

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E QUÍMICA
MEDICINAL**

**ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DO VENENO DE *BOTHROPS
JARARACUSSU* E *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS TUBULARES RENAIIS DA
LINHAGEM LLC-PK1 E ANTAGONISMO PELA HEPARINA**

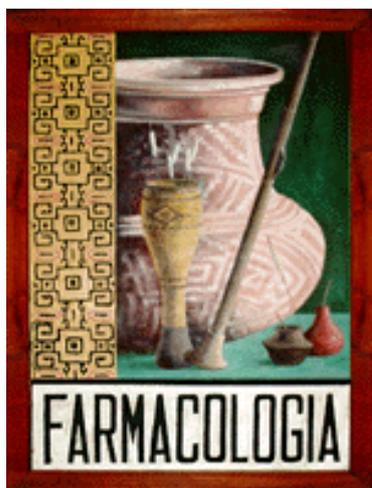
JHONATHA DA MOTA TEIXEIRA CRUZ

**RIO DE JANEIRO
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E QUÍMICA
MEDICINAL**

**ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DO VENENO DE *BOTHROPS
JARARACUSSU* E *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS TUBULARES RENAIS DA
LINHAGEM LLC-PK1 E ANTAGONISMO PELA HEPARINA**

JHONATHA DA MOTA TEIXEIRA CRUZ



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

RIO DE JANEIRO

2014

Teixeira-Cruz, Jhonatha da Mota.

Estudo do efeito citotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* em células tubulares renais da linhagem LLC-PK1 e antagonismo pela heparina / Jhonatha da Mota Teixeira Cruz. – Rio de Janeiro: UFRJ / ICB, 2014.

Orientador: Luis Eduardo Menezes Quintas

Co-Orientador: Paulo de Assis Melo

Dissertação (mestrado) – UFRJ / ICB / Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 53-74.

1. *Bothrops jararacussu*. 2. *Apis mellifera*. 3. LLC-PK1. 4. Heparina. 5. Citotoxicidade. 6. Insuficiência Renal Aguda. I. Quintas, Luis Eduardo Menezes. II. Melo, Paulo de Assis. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.

RESUMO

ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU* E *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS TUBULARES RENAIIS DA LINHAGEM LLC-PK1 E ANTAGONISMO PELA HEPARINA

Jhonatha da Mota Teixeira Cruz

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* e da abelha *Apis mellifera* são constituídos principalmente de proteínas com diferentes atividades enzimáticas. Quando inoculados nos tecidos causam danos locais e sistêmicos, que podem gerar disfunções graves em órgãos altamente vascularizados, como os rins, um processo que pode levar à insuficiência renal aguda. Embora a disfunção renal tenha sido descrita na literatura nos acidentes causados por esses animais, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse fenômeno. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* em células do túbulo renal proximal da linhagem LLC-PK1 e seu antagonismo pela heparina. O veneno de *B. jararacussu* aumentou a atividade de LDH nas concentrações de 25 (180 min de incubação) e 50 µg/mL (120 min). O veneno de *A. mellifera* causou o mesmo efeito nas concentrações de 10 e 25 µg/mL de modo mais rápido, *i.e.*, a partir de 15 min. Houve queda da viabilidade celular com os venenos de *B. jararacussu* (em 180 min) e *A. mellifera* (após 15 min) nas concentrações de 10-50 µg/mL avaliada pela redução do MTT, e ambos foram capazes de reduzir acentuadamente o número de células viáveis nas concentrações máximas testadas. Morfologicamente, observamos uma alteração progressiva a partir de 30 min com o veneno de *B. jararacussu* (10 µg/mL), com marcação acentuada da actina filamentosa cortical, arredondamento e destacamento das células, sendo mais rápido e intenso na concentração de 25 µg/mL. Com o veneno de *A. mellifera*, observamos que já em 5 min na concentração de 5 µg/mL ocorre perda de integridade da membrana celular, com diminuição da marcação cortical de actina filamentosa e formação de núcleos picnóticos. Esses efeitos são concentração- e tempo-dependentes e revelam que possivelmente os mecanismos citotóxicos são distintos. Heparina em diferentes concentrações evitou, pelo menos parcialmente, o aumento da atividade de LDH, diminuição da redução de MTT e do número de células viáveis, podendo ser um fármaco promissor para o tratamento do envenenamento e instalação de insuficiência renal induzida por estas peçonhas.

Palavras-Chaves: *Bothrops jararacussu*, *Apis mellifera*, LLC-PK1, heparina, citotoxicidade, insuficiência renal aguda.

ABSTRACT

CYTOTOXIC EFFECT OF *Bothrops jararacussu* AND *Apis mellifera* VENOM IN RENAL TUBULAR CELLS (LLC-PK1) AND ANTAGONISM BY HEPARIN

Jhonatha da Mota Teixeira Cruz

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Venoms from snakes of *Bothrops* genus and *Apis mellifera* bee consist primarily of proteins with different enzymatic activities. When inoculated into tissues they cause systemic and local damages that can generate serious dysfunctions in highly vascularized organs such as the kidneys, a process that can lead to acute renal failure. Although renal dysfunction has been described in the literature on accidents caused by these animals, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in this phenomenon. The objective of this work was to evaluate the cytotoxic effect of *Bothrops jararacussu* and *Apis mellifera* venoms in renal proximal tubule cell line LLC-PK1 and its antagonism by heparin. The crude venom of *B. jararacussu* increased LDH activity at concentrations of 25 (180 min incubation) and 50 µg/mL (120 min). The crude venom of *A. mellifera* caused a more rapid effect at concentrations of 10 and 25 µg/mL (after 15 min). There was loss of cell viability with the venoms of *B. jararacussu* (180 min) and *A. mellifera* (after 15 min) at concentrations of 10-50 µg/mL when evaluated by MTT reduction, and both of them were able to sharply reduce the number of viable cells at the maximal concentrations tested. Morphologically, we observed a progressive change after 30 min with *B. jararacussu* venom (10 µg/mL), with marked staining of cortical filamentous actin, rounding and detachment of cells from the matrix, being faster and more intense at 25 µg/mL. With *A. mellifera* venom, we noted that loss of cell membrane integrity begins to occur in 5 min at a concentration of 5 µg/mL, with decreased staining of cortical filamentous actin and picnotic nuclei formation. These effects are concentration- and time-dependent and reveal that cytotoxic mechanisms are possibly distinct. Heparin in different concentrations blocked, at least in part, the increased LDH activity, decreased MTT reduction and the number of viable cells, indicating that heparin may be a promising drug for the treatment of envenomation and installation of renal failure induced by these venoms.

Key words: *Bothrops jararacussu*, *Apis mellifera*, LLC-PK1, heparin, cytotoxicity, acute renal failure.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAMs	A Disintegrin And Metalloproteases
ADP	adenosina difosfato
BthTX	bothropstoxina
CK	creatinocinase
DMEM	Modified Dulbecco's Eagle Medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FLA ₂	fosfolipase A ₂
FU	fluxo urinário
H1	histamina do tipo 1
HA	ácido hialurônico
HF	heparina fracionada
i.v.	intravenosa
LAAOs	L-aminoácido oxidases
LDH	lactato desidrogenase
LLC-PK1	Lilly Laboratories Cells-Porcine Kidney 1
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MMPs	metaloproteases de matriz
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
PP	pressão de perfusão
RET	resistência elétrica transepitelial
RV	resistência vascular
s.c.	subcutânea
SAB	soro antibotrópico
SFB	soro fetal bovino
SVMP	metaloproteases de venenos de serpentes

SVSP	serino-proteases de veneno de serpentes
TFG	taxa de filtração glomerular
VWF	von Willebrand
ZO-1	zonula occludens protein 1

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância e Epidemiologia dos Venenos	1
1.2 Composição e Atividade do Veneno Bruto	2
1.2.1 Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	2
1.2.1.1 Metaloproteases	3
1.2.1.2 Fosfolipases A ₂	3
1.2.1.3 Outros componentes	4
1.2.2 Veneno de <i>Apis mellifera</i>	5
1.2.2.1 Melitina	5
1.2.2.2 Fosfolipase A ₂	7
1.2.2.3 Apamina.....	7
1.2.2.4 Outros componentes	8
1.3 Modelo de Estudo de Lesão Tecidual	8
1.3.1 Modelos <i>in vivo</i>	8
1.3.2 Modelos <i>in vitro</i>	9
1.4 Sistema Renal e Acidentes Ofídicos	9
1.4.1 Morfofisiologia renal.....	9
1.4.1.1 Insuficiência renal	13
1.5 Tratamento do Envenenamento	16
1.5.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	16
1.5.2 <i>Apis mellifera</i>	16
1.6 Heparina como Antiveneno	18
2. OBJETIVOS.....	20

2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Reagentes	21
3.2	Cultura de células	21
3.3	Ensaio de LDH	21
3.4	Ensaio de MTT	22
3.5	Contagem de células	22
3.6	Ensaio de Fluorescência	22
3.7	Análise estatística	23
4.	RESULTADOS	24
4.1	Efeito citotóxico do veneno de <i>B. jararacussu</i> e <i>A. mellifera</i> em células renais LLC-PK1	24
4.2	Efeito da heparina sobre a citotoxicidade do veneno de <i>B. jararacussu</i> e <i>A. mellifera</i> em células renais LLC-PK1	31
4.3	Ensaio de Fluorescência	38
5.	DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÃO	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância e Epidemiologia dos Venenos

No mundo ocorrem vários acidentes causados por animais e insetos peçonhentos, podendo-se destacar os acidentes causados por serpentes e abelhas (Ministério da Saúde & Fundação Nacional de Saúde, 2001). No Brasil foram notificados mais de 120.000 empeçonhamentos somente no ano de 2010. A maioria dos acidentes causados por serpentes é atribuída ao gênero *Bothrops*, que corresponde a 90% dos casos de ofidismo notificados no país, seguidas pelos gêneros *Crotalus* (7,7%), *Lachesis* (1,4%) e *Micrurus* (0,4%), havendo pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográfica das serpentes, sendo que, muitas vezes a identificação da serpente não é realizada (Ministério da Saúde & Fundação Nacional de Saúde, 2001). A maioria das notificações é procedente das regiões Sudeste e Sul, que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação (Ministério da Saúde & Fundação Nacional de Saúde, 2001). Essa região compreende a região de ocupação da espécie *Bothrops jararacussu*, estendendo para a Região Centro-Oeste e outros países como Paraguai, Bolívia e Argentina (Fig. 1) (Milani Jr *et al.*, 1997). Os acidentes estão relacionados com fatores climáticos, atividades de trabalho no campo e são mais prevalentes na faixa etária de 15 a 49 anos, acometendo principalmente o sexo masculino (Pinho e Pereira., 2001).

Outro tipo de acidente que constitui um problema de saúde pública é o causado por picadas de abelhas, que estão relacionadas ao surgimento e expansão de abelhas africanizadas nas Américas (Pinto *et al.*, 2005). A espécie de abelha mais comum no Brasil foi introduzida pelos europeus, denominada *Apis mellifera* européia. A africanização teve início na década de 1950, quando uma colônia de abelhas *Apis mellifera scutellata*, importada da África, com o objetivo de originar populações mais adaptadas às condições tropicais, hibridizaram-se com a espécie européia (Hall, 1990; Hall e Smith, 1991; Schneider *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2005).

O ataque das abelhas é tido como um problema rural e também urbano, onde homens e animais estão expostos aos ataques (Tu, 1984). Os acidentes por esses animais podem causar várias reações adversas, podendo culminar em morte por anafilaxia, quando o indivíduo apresenta hipersensibilidade, ou pelo envenenamento

que está relacionado a múltiplas picadas (Curci, 2001; Schumacher *et al.*, 1995; Azevedo–Marques *et al.*, 1997).

Quando um veneno é inoculado em um organismo, observa-se várias manifestações que podem produzir tanto respostas locais como sistêmicas (Mebs e Ownby, 1990; Ackroyd, 1981). As alterações localizadas podem ter repercussões sistêmicas, causando grave disfunção de órgãos ricamente vascularizados como o rim, levando a um processo de insuficiência renal aguda. Embora a disfunção renal tenha sido descrita em vários tratados de medicina, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesta disfunção (Rosenfeld, 1971). Além disso, os acidentes ofídicos são uma enfermidade negligenciada, já que desde a descoberta da soroterapia não houve uma busca de novas terapias potencialmente superiores ao soro antiofídico (Mebs, 1986; Gutiérrez *et al.*, 2009).



Figura 1 – Distribuição geográfica da serpente *Bothrops jararacussu*. (Retirado de Milani Jr.*et al.*, 1997).

1.2 Composição e Atividade do Veneno Bruto

1.2.1 Veneno de *Bothrops jararacussu*

A peçonha destes animais possui vários componentes enzimáticos como metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ (FLA₂) (miotoxinas e cardiotoxinas), pequenos peptídeos, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, lectinas

do tipo-C, íons metálicos, aminas biogênicas, carboidratos, aminoácidos, lipídeos e nucleosídeos (Mebs e Ownby, 1990; Sanchez *et al.*, 1992; Tu, 1996; Markland, 1998; Aird, 2002; Koh *et al.*, 2006; Correa-Netto *et al.*, 2010). A seguir, descreve-se em mais detalhes os principais elementos envolvidos na ação desse veneno.

1.2.1.1 Metaloproteases

Estas enzimas são proteases dependentes de Zn^{2+} e são semelhantes estruturalmente com as metaloproteases de matriz (MMPs) e ao grupo uma desintegrina e metaloproteases (“A Disintegrin And Metalloproteases”, ADAMs). As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMP) são classificadas de PI a PIV de acordo com a constituição de seus domínios. O primeiro grupo (PI) é composto apenas pelo domínio metaloprotease com o sítio de ligação do zinco; o segundo grupo (PII) possui domínios adicionais não-catalíticos como desintegrinas; o terceiro grupo (PIII) é composto de domínios tipo desintegrinas e domínios ricos em cisteína. Já o quarto grupo (PIV) é composto de todos componentes de PIII mais dois domínios tipo lectinas conectados por ligações dissulfeto ao domínio rico em cisteína (Bjnarsson e Fox, 1994; Baldo *et al.*, 2010; Fox e Serrano, 2009). Uma SVMP do veneno de *B. jararacussu*, denominada bjussuMP-I da classe P-III, possui uma atividade hemorrágica eficaz, atividade fibrinolítica e inibição plaquetária induzida pelo ADP ou colágeno (Mazzi *et al.*, 2004; Mazzi *et al.*, 2007). Outra SVMP também isolada do veneno de *B. jararacussu* foi a BjussuMP-II, semelhante a outras SVMP da classe PI. Dentre suas atividades podem causar a proteólise do fibrinogênio, colágeno, fibrina e caseína. Porém, essa enzima é incapaz de causar miotoxicidade, hemorragia e letalidade (Marcussi *et al.*, 2007).

1.2.1.2 Fosfolipases A₂

As fosfolipases do tipo A₂ (FLA₂) induzem a hidrólise específica das ligações ésteres *sn*-2 dos fosfolipídeos, e apresenta atividade aumentada nos lipídeos em agregados lamelares e micelares, nas membranas e em outras interfaces (Arni e Ward, 1996). FLA₂ são enzimas que possuem estrutura que varia entre 119 e 134 aminoácidos, baixa massa molecular, variando entre 13 e 15 kDa, necessitam de cálcio, e apresentam entre 6 e 8 pontes dissulfeto, para conferir estabilidade à sua estrutura. Entre suas atividades destacam-se a neurotoxicidade, miotoxicidade,

citotoxicidade, indução de edema, desestabilização de membranas artificiais, atividades anticoagulante, anti-agregante plaquetária, hemolítica, convulsivante, hipotensiva, bactericida e antiparasitária. Sendo que nem todas FLA₂ são capazes de produzir todos esses efeitos (Soares e Giglio, 2003).

O veneno de *B. jararacussu* possui duas miotoxinas com estrutura de FLA₂, denominadas bothropstoxina I (BthTX-I) e bothropstoxina II (BthTX-II). A primeira é enzimaticamente inativa, por possuir o aminoácido lisina na posição 49 ao invés de um aspartato. As FLA₂ enzimaticamente inativas são capazes de se ligar na superfície do sarcolema, sem hidrólise de fosfolipídeos, possivelmente por uma interação de cargas, já que essas FLA₂ possuem caráter catiônico em contraste ao caráter aniônico da membrana plasmática (Ownby *et al.*, 1999; Valentin e Lambeau, 2000). A BthTX-II é enzimaticamente ativa, hidrolisando fosfolipídeos das membranas celulares e formando poros que resultam alteração do fluxo de íons através da membrana plasmática (Harris, 2003; Melo e Ownby, 1996, Tomaz *et al.*, 2008).

1.2.1.3 Outros componentes

Dentre outros componentes, as serino-proteases de veneno de serpentes (SVSP) são enzimas que possuem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, embora a maioria atue somente clivando o fibrinogênio com seletividade pelo fibrinopeptídeo A, B ou com igual seletividade para ambos (Serrano e Mauron, 2005).

As lectinas do tipo C afetam as plaquetas por se ligarem ao fator de von Willebrand (VWF) ou receptores como GPIIb, a2b1 e GPVI. A interação de lectinas do tipo C com a GPIIb pode causar tanto a inibição da ativação das plaquetas quanto a aglutinação das mesmas (Lu *et al.*, 2005).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) têm sido descritas como capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP, através da formação de H₂O₂ que impediria a interação entre a integrina GPIIb/IIIa de plaquetas ativadas e fibrinogênio. Já outros autores afirmam que o efeito pró-coagulante que pode ser causado por LAAOs também seriam causados pela formação de H₂O₂, que aumentaria a síntese de tromboxano A₂, potencializando a agregação plaquetária. (Lu *et al.*, 2005; Zuliani *et al.*, 2009).

Desintegrinas inibem integrinas das subfamílias b1 e b3, incluindo o receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa, os receptores de vitronectina e fibronectina. As desintegrinas inibem a agregação plaquetária via GPIIb/IIIa causada por ADP, trombina, colágeno e ácido araquidônico (Lu *et al.*, 2005).

As hialuronidases são enzimas que degradam o ácido hialurônico (HA), principal componente inerente à matriz extracelular dos tecidos conectivos de vertebrados. As hialuronidases de veneno de serpentes podem causar um maior dano local por permitir um maior espalhamento de toxinas locais e os fragmentos gerados da degradação do HA podem causar um efeito inflamatório (Kemparaju e Girish, 2006).

1.2.2 Veneno de *Apis mellifera*

É constituído da mistura de componentes como proteínas, peptídeos e moléculas orgânicas de massa molecular pequena. Os efeitos tóxicos ou nocivos do veneno são atribuídos principalmente à presença de melitina, FLA₂ e apamina que representam, respectivamente, 40-60%, 15-20% e 2% do veneno bruto (Habermann, 1972; Schumacher *et al.*, 1992 ; Okamoto *et al.*, 1995; Ownby *et al.*, 1997). Estes autores também descrevem a presença significativa de hialuronidase, histamina e fator de degranulação de mastócitos.

1.2.2.1 Melitina

O componente mais abundante no veneno de abelha é um polipeptídeo anfipático, que consiste de 26 aminoácidos, denominado melitina (Fig. 2A e B). Possui 20 aminoácidos hidrofóbicos e 6 polares, e possui propriedade catiônica que é responsável pelo efeito do peptídeo na membrana celular (Raghuraman e Chattopadhyay, 2007). A melitina é representante da pequena classe de proteínas solúveis em água que são capazes de se integrar espontaneamente na bicamada lipídica (Fig. 3). Tal propriedade permite que a melitina se associe espontaneamente com os fosfolípidios aniônicos da membrana celular, resultando em lise celular. A inserção da melitina na bicamada ocorre com a formação na membrana de α -hélice pelos resíduos 1–7. O resíduo 19 se associa com o grupo α -carbonil da matriz lipídica e os resíduos 21–26 se ligam eletrostaticamente na região da cabeça polar da membrana. Assim, a melitina possui uma potente ação destrutiva sobre as

membranas biológicas, principalmente quando atua sinergicamente com a FLA₂ na estrutura de fosfolipídios das membranas, atuando também como fator de difusão (Hermetter e Lakowicz, 1986; Fletcher e Jiag, 1993; Ferreira *et al.*, 1995; Cajal e Jain, 1997; Ownby *et al.*, 1997; Bernèche *et al.*, 1998). A melitina é um peptídeo que possui atividade citotóxica, induzindo hemólise, efeitos cardiotóxicos e miotóxicos (Fletcher *et al.*, 1996; Owmbly *et al.*, 1997).

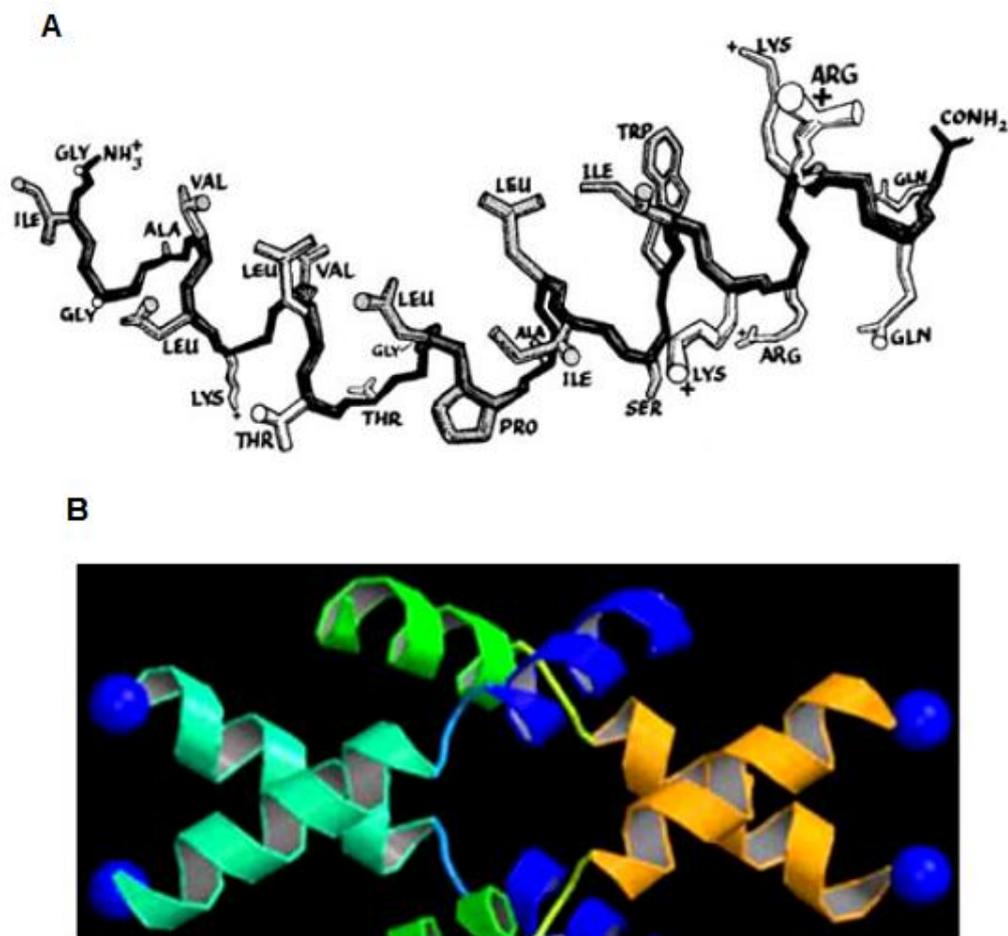


Figura 2: (A) Composição dos 26 aminoácidos que compõe a melitina. (B) Estrutura cristalográfica de raio-X do tetrâmero da melitina. Cada monômero de melitina é composto por 2 segmentos em α -hélice (Raghuraman e Chattopadhyay, 2007).

