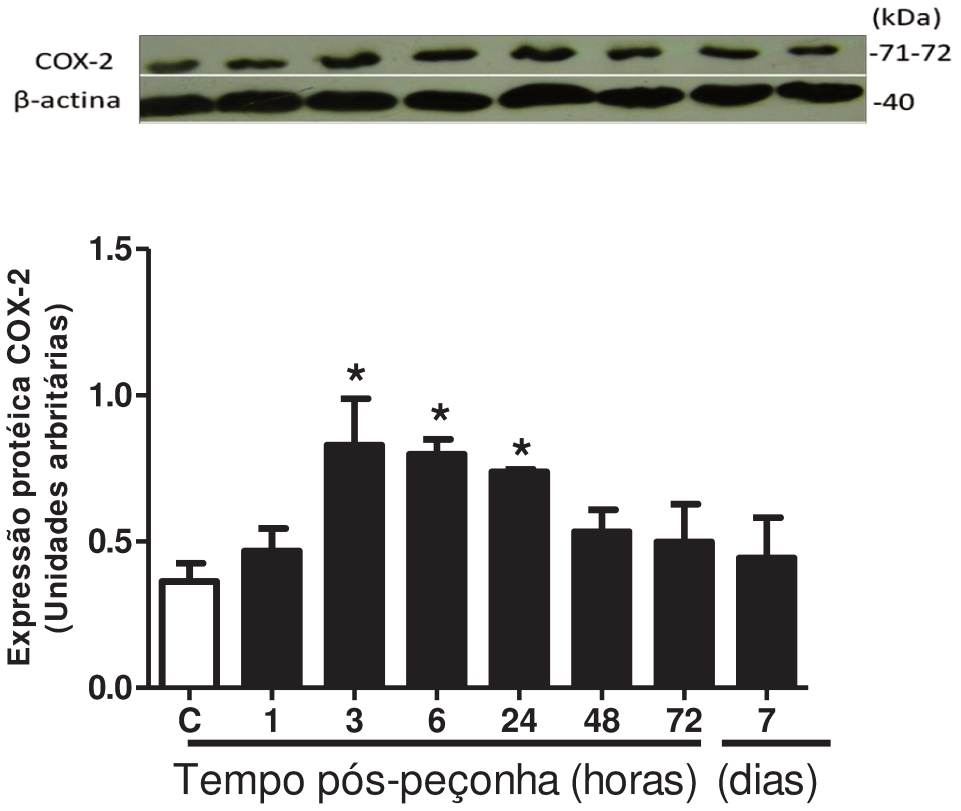

Figura 14. Expressão protéica da COX-2 renal em ratos controle (coluna C) e tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A expressão protéica foi analisada por *western blotting* (painel superior) do sobrenadante de homogenados renais, e o gráfico (painel inferior) mostra a quantificação por densitometria das bandas detectadas. A expressão da COX-2 foi normalizada relativa à expressão da β-actina e os resultados expressos em unidades de pixiel. As colunas representam a média ± DP (n=4). *p<0,05 comparados com o grupo controle (ANOVA seguido por teste de Bonferroni).

A Figura 15 mostra a localização da COX-1 e as Figuras 16 e 17 a expressão da COX-2, em rins de ratos tratados com a peçonha de *B. alternatus*. Em todos os grupos, inclusive o grupo controle, foi observado a expressão da COX-1 (isoforma constitutiva), principalmente nos túbulos coletores e nas células intersticiais da região da medula interna. Porém não houve diferença na localização ou intensidade da marcação da COX-1 entre os grupos controles e tratados.

A COX-2 é caracterizada por ser uma isoforma induzível, porém no rim, ela tem uma expressão basal que pode ser induzida em casos patológicos. A Figura 16 mostra que rins de ratos do grupo controle expressaram a COX-2 nos túbulos distais e nos túbulos coletores. Houve um aumento na expressão da COX-2 em 3 h, 6 h e 24 h pós-peçonha. Nestes grupos, a COX-2 foi expressa mais abundantemente nos túbulos proximais, distais e coletores. A localização da COX-2 foi principalmente citoplasmática e membranal.

Em 3 h, 6 h e 24 h houve expressão da COX-2 também nos vasos renais. A Figura 17 demonstra que a expressão da COX-2 foi mais evidente em 3 h e 6 h, sendo que em 48 h houve uma diminuição da marcação. Em ratos controles e em intervalos >48 h em ratos tratados com peçonha não houve marcação para COX-2.

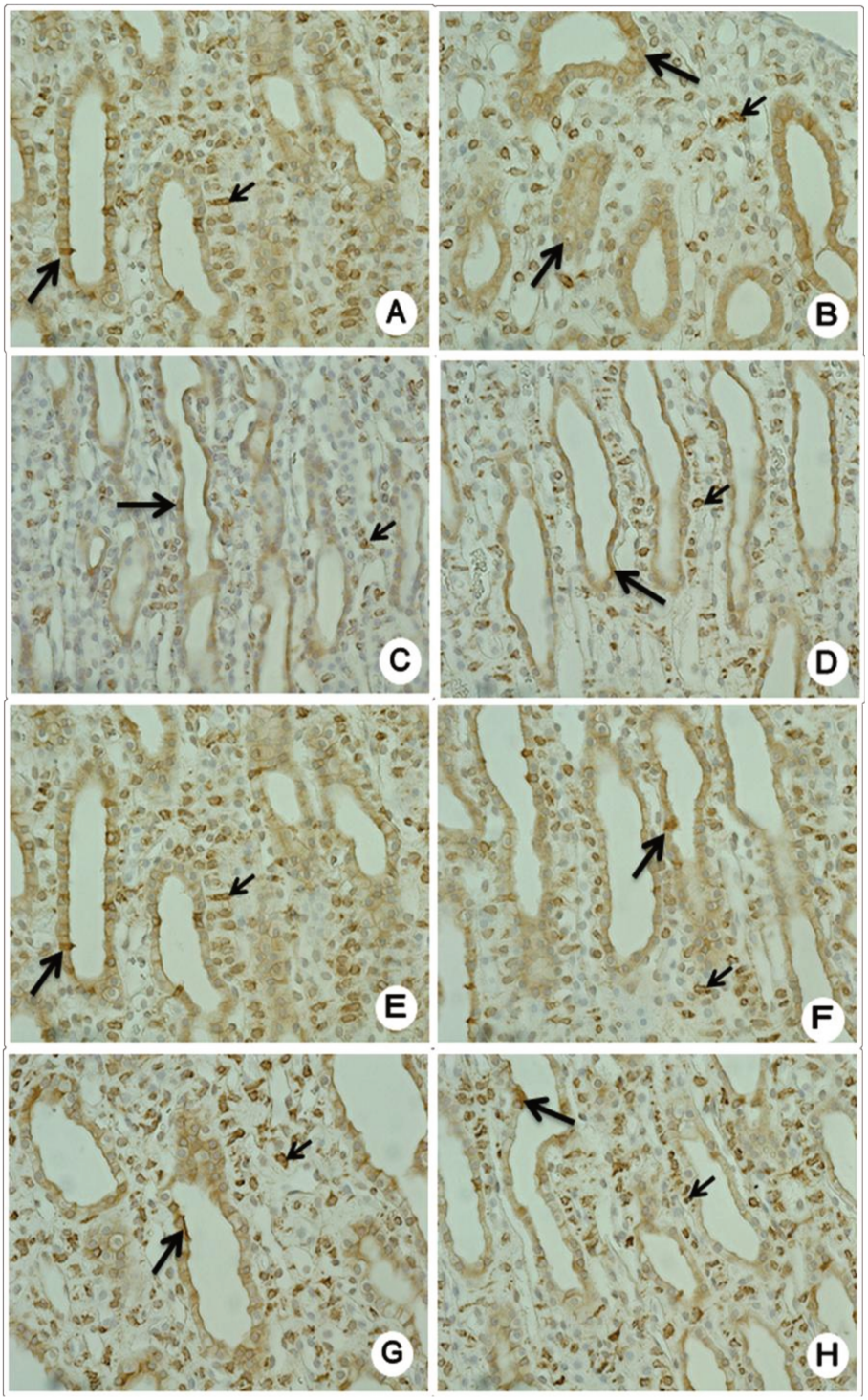

Figura 15. Expressão de COX-1 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A** – controle, **B** – 1 h, **C** – 3 h, **D** – 6 h, **E** – 24 h, **F** – 48 h, **G** – 72 h e **H** – 7 dias. A coloração marrom (setas) indica localização da COX-1, **c** = túbulo coletor, **i** = células intersticiais. Marcação com anticorpos específicos para COX-1 e contra-coloração com hematoxilina. Barra = 20 µm.

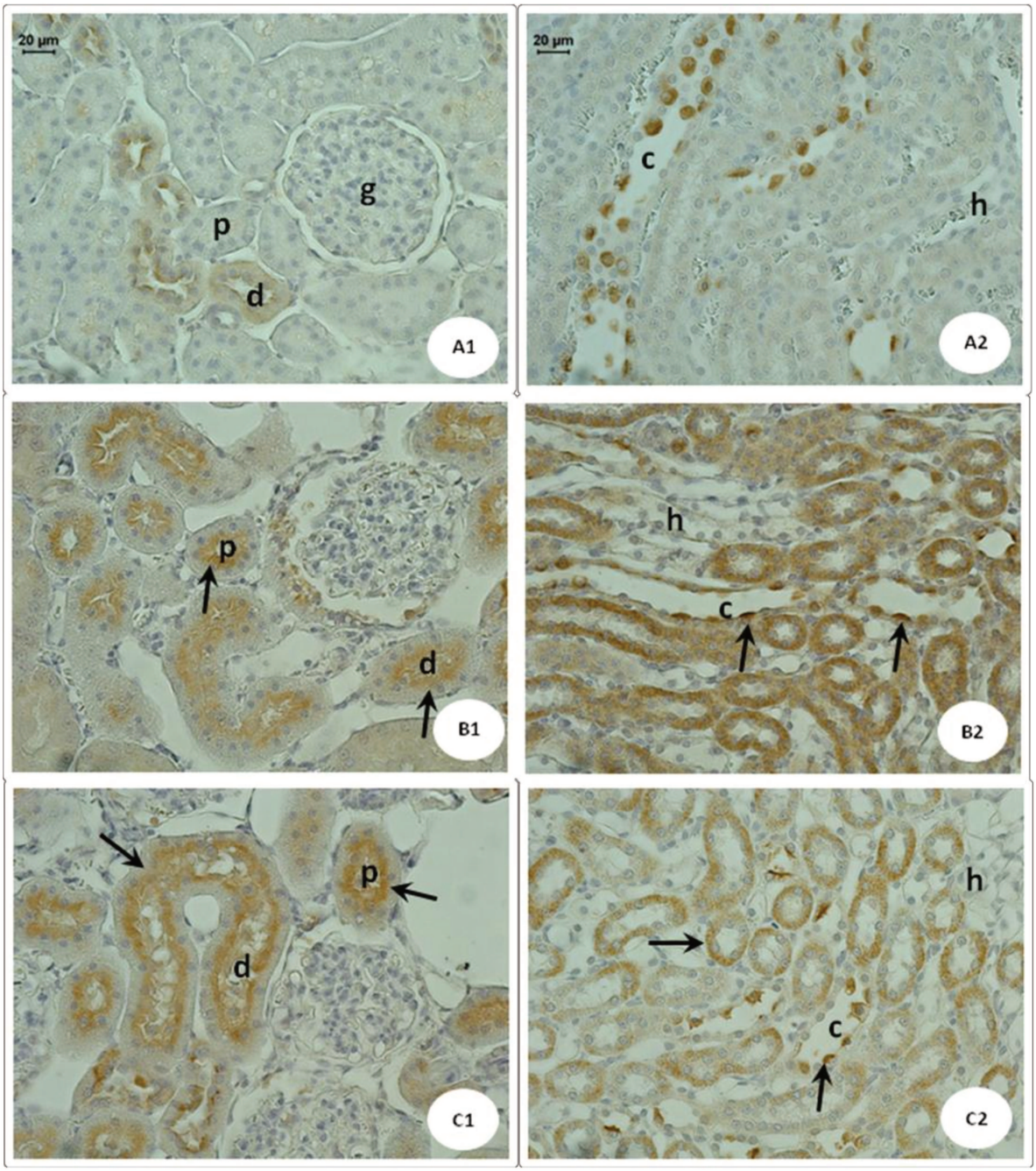

Figura 16. Legenda na próxima página.

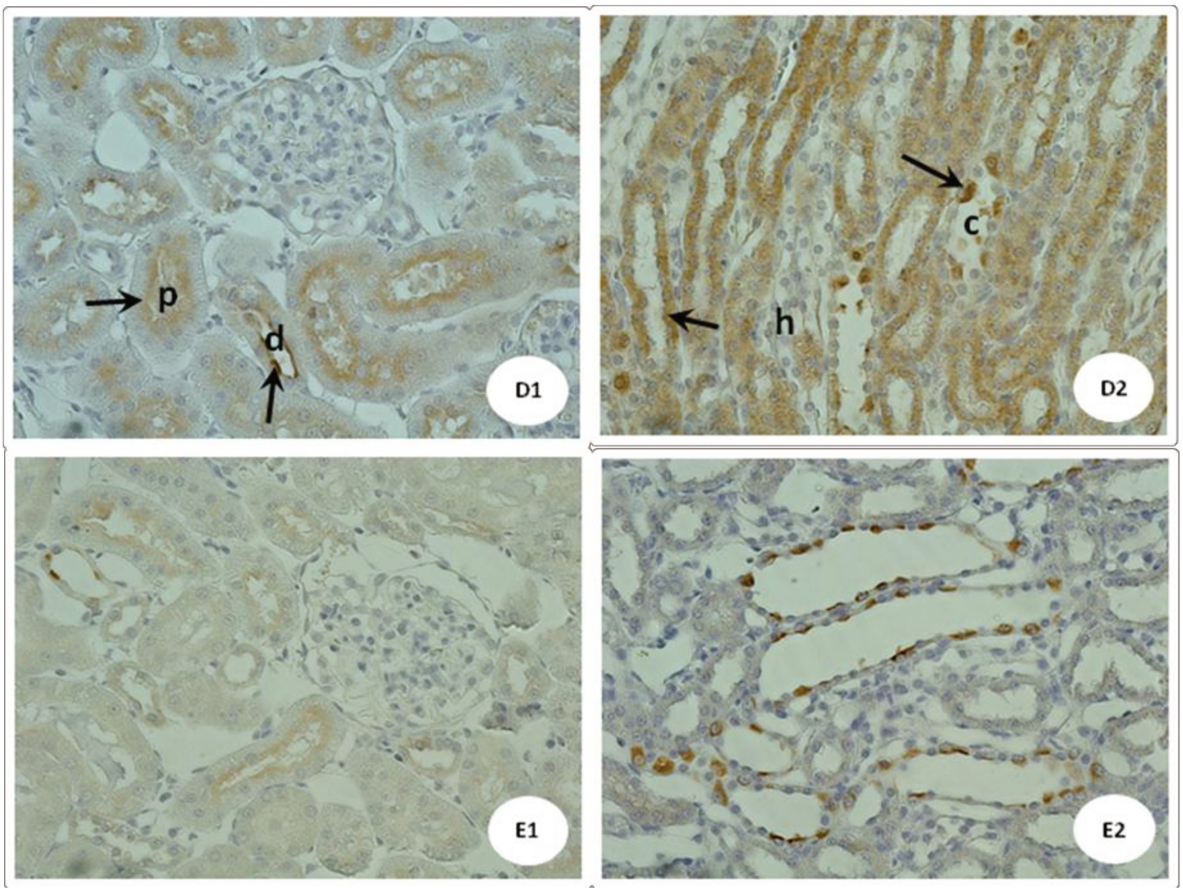

Figura 16. Detecção de COX-2 por imuno-histoquímica em rins de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). A coluna 1 (lado esquerdo) representa a região cortical e a coluna 2 (lado direito), a região medular. **A** – controle, **B** – 3 h, **C** – 24 h, **D** – 48 h e **E** – 72 h. As setas indicam expressão mais proeminente para COX-2**. c** = túbulo coletor, **d** = túbulo distal, **g** = glomérulo, **h** = alça de Henle e **p** = túbulo proximal. Marcação com anticorpos específicos para COX-2 e contra-coloração com hematoxilina. Barra = 20 µm.

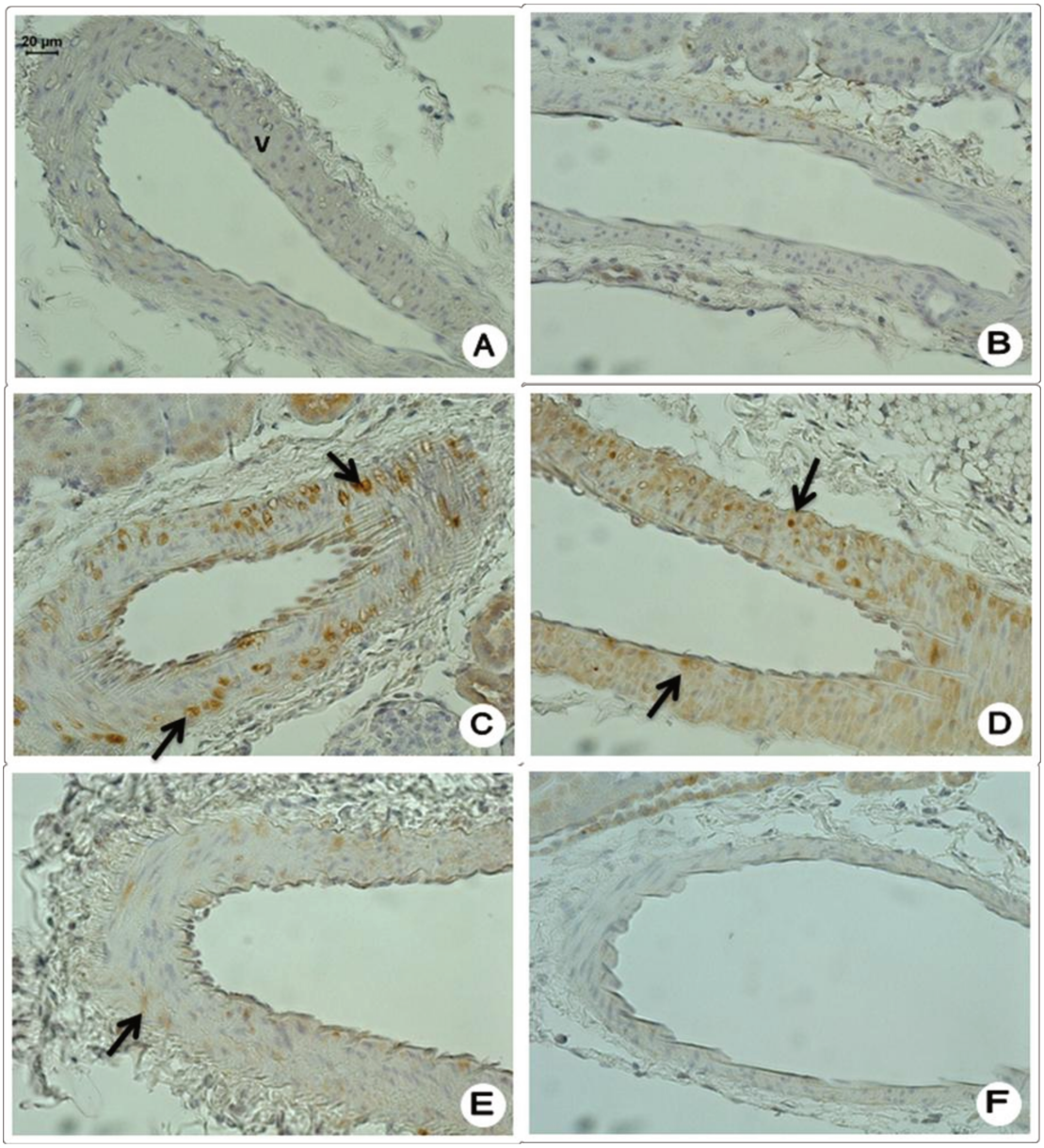

Figura 17. Detecção da COX-2 por imuno-histoquímica em vasos renais de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A** – controle, **B** – 1 h, **C** – 3 h, **D** – 6 h, **E** – 24 h e **F** – 48 h. As setas indicam expressão da COX-2, **v** = vaso. Marcação com anticorpos específicos para COX-2 e contra-coloração com hematoxilina. Barra = 20 µm.

DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a peçonha de *B. alternatus* produz um quadro de dano renal envolvendo uma série de alterações morfológicas e funcionais. A eficácia do tratamento sistêmico foi confirmada monitorando-se algumas atividades enzimáticas frequentemente usadas como marcadores de lesões sistêmicas. As enzimas ALT e AST são indicadores de disfunção hepática, enquanto CK-MB é um marcador para a integridade do miocárdio (118). Conforme visto aqui, 3 h após a administração da peçonha de *B. alternatus* houve aumento das atividades séricas de ALT, AST e CK-MB, sugerindo que a peçonha injetada havia de fato de distribuída pelo sistema circulatório geral, atingindo órgãos distantes do sítio de injeção. Estes resultados foram confirmados pelos achados histopatológicos no fígado e no coração, os quais demonstraram alterações celulares 1 h e 3 h após administração da peçonha (ver Apêndice 1). Outros estudos também demonstraram alterações hepáticas e cardíacas dentro de 3 h após injeção de peçonha botrópica (27,118).

5.1- Alterações morfológicas

A IRA é uma importante causa de morbidade e mortalidade em envenenamentos por *Bothrops* (3,75). A susceptibilidade do tecido renal ao dano reflete em parte o papel central deste órgão em filtrar o sangue e concentrar xenobióticos para excreção (18,119). Dentre as alterações morfológicas mais comumente vistas na clínica (3,17,23,26) e na experimentação (1,24,25,120,121) estão a descamação das células epiteliais tubulares, microaneurismos e necrose tubular cortical. Várias destas alterações também têm sido observadas *in vitro*, tanto em preparações de rim isolado (122) como em células em cultura (20,21).

As lesões causadas pela peçonha de *B. alternatus* se enquadram no perfil descrito acima, e podem ter diversas causas, tais como a ação fosfolipásica (27) e proteolítica (28) e a coagulação intravascular, possívelmente desencadeada pela balterobina (41) e outras serinoproteases (40) presentes na peçonha de *B. alternatus*. A presença de trombos levando à oclusão vascular poderia desencadear um quadro de isquemia resultando em dano celular.

Os microaneurismas podem resultar da deposição de fibrina nos capilares glomerulares devido à ação coagulante da peçonha, como também podem ser causadas pela desorganização do tufo glomerular através da ação proteolítica direta da peçonha sobre a matrix extracelular, a membrana celular e os podócitos (1). As PLA_2 da peçonha também

podem desestabilizar a membrana glomerular, aumentando a permeabilidade a íons e macromoléculas (1,115).

Lesões em vasos sanguíneos, a deposição de fibrina nos glomérulos, e a presença de hemólise e hemoglobinúria (28,120) também podem contribuir para as alterações morfológicas observadas. A presença de material protéico na luz dos túbulos pode ser justificada pelo aumento da hemólise ou pela liberação de mioglobinas na circulação (120).

5.2- Alterações funcionais

Além das lesões morfológicas, as peçonhas botrópicas também causam alterações funcionais, sendo as mais importantes uma redução na filtração glomerular, resultando em oligúria ou anúria, alterações na excreção de Na^+ e K^+ e proteinúria. (conseqüência das lesões morfológicas como a descamação de células epiteliais).

Estas alterações funcionais frequentemente têm sua causa no dano morfológico causado pela peçonha. Assim, por exemplo, o aumento da permeabilidade da membrana e a presença de microaneurismas glomerulares podem contribuir para a proteinúria observada aqui. De modo semelhante, alterações urinárias como a oligúria, o aumento da densidade urinária, e a presença de leucócitos e sangue oculto na urina podem ser co-relacionados às alterações morfológicas causadas pela peçonha de *B. alternatus*.

A proteinúria resultou na presença de diversas proteínas na urina nas primeiras horas do envenenamento. Entretanto, com a exceção da albumina, a identidade das outras proteínas é desconhecida: podem ser proteínas da própria peçonha ou do tecido renal (liberadas pela ação proteolítica da peçonha), e podem ainda ser fragmentos de proteínas que já sofreram degradação proteolítica no fígado, pulmão ou próprio rim. Em estudos com outras peçonhas onde se investigou as proteínas presentes na urina foram detectadas a hemoglobina (124), N-acetil-β-D-glucosaminidase (125), produtos de degradaçao de fibrina (126), β_2-microglobulin (127) e mioglobina (128).

O aumento da densidade urinária em 3 h e 6 h provavelmente reflete a proteinúria marcantes neste período.

5.3- Alteração na expressão e/ou atividade de enzimas chaves

Os resultados deste estudo mostram que ocorreu aumento na expressão e/ou atividade de algumas enzimas chaves (HO, COX e SOD) em tecido renal nas primeiras 24 h após o envenenamento, ou seja, na fase aguda do dano. Conforme indicado acima, a peçonha causou diversas lesões celulares no tecido renal. Estas lesões podem estar associadas a um aumento na produção de ERO que aumentaria o estresse oxidativo e, consequentemente, o dano tecidual no rim. Em consonância com isso, os picos de aumento nas atividades da SOD e catalase, que serviriam para combater este aumento de radicais livres, ocorreram nas primeiras horas após o envenenamento, quando acontece bastante dano renal e as concentrações circulantes da peçonha ainda estão elevadas (119). De fato, estudos *in vivo* (129) e *in vitro* (20,22) têm implicado o estresse oxidativa e peroxidação lipídica no dano renal causado por peçonhas. Parte deste estresse oxidativo pode ser mediada pela ação de enzimas como a L-aminoácido oxidase (LAO) que causa lesões e morte celular através da produção de H_2O_2 (131,132). Nascimento *et al*. (71) concluiram que a peçonha de *B. alternatus* pode gerar espécies reativas como O_2^- e H_2O_2 em culturas de células MDCK uma vez que a incubação com a SOD e catalase diminuiu as lesões celulares, sugerindo que estas duas enzimas podem exercer um papel citoprotetor no rim. Esta conclusão está de acordo com o fato da SOD ser uma enzima antioxidante, que dismuta o anion superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é logo convertido em molécula de água e oxigênio pela ação da catalase (93,94).

Observamos também um aumento na expressão e atividade da HO após o envenenamento. A HO é uma enzima citoprotetora envolvida no controle da circulação sanguínea, diurese e natriurese (71,89). Entre os efeitos citoprotetores, a HO está ativa em condições de IRA, glomerulonefrites, processos isquêmicos e estresses oxidativos (72,134). Esta enzima é encontrada ao longo do néfron, tanto na sua isoforma constitutiva HO-2 como a induzível, HO-1 (77,87).

No córtex houve aumento da atividade da HO em 3 h e 6 h após a peçonha, enquanto que na medula a atividade estava aumentada em 1 h, 3 h e 6 h. Conforme mostrado aqui, não houve aumento na expressão gênica da isoforma constitutiva (HO-2), mas houve aumento da forma induzível (HO-1) nos tempos de 3 h e 6 h. Estes resultados indicam que a

atividade aumentada em relação ao grupo controle era proveniente da HO-1. A HO-1 tem sido caracterizada como uma enzima que combate a inflamação e o estresse oxidativo que são comuns em quadros de isquemia renal (73).

Entre as lesões causadas pela peçonha de *B. alternatus* observamos a presença de infiltrado inflamatório. As peçonhas botrópicas podem causar inflamação acompanhada pela liberação de diversas citocinas, TNFα e EROs (15,18). Estes mediadores pró-inflamatórios podem estimular a expressão e atividade de HO-1 tecidual. O aumento da atividade de HO leva à formação de mais biliverdina e CO, que por sua vez possuem atividades antioxidantes, diminuindo a peroxidação lipídica (77,133). O ferro liberado pela ação da HO também ajuda na ação antioxidante, já que aumenta o nível da ferritina que seqüestra o ferro envolvido na formação de radicais de oxigênio (126).

A rabdomiólise (aumento de mioglobulinas no plasma) ou a administração de hemoglobinas em animais causa dano renal e aumenta a expressão da HO-1 (72). Um aumento excessivo nos níveis da heme, o substrato principal da HO, pode ser citotóxico devido à formação de radicais livres (67,72). Nos ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* observamos sangue hemolisado na urina até 24 h pós-peçonha. Considerando que sangue hemolisado pode liberar heme para o tecido ou meio extracelular, o aumento de HO-1 observado aqui poderia servir para metabolizar o excesso de heme, restringindo assim os efeitos citotóxicos deste no rim.

Vários trabalhos relatam que a proteinúria é acompanhada por aumento da expressão da HO-1 renal (127,128) e que esta enzima diminue o quadro clínico de proteinúria causada por fatores antiinflamatórios (135,136). A degradação de proteínas renais pode estimular a geração de agentes oxidantes, os níveis dos quais podem ser regulados por enzimas citoprotetoras como a HO-1 (136). Nos experimentos descritos aqui, em todos os grupos em que foi observado proteinúria, houve também aumento na atividade da HO-1.

A inflamação é uma das mais importantes características do envenenamento botrópico (2,15) e frequentemente envolve uma complexa rede de mediadores químicos como citocinas (IL-6, IL-8 e TNFα), mecanismos adrenérgicos, e metabólitos provenientes do ácido araquidônico, e.g., PGE_2, provenientes do aumento da expressão da COX-2 (15). O aumento da produção de citocinas por células endoteliais, macrófagos e leucócitos circulantes pode levar ao aumento da expressão da COX-2 tecidual.

O tratamento dos animais com a peçonha de *B. alternatus* resultou em aumento da expressão da COX-2 nas primeiras horas após o envenenamento, sem afetar significativamente a expressão da COX-1. Este resultado está de acordo com estudos mostrando um aumento apenas da isoforma COX-2 em camundongos tratados com peçonha de *B. jararacussu* (11). Este aumento poderia ser decorrente de uma ação indireta, através dos mediadores indicados acima, ou poderia resultar de uma ação direta de componentes da peçonha, como a PLA_2 (10,19) e metaloproteinases (22), que podem estimular a COX-2 levando à formação de prostanóides.