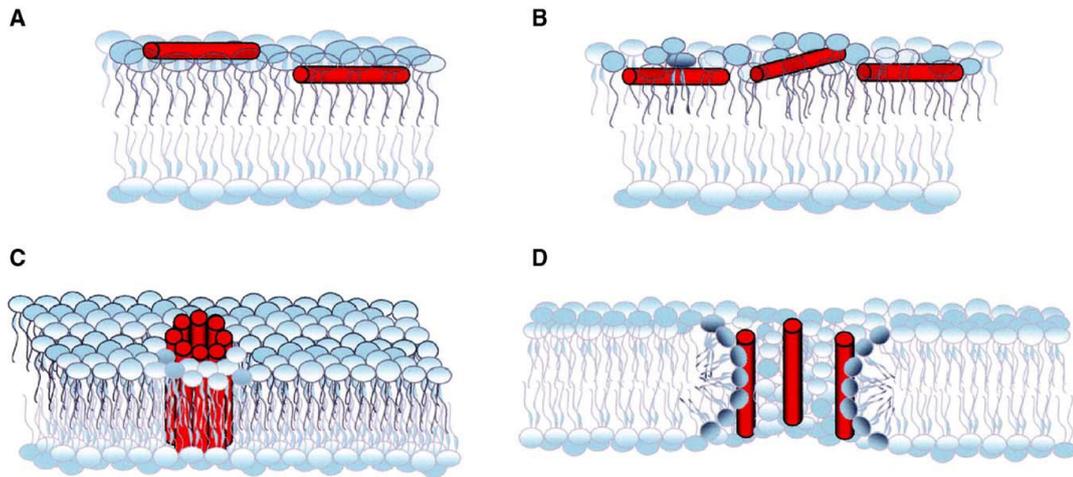


Figura 3: Modelos de formação de canal transmembrana da Melitina. (A) Peptídeos em α hélice (cilindros) paralelos, inicialmente associados à superfície. (B) Peptídeos continuam a se acumular dentro ou perto da bicamada lipídica desestabilizando a membrana. (C) Inserção na membrana. (D) Formação de poros localizados (Sato e Feix, 2006).

1.2.2.2 Fosfolipase A₂

Como a de *Bothrops*, a fosfolipase presente na peçonha de *A. mellifera* é secretória, de baixo peso molecular e dependente de cálcio. Além de alergênica, apresenta atividade neuro e miotóxica, induzindo a formação de poros e lise celular (Landucci *et al.*, 2000; Gutiérrez e Ownby, 2003).

1.2.2.3 Apamina

A apamina é um peptídeo constituído por 18 aminoácidos e duas ligações dissulfeto estáveis. Compõe 2-3% do total do veneno seco, possui uma ação inibitória seletiva dos canais de potássio ativados por cálcio que estão envolvidos na regulação do período de pós-hiperpolarização e na frequência da geração do potencial de ação do sistema nervoso central (Catterall *et al.*, 2002). É indicado como sendo o causador da hipermotilidade descoordenada, provavelmente por um efeito central na permeabilidade de cátions, afetando o processo da neurotransmissão. Apresenta efeitos na medula espinhal e em tecidos excitáveis como as fibras musculares estriadas, levando à miotoxicidade (Haberman, 1972; Blatz e Magleby, 1986; Catterall *et al.*, 2002; Jenkinson, 2006). A ativação dos receptores muscarínicos M2 nas terminações nervosas também pode estar relacionada com a inibição da transmissão neuromuscular (Silva *et al.*, 2010).

1.2.2.4 Outros componentes

A hialuronidase presente no veneno de abelha, assim como nos venenos de serpentes hidrolisa o HA, polímero viscoso que geralmente se localiza na matriz extracelular, facilitando a difusão dos componentes do veneno para o interior das células (Gmachl e Kreil, 1993; Alberts *et al.*, 1994).

O fator de degranulação de mástocitos induz a liberação de histamina, serotonina, heparina e enzimas que induzem a síntese de ácido araquidônico e seus metabólitos. Esses mediadores são os principais responsáveis pela resposta local causada pela picada de abelha, o edema angioneurótico e as reações alérgicas e anafilaxia (Habermann, 1972; King *et al.*, 2003).

1.3 Modelo de Estudo de Lesão Tecidual

1.3.1 Modelos *in vivo*

Estudos de lesões induzidas por peçonhas ou toxinas em diferentes tecidos já foram investigadas em diferentes condições experimentais, *in vivo* e *in vitro* (Melo e Suarez Kurtz, 1988a e b; Melo *et al.*, 1993; Fuly *et al.* 2000; Gutiérrez *et al.*, 2008, Saraiva-Otten *et al.*, 2013). Destas investigações avaliaram a lesão tecidual usando o efluxo de enzimas como indicadores da lesão celular. Observações em diferentes preparações de músculos isolados de rãs, ratos e camundongos expostos a diferentes peçonhas ou toxinas, mostram que o aumento do efluxo de enzimas sarcoplasmáticas como lactato desidrogenase (LDH) e creatinocinase (CK) é indicador de lesão no sarcolema (Melo e Suarez Kurtz 1988a e b; Melo e Ownby, 1999). As lesões de tecido muscular em experimentos *in vivo* induzidos por diversas peçonhas de serpentes, veneno de abelhas e toxinas já foram também demonstradas por vários autores, bem como, o antagonismo dos efeitos miotóxicos por substâncias como heparina, suramina, dextrana sulfatada e substâncias naturais obtidas de plantas ou sintetizadas (Melo *et al.*, 1993 e 1994; Arruda *et al.*, 2002; Tomaz *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2010; EL-Kik *et al.*, 2013). Foi demonstrado também que em diferentes músculos têm diferentes sensibilidades a peçonhas e toxinas (Melo e Ownby, 1996; Tomaz *et al.*, 2008). Nosso interesse em particular, foi de avaliar os efeitos dos venenos de *B. jararacussu* e *A. mellifera*.

1.3.2 Modelos *in vitro*

Os modelos para avaliação dos efeitos diretos de venenos geralmente são os de órgãos isolados e culturas de células. Igualmente aos modelos *in vivo*, os modelos *in vitro* também utilizam o efluxo de enzimas como avaliação de lesão celular. Melo e colaboradores (1993; 1994 e 1996) já demonstraram a miotoxicidade *in vitro* no músculo *extensor digitorum longus* induzido por peçonhas e toxinas isoladas. Os efeitos cardiotoxícos do veneno de *B. jararacussu* avaliado em modelo de coração isolado em nosso laboratório com aumento da atividade de CK, assim como, o efeito do veneno de *A. mellifera* em cultura de células endoteliais, mostram que ambos induzem significativo aumento na taxa de liberação de LDH, CK ou CK-MB (Sifuentes *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2010; EL-Kik, 2003). A liberação citosólica de LDH também foi descrita por Mora e colaboradores (2008) no ensaio de citotoxicidade em culturas de células de músculo liso por miotoxinas do veneno de *B. asper*. O corante Azul de Trypan que indica dano celular já foi também usado como indicador da viabilidade de neutrófilos após exposição de FLA₂ (Asp 49) de *B. asper* (Moreira *et al.*, 2011). Outro método complementar de viabilidade celular foi avaliado pela redução de MTT por mioblastos expostos a miotoxinas e metaloproteases desse mesmo veneno (Saraiva-Otten *et al.*, 2013). Demonstrando assim a importância do uso de cultura de células para avaliação dos efeitos diretos dos venenos e toxinas isoladas.

1.4 Sistema Renal e Acidentes Ofídicos

1.4.1 Morfofisiologia renal

Os rins são os órgãos que estão localizados posteriormente ao abdômen, posicionados de cada lado da coluna vertebral. Eles desempenham um papel crucial na homeostasia do volume de fluidos e várias substâncias nos organismos vivos (Brenner e Rector, 2008). O lado medial de cada rim contém uma região indentada chamada de Hilo, onde passam a artéria e veia renais, vasos linfáticos, fibras nervosas e o ureter que carrega urina do rim à bexiga (Guyton e Hall, 2006). A secção desse órgão expõe duas regiões distintas: uma região exterior pálida denominada córtex e uma parte interior mais escura denominada medula (Fig. 4A).

A medula do rim humano é dividida em 8 a 18 massas cônicas estriadas, chamadas de pirâmides renais. A base de cada pirâmide é posicionada sobre o limite corticomedular e o vértice se prolonga para a pélvis renal, que é uma estrutura em formato de funil que continua com a extremidade superior do ureter. A borda externa da pelve é dividida em estruturas de fundo-cego chamadas cálices maiores, que se dividem em cálices menores, os quais coletam a urina dos túbulos de cada papila. Cada rim contém cerca de um milhão de néfrons que é a unidade funcional deste órgão (Fig. 4B). Os componentes essenciais do néfron são glomerulo e cápsula de Bowman, túbulo proximal, túbulo distal e os segmentos de ligação (Fig. 4C) (Brenner e Rector, 2008).

Uma parte da água do plasma é forçada através de um filtro nos capilares glomerulares que possuem três componentes básicos: As células endoteliais fenestradas do capilar, uma membrana basal revestindo logo abaixo das células endoteliais e os diafragmas de filtração em fenda formados por células epiteliais que cobrem a membrana basal no seu lado do espaço urinário. Os solutos de pequeno tamanho fluem com a água filtrada para a cápsula de Bowman, que envolve todo o glomérulo, formando o ultrafiltrado glomerular no interior do túbulo proximal, que se situa na zona cortical renal, enquanto as macromoléculas de grande peso molecular e substâncias ligadas às proteínas plasmáticas são retidas pela barreira filtrante (Brunton e cols., 2012).

O túbulo proximal é subdividido em segmentos S1, S2 e S3 de acordo com a morfologia das células epiteliais que revestem o túbulo. Aproximadamente 65% do Na^+ é reabsorvido no túbulo proximal, além de ser muito permeável à água. A reabsorção de cada substância, incluindo água, está relacionada, de algum modo, à manutenção da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase localizada na membrana basolateral do epitélio tubular. Este segmento também cumpre papel fundamental na função renal de regulação do equilíbrio ácido/base através de uma secreção significativa de prótons (Brenner e Rector, 2008).

O túbulo proximal se altera morfológicamente para se tornar o ramo descendente delgado da alça de Henle, a qual mergulha no interior da medula renal, em seguida forma uma volta, dando origem ao ramo ascendente delgado. O túbulo altera sua morfologia novamente e se torna o ramo ascendente espesso (Brunton *et al.*, 2012). No final do segmento espesso do ramo ascendente está um segmento

curto com células diferenciadas, em íntimo contato com o glomérulo, que possui um papel importante no controle da função do néfron, já que dispara uma resposta autorregulatória que resulta na alteração da reabsorção hidroeletrolítica. Depois da mácula densa, o líquido entra no túbulo distal, que, como o túbulo proximal, situa-se no córtex renal. Este é seguido pelo túbulo conector e o túbulo coletor cortical, que levam ao ducto coletor cortical. As partes iniciais de 8 a 10 ductos coletores corticais juntam-se para formar um único ducto coletor maior que se dirige para a medula e forma o ducto coletor medular. Os ductos coletores se unem para formar ductos progressivamente maiores que se esvasiam na pelve renal através das extremidades das papilas renais (Guyton e Hall, 2006).

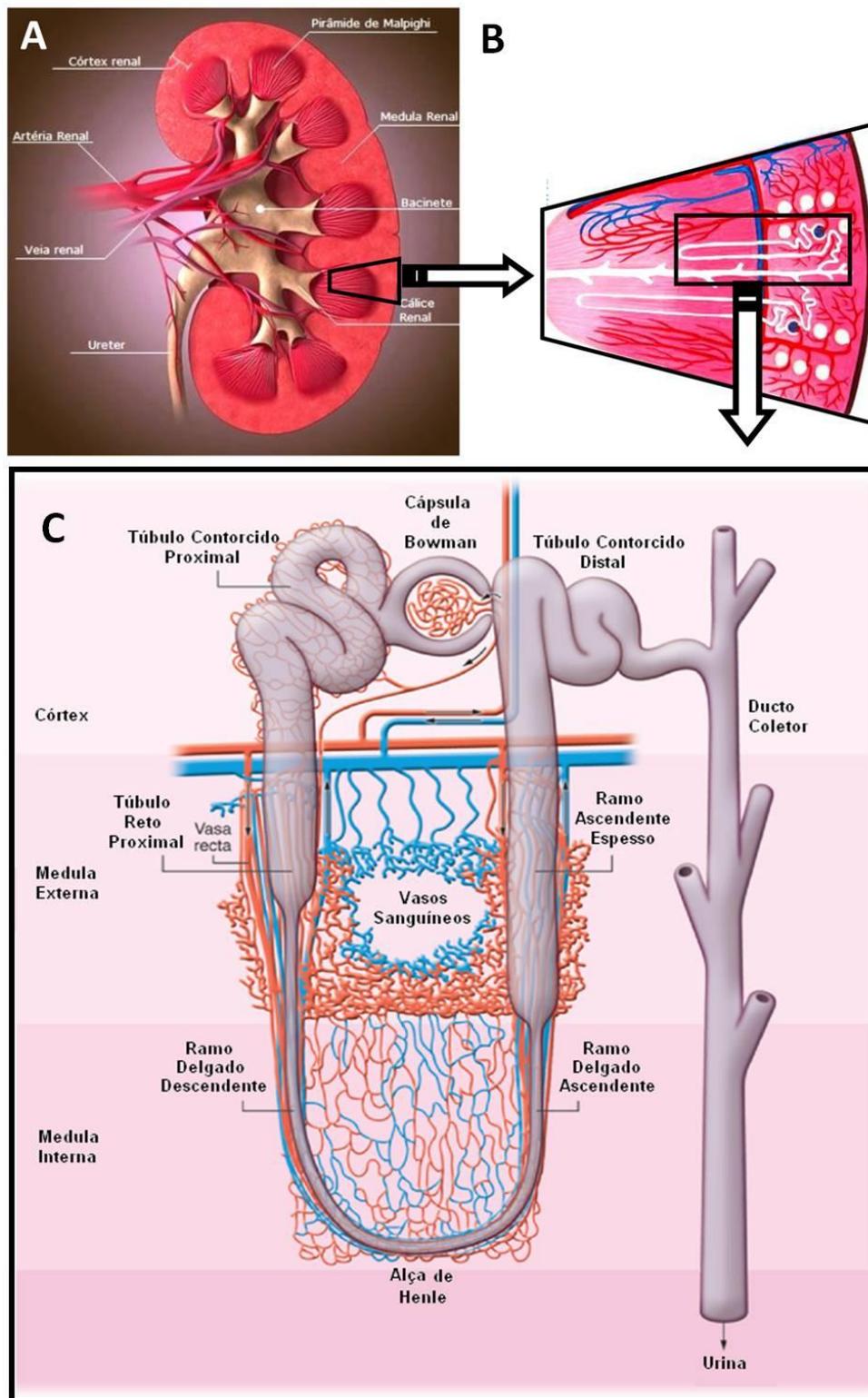


Figura 4. Morfologia renal. (A) Anatomia geral do rim; (B) Localização do nefron ao longo da região cortical e medular renal (Retirado parcialmente de <<http://www.calculorenal.org/imagem-rim-calculorenal.htm>>; (C) néfron com regiões identificadas e sistema vascular em vermelho e azul (Modificado de Bonventre & Yang, 2011).

O ramo descendente delgado da alça de Henle é muito permeável à água, enquanto sua permeabilidade ao NaCl e uréia é baixo. Em contraste o ramo ascendente delgado é permeável ao NaCl e uréia, mas impermeável à água. O ramo ascendente espesso reabsorve ativamente o NaCl, mas é impermeável à água e a uréia. Aproximadamente 25% do Na⁺ filtrado é reabsorvido na alça de Henle, grande parte no ramo ascendente espesso, que tem grande capacidade de reabsorção. Semelhante ao ramo ascendente espesso, o túbulo contorcido distal transporta de forma ativa o NaCl e é impermeável à água. Por fim os ajustes finais na composição de eletrólitos são feitos nos ductos coletores (Brunton *et al.*, 2012).

Existem muitos estados fisiopatológicos e medicamentos que podem contribuir para diminuição da função desse órgão, gerando o quadro de insuficiência renal aguda (Bonventre e Yang, 2011). Esse quadro, seja ele ocasionado por um processo isquêmico ou nefrotóxico, decorre de um somatório de eventos hormonais, hemodinâmicos e tubulares, no contexto celular e molecular, que, ao final, levam à súbita diminuição do ritmo de filtração glomerular (Durão Jr *et al.*, 1996).

1.4.1.1 Insuficiência renal

A insuficiência renal aguda é tradicionalmente descrita como uma rápida diminuição da função renal (variando de horas a semanas, em um período inferior a 3 meses) e também com aumento da creatinina sérica (Bonventre & Yang, 2011). Na insuficiência renal aguda ocorrem alterações regionais importantes no fluxo sanguíneo renal (Le Dorze *et al.*, 2009). A vasoconstrição em resposta a lesão do endotélio juntamente com a oclusão de pequenos vasos, devido às interações endoteliais de leucócitos, contribuem para a isquemia (Conger, 1997; Bonventre e Zuk, 2004). Há ativação de células inflamatórias e ambas as respostas imune inata e adaptativa também são importantes contribuintes para a patologia da lesão isquêmica (Bonventre e Yang, 2011). A lesão celular epitelial associada a isquemia/reperfusão é mais evidente no segmento S3 do túbulo proximal nos modelos utilizando animais (Bonventre *et al.*, 1998).

A complicação mais comum entre os casos letais após acidentes ofídicos no Brasil é o processo de insuficiência renal aguda. Este processo pode ocorrer mesmo após o tratamento com o antiveneno específico, mas a sua patogênese não é bem compreendida (Ribeiro *et al.*, 1998). Algumas evidências sugerem a coagulação

intravascular disseminada como uma possível causa para a lesão renal (Amaral *et al.*, 1986). *B. jararacussu* possui efeito miotóxico adicional, que pode resultar em mioglobínúria, causando ainda mais danos aos rins, mas não se pode excluir a presença de enzimas proteolíticas e outras substâncias que poderiam promover, ou mesmo potencializar, o processo (Milani Jr *et al.*, 1997). Outros pesquisadores também relataram a possível existência de um agente nefrotóxico direto, que não foi bem descrito até agora (Sitprija e Chaiyabutr, 1999; Boer-Lima *et al.*, 1999). Experimentalmente, a investigação da lesão renal tem sido realizada através do modelo de perfusão do rim de ratos (*ex vivo*) onde vários parâmetros funcionais são observados (Havt *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2002; 2005). Nesse modelo foi observado que o veneno bruto de *B. jararacussu* modifica o funcionamento renal, elevando a taxa de filtração glomerular, o fluxo urinário, reduzindo a pressão de perfusão e resistência vascular renal, sendo que as toxinas isoladas apresentam papel relevante na injúria renal (Boer-Lima *et al.*, 1999; Havt *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2002; 2005; Linardi *et al.*, 2011). O rim, um órgão altamente vascularizado, é propenso à toxicidade induzida por peçonhas e todas as estruturas renais podem ser afetadas já que a sua própria excreção parece ser majoritariamente renal (Mello *et al.*, 2010).

Tem sido também relatado em vários países a insuficiência renal aguda provocada por múltiplas picadas de abelha (Winston, 1994; Tunget e Clark, 1993). Assim como para venenos de serpentes, a patogênese das lesões renais induzidas pelo veneno abelha não é totalmente compreendida. Choque, rabdomiólise, hemólise e nefrotoxicidade tubular direta têm sido apontados como possíveis fatores para o dano renal (Franca *et al.*, 1994; dos Reis *et al.*, 1998). Azevedo-Marques e colaboradores (1992) demonstraram que a injeção do veneno de abelha *A. mellifera* induz mionecrose e mais tardiamente hematúria, rabdomiólise e insuficiência renal aguda, e observou também um aumento de enzimas séricas como CK e LDH. A lesão histológica renal mais frequente encontrada na insuficiência renal aguda induzida pelo veneno é a necrose aguda tubular (Burdmann *et al.*, 1993; de Castro *et al.*, 2004).

Os efeitos do veneno sobre o rim podem ser decorrentes de metaloproteases que clivam os componentes da matriz extracelular interrompendo a

adesão celular (Kamiguti, 1998) e FLA₂ que desestabilizam a membrana celular podendo gerar necrose tissular (Kini, 2003).

O uso de células em cultura para avaliar o efeito citotóxico direto de venenos e outros agentes tem sido descrito na literatura, embora de forma escassa, particularmente para caracterização dos mecanismos celulares e moleculares de ação de agentes tóxicos bem como de antagonistas (Lomonte *et al.*, 1994; Willinger *et al.*, 1995; Collares-Buzato *et al.*, 2002; Mandal e Bhattacharyya, 2007; Nascimento *et al.*, 2007). Dentre elas, as células LLC-PK1, que são células tubulares proximais de rim de suínos Hampshire que possuem características morfológicas do epitélio renal, como microvilos apicais e *tight junctions* (Ardaillou *et al.*, 2000; Lieberthal, 1997).

A análise por citometria de fluxo com o veneno de *Bothrops leucurus* em cultura de células do epitélio tubular distal renal de cães (MDCK - Madin-Darby Canine Kidney) mostrou que a população de células necróticas aumentou significativamente de uma forma concentração-dependente, com pouca porcentagem de células em apoptose e apenas em concentrações mais baixas (de Moraes *et al.*, 2013). O veneno de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* causou um rearranjo do citoesqueleto e alterações morfológicas desta mesma linhagem celular, além de diminuir a viabilidade (Collares-Buzato *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2007). Outros estudos revelam que componentes do veneno de *B. jararacussu* diminuem a viabilidade de várias linhagens celulares, como por exemplo, fibroblastos (COS-7 e NIH 3T3) e células de carcinoma gástrico humano (MKN45 e AGS), porém, até o momento, não encontramos estudos em linhagens de células renais (Bonfim *et al.*, 2009; Nolte *et al.*, 2012).