Resumindo, os resultados do presente estudo mostram que a peçonha de *B. alternatus* provoca alterações morfológicas e funcionais renais semelhantes àquelas vistas com outras espécies do gênero. A análise da expressão e/ou atividade de algumas enzimas chaves (HO, COX, SOD e catalase) envolvidas em mecanismos antioxidantes ou citoproteção mostrou que em todos os casos as alterações observadas ocorreram nas primeiras horas após o envenenamento, durante a fase aguda de intoxicação e das lesões renais. Esta observação sugere que há uma estreita relação entre o dano renal e a ativação destas enzimas para tentar atenuar os efeitos deletérios da peçonha na função renal. Do ponto de vista terapêutico, o aumento observado nestas enzimas sugere que intervenções visando melhorar a expressão e atividade destas enzimas poderiam ser uma abordagem interessante para futuras investigações.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

1. Na dose de 0,8 mg/kg, i.v., a peçonha de *B. alternatus*, prejudica a função renal de ratos Wistar até 7 dias pós-peconha, com alterações funcionais, morfológicas e urinárias.

2. Na dose de 0,8 mg/kg, i.v., a peçonha de *B. alternatus* estimula a expressão e/ou atividade das enzimas COX-2, HO-1 e Cu/Zn-SOD em tecido renal, sendo que o perfil deste aumento acompanha as principais alterações morfológicas renais durante os primeiros 48 h pós-peçonha. Este paralelismo sugere que os aumentos podem estar ligados a uma ação citoprotetora destas enzimas no tecido renal.

REFERÊNCIAS

7- REFERÊNCIAS

1. Boer-Lima PA, Gontijo JAR, Cruz-Höfling. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 61: 698-706.

2. Petricevich VI, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Guitiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon 2000; 38: 1253-1266.

3. França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Animals Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds.) 2003; pp. 72-86, Savier/FAPESP, São Paulo.

4. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro CV, Furtado MF, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. Toxicon 2008; 52: 842-851.

5. Hoge AR, Romano SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Mem. Inst. Butantan 1979; 43: 373-496.

6. Campbell JA, Lamar WW. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca. 2004.

7. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metaloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochemie. 2000; 82: 841-850.

8. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damge. Toxicon 2005; 45: 997-1011.

9. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A_2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 2003; 42: 915-931.

10. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A_2. Toxicon 2003; 42: 947-962.

11. Moreira V, Gutiérrez JM, Soares AM, Zamunér SR, Purgatto E, Teixeira CFP. Secretory phospholipase A_2 isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induced distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E_2 and D_2 and expression of cyclooxygenases. Toxicon 2008; 52: 428-439.

12. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon 2009; 54: 976-987.

13. Cher CD, Armugan A, Lachumanan R, Coghlan MW, Jeyasseelan K. Pulmonary inflammation and edema induced by phospholipase A_2: global gene analysis and effects on aquaporins and Na^+/K^+ATPase. J. Biol. Chem. 2003; 33: 31352-31360.

14. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. Toxicon 2009; 54: 67-76.

15. Olivo RA, Teixeira CFP, Wallace JL, Guitiérrez JM, Zamunér SR. Role of cyclooxygenase in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon 2007; 49: 670-677.

16. Warrell DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. (Campbell JA, Lamar WW, eds) 2004; pp. 709-761, Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca.

17. Pinho FM, Yu L, Burdmann EA. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. Semin. Nephrol. 2008; 28: 354-262.

18. Sitprija V. Snakebite nephropathy. Nephrology 2006; 11: 442-448.

19. Ribeiro LA, Alburquerque MK, Pires de Campos VAF, Katz G, Takoaka NY, Lebrão ML, Jorge MT. Deaths caused by venomous snakes in the state of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. Rev. Assoc. Med. Bras. 1998; 44: 311-318.

20. Castro I, Burdmann EA, Seguro AC, Yu L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. Toxicon 2004; 43: 833-839.

21. Collares-Buzato CB, de Paula LSL, da Cruz-Hölfling. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and citotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular ephitelia. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2002; 181: 124-132.

22. Nascimento JM, Franchi Jr. GC, Nowill AE, Collares-Buzato CB, Hyslop S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. Biochem. Cell. Biol. 2007; 85: 591-605.

23. Amaral CFS, Rezende NA, Silva OA, Ribeiro MMF, Magalhães RA, Reis RJ, Carneiro JG, Castro JRS. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópicos e crotálicos. Análise de 63 casos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1986; 26: 220-227.

24. Rezende NA, Amaral CF, Bambina EA, Lachatt JJ, Coimbra TM. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. Braz. J. Med. Biol. Res. 1989; 22: 407-416.

25. Burdmann E, Woronik V, Prado EBA, Abdulkader RC, Saldanha LB, Barreto OCO, Marcondes M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1993; 48: 82-88.

26. Milani R, Jorge MT, Campos FPF, Martins AB, Cardoso JLC, Ribeiro LA, Fan HW, França FOS, Sano-Martins IS, Cardoso D, Fernandez ICOF, Fernandez JC, Aldred VL, Sandoval MP, Puorto G, Theakston RDG, Warrell DA. Snake bites by jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. Q. J. Med. 1997; 90: 323-334.

27. Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. Contribution of phospholipase A_2 to lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Toxicon 1986; 24: 807-817.

28. Gay CC, Maruñak SL, Teibler P, Ruiz R, Pérez OCA, Leiva LC. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. Toxicon 2009; 53: 53-59.

29. Braga MDM, Martins AMC, Amora DN, de Menezes DB, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Alves CD, Barbosa PSF, Alves RS, Fonteles MC, Monteiro HAS.

Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon 2008; 51: 199-207.

30. Havt A, Toyama MH, do Nascimento NR, Toyama DO, Nobre AC, Martins AM, Barbosa PS, Novelho JC, Boschero AC, Carneiro EM, Fonteles MC, Monteiro HS. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsable for the snake venom major effects in the isolated kidney. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2005; 37: 130-141.

31. Braga MDM, Martins AMC, Amora DN, de Menezes DB, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Barbosa PSF, Alves RS, Fonteles MC, Monteiro HSA. Purificaiton and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon 2006; 47: 859-867.

32. Barbosa PSF, Havt A, Facó PEG, Sousa TM, Bezerra ISAM, Fonteles MC, Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Monteiro HAS. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. Toxicon 2002; 40: 1427-1435.

33. Barbosa PSF, Martins AMC, Havt A, Toyama DO, Evangelista JSAM, Ferreira DPP, Joazeiro PP, Beriam LOS, Toyama MH, Fonteles MC, Monteiro HAS. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. Toxicon 2005; 46: 376-386.

34. Braga MDM, Martins AMC, Alves CD, de Menezes DB, Martins RD, Barbosa PSF, Oliveira IMS, Toyama MH, Toyama DO, Diz Filho EBS, Fagundes FHR, Fonteles MC, Monteiro HAS. Purification and renal effects of phospholipase A_2 isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon 2008; 51: 181-190.

35. Evangelista IL, Martins AM, Nascimento NR, Havt A, Evangelista JS, de Norões TB, Toyama MH, Diz-Filho EB, Toyama O, Fonteles MC, Monteiro HS. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A_2. Toxicon 2010; 55: 1061-1070.

36. Braga MDM, Martins AMC, de Menezes DB, Barbosa PSF, Evangelista JSAM, Toyama MH, Toyama DO, Fonteles MC, Monteiro HAS. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon 2007; 49: 329-338.

37. Furtado MFD, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon 1991; 29: 219-226.

38. de Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Gould E, Litwin S, Dokmetijan JC, Segrel L, Vidal JC. A study on venom yield of venomous snake species from Argentina. Toxicon 1998; 36: 1949-1957.

39. Mebs D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. Int. J. Biochem. 1970; 1: 335-342.

40. Ohler M, Georgive D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, Betzel C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulapathic activities. J. Proteome Res. 2010; 9: 2422-2437.

41. Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon 1998; 36: 1059-1063.

42. Castro HC, Dutra DL, Oliveira-Carvalho Al, Zingali RB. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon 1998; 36: 1903-1912.

43. Souza DH, Iemma MR, Ferreira LL, Faria JP, Oliva ML, Zingali RB, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo HS. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. Arch. Biochem. Biophys. 2000; 382: 341-350.

44. Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta de Pérez O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. Toxicon 2005; 46: 546-554.

45. Ponce-Soto La, Lamonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A_2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. Biochim. Biophys. Acta 2007; 1170: 585-593.

46. Ponce-Soto LA, Barros JC, Marangoni S, Hernandez S, Dal Belo CA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA_2 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2009; 150: 291-297.

47. Stabeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. Bioorg. Med. Chem. 2004; 12: 2881-2886.

48. Valério AA, Corradini AC, Panunto PC, Mello SM, Hyslop S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. J. Protein Chem. 2002; 21: 495-503.

49. Vitorino-Cardoso AF, Pereira Ramos OH, Homsi-Bradeburgo MI, Selistre-de-Araujo HS. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. Comp. Biochem. Physiol. B. Mol. Biol. 2006; 144: 334-342.

50. Bauab BA, Junqueira GR, Corradini MC, Silveira PV, Nishioka AS. Clinical and epidemiological aspects of the “urutu” lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. Trop. Med. Parasitol. 1994; 45: 243-245.

51. Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. Annu. Rev. Physiol. 2008; 70: 357-377.

52. Mbonye UR, Song I. Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. BMB Reports 2009; 42: 552-560.

53. Radi ZA. Pathophysiology of cyclooxygenase inhibition in animal models. Toxicol. Pathol. 2009; 37: 34-46.

54. Haider A, Olszanecki R, Gryglewski R, Schwartzman ML, Lianos E, Kappas A, Nasjletti A, Abrahamm NG. Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002; 300: 188-194.

55. Ichii O, Yabuki A, Ojima T, Matsumoto M, Tanigushi K, Suzuki S. Immunohistochemical localization of renin, NO synthase-1, and cyclooxygenase-2 in rodent kidney. Histochem. Histopatol. 2008; 23: 143-150.