O veneno bruto de *A. mellifera* diminui a viabilidade de células de linhagens de cânceres de pulmões (A549 and NCI-H460) e aumentam a expressão de proteínas apoptóticas (Kollipara *et al.*, 2014). O componente majoritário melitina também reduz a viabilidade de células endoteliais de cordão umbilical humano em cultura (HUVECs), como mostrado no trabalho de Cerne e colaboradores (2013). Esse mesmo efeito foi observado por nosso grupo para o veneno de *A. mellifera* na cultura primária de células endoteliais mesentéricas de rato (El-Kik *et al.*, 2013). O mesmo efeito é observado com veneno bruto em cultura primária de células renais

de coelho, porém os estudos ainda são escassos utilizando cultura de células renais (Han *et al.*, 2000).

1.5 Tratamento do Envenenamento

1.5.1 *Bothrops jararacussu*

O único medicamento oficialmente aprovado pelo Ministério da Saúde brasileiro para o tratamento de acidentes ofídicos é o soro antiofídico ou antiveneno, que é específico para cada tipo de serpente. O antiveneno usado no tratamento do empeçonhamento por serpentes do gênero *Bothrops sp* é o soro antibotrópico (SAB). Este é produzido do sangue de cavalos imunizados com uma mistura de venenos de várias espécies. É necessário se considerar a possibilidade de reações adversas devido à administração de proteínas estranhas, podendo haver reações de hipersensibilidade que podem culminar em choque anafilático (Chippaux *et al.*, 1998). O soro antiofídico antagoniza o efeito hemorrágico do veneno e previne a letalidade, mas não previne completamente outros danos (Dos-Santos *et al.*, 1992).

Ao avaliar alguns efeitos de três soros polivalentes antibotrópicos produzidos por diferentes empresas brasileiras contra os venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*, da Silva e colaboradores (2007) demonstraram apenas efeitos parciais, que variam entre esses soros comerciais. Assim, é necessário o esforço para se buscar outras substâncias capazes de antagonizar os efeitos locais e sistêmicos dos venenos de serpentes.

1.5.2 *Apis mellifera*

As reações sintomáticas locais devem ser tratadas com gelo, compressas frias e uso de corticosteróides tópicos. O uso pela via oral de antagonistas do receptor de histamina do tipo 1 (H1) podem diminuir o prurido local. Os ferrões devem ser retirados de forma cuidadosa e o mais rápido possível para evitar maior inoculação do veneno e promover alívio da dor (Rangan, 2007).

Na maioria das vezes, vítimas de múltiplas picadas são fatais devido à falta de um antídoto específico para o veneno, a complexidade de seus componentes e a falta de informações sobre os efeitos sistêmicos. A investigação dos mecanismos

envolvidos na citotoxicidade do veneno de abelha assim como o desenvolvimento de substâncias antagonistas é relevante e requer esforço multidisciplinar.

A conduta proposta pelo Ministério da Saúde é o tratamento de suporte e sintomático. Quando necessária, a analgesia deve ser feita com dipirona por via parenteral (1 ampola de 500 mg). Para as reações anafiláticas, o tratamento sugerido é a administração subcutânea (s.c.) de adrenalina 1:1.000, iniciando-se com dose de 0,5 mg e, se necessário, doses repetidas duas vezes em intervalos de 10 minutos, em adultos. Para redução da intensidade e da duração de reações graves como urticária, edema de glote, broncoespasmo e choque faz-se uso também de glicocorticóides e anti-histamínicos. A indicação do Ministério da Saúde é uso intravenoso de succinato sódico de hidrocortisona (500-1000 mg). Para alívio das reações alérgicas tegumentares, indica-se o uso tópico de glicocorticóide e uso oral de anti-histamínicos. As manifestações respiratórias asmátiformes que são causadas pelo broncoespasmo devem ser controladas com oxigênio nasal e inalação de broncodilatadores (fenoterol ou salbutamol) ou ainda pode-se usar aminofilina por via intravenosa (i.v.). Como medida geral de suporte faz-se a manutenção das condições do equilíbrio ácido-básico e assistência respiratória (FUNASA, 2001).

As complicações do envenenamento como choque anafilático, insuficiência respiratória e a insuficiência renal aguda devem ser abordados de maneira rápida e vigorosa. Os pacientes vítimas de enxames devem ser mantidos em Unidade de Terapia Intensiva (FUNASA, 2001; Bonifazi *et al.*, 2005).

Até o presente momento, apenas o tratamento sintomático e de suporte são oferecidos aos pacientes que sofreram acidentes graves por picadas de *Apis mellifera*. Não existe nenhuma substância capaz de proteger as células do processo de citólise desencadeado pelo veneno de *Apis mellifera*. Ainda não há um antídoto para neutralizar o veneno inoculado no tecido, ou o que se encontra na circulação sanguínea. É relevante salientar que grupos de pesquisa estão empenhados em comercializar um soro antiveneno de abelha e os ensaios preliminares mostram-se promissores.

1.6 Heparina como Antiveneno

A heparina (Fig. 5) é um polissacarídeo sulfatado que faz parte da família dos glicosaminoglicanos, sendo um polímero linear constituído por unidades repetidas de dissacarídeos que contem ácidos urônicos alternados com glucosaminas (Jaques, 1980). As heparinas de diferentes tamanhos são importantes agentes terapêuticos, utilizadas na clínica principalmente no tratamento de doenças cardiovasculares. Entretanto, estudos apontam para uma possível utilização dessas substâncias em diversas outras doenças, como câncer e inflamação (Casu *et al.*, 2010). Estas substâncias apresentam massa molecular variando de 4 - 60 kDa, sendo encontradas fisiologicamente em grânulos de mastócitos. Comercialmente, são extraídas do pulmão e da mucosa intestinal de porco. A sulfatação dos grupamentos N e O desta cadeia de carboidratos confere a este polímero grande quantidade de carga negativa, sendo chamada de polianiontes (Jaques, 1980; Gandhi *et al.*, 2008).

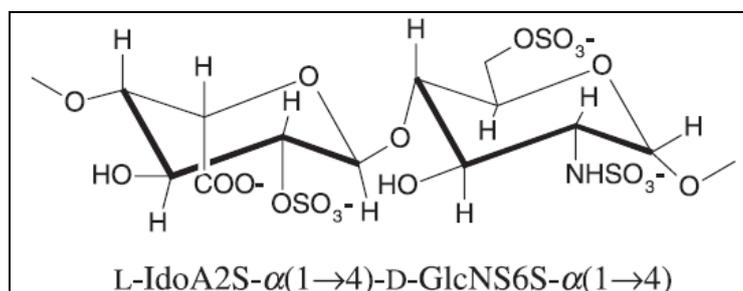


Figura 5: Estrutura química da heparina. Moléculas de 2,6-dissulfoglicosamina alternadas com ácido L-idurônico (Ghandi *et al.*, 2008).

A heparina é comercializada na forma de heparina de alto peso molecular ou não-fracionada, e a heparina fracionada (HF) ou de baixo peso molecular. Esta última é obtida a partir da despolimerização química ou enzimática da heparina de alto peso (Smoremburg *et al.*, 2001; Young, 2008).

Higbothan e Karnella (1970) usaram a heparina para neutralizar o veneno de abelha *in vitro*, mostrando que ela reduzia a atividade citolítica desta peçonha. Em venenos de serpentes, Melo e Suarez-Kurtz (1988 a e b) foram os primeiros a demonstrar a atividade antimiotóxica das heparinas induzida pelo veneno de

serpente. Foi proposto por Melo e colaboradores (1993) que esta ação da heparina seria devido à neutralização de resíduos básicos presentes em proteínas do veneno.

A heparina é um excelente inibidor da P e L-selectina (Wang *et al.*, 2002; Koenig *et al.*, 1998), sendo que a L-selectina, expressa nos leucócitos, e a P-selectina, expressa nas plaquetas e células endoteliais, são as que promovem o rolamento, aderência e migração da célula para o local da lesão. Este processo é fundamental para a resposta inflamatória aguda, sendo esta uma proposta de ação antiinflamatória da heparina (Wang *et al.*, 2002; Tyrrell *et al.*, 1999; Celi *et al.*, 1994).

Portanto, os efeitos diretos de venenos de serpentes e abelhas sobre células do túbulo proximal, principal local de lesão renal em acidentes peçonhentos, permanece pouco explorado. Além disso, é importante salientar que o efeito do tratamento com polianions, experimental ou clinicamente, ainda é totalmente desconhecido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* em células LLC-PK1 e o antagonismo da citotoxicidade por heparina.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a atividade da enzima LDH nas células LLC-PK1 quando expostas aos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* isolados ou pre-incubados com heparina.
- 2) Analisar a redução de MTT pela cultura de células LLC-PK1, na presença e ausência dos venenos brutos sozinhos ou pré-incubados com heparina.
- 3) Quantificar o número de células viáveis após exposição aos venenos com ou sem heparina.
- 4) Analisar a morfologia celular após exposição dos venenos brutos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A heparina foi adquirida da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). Os venenos brutos de *B. jararacussu* e *A. mellifera* foram adquiridos de serpentário e apicultor particulares de Ribeirão Preto, respectivamente. Foi utilizado o “Kit” LDH UV adquirido da Bioclin – Quibasa Química Básica (Belo Horizonte, Brasil). Os demais reagentes e sais utilizados foram de grau analítico.

3.2 Cultura de células

A linhagem celular LLC-PK1 (Lilly Laboratories Cells-Porcine Kidney 1), derivada de túbulo proximal de rim suíno, foi utilizada para os experimentos. Elas são fenotipicamente normais e possuem alta capacidade proliferativa. A cultura de linhagens celulares possui vantagens em relação a cultura primária por dispensar o sacrifício de animais, pela sua utilização por tempos mais prolongados devido ao retardo de senescência celular e pela redução da variabilidade experimental. As células foram cultivadas em placa de cultura em meio Modified Dulbecco's Eagle Medium (DMEM – Sigma, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen, EUA), NaHCO₃ (44 mM) e gentamicina (40 mg/L) (pH 7,4). O cultivo das células ocorreu em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ (Hitashi, Japão). Quando confluentes, as células foram subcultivadas utilizando solução EDTA-tripsina 0,25% (Invitrogen, EUA) (Amaral, 2011).

3.3 Ensaio de LDH

Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* foi feita a dosagem de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura das células LLC-PK1 cultivadas em placas de 24 poços com aproximadamente 80% de confluência. Para determinação do LDH liberado, o meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% foi substituído por PBS uma hora antes dos experimentos que foram então realizados com os venenos de *B. jararacussu* (10, 25 e 50 µg/mL) por 60-180 min ou *A. mellifera* (5, 10 e 25 µg/mL) por 15-60 min. Para determinação do efeito protetor heparina, os venenos de *B. jararacussu* (50 µg/mL) ou *A. mellifera* (25 µg/mL) foram pré-incubados a 37°C por 30 min com diferentes concentrações de heparina (0,1-30 µg/mL). Após retirada

e centrifugação do meio foi realizada a leitura em espectrofotômetro do sobrenadante juntamente com o “Kit” LDH UV em 340 nm. O detergente não-iônico Triton X-100 0,1% foi empregado como controle positivo. Foi utilizado o método cinético e os resultados expressos em U/L (Cruz-Chamarro *et al.*, 2006).

3.4 Ensaio de MTT

Para avaliar a viabilidade celular, placas de cultura de 96 poços tiveram o meio trocado para DMEM sem soro, imediatamente após as células foram expostas a diferentes concentrações de veneno de *B. jararacussu* (2,5, 5, 10, 25 e 50 µg/mL) por 180 min ou *A. mellifera* (2,5, 5, 10, 25 e 50 µg/mL) por 15 e 60 min sozinhos ou incubados com heparina (1-30 µg/mL). Ao término do período de exposição, foi retirado parte do meio, adicionado o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio; 12 mM) e as células então incubadas por 4 h a 37 °C. Em seguida, foi adicionado DMSO para solubilizar os cristais formados e após 30 min foi realizada leitura da absorbância a 570 nm com auxílio de um leitor de placas (Tecan modelo Sunrise, Alemanha).

3.5 Contagem de células

As células de linhagem LLC-PK1 após serem cultivadas em placas de 24 poços, tiveram seu meio trocado para DMEM sem SFB e em seguida foram expostas aos venenos de *B. jararacussu* (50 µg/mL) por 180 min ou *A. mellifera* (25 µg/mL) por 15 e 60 min, sozinhos ou pré-incubados a 37°C por 30 min com diferentes concentrações de heparina (0,1-30 µg/mL). Após exposição, foram retiradas as células com tripsina e centrifugadas a 2.500 rpm, por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida as células foram ressuspensas em solução PBS para contagem. As células foram coradas com azul de Tripán e a contagem foi realizada em hemocitômetro de Neubauer (Amaral, 2011). O detergente não-iônico Triton X-100 0,1% foi empregado como controle positivo.

3.6 Ensaio de Fluorescência

As células LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços. Ao atingirem cerca de 80% de confluência (160.000/poço) foram expostas a 10 ou 25 µg/mL do

veneno de *B. jararacussu* durante 15-180 min. Após a incubação, as células LLC-PK1 foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o PFA foi retirado e as células foram incubadas com triton X-100 0,2% por 5 minutos à temperatura ambiente para permeabilização, seguido de 3 lavagens de 5 minutos em suave agitação orbital para a retirada do excesso de triton X-100. As células foram incubadas com faloidina (Invitrogen-Carlsbad, Califórnia) (5 μ L/ 300 μ L) + Hoechst 33342 (Thermo Scientific, Illinois) (1/10.000) diluídos em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, para marcação de actina filamentosa e núcleo celular respectivamente. Após este tempo as células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada. As imagens das células foram capturadas em objetiva de 20x em microscópio de fluorescência (Olympus DP72).

3.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão, sendo o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni utilizados para análise estatística dos dados. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados para indicar diferença estatisticamente significativa entre as médias.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito citotóxico do veneno de *B. jararacussu* e *A. mellifera* em células renais LLC-PK1

Utilizamos nos ensaios de citotoxicidade/viabilidade celular dois métodos complementares: a medida do LDH liberado por células mortas e a redução química do MTT em formazan pelo metabolismo mitocondrial.

Após exposição ao veneno de *B. jararacussu* em diferentes concentrações (10-50 µg/mL) e tempos (60-180 min), foi observado o aumento da atividade de LDH liberado no sobrenadante em relação ao controle, principalmente nas concentrações de 50 µg/mL a partir de 120 min e 25 µg/mL em 180 min (Figura 1).

No tempo em que o efeito citolítico se apresentou mais proeminente, 180 min, foram realizados ensaios de MTT com diferentes concentrações de veneno de *B. jararacussu* (2,5-50 µg/mL). Podemos observar que após o período de exposição ao veneno nas concentrações 10, 25 e 50 µg/mL, ocorreu diminuição significativa da redução do MTT, indicando diminuição da atividade mitocondrial e conseqüentemente da viabilidade celular (Figura 2), resultado semelhante ao visto com o ensaio de LDH (Figura 1).

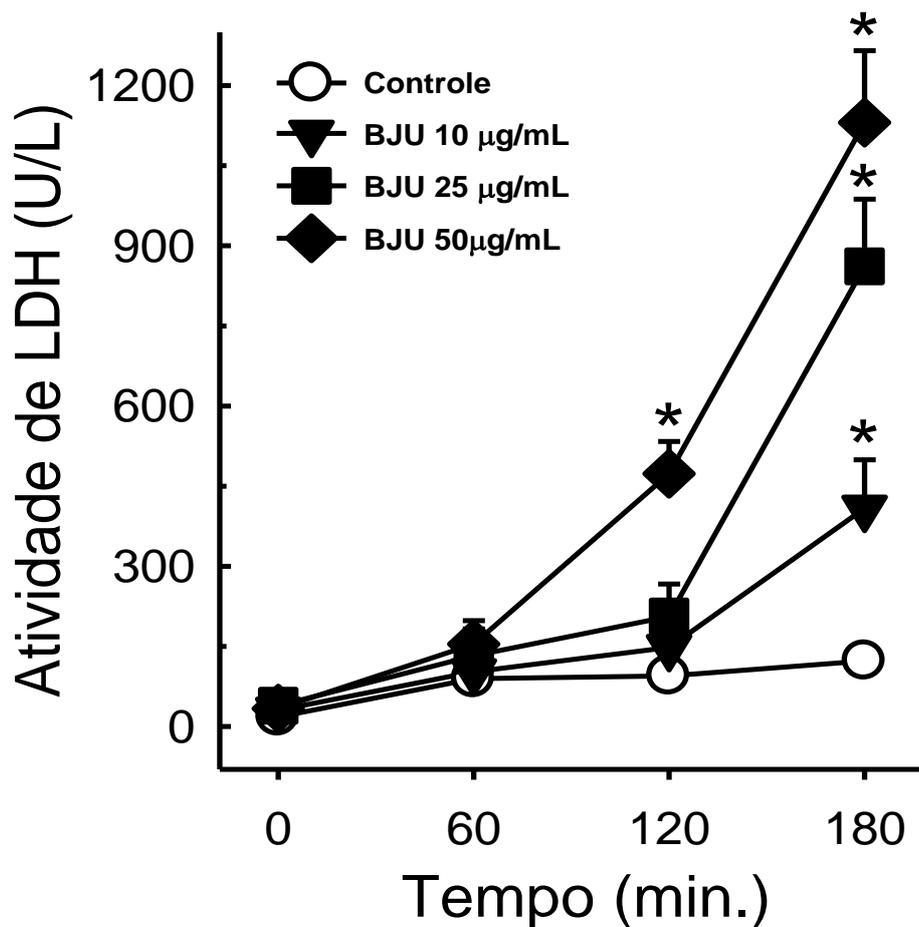


Figura 1 – Atividade de LDH (U/L) liberado de células LLC-PK1 durante exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com diferentes concentrações do veneno de *B. jararacussu* (10-50 µg/mL) em diferentes períodos de tempos (60-180 min) e a liberação de LDH no meio de cultura foi avaliada em espectrofotometria. * $p < 0,01$ vs controle (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. BJU: *Bothrops jararacussu*.

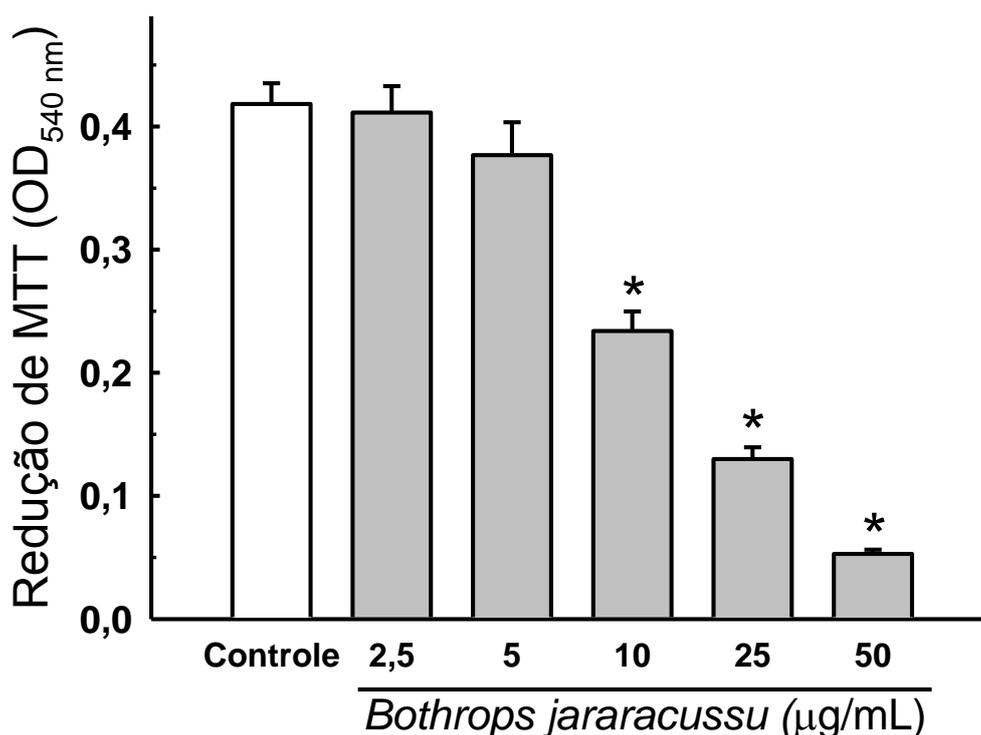


Figura 2 – Redução do MTT após exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com diferentes concentrações do veneno de *B. jararacussu* (2,5 - 50 µg/mL) durante 180 min e a redução do MTT em formazan foi avaliada por espectrofotometria. * $p < 0,01$ vs controle (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. OD – Densidade Óptica.

Quando essas células foram expostas a diferentes concentrações do veneno de *A. mellifera* (5, 10 e 25 µg/mL) nos mesmos períodos referentes ao veneno de *B. jararacussu* observou-se que a concentração mais alta gerou uma grande liberação de LDH logo em 60 min. Assim, foram escolhidos os tempos de 15, 30 e 60 min para análise, e pode-se observar a liberação significativa de LDH na concentração de 25 µg/mL já em 15 min (Figura 3).

Semelhante aos resultados obtidos com a medida de LDH, os experimentos de MTT com o veneno de *A. mellifera* na faixa de concentração de 2,5-50 µg/mL durante 15 e 60 minutos mostraram uma diminuição significativa da redução do MTT nas concentrações 10, 25 e 50 µg/mL (Figura 4).

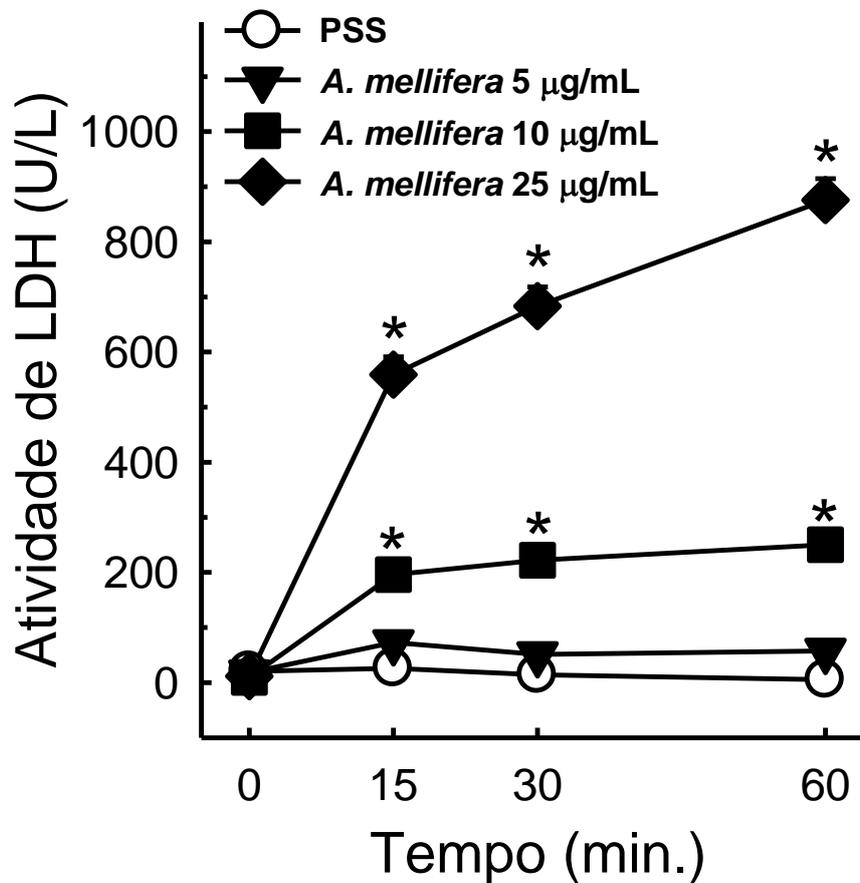


Figura 3 - Atividade de LDH (U/L) liberado de células LLC-PK1 durante exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com diferentes concentrações do veneno de *A. mellifera* (5 - 25 µg/mL) em diferentes períodos de tempos (15 - 60 min) e a liberação de LDH no meio de cultura foi avaliada por espectrofotometria. * $p < 0,01$ vs controle (n= 6 em duplicata) ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

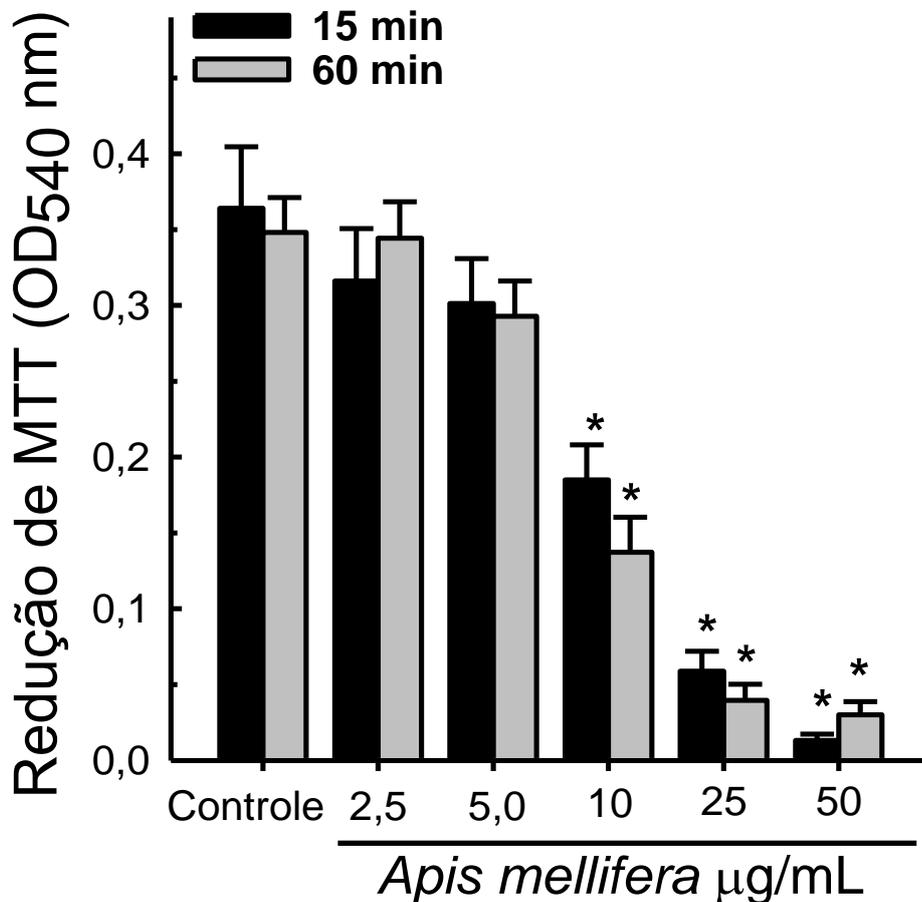


Figura 4 – Redução do MTT após exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com diferentes concentrações do veneno de *A. mellifera* (2,5-50 µg/mL) durante 180 min e a redução do MTT em formazan foi avaliada por espectrofotometria. * $p < 0,01$ vs controle (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. OD – Densidade Óptica.

Foi realizada a contagem de células viáveis após 180 min de incubação com o veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração de 50 µg/mL e foi observado uma diminuição acentuada em relação ao controle (Figura 5).

Uma redução expressiva de células viáveis também foi notada após a incubação por 15 e 60 min com 25 µg/mL de veneno bruto de *A. mellifera* (Figura 6).

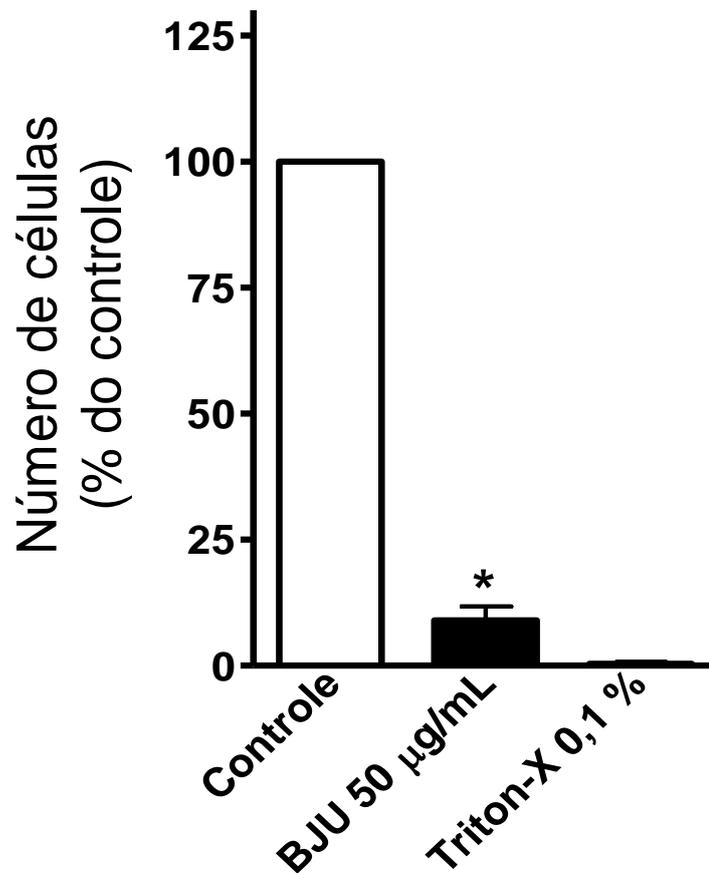


Figura 5 – Contagem do número células viáveis após exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (50 µg/mL) durante 180 min e o número de células viáveis foi avaliado em hemocitômetro.* $p < 0,01$ vs veneno (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. BJU = *Bothrops jararacussu*.

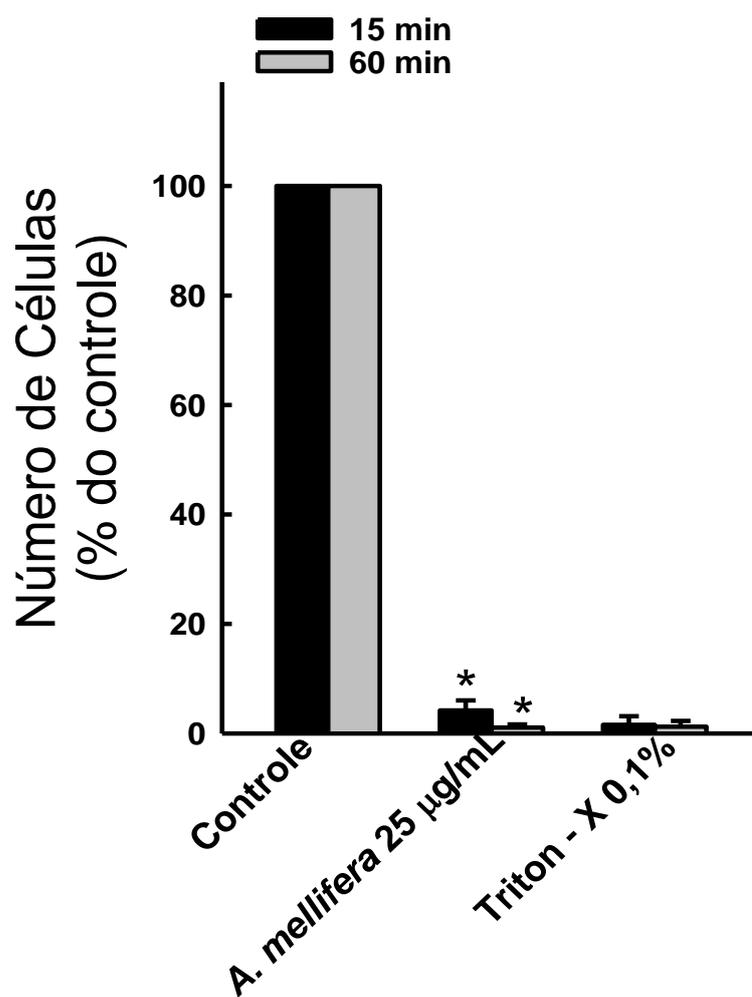


Figura 6 – Contagem do número células viáveis após exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *A. mellifera* (25 µg/mL) durante 15 e 60 min e o número de células viáveis foi avaliado em hemocitômetro. * $p < 0,01$ vs veneno (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

4.2 Efeito da heparina sobre a citotoxicidade do veneno de *B. jararacussu* e *A. mellifera* em células renais LLC-PK1

A heparina de alto peso molecular em diferentes concentrações (0,1-30 µg/mL), pré-incubada por 30 min com 50 µg/mL do veneno de *B. jararacussu* e depois incubados durante 180 min com as células LLC-PK1 foi capaz de reduzir a liberação de LDH por essas células (Figura 7A). A atividade do veneno de *B. jararacussu* foi reduzida em cerca de 75% já na concentração de 7 µg/mL de heparina (Figura 7B). A concentração inibitória média (IC₅₀) estimada foi em torno de 0,82 ± 1,68 µg/mL para 50 µg/mL do veneno (Figura 7B).

Após pré-incubação (30 min) de diferentes concentrações de heparina com 25 µg/mL de veneno de *A. mellifera* por 15 e 60 min, foram capazes de reduzir a liberação de LDH pelas células LLC-PK1 (Figura 8A). No tempo de 60 min, a atividade do veneno foi reduzida em torno de 40% com a maior concentração testada e, mesmo considerando uma estimativa primária pela pouca quantidade de pontos experimentais, a heparina demonstrou uma concentração inibitória média (IC₅₀) de aproximadamente 23,4 ± 1,1 µg/mL (Figura 8B).

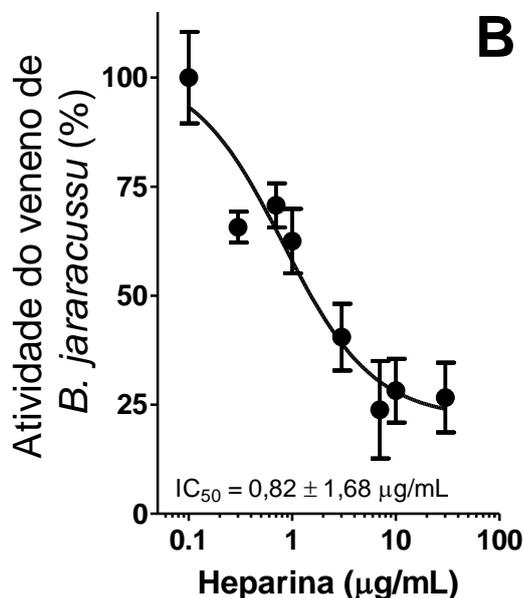
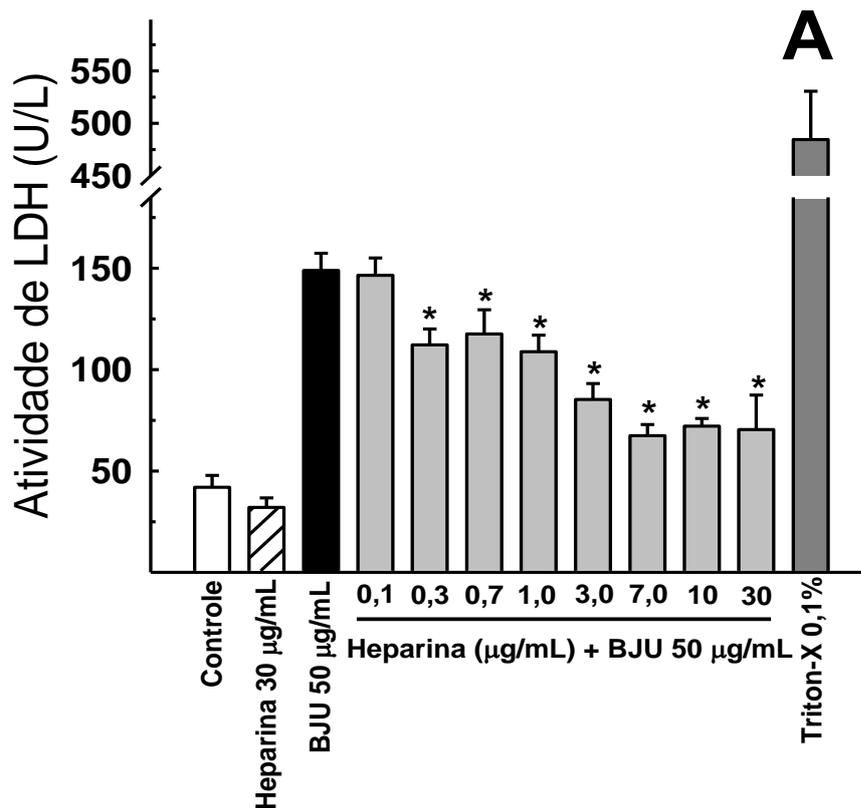


Figura 7 – Efeito da heparina sobre a liberação de LDH (U/L) após exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (50 µg/mL) e diferentes concentrações de heparina de alto peso molecular (0,1-30 µg/mL) durante 180 min e a liberação de LDH no meio de cultura foi avaliada em espectrofotômetro. O painel **A** mostra a liberação de LDH (em U/L) no meio de cultura. O painel **B** demonstra os percentuais de antagonismo da atividade citotóxica induzida pelo veneno. * $p < 0,01$ vs *B. jararacussu* 50 µg/mL (n = 4 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. BJU = *Bothrops jararacussu*.

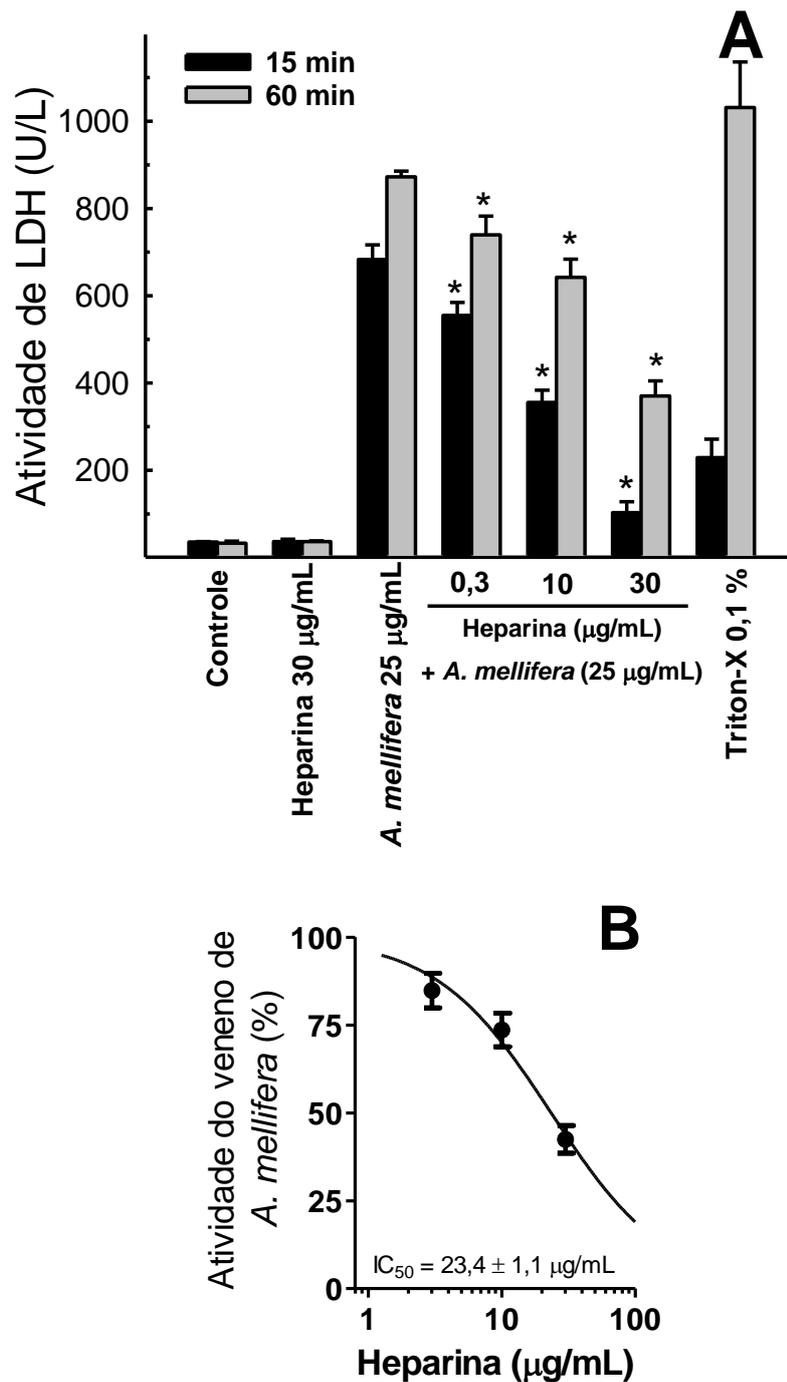


Figura 8: Efeito da heparina sobre a liberação de LDH (U/L) após exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *A. mellifera* (25 µg/mL) e diferentes concentrações de heparina de alto peso molecular (3-30 µg/mL) durante 15 e 60 min e a liberação de LDH no meio de cultura foi avaliada por espectrofotometria. O painel **A** mostra a liberação de LDH (em U/L) no meio de cultura. O painel **B** demonstra os percentuais de antagonismo da atividade citotóxica induzida pelo veneno. *p<0,01 vs *A. mellifera* 25 µg/mL (n = 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Os experimentos com MTT revelaram que a heparina evitou a redução da viabilidade celular produzida pelos venenos de *B. jararacussu* (50 µg/mL, Figura 9) e *A. mellifera* (25 µg/mL, Figura 10), pelo menos parcialmente, em consonância aos resultados obtidos com os ensaios de liberação de LDH.

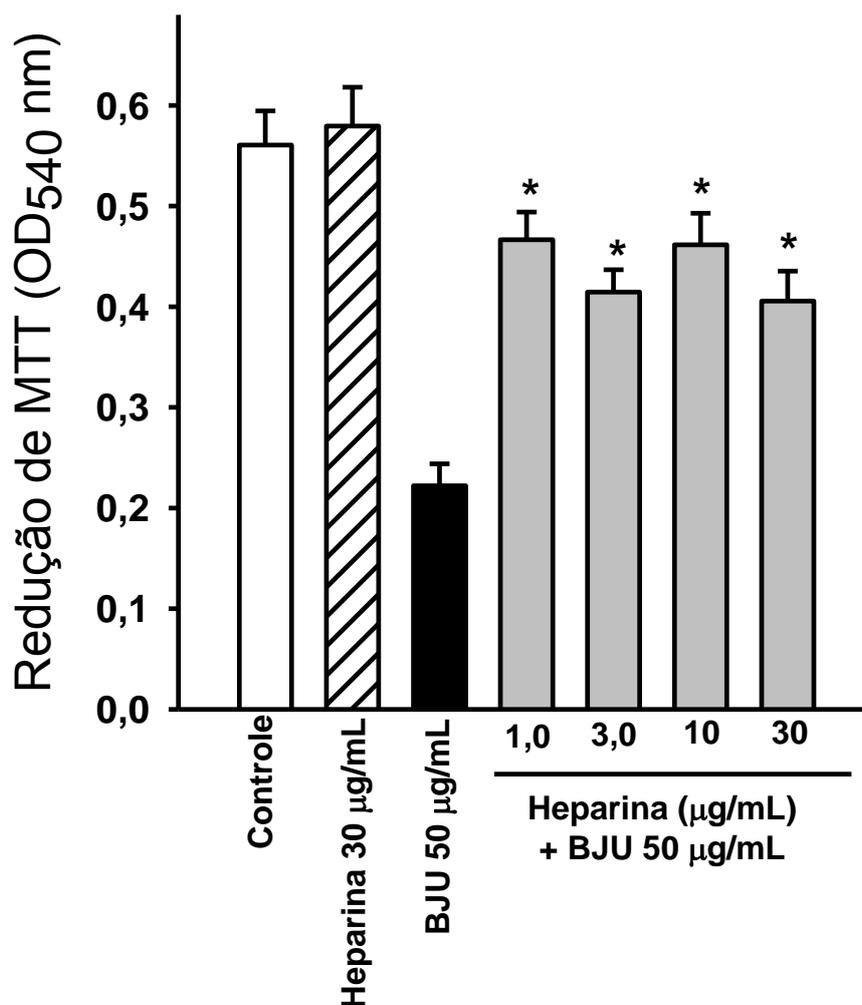


Figura 9 – Efeito da heparina sobre a redução do MTT (OD 540 nm) após exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (50 µg/mL) e diferentes concentrações de heparina de alto molecular (1-30 µg/mL) durante 180 min e a redução de MTT em formazan foi avaliada por espectrofotometria. *p<0,01 vs veneno (n= 4-6 em triplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. BJU = *Bothrops jararacussu*.