56. Olivo LA, Teixeira CFP, Wallace JL, Guitérrez JM, Zamunér SR. Role of cyclooxygenase in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon 2007; 49: 670-677.

57. Mancuso C, Perluigi M, Cini C, De Marco C, Giuffrida AM, Calabrese V. Heme-oxygenase and cyclooxygenase in the central nervous system: a functional interplay. J. Neurosci. Res. 2006; 84: 1385-1391.

58. Rangel BE, Moura LA, Franco MF, Silva PA. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in different grades of acute human renal allograft rejection. Prostagland. Leuk. Essential Fatty Acids 2007; 76: 235-243.

59. Feitoza CQ, Semedo P, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Pinheiro HS, Santos OFP, Landgraf RG, Silva AP, Camara NOS. Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. Inflammation Res. 2010; 59: 167-175.

60. Moreira V, Zamunér SR, Wallace JL, Teixeira CF. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding the production of prostaglandins E_2 and D_2, and expression of cyclooxygenases. Toxicon 2007; 49: 615-624.

61. Hla T, Bailey DB, Liu CH, Schaefers HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999; 31: 551-557.

62. Breyer MD, Breyer RM. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. Annu. Rev. Physiol. 2001; 63: 579-605.

63. Zhang MZ, Lopez PS, Mckanna JA, Harris RC. Regulation of cyclooxygenase expression by vasopressin in rat renal medulla. Endocrinology 2004; 145: 1402-1409.

64. Kim GH, Choi NW, Jung JY, Song JH, Lee CH, Kang CM, Kenneper MA. Treating lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus with COX-2 inhibition improves polyuria

via upregulation of AQP2 and NKCC2. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2008; 294: 702-709.

65. Vogt L, Zeeuw D, Woittiez AJ, Navis G. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces proteinuria in renal patients. Nephrol. Dial. Transplant. 2009; 24: 1182-1189.

66. Machida K, Wakamatsu S, Izumi Y, Yosifovska T, Matsuzaki Y, Kohda Y, Inoue T, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H. Downregulation of the V2 vasopressin receptor in dehydration: mechanisms and role of renal prostaglandin synthesis. Am. J. Physiol. 2006; 292: 1274-1282.

67. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenus production, physiological functions, and pharmacological applications. Pharmacol. Rev. 2005; 57: 585-630.

68. Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ, Winslow RM. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive response *in vivo*. Circ. Res. 1998; 83: 568-577.

69. Tracz MJ, Alam J, Nath KA. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. J. Am. Soc. Nephrol. 2007; 18: 414-420.

70. Kapturczak NH, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. DNA Cell Biol. 2002; 21: 307-321.

71. Li C, Hossieny P, Wu BJ, Qawasmeh A, Beck K, Stoker R. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. Antiox. Redox Signal. 2007; 9: 2227-2239.

72. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia. Antiox. Redox Signal. 2004; 6: 867-877.

73. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat. Med. 2000; 6: 422-428.

74. Ryter SW, Alan J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to the therapeutic application. Physiol. Rev. 2006; 86: 583-560.

75. Scott JR, Chin BY, Bilban MH, Otterbein LE. Restoring homeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? Trends Pharmacol. Sci. 2007; 28: 200-205.

76. Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SE, Choi AMK. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. FASEB J. 2004; 18: 1080-1089.

77. Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from the heme oxygenase-1 gene ablation and expression. J. Am. Soc. Nephrol. 2000; 11: 965-973.

78. Taillé C, Foresti R, Lanone S, Zedda C, Gren C, Aubier M, Motterlini R, Boczkowski J. Protective role of heme oxygenase against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 163: 753-761.

79. Aziz MTA, Al-asmar MF, Mostafa T, Atta H, Rashed L, Sabry D, Ashour S, Aziz ATB. Assessment of heme oxygenase-1 (HO-1) activity in the cavernous tissues of sidenafil citrate-treated rats. Asian J. Androl. 2007; 9: 377-381.

80. Nishikawa Y, Stepp DW, Merkus D, Jones D, Chilian WM. *In vivo* role of heme oxygenase in ischemic coronary vasodilation. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004; 286: 2296-2304.

81. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000; 279: 1029-1037.

82. Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. Free Radic. Biol. Med. 2005; 39: 1-25.

83. Seta F, Bellner L, Rezzani R, Regan RF, Dunn MW, Abraham NG, Gronet K, Laniado-Schawartzman M. Heme oxygenase-2 is a critical determinant for execution of an acute inflammatory and reparative response. Am. J. Pathol. 2006; 169: 1612-1623.

84. Balla G, Jacob HS, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferretin: a cytoprotective antioxidant stratum of endothelium. J. Biol. Chem. 1992; 267: 18148-18153.

85. Ferris CD, Jaffrei SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. Heme oxygenase-1 prevents cell death by regulation cellular iron. Nat. Cell. Biol. 1999; 1: 152-157.

86. Barañano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 16093-16098.

87. Zhang W, Contag PR, Hardy J, Zhao H, Vreman HJ, Hajdena-Dawson M, Wong RJ, Stevenson DK, Contag CH. Selection of potential therapeutics based on *in vivo* spatiotemporal transcription patterns of heme oxygenase-1. J. Mol. Med. 2002; 80: 655-664.

88. Hu Y, Ma N, Yang M, Semba R. Expression and distribution of heme oxygenase-2 mRNA and protein in rat kidney. J. Histochem. Cytochem. 1998; 46: 249-256.

89. Rodriguez F, Kemp R, Balazy M, Nasjletti A. Effects of exogenous heme on renal function role of heme oxygenase and cyclooxygenase. Hypertension 2003; 42: 680-684.

90. Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabbawy HE, Lianos E, Abraham NG. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribuition in rat kidney. Kidney Int. 2001; 59: 1448-14857.

91. Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW. Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. Hypertension 2000; 35: 342-347.

92. Courtney AE, Maxwell AP. Heme oxygenase 1: does it have a role in renal cytoprotection? Am. J. Kidney Dis. 2008; 51: 678-690.

93. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Anal. Biochem. 1995; 232: 243-248.

94. Farmand F, Ehadaie A, Roberts CK, Sindhu RK. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. Environ. Res. 2005; 98: 33-39.

95. Traber MG. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. Miner. Electrolyte Metab. 1997; 23: 135-139.

96. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. Internat. J. Vit. Nutr. Res. 1997; 67: 289-297.

97. Eraslan G, Kanbur M, Silici S, Altinordulu S, Karabacak M. Effects of cypermethrin on some biochemical changes in rats: the protective role of propolis. Exp. Anim. 2008; 57: 453-460.

98. Frederiks WM, Bosch KS. Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues. Free Radic. Biol. Med. 1997; 22: 241-248.

99. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. 1989; 543 p.

100. Craven PA, Melhem MF, Phillips SL, DeRubertis FR. Overexpression of Cu^{2+}/Zn^{2+} superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. Diabetes 2001; 50: 2114-2125.

101. Hernandez-Saavedra D, Zhou H, McCord JM. Anti-inflammatory properties of a chimeric recombinant superoxide dismutase: SOD 2/3. Biomed. Pharmacother. 2005; 59: 204-208.

102. Manning RD, Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. Acta Pysiol. Scand. 2003; 179: 243-250.

103. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabes TT, Stengink LD, Diekus M, Oberley L. Effects of insulin and oral gluthatione on gluthatione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 1986; 35: 503-507.

104. Gupta BL, Azan M, Baquer NZ. Changes in erythrocytes glutathione peroxidase and gluthathione reductase in alloxan diabetes. Biochem. Int. 1990; 21: 725-731.

105. Freitas RM. Behavioural and neurochemical alterations during the acute phase of convulsive process induced by policarpine. Rev. Eletr. Farmácia 2008; 3: 60-70.

106. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. J. Nutr. 1992; 122: 625-626.

107. Kim J, Park JW, Park KW. Increased superoxide formation induced by irradiation preconditioning triggers kidney resistance to ischemia-reperfusion injury in mice. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2009; 296: 1202-1211.

108. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.

109. Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel Electrophoresis of Proteins - a Practical Approach (Hames BD, ed.). 1990; pp. 1-147, IRL Press, Oxford.

110. Boer-Lima PA, Gontijo JAR, Cruz-Höfling. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002; 67: 217-222.

111. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979; 76: 4350-4354.

112. Bifaroni RMS. Papel da heme oxigenase na ação da peçonha de *Bothrops jararacussu*. Dissertação de Mestrado, FCM/UNICAMP, 2008; Campinas. pp. 40-41.

113. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, de Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002; 3: 34.1-34.11.

114. Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rat. Arch. Biochem. Biophys. 1983; 227: 534-541.

115. Aebi H. Catalase *in vitro.* Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.

116. Henry JB. Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais. Manole. 1995; 1678 p.

117. Chaves F, Guitiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. Toxicon 1989; 27: 1085-1093.

118. Mello SM, Linardi A, Rennó AL, Tarsitano CA, Pereira EM, Hyslop S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (urutu) snake venom in rats. Toxicon 2010; 55: 470-480.

119. Koscinczuk P, Borda JT, Maruñak S, Perez AO, Coppo NM. Daño renal em ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. Medicina (Buenos Aires). 2004; 64: 320-324.

120. Perez OA, Koscinczuk P, Negrette MS, Teibler P, Ruiz R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos organos de ratones. Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam. 1996; 46: 97-102.

121. Monteiro HSA, Fonteles MC. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. Pharmacol. Toxicol. 1999; 85: 198-200.

122. Uiker S, Kriz W. Structural analysis of the formation of glomerular microaneurysms in the habu venom model. Virchows Arch. 1995; 426: 281-293.

123. Gao R, Kini RM, Gopalakrishnakone P. Purification, properties and amino acid sequence of a hemoglobinuria-inducing phospholipase A_2, MiPLA-1 from *Micropechis ikahaka* venom. Arch. Biochem. Biophys. 1999; 369: 181-192.

124. Aung W, Kyaw A, Win T, Kyaw KPP, Hla B, Hlaing TT. Isoenzyme profile of urinary NAG in Russell´s viper bite patients with renal demage. Clin. Chim. Acta 1997; 264: 251-254.