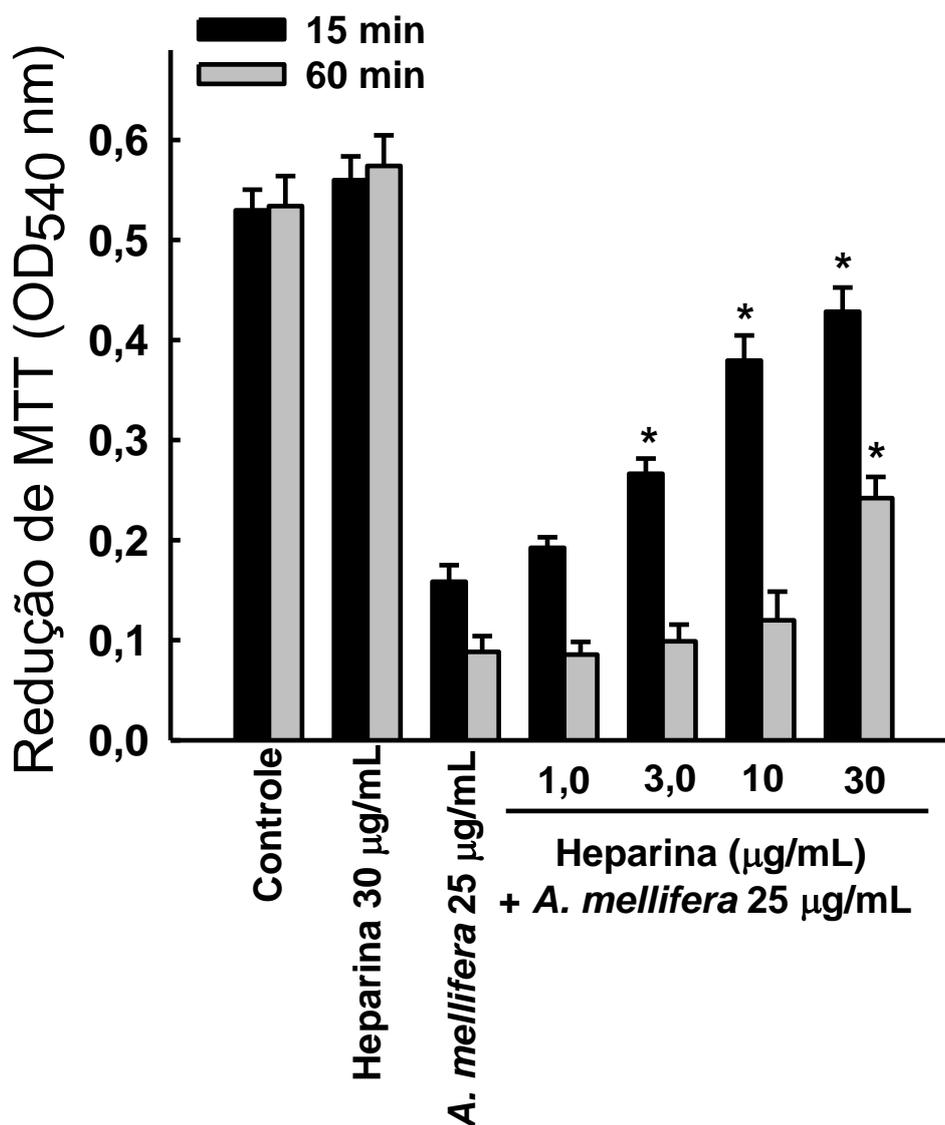


Figura 10 – Efeito da heparina sobre a redução do MTT (OD 540 nm) após exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *A. mellifera* (25 µg/mL) e diferentes concentrações de heparina de alto molecular (1-30 µg/mL) durante 15 e 60 min e a redução de MTT em formazan foi avaliada por espectrofotometria. * $p < 0,01$ vs veneno (n= 4-6 em triplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

A contagem de células viáveis mostrou que a heparina impediu parcialmente o efeito do veneno de *B. jararacussu*, mesmo na concentração mais alta de heparina (30 $\mu\text{g/mL}$; Figura 11). Esse efeito parece similar ao do veneno de *A. mellifera* (Figura 12).

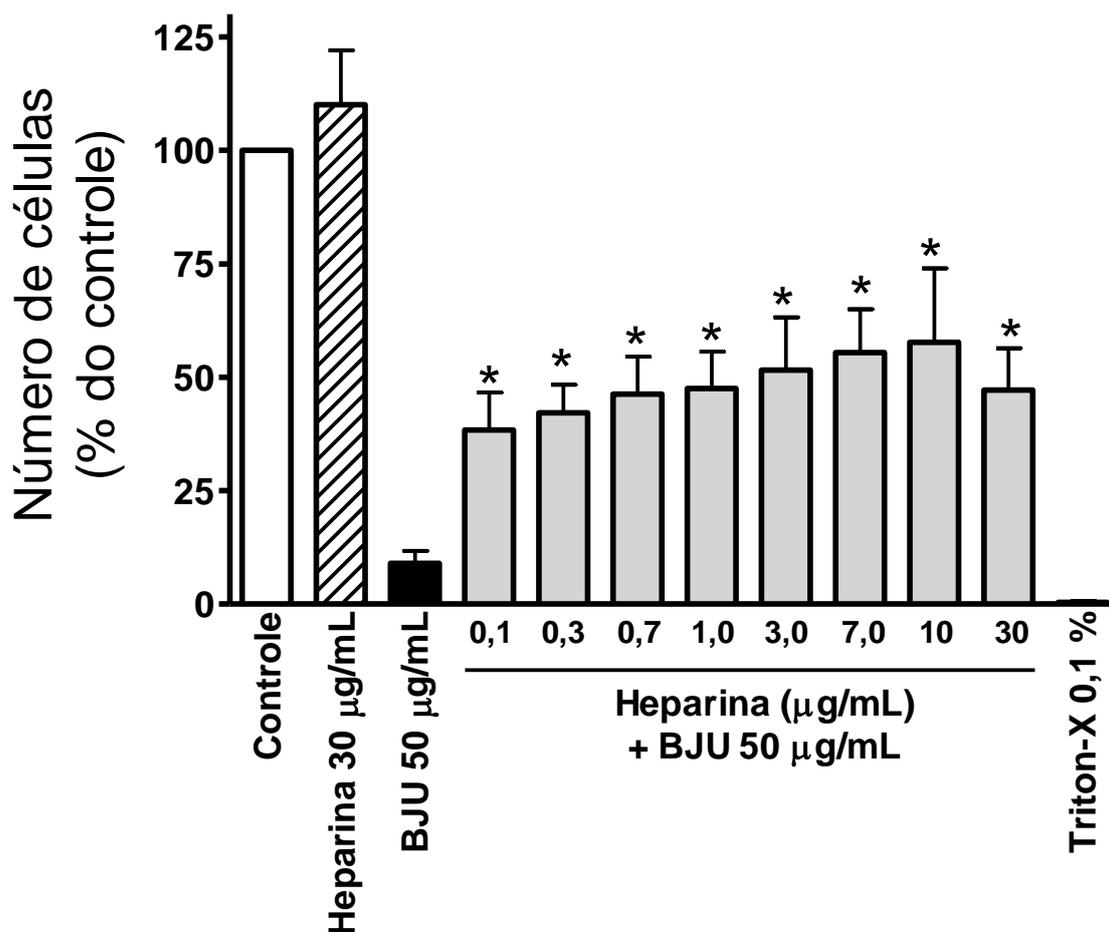


Figura 11 – Efeito da heparina sobre a contagem do número células viáveis após exposição ao veneno de *Bothrops jararacussu*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (50 $\mu\text{g/mL}$) e diferentes concentrações de heparina de alto molecular (0,1-30 $\mu\text{g/mL}$) durante 180 min e o número de células viáveis foi avaliado em hemocitômetro. * $p < 0,05$ vs veneno (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

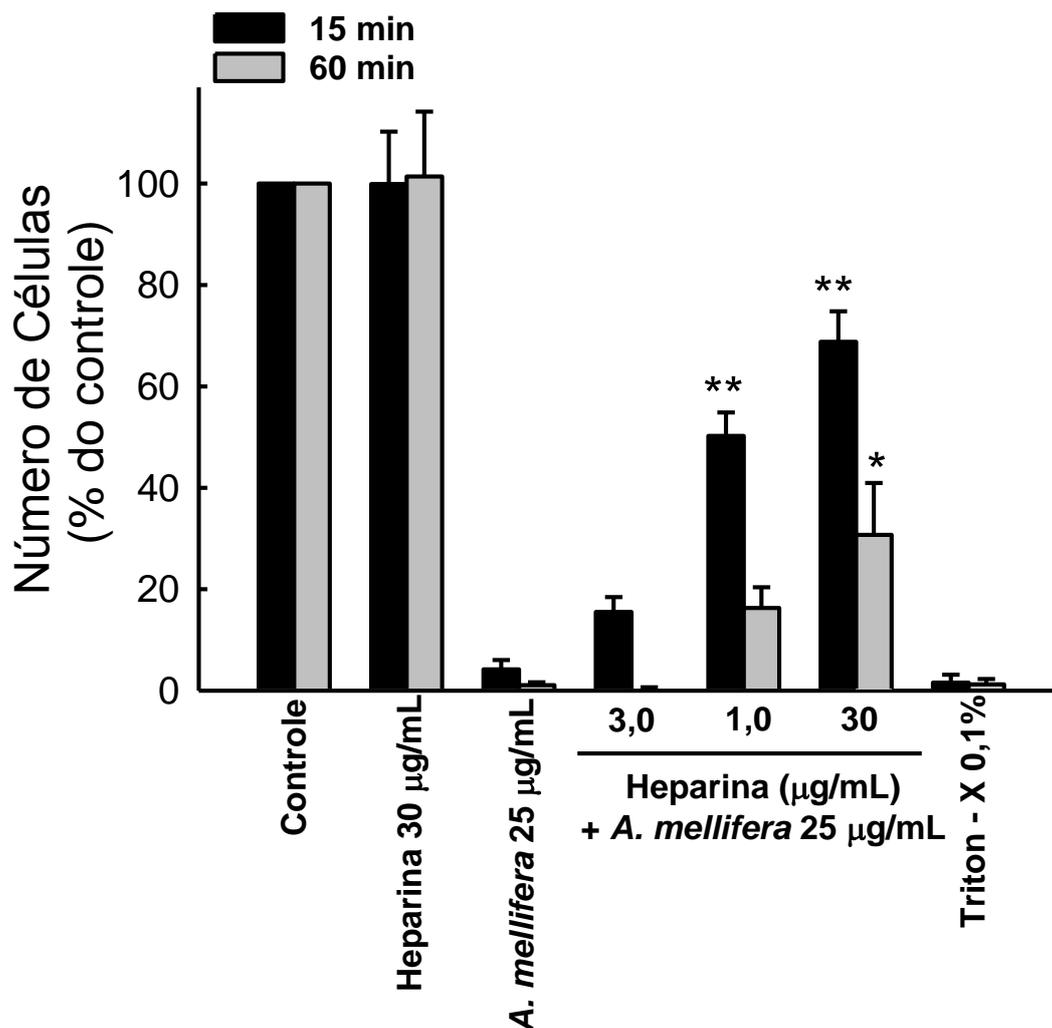
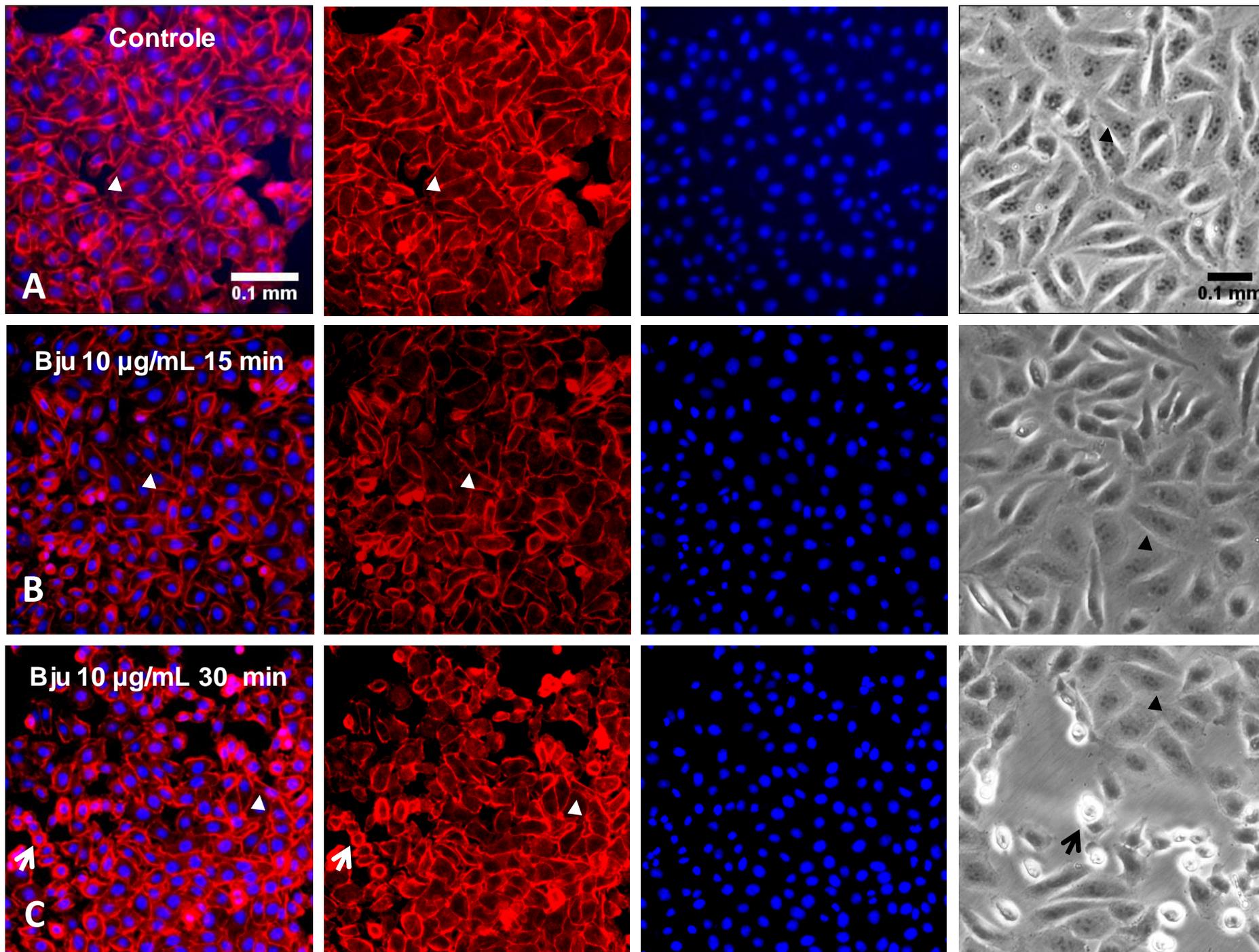


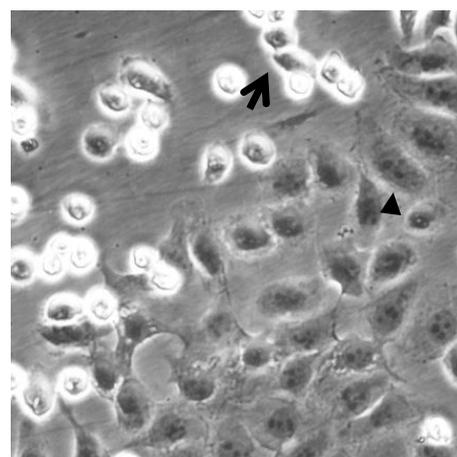
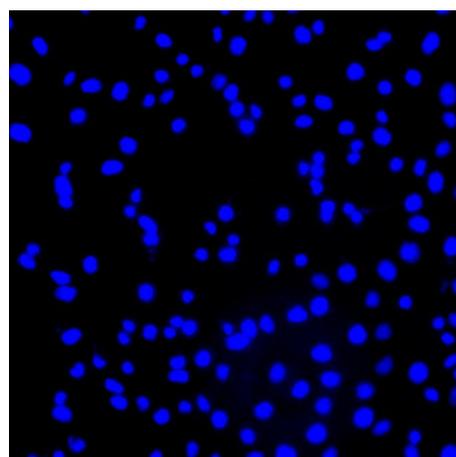
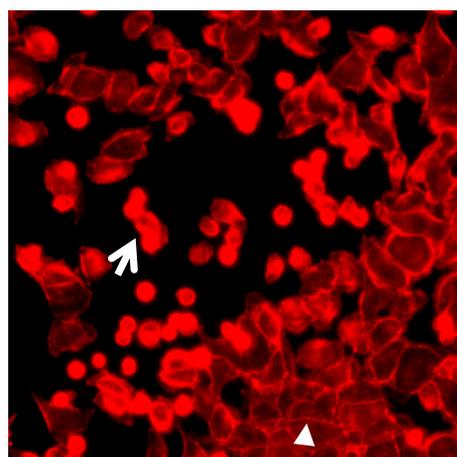
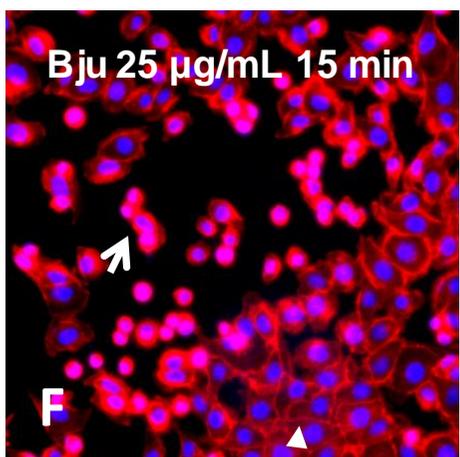
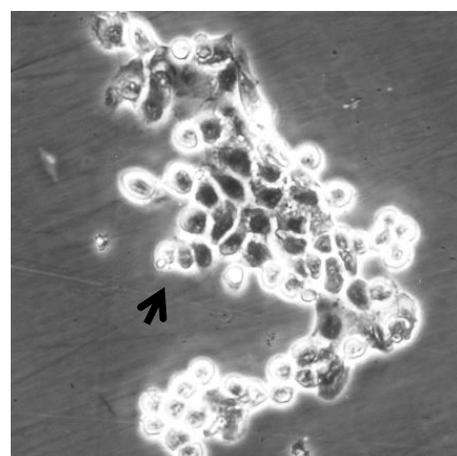
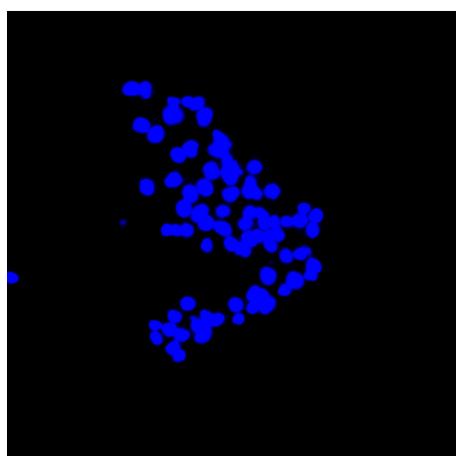
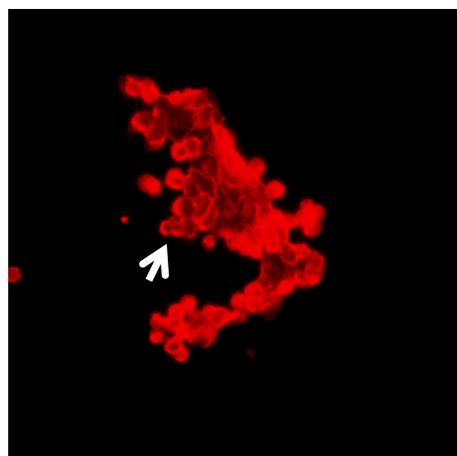
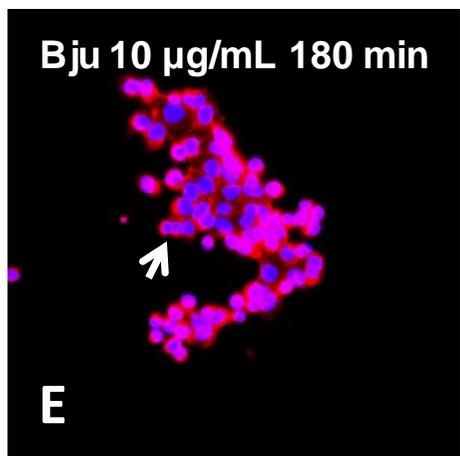
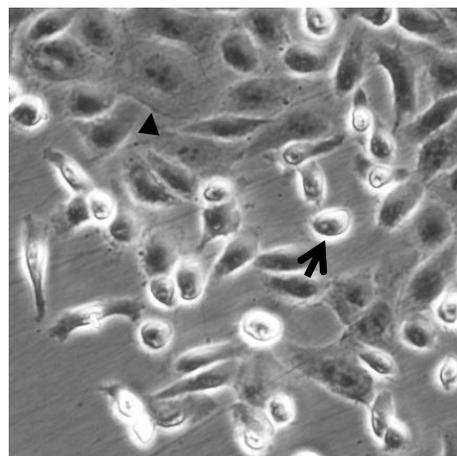
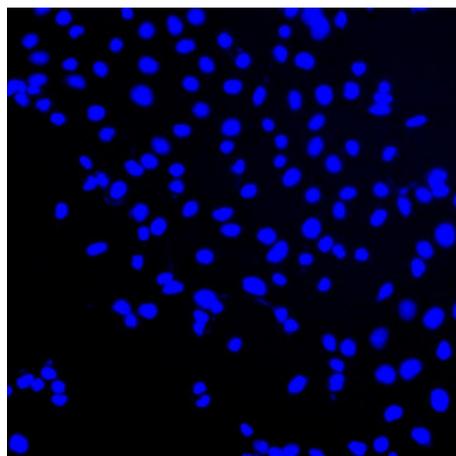
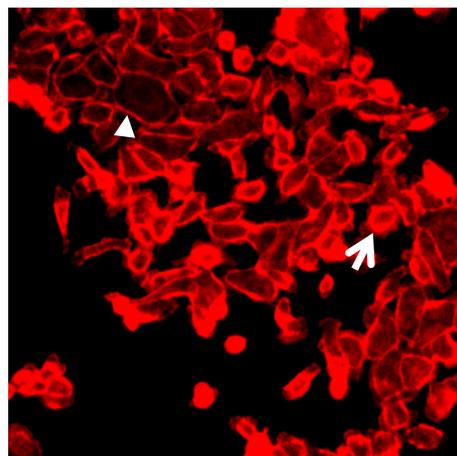
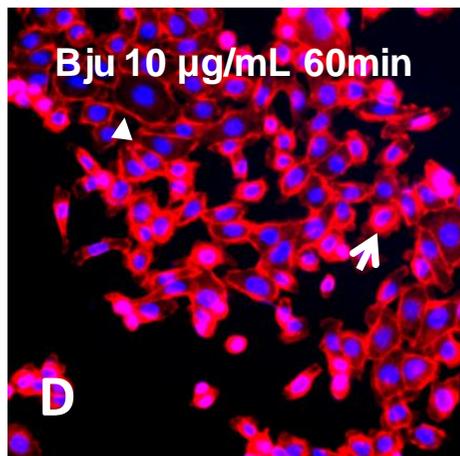
Figura 12 – Efeito da heparina sobre a contagem do número células viáveis após exposição ao veneno de *Apis mellifera*. Células tubulares renais LLC-PK1 foram incubadas com o veneno de *A. mellifera* (25 µg/mL) e diferentes concentrações de heparina de alto molecular (3-30 µg/mL) durante 15 e 60 min e o número de células viáveis foi avaliado em hemocitômetro. * p<0,05; ** p<0,01 vs veneno (n= 6 em duplicata). ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

4.3 Ensaio de Fluorescência

Após esses resultados, avaliamos a morfologia das células expostas aos venenos de *B. jararacussu* e *A. mellifera*. Nos experimentos que utilizamos o veneno de *B. jararacussu* podemos observar que após 180 min as células controles mantinham as características morfológicas de células epiteliais, exibindo marcação cortical da actina filamentosa (Figura 13A). Na concentração de 10 µg/mL no tempo de 15 min não observamos nenhuma alteração de morfologia ou marcação de actina filamentosa (Figura 13B). A partir de 30 min, observamos uma alteração progressiva de morfologia celular e marcação da actina filamentosa acentuada (Figura 13C-E). Há uma perda de adesão das células ao substrato o que sugere fortemente perda de adesão à matriz extracelular. Em 180 min de exposição ao veneno há um claro destacamento de grupos celulares do substrato, no entanto a adesão célula-célula parece ser mantida (Figura 13E). Esses efeitos são mais rápidos e intensos na concentração de 25 µg/mL (Figura 13F-I).

Em relação a exposição ao veneno de *A. mellifera*, podemos observar que já em 5 min na concentração de 5 µg/mL inicia-se a formação de núcleos picnóticos e perda de integridade da membrana celular, com diminuição da marcação cortical de actina filamentosa (Figura 14B). Esses efeitos se intensificam nos tempos de 10 (Figura 14C) e 15 min (Figura 14D). Na concentração de 10 µg/mL nos tempos de 5-15 min, a perda de integridade da membrana celular é mais evidente, sugerindo a morte por necrose (Figura 14E-G).





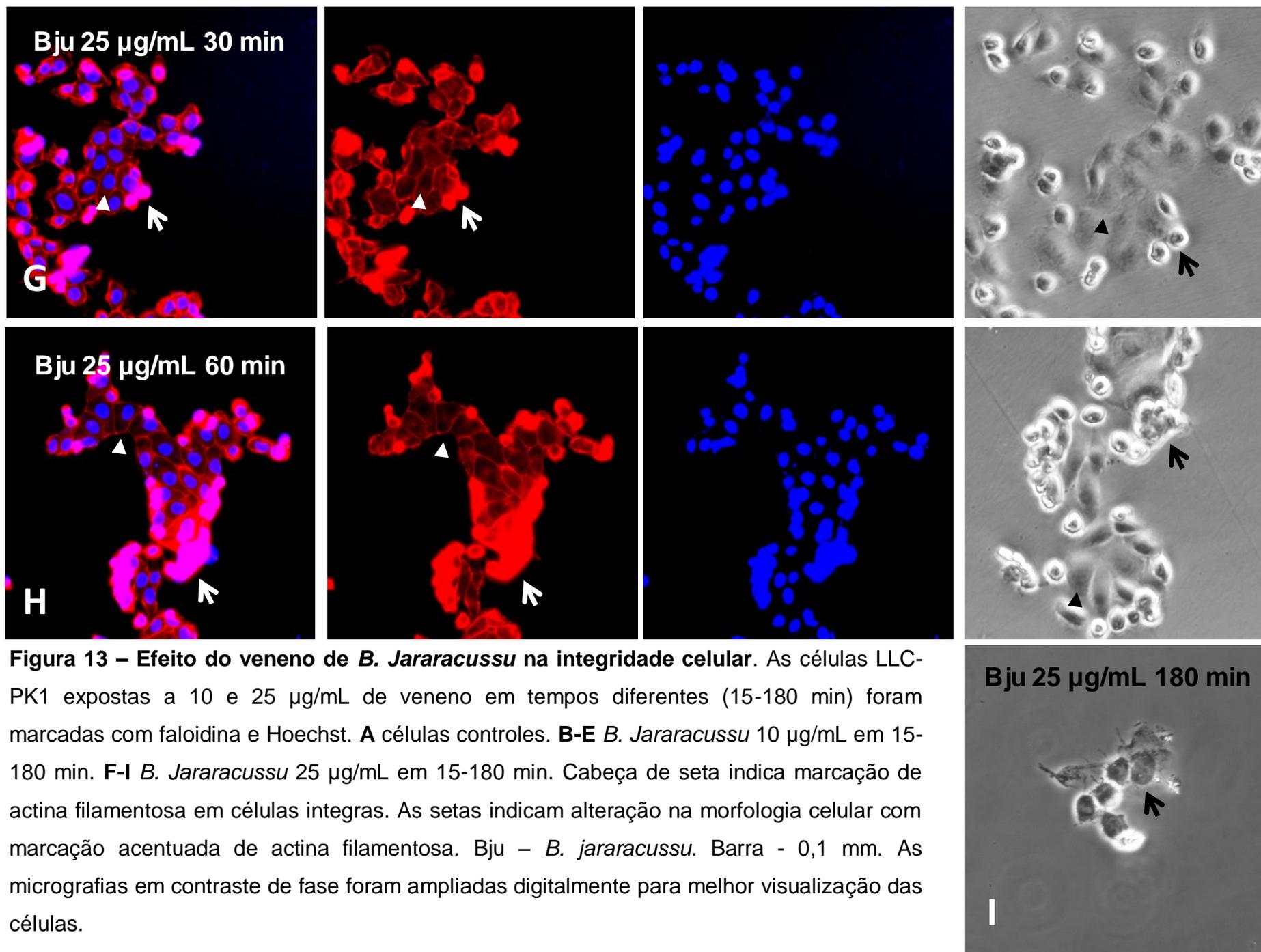
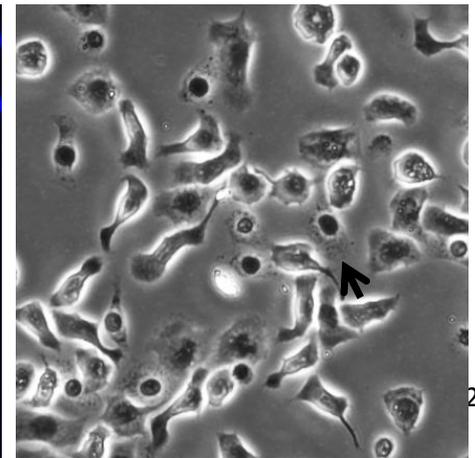
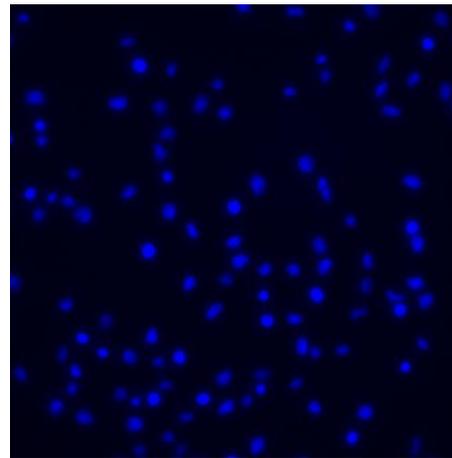
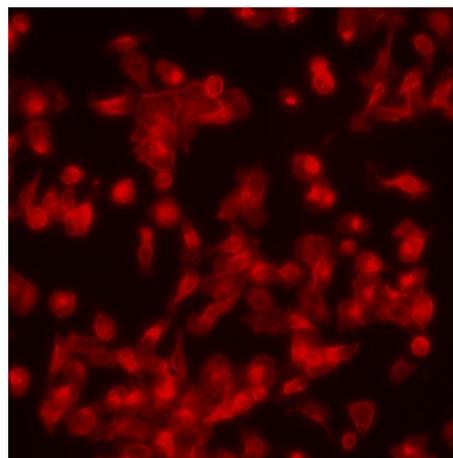
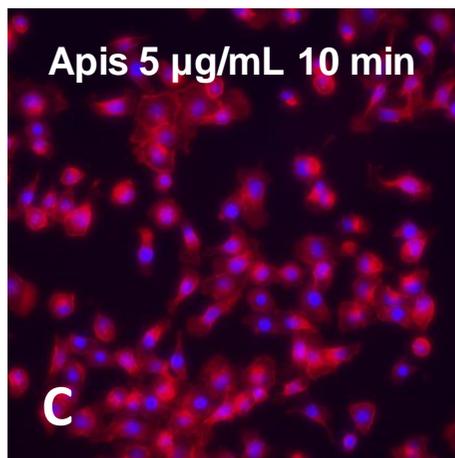
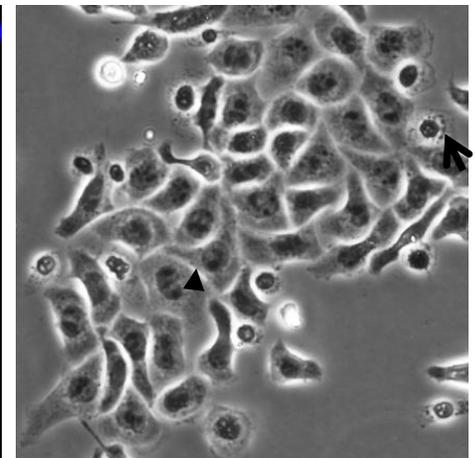
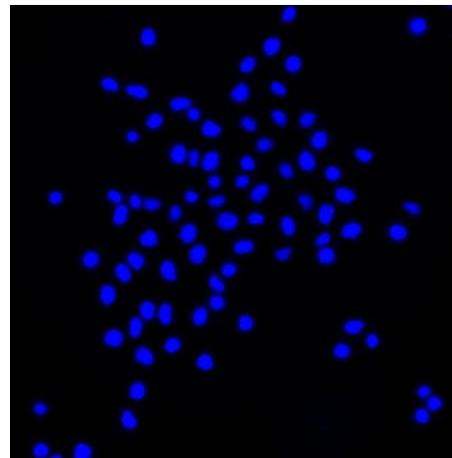
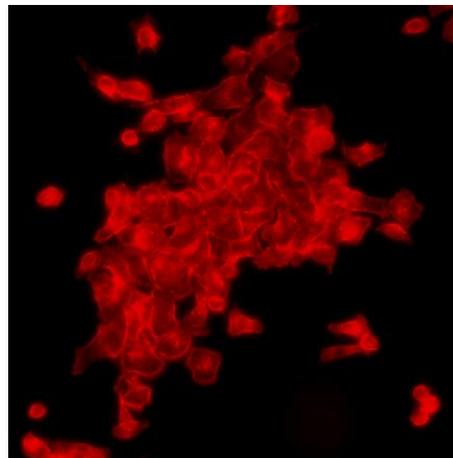
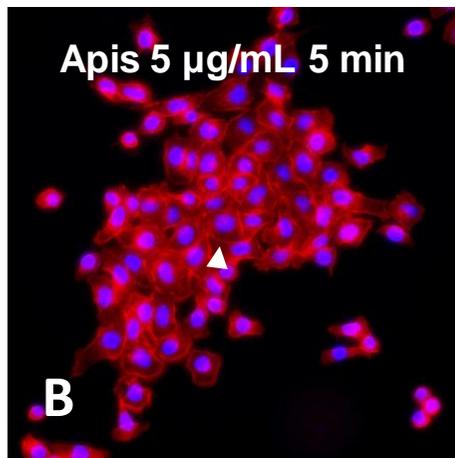
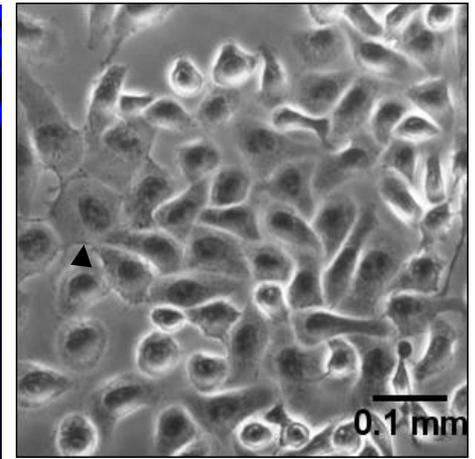
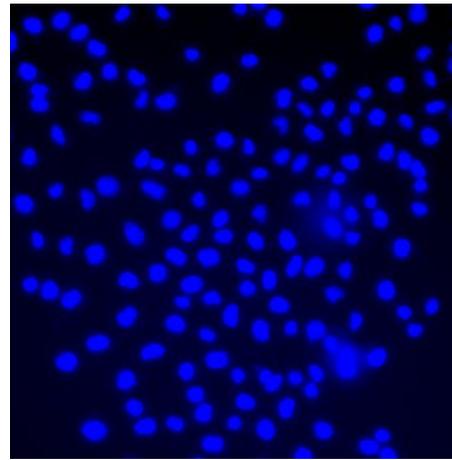
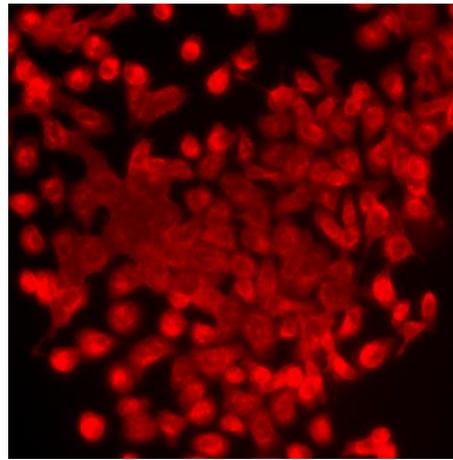
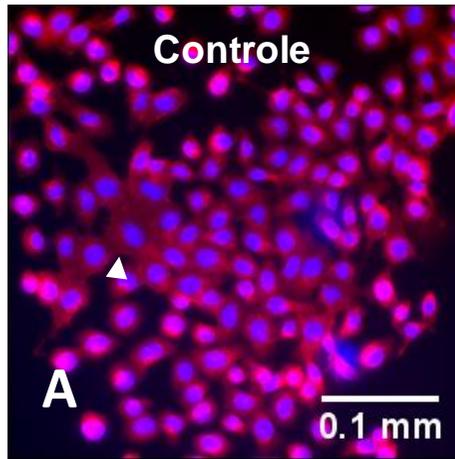
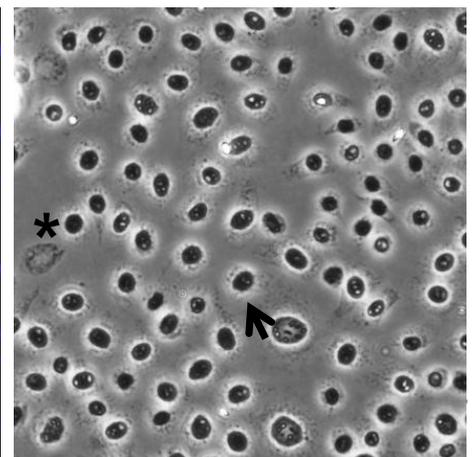
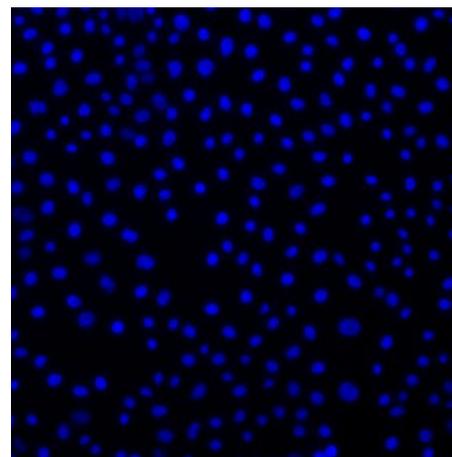
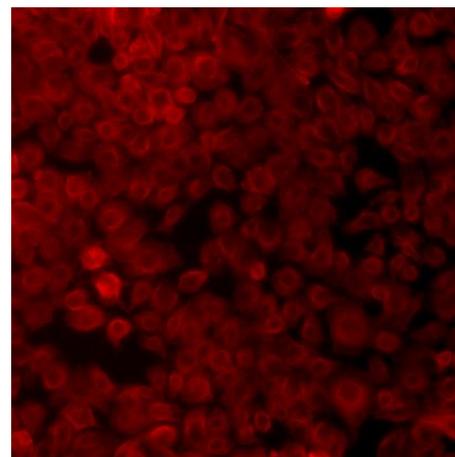
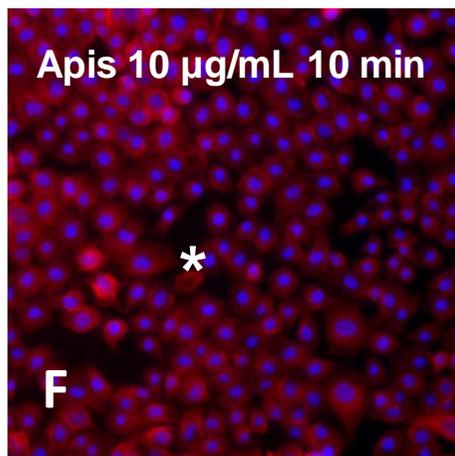
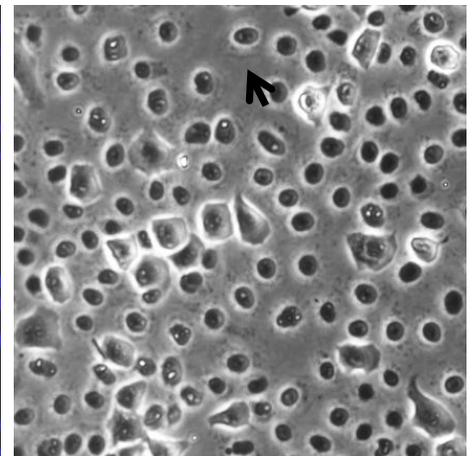
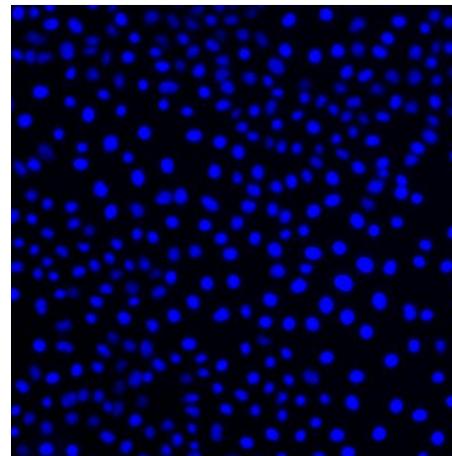
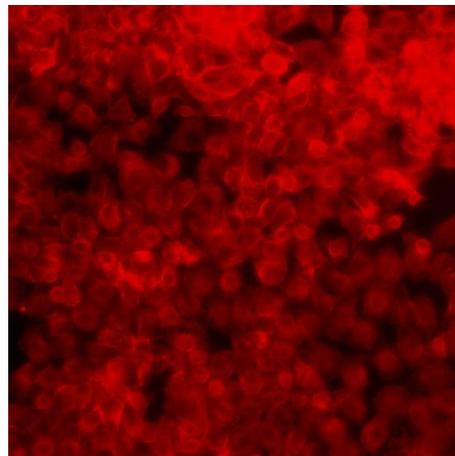
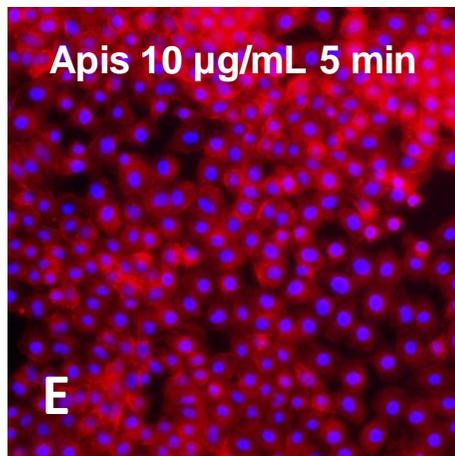
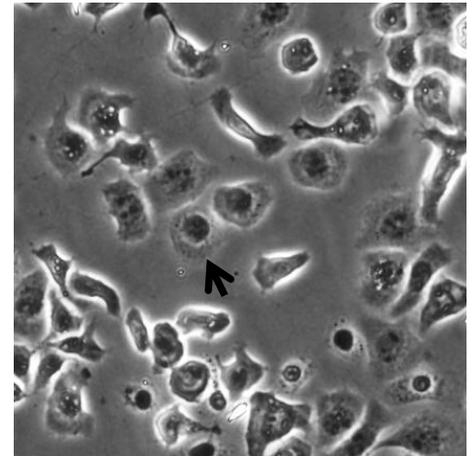
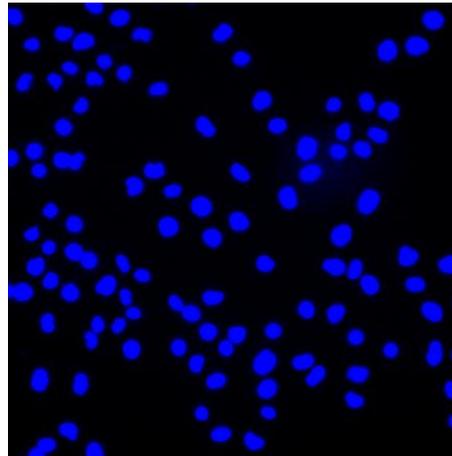
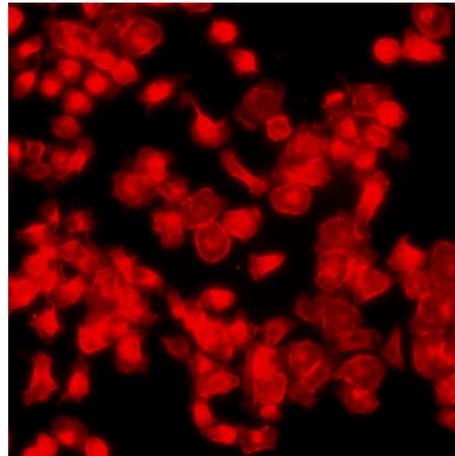
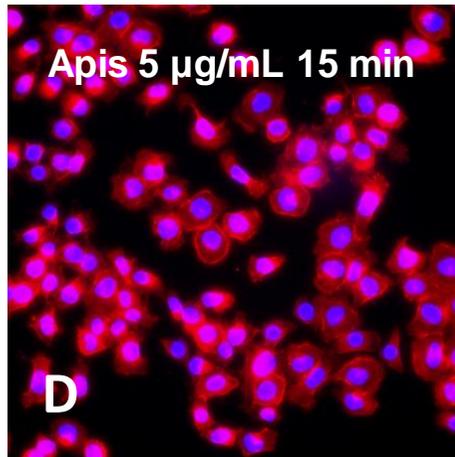


Figura 13 – Efeito do veneno de *B. Jararacussu* na integridade celular. As células LLC-PK1 expostas a 10 e 25 µg/mL de veneno em tempos diferentes (15-180 min) foram marcadas com faloidina e Hoechst. **A** células controles. **B-E** *B. Jararacussu* 10 µg/mL em 15-180 min. **F-I** *B. Jararacussu* 25 µg/mL em 15-180 min. Cabeça de seta indica marcação de actina filamentososa em células integras. As setas indicam alteração na morfologia celular com marcação acentuada de actina filamentososa. Bju – *B. jararacussu*. Barra - 0,1 mm. As micrografias em contraste de fase foram ampliadas digitalmente para melhor visualização das células.