125. Han KE, Than T, Lwin M, Swe TN, Pe T. Urinary fibrin(-ogen) degradation products in Russell's viper (*Daboia russelii siamensis*) bite victms. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 1993; 24: 198-201.

126. Tin-Nu-Swe TT, Myint L, Than T, Pe T, Robertson JI, Leckei BJ, Philips WE, Warrell DA. Renal ischaemia, transient glomerular leak and acute renal tubular damage in patients envenomed by Russell's viper (*Daboia russelii siamensis)* in Myanmar. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1993; 87: 678-681.

127. Philips RE, Theakston RD, Warrell DA, Galigedara Y, Abeyskera DT, Dissanayaka P, Hutton RA, Aloysius DJ. Paralysis, rhabdomyolysis and haemolysis caused by bites of Russell's viper (*Vipera russelli pulchella*) in Sir Lanka: failure of Indian (Haffkine) antivenom. Q. J. Med. 1988; 257: 691-715.

128. Yamasaki SC, Villarroel JS, Barone JM, Villela LZ, Silveira PF. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. Toxicon 2008; 52: 445-454.

129. Du XY, Clemetson Kj. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon 2002; 40:659-665.

130. Zuliani JP, Kayano AM, Zaqueo KD, Neto AC, Sampaio SV, Soares AM, Stabeli RG. Snake venom L-amino acid oxidase: some considerations about their functional characterization. Protein Pept. Lett. 2009; 16: 908-916.

131. Courteney AE, Maxwell AP. Heme oxygenase-1: does it have a role in renal cytoprotection? Am. J. Kidney Dis. 2008; 4: 678-690.

132. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturezak N, Agarwal A. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004; 286: 425-441.

133. Datta PK, Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. Kidney Int. 1999; 55: 1734-1739.

134. Pedraza-Chaverri J, Murali NS, Croatt AJ, Alam J, Grande JP, Nath KA. Proteinuria as a determinant of renal expression of heme oxygenase-1: studies in models of glomerular and tubular proteinuria in the rat. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2006; 290: 196-204.

135. Vogt BA, Shanley TP, Cratt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. J. Clin. Invest. 1996; 98: 2139-2145.

136. Fernandes CM, Teixeira C, Leite AC, Gutiérrez JM, Rocha FA. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-α and PGE_2-dependent mechanisms. Br. J. Pharmacol. 2007; 151: 1254-1261.

APÊNDICE 1

Alterações histológicas em outros órgãos

Além do tecido renal, foram analisadas também amostras de tecido pulmonar, hepático e cardíaco de ratos tratados com a peçonha *B. alternatus*. A seguir resumimos os principais achados.

As Figuras suplementares S1 e S2 mostram as alterações morfológicas em alvéolos e nos brônquios, respectivamente. Até em 24 h, os pulmões dos ratos tratados com a peçonha apresentaram lesão macroscópica, com pontos hemorrágicos espalhados pelo tecido. A Figura S1 ilustra focos de extravasamento de eritrócitos para o meio intra-alveolar, sendo este mais intenso na primeira hora e decaindo até 24 h (Fig. S1 - B1 e B2 até E1 e E2). No grupo de 48 h (Fig. S1 - F1 e F2) não foi observado nenhum tipo de lesão nos alvéolos, e não diferença morfológica em comparação ao grupo controle (Fig. S1 - A1 e A2).

A Figura S2 apresenta alterações morfológicas nos brônquios de ratos tratados com a peçonha. Na primeira hora (Fig. S2 - B) já foi possível observar descamações epiteliais e deposição de material biológico (células e eritrócitos) no interior dos alvéolos, sendo que estas alterações morfológicas foram observadas até 24 h (Fig. S2 - C, D e E), mas com diminuição da intensidade da lesão. No grupo de 48 h (Fig. S2 - F), houve focos de regeneração celular no epitélio dos brônquios. O grupo controle não apresentou nenhum tipo de lesão tecidual (Fig. S2 - A).

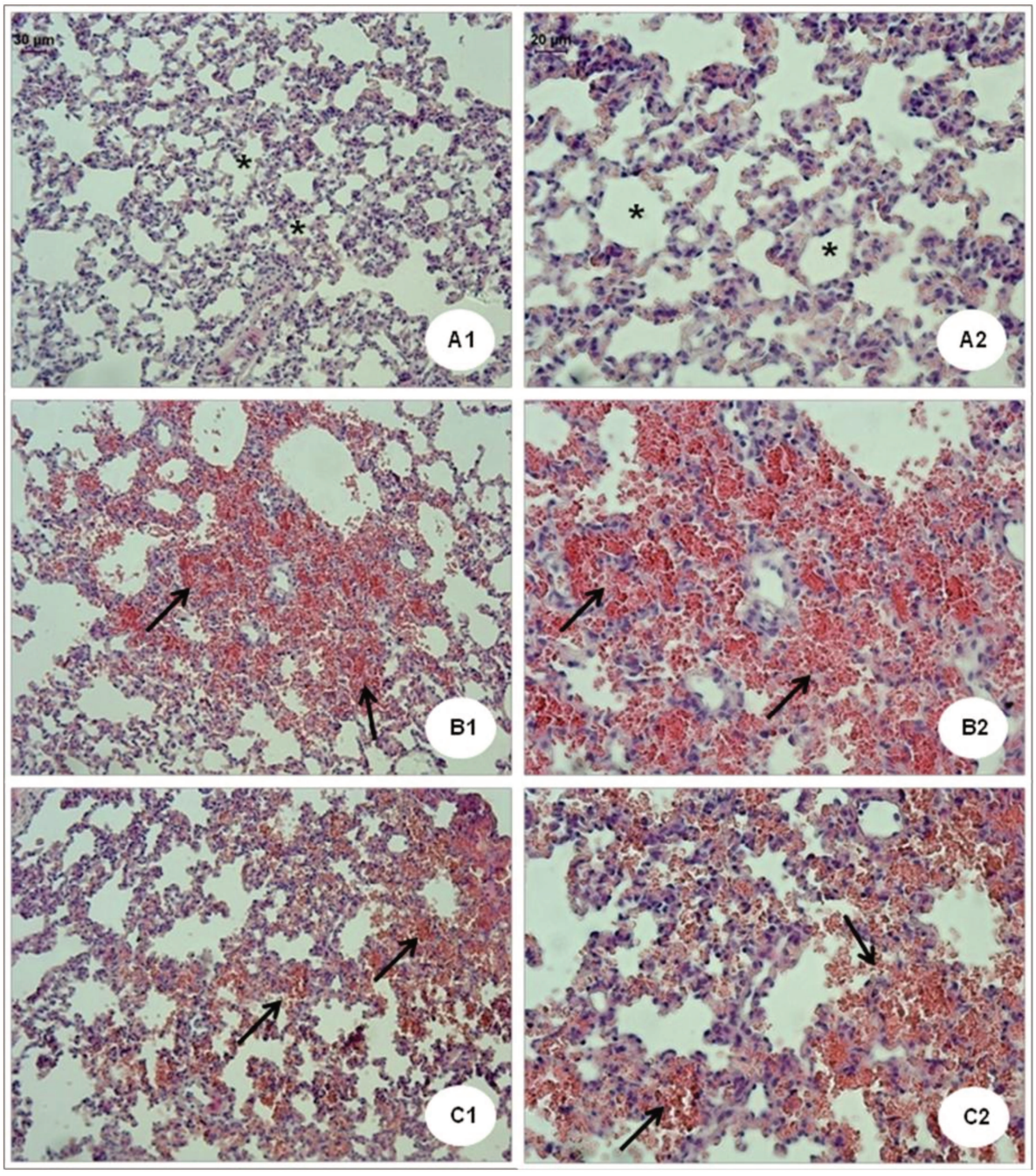

Figura S1- Legenda na próxima página.