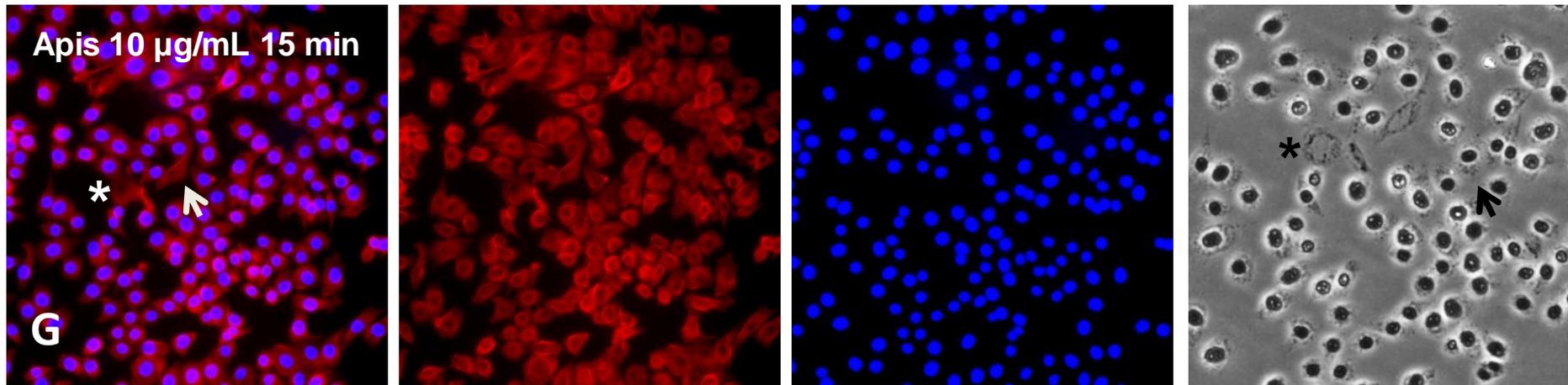


Figura 14 – Efeito do veneno de *A. mellifera* na integridade celular. As células LLC-PK1 expostas a 5 e 10 µg/mL de veneno em tempos diferentes (5-15 min) foram marcadas com faloidina e hoechst. **A** células controles. **B-D** *A. mellifera* 5 µg/mL em 5-15 min. **E-G** *A. mellifera* 10 µg/mL em 5-15 min. Cabeça de seta indica marcação de actina filamentosa em células integras. As setas indicam células com comprometimento de integridade de membrana. * indica “fantasmas” celulares. Apis – *A. mellifera*. Barra - 0,1 mm. As micrografias em contraste de fase foram ampliadas digitalmente para melhor visualização das células.

5. DISCUSSÃO

Acidentes por animais peçonhentos constituem um importante problema de saúde pública. Além de ser doença negligenciada, as ações dos venenos ocorrem de maneira complexa, acarretando alterações localizadas que podem ter repercussões sistêmicas, e causar graves disfunções em diversos órgãos. Tanto no envenenamento botrópico quanto pelo veneno de abelha, a insuficiência renal aguda é uma das complicações mais graves (Fernandes *et al.*, 2006; Marsh e Williams, 2005; Marcussi *et al.*, 2007; White, 2005; Bresolin *et al.*, 2002; Daher *et al.*, 2003; Gabriel *et al.*, 2004; Vetter *et al.*, 1999), gerando necrose tubular cortical e glomerulonefrite (Amaral *et al.*, 1985), e insuficiência renal crônica e necessidade de transplante, sendo a principal causa de morte naqueles pacientes que sobrevivem aos efeitos agudos do veneno (da Silva *et al.*, 1979; Sgrignolli *et al.*, 2011).

Vários autores descrevem que a insuficiência renal aguda causada por estas peçonhas é originada principalmente em decorrência de efeitos indiretos, como a mioglobínúria e hemoglobínúria derivada do processo de rabdomiólise e hemólise, respectivamente (Humblet *et al.*, 1982; Muñoz-Arizpe *et al.*, 1992; Mejía Vélez, 2010; Burdmann *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2007), a coagulação intravascular disseminada (Daher *et al.*, 2009; Bresolin *et al.*, 2002; Milani Jr *et al.*, 1997; Amaral *et al.*, 1986) e alterações hemodinâmicas como diminuição do fluxo renal e da pressão arterial (Rezende *et al.*, 1989; dos Reis *et al.*, 1997; Guimarães *et al.*, 2004).

Entretanto, existem várias evidências de efeitos diretos sobre o rim. A administração intramuscular em ratos do veneno de *B. neuwiedii diporus* resultou em rápida elevação dos níveis séricos de creatina cinase (CK), uréia e creatinina, além de características histopatológicas de insuficiência renal aguda. Observações similares foram realizadas para *B. asper* (Chaves *et al.*, 1989). A injeção intravenosa do veneno de *B. moojeni* em ratos revelou, na ausência de alteração da pressão arterial, uma diminuição aguda da taxa de filtração glomerular (TFG) e aumento da excreção de Na⁺ e K⁺, particularmente da fração proximal, associado à intensa degeneração de capilares glomerulares, da arquitetura tubular, e sugeriu-se que a desorganização do citoesqueleto e perda de adesão celular fossem pelo menos em parte responsáveis por esses efeitos (Boer-Lima *et al.*, 1999). Boer-Lima e colaboradores (2002) sugerem que a modificação do estado da actina filamentosa pode ser responsável pela disfunção dos podócitos glomerulares resultante do

envenenamento experimental com *B. moojeni*. Além disso, também sugerem que a ação proteolítica na matriz extracelular poderia provocar perda de adesão dos podócitos à lâmina basal. O aumento compensatório da expressão da Na⁺/K⁺-ATPase renal também foi notado após administração do veneno de *B. alternatus* (Linardi *et al.*, 2011). Recentemente, foi visto que o veneno de *B. moojeni* por via intravenosa modificou a expressão e localização de moléculas de adesão no glomérulo e/ou nos túbulos renais, com redução da proteína de junção aderente ZO-1 e de adesão focal β 1 integrina, vinculina e F-actina, além de laminina da membrana basal (Collares-Buzato e Cruz-Höfling, 2014). Utilizando o modelo de perfusão de rim de rato isolado, portanto sem a influência de fatores extrarrenais, mostrou-se que o veneno de *B. moojeni* produz efeitos funcionais semelhantes ao modelo *in vivo*, além de reduzir o fluxo urinário (FU) em 60 min, e a pressão de perfusão (PP) e resistência vascular (RV) renais em 90 min (Barbosa *et al.*, 2002). Este padrão é compartilhado pelos venenos de *B. jararaca*, com dilatação e necrose tubular (Serra *et al.*, 1999), *B. pirajai* (Havt *et al.*, 2005), *B. erythromelas* (Martins *et al.*, 2005), *B. marajoensis* (Evangelista *et al.*, 2010), *B. leucurus* (de Moraes *et al.*, 2013). Alguns desses efeitos envolvem o fator de ativação plaquetária e produtos da ciclooxigenase (Serra *et al.*, 1999). No caso do veneno de *B. jararacussu* foram observadas alterações apenas após 120 min, em uma concentração três vezes maior (30 μ g/mL), sendo que não houve redução, mas sim aumento da TFG e do FU (Havt *et al.*, 2001). Em túbulos proximais isolados de rato, o emprego do veneno de *B. jararaca* na concentração de 250 μ g/mL gerou lesão celular, detectada através da medida de LDH, e peroxidação lipídica, que foi independente de Ca²⁺ extracelular e antagonizado por antiveneno botrópico (de Castro *et al.*, 2004).

Em concordância com os resultados *in vivo* e *ex vivo* comentados acima, nosso trabalho demonstra que o veneno de *B. jararacussu* causa o declínio da viabilidade de células de túbulo proximal renal LLC-PK1, com redução do número de células viáveis aderidas e liberação de LDH, justificando a ação direta do veneno com conseqüente necrose tubular e o que explicaria a menor capacidade do rim afetado em reabsorver Na⁺ e K⁺, cujo principal local de reabsorção é o túbulo proximal. É importante notar que esses efeitos são observados de forma mais proeminente na concentração de 25 e 50 μ g/mL após 180 min de incubação, dentro da faixa que foi utilizada em experimentos com o rim isolado para esse veneno (Havt

et al., 2001). Segundo estimativas, serpentes do tipo *Bothrops* injetam em torno de 50 mg de veneno por picada. Assumindo-se que as concentrações do veneno no túbulo proximal sejam 10-20 vezes maiores que no plasma, pelo papel concentrador do rim, é possível que este alcance mais de 100 µg/mL localmente (de Castro *et al.*, 2004). Portanto, nossos dados são compatíveis com o que acontece clinicamente.

O efeito citotóxico do veneno de algumas espécies de *Bothrops* foi investigado na linhagem de células tubulares distais caninas MDCK. Foi demonstrado que o veneno de *B. moojeni* promoveu a liberação de LDH (necrose) e reduziu incorporação do corante vital vermelho neutro após 5 h de incubação (15% das células, 6,9 µg/mL; Collares-Buzato *et al.*, 2002). Observou-se redução da resistência elétrica transepitelial (RET), sem alterações morfológicas importantes ou perda de contato intercelular, com aparente manutenção da distribuição de ocludina, ZO-1 e E-caderina, mas com comprometimento da adesão matricial e junções aderentes focais, além de desorganização de fibras de estresse na região basal (Collares-Buzato *et al.*, 2002). Efeitos semelhantes referentes ao vermelho neutro, RET e fibras de estresse foram evidenciados com 10 e 100 µg/mL de veneno de *B. alternatus* (Nascimento *et al.*, 2007). Neste trabalho e com *B. leucurus* (de Moraes *et al.*, 2013) houve perda de viabilidade revelada através do ensaio de MTT e identificação de necrose, com poucas células apoptóticas, onde o aumento de Ca²⁺ intracelular e mudança do potencial de membrana mitocondrial podem estar envolvidos. Novamente, nossos resultados em células de túbulo proximal, cujo modelo é mais próximo ao que sucede *in vivo* por ser o tipo celular mais afetado pelo envenenamento botrópico, são semelhantes ao de MDCK. Mais que isso, os dados de microscopia de fluorescência sugerem que a cinética de efeito do veneno passa primeiramente pela perda de adesão celular com a matriz, com menor efeito aparente sobre o contato intercelular, o que vem de encontro com os achados *in vitro* de Collares-Buzato e colaboradores (2002) e mais recentemente *in vivo* (Collares-Buzato e Cruz-Höfling, 2014). Acreditamos que por serem células aderentes, as LLC-PK1 que perdem a adesão individualmente ou *en bloc*, em um primeiro momento, logo após acabam perdendo a viabilidade e depois entram em necrose, liberando LDH. Assim, pode-se explicar porque com 10 µg/mL em 180 min há redução significativa da viabilidade e do número de células aderidas (imunocitoquímica) mas ausência de liberação significativa de LDH. O mesmo pode

ser considerado, por exemplo, para 25 µg/mL em 60 min. Não podemos descartar, entretanto, que o processo de apoptose esteja ocorrendo, ou mais precisamente de anoikis, que é a morte programada da célula induzida pela perda de adesão ao substrato e relatada para algumas metaloproteinases botrópicas (Tanjoni *et al.*, 2005; Bustillo *et al.*, 2012)

Alguns componentes foram cogitados como responsáveis pela nefrotoxicidade, como a lectina do tipo C (*B. pirajai*, Havt *et al.*, 2005; *B. insularis*, Braga *et al.*, 2006), FLA₂ (*B. insularis*, Braga *et al.*, 2008a), L-amino ácido oxidase (Braga *et al.*, 2008b), metaloproteases (*B. alternatus*, Gay *et al.*, 2009). A metaloprotease BaH1 isolada do veneno de *Bothrops asper* causa perda de adesão concentração-dependente, de células endoteliais em cultura, provavelmente devido à degradação de componentes da matriz extracelular, uma vez, que tal efeito foi abolido quando esta metaloprotease foi incubada com agentes quelantes (Borkow *et al.*, 1995). Uma vez observado esse efeito nas células LLC-PK1 em nossos experimentos, podemos especular que essa atividade possa ser em parte, referente a metaloproteases presente no veneno de *B. jararacussu*. Sabe-se que o veneno de *B. jararacussu* possui uma metaloprotease denominada de BjussuMP-I da classe P-III que apresentaram atividade hemorrágica e inibição da agregação plaquetária (Mazzi *et al.*, 2007). BjussuMP-II é uma metaloprotease de classe P-I e não induz hemorragia, miotoxicidade e letalidade, mas apresenta atividade proteolítica dose-dependente em fibrinogênio, colágeno, fibrina, caseína e gelatina, mantendo-se estável em diferentes pHs, temperaturas e presença de vários íons divalentes (Marcussi *et al.*, 2007). FLA₂ de venenos de *Bothrops* são os principais componentes responsáveis pelo dano celular através da hidrólise de fosfolipídios de membrana. Elas podem ser classificadas em dois subgrupos: (I) FLA₂ Asp49 (por exemplo, *B. jararacussu* - BthTX-II), com baixa a moderada, atividade enzimática, e (II) FLA₂ Lys49 (por exemplo, *B. jararacussu* - BthTX-I), que não apresentam qualquer atividade hidrolítica sobre substratos sintéticos (Lomonte e Gutiérrez, 2011; Lomonte e Rangel, 2012). As atividades das FLA₂ na hidrólise dos fosfolipídeos de membrana também explicaria a morte celular em nossos experimentos causado pelo veneno de *B. jararacussu*. Ademais, desintegrinas, produtos proteolíticos das SVMP, que inibem a adesão celular com a matriz, foram encontrados nos venenos de *B.*

jararaca (De Luca *et al.*, 1995), *B. alternatus* (Souza *et al.*, 2000), *B. colombiensis* (Sánchez *et al.*, 2009) e *B. insularis* (Della-Casa *et al.*, 2011).

Assim como para os venenos de serpentes, evidências anteriores indicavam que o veneno de *A. mellifera* apresenta ação renal direta (dos Reis *et al.*, 1997; Vetter *et al.*, 1999). Apesar de escassos, trabalhos experimentais mostraram que diversas alterações morfológicas correspondentes à lise celular (necrose) foram observadas no túbulo proximal de animais após injeção intravenosa do veneno, indicando a interação com a membrana plasmática (dos Reis *et al.*, 1998). Grisotto e colaboradores (2006) apontaram alterações da função renal em ratos como a redução da TFG e FU independentes da pressão arterial, epitélio tubular achatado, degeneração com perda de células do túbulo e *tubulorrhesis*, e a incubação do veneno (0,1-10 µg/mL) com túbulos proximais de rato em suspensão resultou em aumento significativo da liberação de LDH após 15 min. Em cultura celular, sem interferência dos efeitos sistêmicos e hemodinâmicos, células tubulares proximais de coelho em contato com o veneno de *A. mellifera* tiveram redução da viabilidade celular com aumento da liberação de LDH e inibição da captação de Pi e Na⁺ (Han *et al.*, 2000). A fração hidrossolúvel do veneno, composta de moléculas com massa molecular <10 kDa, mimetizou tais efeitos (Han *et al.*, 2002), sendo sugestivo da ação do componente majoritário melitina (Han *et al.*, 2000). Por outro lado, em epitélio da bexiga urinária de sapo, a melitina aumentou a permeabilidade apical ao Na⁺ com diminuição de RET (McGahan *et al.*, 1986). A perda de integridade da membrana plasmática também pode ocorrer pela ação da FLA₂ secretória do veneno de abelha (Putz *et al.*, 2007)

Neste trabalho, mostramos que o veneno de *A. mellifera* causa uma rápida e intensa perda da viabilidade celular de túbulo proximal renal LLC-PK1, liberação de LDH e com praticamente ausência do número de células viáveis aderidas em 15 min na concentração de 25 µg/mL. É interessante ressaltar que a morte celular é bem diferente da que ocorre com o veneno de *B. jararacussu*. É possível observar contração citoplasmática e picnose, o que já acontece em 5 µg/mL, mas a variação da viabilidade e do teor de LDH é apenas detectada com 10 µg/mL. Tais concentrações são compatíveis com aquelas utilizadas em diversos outros relatos (Jang *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2008; Alizadehnohi *et al.*, 2012). Entretanto, comparando com dados do nosso laboratório em células

endoteliais, as células renais parecem ser mais resistentes ao efeito citotóxico do veneno, já que naquelas a liberação de LDH foi praticamente máxima na concentração de 0,1 µg/mL em 60 min (El-Kik *et al.*, 2013). Isto parece de acordo com a proposição de que a citotoxicidade da melitina é significativamente menor em células epiteliais polarizadas, como o caso da célula renal (Maher e McClean, 2008). A melitina prontamente se incorpora na membrana celular, levando a uma desordem na estrutura da bicamada de fosfolípidos (Ladokhin e White, 1999). Alguns autores descrevem que a melitina orienta-se paralelamente a membrana plasmática e depois altera sua orientação causando poros na membrana, induzindo a desintegração da mesma (Klocek e Seelig, 2008). Esse peptídeo catiônico também se liga ao DNA com uma alta afinidade por interações eletrostáticas com o esqueleto de fosfato aniônico (Québatte *et al.*, 2013). Foi relatado que a melitina causa apoptose em células de músculo liso vascular (Son *et al.*, 2006) e em células de carcinoma hepatocelular (Li *et al.*, 2006). Melitina também aumenta a ação da FLA₂, e tem uma variedade de efeitos sobre as células (Lad e Shier, 1979). A FLA₂ presente no veneno de abelha hidrolisa fosfolípidos de membrana em lisofosfolípidos e ácido araquidônico (Habermann, 1972). Notavelmente, a exposição à FLA₂ desse veneno leva a danos das membranas celulares e, em altas concentrações, à morte celular por necrose (Ownby *et al.*, 1997), o que pode ter acontecido em nossos ensaios.

Demonstramos pela primeira vez que a heparina de alto peso molecular em diferentes concentrações, quando pré-incubada com esses venenos, foi capaz de inibir, pelo menos parcialmente, os parâmetros indicativos de viabilidade e de morte celular. Esta ação antagonista da heparina possivelmente ocorre devido à neutralização de resíduos básicos presentes em proteínas dos venenos, de acordo com Melo e colaboradores (1993).

6. CONCLUSÃO

Demonstramos que os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Apis mellifera* podem causar citotoxicidade direta em células tubulares proximais renais. No entanto, a cinética e intensidade são distintas, assim como, possivelmente, o mecanismo citotóxico. Nosso trabalho também demonstra que a heparina inibe, pelo menos de forma parcial, as atividades citotóxicas desses venenos sobre células renais, podendo ser um fármaco promissor para o emprego nos quadros de envenenamento e instalação de insuficiência renal induzida por estas peçonhas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, J. F. Treatment of severe anaphylactic reactions to insect stings. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 74, p. 567-569, 1981.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335-393, 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. Em: **The Cell**, 4^a. Ed. New York Ed. Garland Science, 949-1010, 1994.

ALIZADEHNOHI, M.; NABIUNI, M.; NAZAR, Z.; SAFAINEJAD, Z.; IRIAN, S. The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp. **J Venom Res**, v. 3, p.22–27, 2012.

AMARAL, C. F.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, n. 6, 877-885, 1985.

AMARAL, C. F.; DE REZENDE, N.A.; DA SILVA O. A. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents Analysis of 63 cases. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.

AMARAL, L. S. Avaliação do efeito dos bufadienólidos em novas vias de sinalização intracelular mediadas pela Na⁺/K⁺-ATPase. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em farmacologia e Química Medicinal, UFRJ, 2011.

ARDAILLOU, R.; RONCO, P.; RONDEAU, E.; FRIEDLANDER, G. Biology of renal cells in culture. In: Brenner BM, Rector FC Jr, editors. **The Kidney**. 6^a ed. Philadelphia: WB Saunders. v. 1, cap. 3, p. 93-191, 2000.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

Arruda, E. Z.; Silva, N. M.; Moraes, R. A.; Melo, P. A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz J Med Biol Res**. v. 35, n. 6, p. 723-726, 2002.

AZEVEDO–MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. Himenópteros (Abelhas, Vespas). In: Nicolella, A.; Barros, E.; Batista Torres, J.; Marques, M. G. (Org.). **Acidentes com Animais Peçonhentos - Consulta Rápida**. 1^a ed. Porto Alegre: Hospital de clínicas de Porto Alegre. V. 1, p. 15–16, 1997.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; FERREIRA, D. B.; COSTA, R. S. Rhabdomyonecrosis experimentally induced in Wistar rats by africanized bee venom. **Toxicon**, v. 30, p. 344-348, 1992.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom

metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACÓ, P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, 2002.

BARBOSA, P. S.; MARTINS, A. M.; HAVT, A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 376-86, 2005.

BERNÈCHE, S.; NINA, M.; ROUX, B. Molecular dynamics simulation of melittin in a dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. **Biophysical Journal**, 75, 1603-1618, 1998.

BJARNASON, J.; FOX, J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BLATZ, A. L.; MAGLEBY, K. L. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. **Nature**, 323, 718-720, 1986.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A. R.; CRUZ-HOFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 61, p. 698-706, 1999.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; CRUZ-HÖFLING, M. A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 67, n. 2, 217-222, 2002.

BONFIM, V. L.; DE CARVALHO, D. D.; PONCE-SOTO, L. A.; KASSAB, B. H. and MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, n.6, p.523-32, 2009.

BONIFAZI, F.; JUTEL, M.; BILÓ, B.M.; BIRNBAUM, J.; MULLER, U.; BUCHER, C.; FORSTER, J.; HEMMER, W.; INCORVAIA, C.; MOSBECH, H.; OUDE-ELBERINK, J.N.G.; REEFF, F.; FERNANDEZ, J.; SENNA,G.; JARISH, R.; WUTHRICH, B. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**, v. 60, p. 1459-1470, 2005.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4210-4221, 2011.

BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int.** v. 66, n. 2 p. 480–485, 2004.