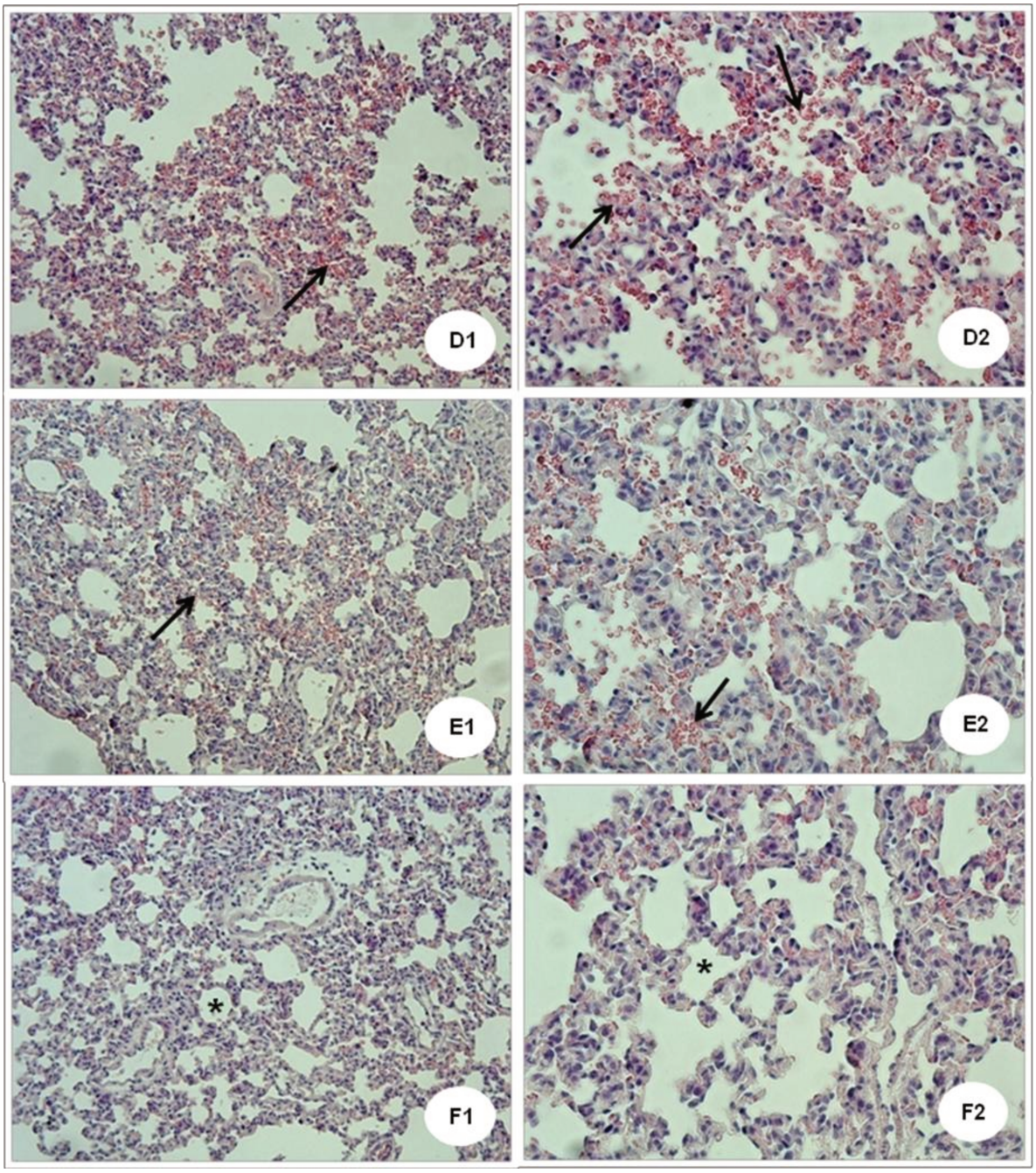

Figura S1. Análise histopatológica do tecido pulmonar de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A1** e **A2** – grupo controle, **B1** e **B2** – 1 h, **C1** e **C2** – 3 h, **D1** e **D2** – 6 h, **E1** e **E2** – 24 h e **F1** e **F2** – 48 h. Asteriscos indicam alvéolos normais e setas apontam extravasamento de eritrócitos no meio intra-alveolar. Coloração HE. Barras de escala: 30 µm para coluna 1 e 20 µm para coluna 2.

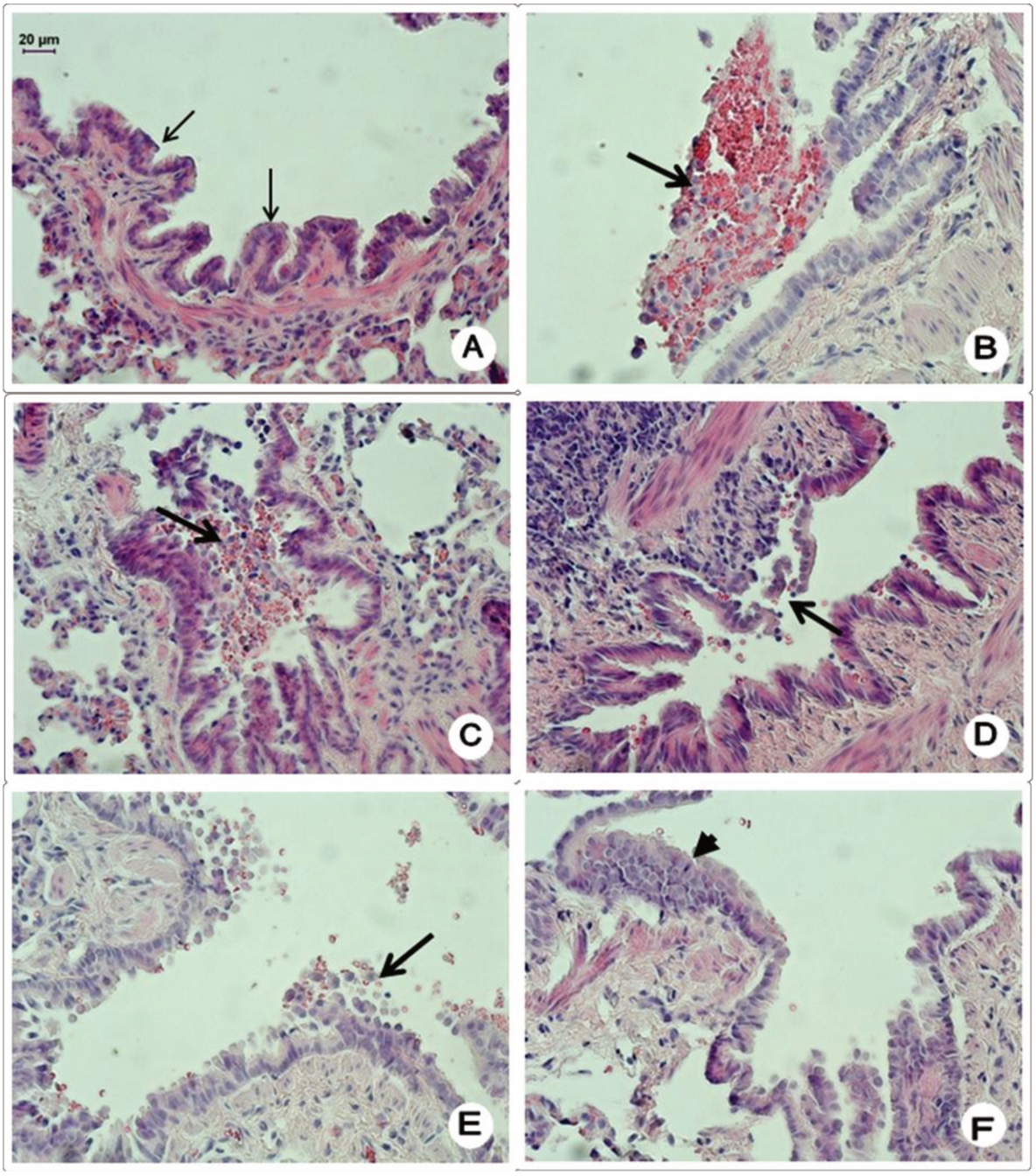

Figura S2. Análise histopatológica de brônquios de ratos tratados com peçonha de *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A** – grupo controle, **B** – 1 h, **C** – 3 h, **D** – 6 h, **E** – 24 h e **F** – 48 h. As setas menores indicam epitélio de aspecto normal, setas grandes indicam lesão tecidual e cabeça de seta, foco de regeneração epitelial. Coloração HE. Barra de escala: 20 µm.

A Figura S3 mostra as alterações histopatológicas do miocárdio de ratos tratados com peçonha. Em 1 h (Fig. S3 - B) e 3 h (Fig. S3 - C) observou-se extravasamento de eritrócitos entre as fibras dos cardiomiócitos. No tempo de 6 h (Fig. S3 - D) o coração destes animais tiveram pequenos focos de infiltrados inflamatórios, principalmente perto dos vasos sanguíneos. Animais controles (Fig. S3 - A), e os grupos de 24 h (Fig. S3 - E) em diante, não apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica.

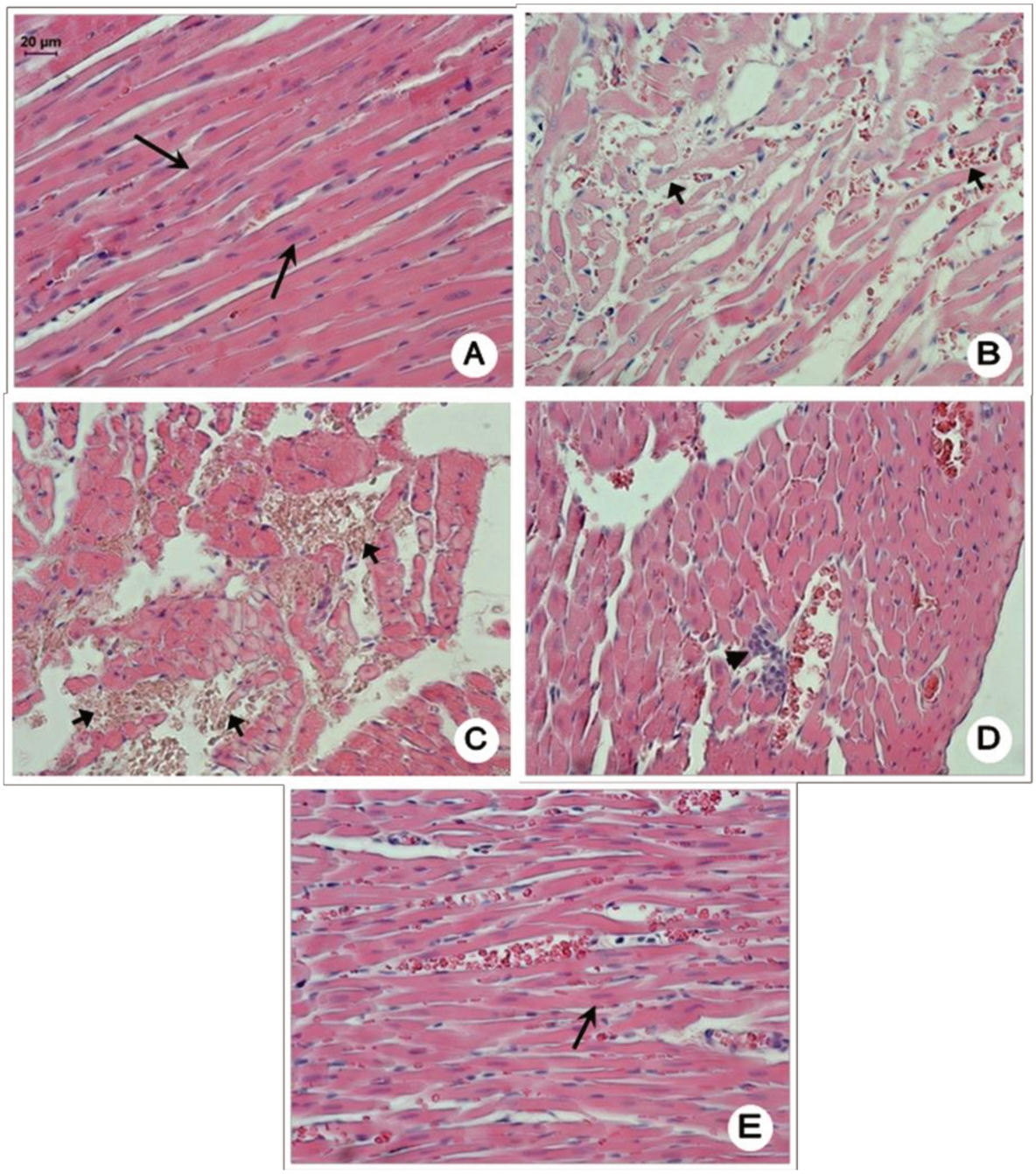

Figura S3. Análise histopatológica do coração de ratos tratados com *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A** – grupo controle, **B** – 1 h, **C** – 3 h, **D** – 6 h e **E** – 24 h. As setas maiores indicam cardiomiócitos normais, enquanto setas menores indicam focos de lesão tecidual e hemorragia e a cabeça de seta indica um infiltrado inflamatório. Coloração HE. Barra de escala: 20 µm.

A Figura S4 mostra a morfologia do tecido hepático de ratos tratados com peçonha. Nos tempos de 1 h (Fig. S4 - B1,2), 3 h (Fig. S4 - C1,2) e 6 h (Fig. S4 - D1,2) houveram alterações morfológicas em comparação aos ratos controles (Fig. S4 - A1,2). No grupo de 1 h (Fig. S4 - B1) e 3 h (Fig. S4 - C1) observou-se destruição e perda da arquitetura hepática. Em 6 h foram observados infiltrados inflamatórios ao longo do tecido (Fig. S4 - D1). Também houve infiltrado inflamatório nas veias centroloburares do tecido hepático destes três grupos (Fig. S4 - B2, C2, D2, respectivamente). Em 24 h (Fig. S4 - E1,2), nenhuma alteração foi observada. Em nenhum dos grupos houve alterações nas zonas periportais.

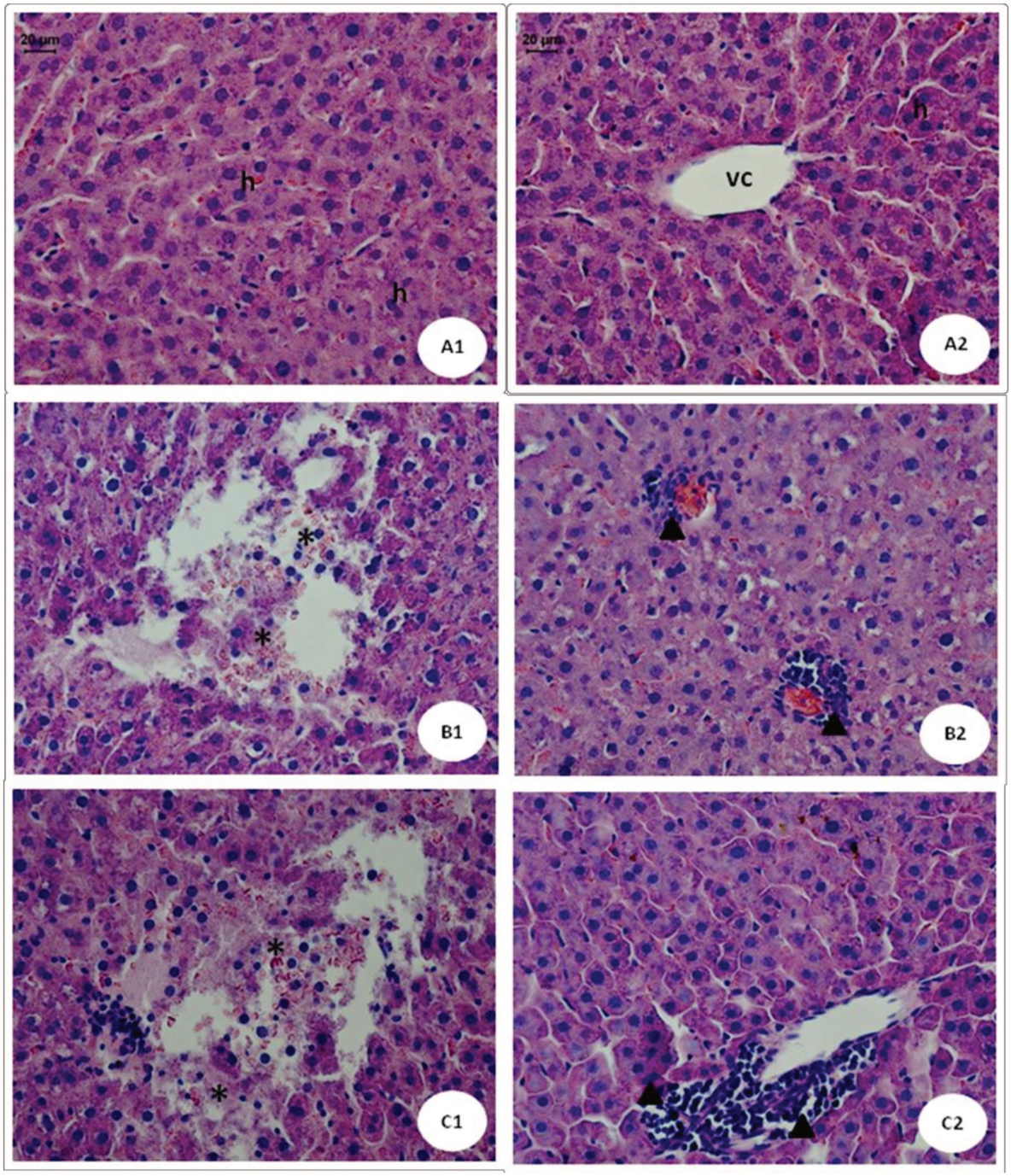

Figura S4. Legenda na página seguinte

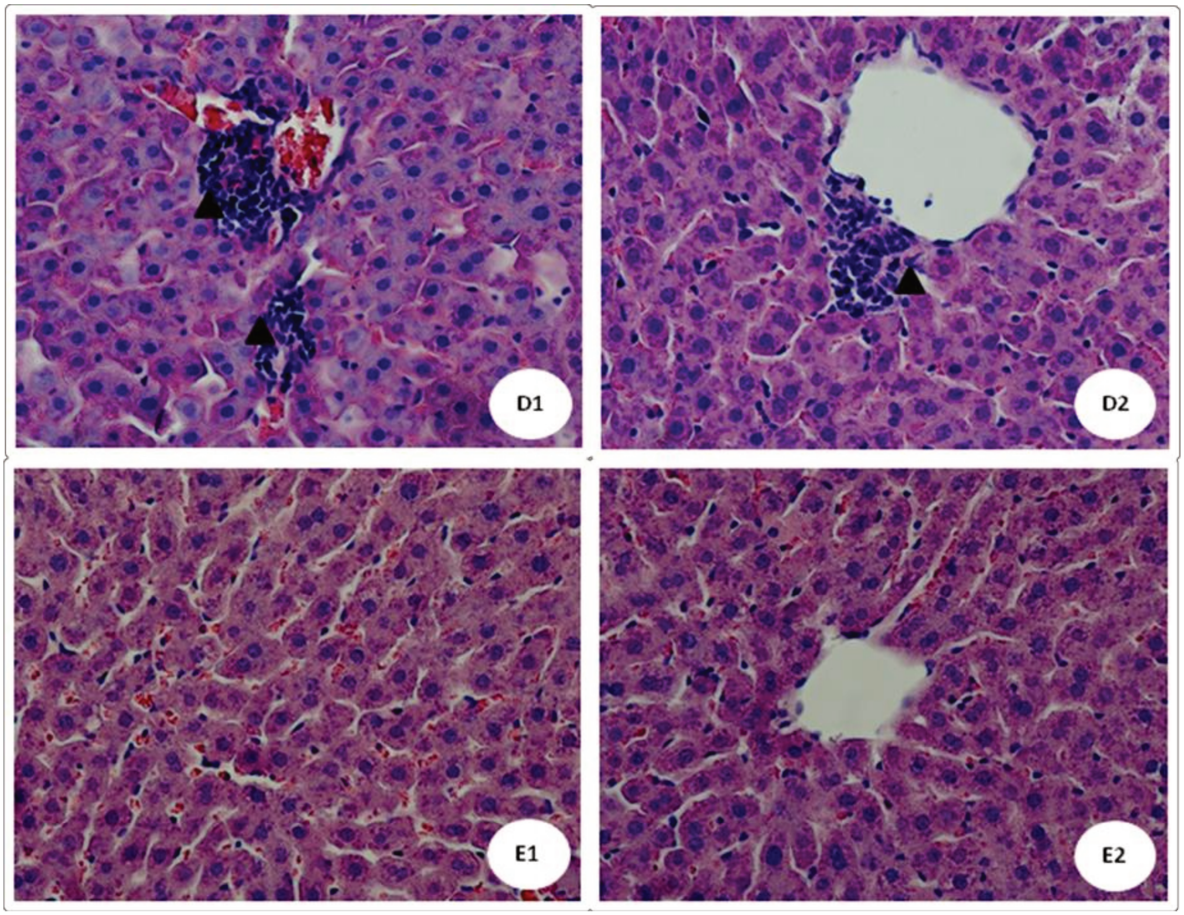

Figura S4. Análise histopatológica de fígado em ratos tratados com *B. alternatus* (0,8 mg/kg, i.v.). **A1** e **A2** – grupo controle, **B1** e **B2** – 1 h, **C1** e **C2** – 3 h, **D1** e **D2** – 6 h e **E1** e **E2** – 24 h. **h** = hepatócito, **vc** = veia centrolobular, * = perda da arquitetura e do tecido hepática e **cabeças de setas** = infiltrado inflamatório. Coloração HE. Barra de escala= 20 µm.

APÊNDICE 2

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1740-1**, sobre **"Perfil da heme-oxigenase, ciclo-oxigenase e superóxido dismutase de rins de ratos tratados com a peçonha de Bothrops alternatus"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop / André Lisboa Rennó**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **09 de fevereiro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1740-1**, entitled **"Profile of heme-oxygenase, cycle-oxygenase and superoxyde dismutase in kidneys of rats trated with"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **February 9, 2009**.

Campinas, 03 de maio de 2010.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/