BONVENTRE, J. V.; BREZIS, M.; SIEGEL, N.; ROSEN, S.; PORTILLA, D.; VENKATACHALAM, M. Acute renal failure, I. relative importance of proximal vs. distal tubular injury. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 623-632, 1988.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. In vitro activity of BaH-1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells, **Toxicon**, v. 32, p. 1387–1391, 1995.

BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; FAGUNDES, F. H.; FONTELES, M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 181-190 2008a.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859-867, 2006.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 199-207, 2008b.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; DE MENEZES, D. B.; BARBOSA, P. S.; EVANGELISTA, J. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 329-338, 2007.

BRENNER, B. M. & RECTOR, F. C. Brenner and Rector's. **The Kidney**. 8a. Ed. Editora Saunders, 2008.

BRESOLIN, N. L.; CARVALHO, L. C.; GOES, E. C.; FERNANDES, R.; BAROTTO, A.M. Acute renal failure following massive attack by Africanized bee stings. **Pediatr. Nephrol.** v. 17, p. 625-627, 2002.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLBMAN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, Cap. 25 p. 671-719, 2012.

BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B.; BARRETO, O. C.; MARCONDES, M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 48, n. 1, 82-88, 1993.

BUSTILLO, S.; GAY, C. C.; GARCÍA DENEGRI, M. E.; PONCE-SOTO, L. A.; BAL DE KIER JOFFÉ, E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L. C. Synergism between baltergin

metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 338-343, 2012.

CAJAL, Y.; JAIN, M.K. Synergism between mellitin and phospholipase A2 from bee venom: apparent activation by intervesicle exchange of phospholipids. **Biochemistry**, 36, 3882-3893, 1997.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Heparin derived heparan sulphate mimics to modulate heparan sulphate-protein interaction in inflammation and cancer. **Matrix Biology**, v. 29, p. 442-452, 2010.

CATTERAL, W. A.; CHANDY, K. G.; GUTMAN, G. A. The IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels. **International Union of Basic and Clinical Pharmacology- Media**, United Kingdom, cap 4, 141, 2002.

CELI, A; PELLEGRINI, G; LORENZET, R; DE BLASI, A; READY, N; FURIE, BC; FURIE, B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 19, p. 8767-8771, 1994.

CERNE, K; ERMAN, A; VERANIC, P. Analysis of cytotoxicity of melittin on adherent culture of human endothelial cells reveals advantage of fluorescence microscopy over flow cytometry and haemocytometer assay. **Protoplasma**, n. 250, p. 1131-1137, 2013.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon**, v. 27, n. 10, p. 1085-1093, 1989.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v.36, p. 823-846, 1998.

COLLARES-BUZATO, C. B.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Disarray of glomerular and tubular cell adhesion molecules in the course of experimental *Bothrops moojeni* envenomation. **Toxicon**, v. 78, p. 41-46, 2014.

COLLARES-BUZATO, C.B.; DE PAULA LE SUEUR, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.181, n. 2, p.124-132, 2002.

CONGER J. Hemodynamic factors in acute renal failure. **Adv Ren Replace Ther**. v. 4 p. 25–37, 1997.

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAÚJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu* : A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

CRUZ-CHAMORRO, L.; PUERTOLLANO, M. A.; PUERTOLLANO, E.; DE CIENFUEGOS, G. A.; DE PABLO, M. A. In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1201-1209, 2006.

CURCI, O. H. **Toxicologia**. La Prensa Médica Argentina, Buenos Aires, 3^a ed. 2001.

DA SILVA, N. M.; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L.; MORAES, R. A.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.

DA SILVA, O. A.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n.2, p. 401-407, 1979.

DAHER, E.F.; OLIVEIRA, R.A.; DA SILVA, L.S. V.; SILVA, E.M.B.; MORAIS, T.P. Acute renal failure following bee stings: case reports. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 42, n. 2, p. 209-212, 2009.

DAHER, E.F.; SILVA JUNIOR, G.B.; BEZERRA, G.P.; PONTES, L.B.; MARTINS, A.M.; GUIMARAES, J. A. Acute renal failure after massive honeybee stings. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, p. 45-50, 2003.

DE CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 833-839, 2004.

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, alpha 2 beta 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 206, n. 2, p. 570-576, 1995.

DE MORAIS, I. C.; TORRES, A. F.; PEREIRA, G. J.; PEREIRA, T. P.; PESSOA BEZERRA DE MENEZES, R. R.; MELLO, C. P.; COELHO JORGE, A. R.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. M. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, 2013.

DELLA-CASA, M. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; BUTERA, D.; CLISSA, P. B.; LOPES, D. S.; SERRANO, S. M.; PIMENTA, D. C.; MAGALHÃES, G. S.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 125-33, 2011.

DOS REIS, M. A.; COSTA, R. S.; COIMBRA, T. M.; TEIXEIRA, V. P. Acute renal failure in experimental envenomation with Africanized bee venom. **Renal Failure**, v. 20, n. 1, p. 39-51, 1998.

DOS REIS, M.A.; COSTA, R.S.; COIMBRA, T.M.; DANTAS, M.; GOMES, U.A. . Renal changes induced by envenomation with Africanized bee venom in female Wistar rats. **Kidney Blood Press. Res**, v.20, p. 271–277, 1997.

DOS-SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 34, p. 77-83, 1992.

DURÃO JR, M. S.; SANTOS, A. F. R.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Fatores de crescimento e canais iônicos: Há uma nova perspectiva na IRA? **J. Bras. Nefrol.** v. 18, n. 3, p. 289-294, 1996.

EL-KIK, C. Z.; FERNANDES, F. F.; TOMAZ, M. A.; GABAN, G. A.; FONSECA, T. F.; CALIL-ELIAS, S.; OLIVEIRA, S. D.; SILVA, C. L.; MARTINEZ, A. M.; MELO, P. A. Neutralization of *Apis mellifera* bee venom activities by suramin. **Toxicon**, v. 67 p. 55-62, 2013.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M.; NASCIMENTO, N. R.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S.; DE NORÕES, T. B.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. .Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47,p. 549–559, 2006.

FERREIRA, D. B.; COSTA, R. S.; OLIVEIRA, J. A. & MUCCILLO, G. An Infarct-like myocardial lesion experimentally induced in wistar rats with africanized bee venom. **Journal of Pathology**, n. 177, p. 95-102, 1995.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S. J.; GONG, Q.; JIANG, M. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon**, v. 34, p. 1301-1311, 1996.

FLETCHER, J. E.; JIANG,M. S. Possible mechanisms of action of snake venom cardiotoxins and bee venom melittin. **Toxicon**, v. 11, p. 669-695,1993.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200-209, 2009.

FRANCA, F. O.; BENVENUTI, L. A.; FAN, H. W.; DOS SANTOS, D. R.; HAIN, J. H.; PICCHI-MARTINS, F. R.; CARDOSO, J. L.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Severe and fatal mass attacks by ‘killer’ bees (Africanized honey bees-*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **Q. J. Med.** v. 87, p. 269–282, 1994.

FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**, p. 59-66, 2001.

GABRIEL, D. P.; RODRIGUES JR., A. G.; BARSANTE, R. C.; DOS SANTOS SILVA, V.; CARAMORI, J. T.; MARTIM, L. C.; BARRETI, P.; BALBI, A. L. .Severe acute renal failure after massive attack of Africanized bees. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 19, p. 2680, 2004.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The Structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical Biology and Drug Design**, v.72, n. 6, p. 455-482, 2008.

GAY, C. C.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O. C.; LEIVA, L. C. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. **Toxicon**, v. 53, n. 1, 53-59, 2009.

GMACHL, M.; KREIL, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 3569-3573, 1993.

GRISOTTO, L.S.; MENDES, G.E.; CASTRO, I. .Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 44-54, 2006.

GUIMARÃES, J. V.; COSTA, R. S.; MACHADO, B. H.; DOS REIS, M. A. Cardiovascular profile after intravenous injection of Africanized bee venom in awake rats. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. v. 46, n. 1, p. 55-58, 2004.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J.M.; FAN, H.W.; SILVERA, C.L.; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625-630, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., Cap.25 p. 291-378, 2006.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science**, v. 177, p. 314-322, 1972.

HALL, H. G. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. **Genetics**, v. 125, p. 611-621, 1990.

HALL, H. G; SMITH, D. R. Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 4548-4552, 1991.

HAN, H. J.; LEE, J.H.; PARK, S.H.; CHOI, H.J.; YANG, I.S.; MAR, W.C.; KANG, S.K.; LEE, H.J. Effect of Bee Venom and its melittin on apical transporters of renal proximal tubule cells. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 23, n. 6, p. 393-399, 2000.

HAN, H. J.; PARK, S. H.; LEE, J. H.; YOON, B. C.; PARK, K. M.; MAR, W. C.; LEE, H. J.; KANG, S. K. Involvement of oxidative stress in bee venom-induced inhibition of Na⁺/glucose cotransporter in renal proximal tubule cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 29, n. 7, p. 564-568, 2002.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 933-945, 2003.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1841-1846 2001.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HERMETTER, A.; LAKOWICZ, J. R. The aggregation state of mellitin in lipid bilayers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 8243-8248, 1986.

SARAVIA-OTTEN, P.; ROBLEDO, B.; ESCALANTE, T.; BONILLA, L.; RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; HERNÁNDEZ, R.; FLOCK, J. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; GASTALDELLO, S. Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. **Muscle Nerve**. v. 47, n. 2, p. 202-212, 2013.

HIGGBOTHAM, R. D.; KARNELA, S. The significance of mast cell response to bee venom. **Journal of Immunology**, v. 106, p. 233-241, 1970.

HUMBLET, Y.; SONNET, J.; VAN YPERSELE DE STRIHOUC. Bee stings and acute tubular necrosis. **Nephron**. v. 31, n. 2, p. 187-188, 1982.

JANG, M. H.; SHIN, M. C.; LIM, S.; HAN, S. M.; PARK, H. J.; SHIN, I.; LEE, J. S.; KIM, K. A.; KIM, E. H.; KIM, C. J. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. **J. Pharmacol.** v. 91, n. 2, p. 95-104, 2003.

JAQUES, L. B. Heparins – anionic polyelectrolyte drugs. **Pharmacologic Reviews**, v. 3, p. 99-166, 1980.

JENKINSON, D. H. Potassium channels – multiplicity and challenges. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p. 63-71, 2006.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, n. 7, p. 853-862, 1998.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, p. 7-12, 2006.

KING, T. P.; JIM, S. Y.; WITTKOWSKI, K. M. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoporan and phospholipase A1. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 131, p. 25-32, 2003.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KLOCEK, G. AND SEELIG, J. Melittin Interaction with Sulfated Cell Surface Sugars. **Biochemistry**, v. 47, n.9, p. 2841–2849, 2008.

KOENIG, A; NORGDARD-SUMNIGHT, K; LINHARDT, R; VARKI, A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low height molecular heparins as therapeutic agents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 877-889, 1998.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KOLLIPARA, P. S; KIM, J. H; WON, D; LEE, S. M; SUNG, H. C; CHANG, H. S; LEE, K. T; LEE, K. S; PARK, M. H; SONG, M. J; SONG, H. S; HONG, J. T. Co-culture with NK-92MI cells enhanced the anti-cancer effect of bee venom on NSCLC cells by inactivation of NF- κ B. **Arch. Pharm. Res.**, n. 37, p. 379-389, 2014.

LAD, P. J.; SHIER, W. T. Activation of microsomal guanylate cyclase by a cytotoxic polypeptide: melittin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 89, p. 315–321, 1979.

LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. **J. Mol. Biol.**, v. 285, p. 1363–1369, 1999.

LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; Oliveira, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Effect of crotafotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, p. 199-208, 2000.

LE DORZE, M.; LEGRAND, M.; PAYEN, D.; INCE, C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. **Curr Opin Crit Care**. v. 15, n.6 p. 503–508, 2009.

LEE, Y. J.; KANG, S. J.; KIM, B. M.; KIM, Y. J.; WOO, H. D.; CHUNG, H. W. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. **Chem. Biol. Interact.** v. 169, n. 3, p. 189-197, 2007.

LI, B.; GU, W.; ZHANG, C.; HUANG, X. Q.; HAN, K. Q.; LING, C. Q. Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. **Onkologie**, v. 29, p. 367–371, 2006.

LIEBERTHAL, W. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. **Kidney Int.**, v. 52, n. 4, p. 1102-1115, 1997.

LINARDI, A.; ROCHA E SILVA, T.A.; MIYABARA, E.H.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; CARDOSO, K.C.; BOER, P.A.; MORISCOT, A.S.; GONTIJO, J.A.; JOAZEIRO, P.P.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1810, n.9, p. 895-906, 2011.

LOMONTE, B. RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520–530, 2012.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A₂ from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta. Chim. Slov.**, v. 58, p. 647–659, 2011.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. .Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p.1359-1369, 1994.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K . J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. **Biochem. Pharmacol.** v. 75, n. 5, p. 1104-1114, 2008.

MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, D. Ability of a small, basic protein isolated from Russell's viper venom (*Daboia russelli russelli*) to induce renal tubular necrosis in mice. **Toxicon**, v.50, n. 2, p. 236-50, 2007.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; OLIVEIRA, C. Z.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2328-2339, 2007.

MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; SILVA PEREIRA, L. L.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; DA SILVA, S. L.; ANTUNES, L. M.; SOARES, A. M. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9-14, 2013.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. .Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p.1171–1181, 2005.

MARTINS, A. M.; SOUSA, F. C.; BARBOSA, P. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; APRÍGIO, C. C.; QUEIROZ, M. G.; GUARNIERI, M. C.; HAVT, A.; DE MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 595-599, 2005.

MAZZI, M. V.; MAGRO, A. J.; AMUI, S. F.; OLIVEIRA, C. Z.; TICLI, F. K.; STÁBELI, R. G.; FULY, A. L.; ROSA, J. C.; BRAZ, A. S.; FONTES, M .R.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 26, n. 1, p. 69-85, 2007.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STÁBELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2004.

MCGAHAN, M. C.; MATTHEWS, D. O.; BENTLEY, P. J. Effects of melittin on a model renal epithelium, the toad urinary bladder. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 855, n. 1, p. 63-67, 1986.

MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipases A2 isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon**, v. 24, n. 10, p. 1001-1008, 1986.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MEJÍA VÉLEZ, G. Acute renal failure due to multiple stings by Africanized bees. Report on 43 cases. **Nefrologia**, v. 30, n. 5, p. 531-538, 2010.

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, p. 285-291, 1993.

MELO, P. A. & SUAREZ-KURTZ, G. Release of creatine kinase from skeletal muscle by *Bothrops* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 21, p. 548-58-48, 1988a.

MELO, P. A. E OWNBY, C. L. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 653-669, 1996.

MELO, P. A. E SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 87-95, 1988.

MELO, P. A.; DO NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 595-603, 1994.

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 285-291, 1993.

MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and parabromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 199-215, 1999.

MELO, P. A.; OWNBY, L. Different sensitivity of fast- and muscles to some snake. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 653-669, 1996.

MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO, H. D.; FERNANDES, F. F.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STRAUCH, M. A.; DA FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N.; CALIL-ELIAS, S.; BUARQUE, C.D.; BRITO, F. V.; COSTA, P. R.; DA SILVA, A. J. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, p. 488-496, 2010.

MELO, P.A. & SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of south American marsupials. **Toxicon**, v. 26, p. 87-95, 1988b.

MILANI JR., R.; JORGE, M. T.; CAMPOS, F. P.; MATINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; SANO-MATINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDEZ, I. C.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 90, p. 323-334, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE & FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Segunda edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, p. 120, 2001.

MOON, D. O.; PARK, S. Y.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; PARK, C.; KO, W. S.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. **Int. Immunopharmacol.** v. 6, n. 12, p. 1796-1807, 2006.

MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 2, p. 1-10, 2008.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; LOMONTE, B.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C. A phospholipase A₂ from Bothrops asper snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE₂ biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 288-296, 2011.

MUÑOZ-ARIZPE, R.; VALENCIA-ESPINOZA, L.; VELÁSQUEZ-JONES, L.; ABARCA-FRANCO, C.; GAMBOA-MARRUFO, J.; VALENCIA-MAYORAL, P. Africanized bee stings and pathogenesis of acute renal failure. **Nephron**. v. 61, n. 4, p. 478, 1992.

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI, G.C. JR; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by Bothrops alternatus snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 5, p. 591-605, 2007.

NOLTE, S.; DE CASTRO DAMASIO, D.; BARÉA, A.C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; MELLO ZISCHLER, L.F.; STUELP-CAMPELO, P.M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; REIS, C.A.; MORENO-AMARAL, A.N. BJcuL, a lectin purified from Bothrops jararacussu venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v. 59, n.1, p. 81-85, 2012.

OKAMOTO, T.; ISODA, H.; KUBOTA, N.; TAKAHATA, K.; TAKAHASHI, T.; KISHI, T.; NAKAMURA, T.Y.; MUROMACHI, Y.; MATSUL, Y. ; GOSHIMA, K. Melittin Cardiotoxicity in Cultures Mouse Cardiac Myocytes and Its Correlation with Calcium Overload. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 133, p. 150-163, 1995.

OLIVEIRA, E. C.; PEDROSO, P. M.; MEIRELLES, A. E.; PESCADOR, C. A.; GOUVÊA, A. S.; DRIEMEIER, D. Pathological findings in dogs after multiple Africanized bee stings. **Toxicon**, v. 49, n. 8, 1214-1218, 2007.

OWNBY, C. L.; POWELL, J. R.; JIANG, M. S.; AND FLETCHER, J. E. Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v. 35, p. 67–80, 1997.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-445, 1999.

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

PINTO, M. A.; RUBINK, W. L.; PATTON, J. C.; COULSOM, R. N.; JOHNSTON, J. S. Africanization in the United States: replacement of European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. **Genetics**, v. 170, p. 1653-1665, 2005.

PUTZ, T.; RAMONER, R.; GANDER, H.; RAHM, A.; BARTSCH, G.; BERNARDO, K.; RAMSAY, S.; THURNHER, M. Bee venom secretory phospholipase A₂ and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate

signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. **Cancer Immunol Immunother.** v. 56, n. 5, p. 627-40, 2007.

QUÉBASSE, G.; KITAS, E. SEELIG, J. riDOM, a cell penetrating peptide. Interaction with DNA and heparan sulfate. **J. Phys. Chem. B**, v. 117, p. 10807–10817, 2013.

RAGHURAMAN, H., CHATTOPADHYAY, A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. **Bioscience Reports**, v. 27, p. 189-223, 2007.

RANGAN, CYRUS. Emergency Department Evaluation and Treatment for Children With Arthropod Envenomations: Immunologic and Toxicologic Considerations, **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, p. 104-107, 2007.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F.; BAMBIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 22, n. 3, p. 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; DE CAMPOS, V. A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRAO, M. L.; JORGE, M. T. Deaths caused by venomous snake in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from to 1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 44, p. 312-318, 1998.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous animals and their Venoms*. **Academic Press**, v. 2, p.345-384, 1971.

SÁNCHEZ, E. E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; PALOMAR, R.; LUCENA, S. E.; BASHIR, S.; SOTO, J. G.; PÉREZ, J. C. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Arch Toxicol.** v. 83, n. 3, 271-279, 2009.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SATO, H.; FEIX, J. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1758, p.1245–1256, 2006.

SCHNEIDER, S. S.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; SMITH, D. R. The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 351-376, 2003.

SCHUMACHER, M. J.; EGEN, N. B. Significance of Africanized bees for public health. A Review. **Arch Intern Med**; v. 155, p. 2038–2043, 1995.

SCHUMACHER, M. J.; SCHIMIDT, J. O.; EGEN, N. B.; DILLON, K. A. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis*

mellifera). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, n. 1, p. 59-65, 1992.

SERRA, H.; MONTEIRO, A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, n. 4, p.198-200, 1999.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 2005.

SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute kidney injury caused by bothrops snake venom. **Nephron Clin Pract.** v.119. n. 2, p. 131-136, 2011.

SIFUENTES, D. N.; EL-KIK, C. Z.; RICARDO, H. D.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; CALIL-ELIAS, S.; ARRUDA, E. Z.; SCHWARTZ, E. F.; MELO, P. A. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 28-36, 2008.

SILVA, L. F. C.; RAMOS, E. R.; AMBIEL, C.; CORREIA-DE-SÁ, P.; ALVES-DO-PRADO, W. Apamin reduces neuromuscular transmission by activating inhibitory muscarinic M2 receptors on motor nerve terminal. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, p. 239-243, 2010.

SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake evenomation. **Nat. Toxins**, v. 8, p. 271-277, 1999.

SMORENBURG, S. M.; NOORDEN, J.F.V. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 1, p. 93-105, 2001.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SON, D. J.; HA, S. J.; SONG, H. S.; LIM, Y.; YUN, Y. P.; LEE, J. W.; MOON, D. C.; PARK, Y. H.; PARK, B. S.; SONG, M. J.; HONG, J. T. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 317, p. 627-634, 2006.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys.** v. 384, n. 2, 341-350, 2000.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G.

P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F.; EL-KIK, C. Z.; MORAES, R. A.; CALIL-ELIAS, S.; SATURNINO-OLIVEIRA, J.; MARTINEZ, A. M.; OWNBY, C. L.; MELO, P. A. Increase of the cytotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom on mouse extensor digitorum longus and soleus by potassium channel blockers and by Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Toxicon**, v. 52, n. 4, p. 551-558, 2008.

TU, A. Overview of snake venom chemistry. **Natural Toxins II**, Plenum Press, New York, p. 37-62, 1996.

TU, A. T. **Handbook of Natural Toxins**. Insect poisons, allergens and other invertebrates venoms. Marcel Dekker, New York, v.2, p. 3-187, 1984.

TU, W. C.; WU, C. C.; HSIEH, H. L.; CHEN, C. Y.; HSU, S. L. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 318-329, 2008.

TUNGET, C. L.; CLARK, R. F. Invasion of the 'killer' bees. Separating fact from fiction. **Postgrad. Med.** v. 94, p. 92-102, 1993,

TYRRELL, D. J.; HORNE, A. P.; HOLME, K. R.; PREUSS, J. M.; PAGE, C. P. Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. **Advances in Pharmacology**, v. 46, p. 151-208, 1999.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-831, 2000.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K.; CAMAZINE, S. Mass envenomations by honey bees and wasps. **The Western Journal of Medicine**, v.170, n. 4, p. 223-227, 1999.

WANG, L; BROWN, J. R; VARKI, A; ESKO, J. D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 1, p. 127-136, 2002.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v.45, p. 951-967, 2005.

WILLINGER, C.C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W. In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. **Kidney Int.**, v. 47, n. 2, p. 518-28, 1995.

WINSTON, M. L. The Africanized 'killer' bee: biology and public health. **Q. J. Med.**, v. 87, p. 263-267, 1994.

YOUNG, E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 6, p. 743-752, 2008.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Some

Consideration About their Functional Characterization. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 908-912, 2009.