Ana Teresa Azevedo Sachetto

**Alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento
por *Bothrops jararaca*: modulação pelo antioxidante natural
rutina (quercetina-3-rutinosídeo)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2018

Ana Teresa Azevedo Sachetto

**Alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento
por *Bothrops jararaca*: modulação pelo antioxidante natural
rutina (quercetina-3-rutinosídeo)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sachetto, Ana Teresa Azevedo

Alterações hemostáticas e de estado redox no
envenenamento por Bothrops jararaca : modulação pelo
antioxidante natural rutina (quercetina-3-
rutinosídeo) / Ana Teresa Azevedo Sachetto. -- São
Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Descritores: 1. Bothrops jararaca 2. Estresse
oxidativo 3. Fator tissular 4. Hemostasia 5. Isomerase
de dissulfetos de proteínas 6. Venenos

USP/FM/DBD-065/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedicatória

A cada criança que encontra na Ciência um sonho e um caminho.

Às pessoas que, apesar de todos os desafios, persistem e continuam a fazer suas pesquisas com qualidade e ética.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Larami Santoro, agradeço acima de tudo pela oportunidade dada 3 anos atrás a uma recém-formada bióloga. Isso permitiu que eu me realizasse como pessoa e profissional, encontrando verdadeiramente o caminho que almejo. Agradeço pelo constante apoio e suporte nessa empreitada e por ser meu grande exemplo de comprometimento, conhecimento e dedicação. Sou grata por me fazer ir além do que eu pensava ser possível, por me instigar cada dia a ser melhor, tendo sempre em mente a responsabilidade e importância do que fazemos.

À Dra. Iara Laporta, sem a qual nada disso teria sido possível.

A Deus e minha família, meus pilares que me deram a base necessária para chegar até aqui e continuar. Ao tio Homero, tio Nestor e suas famílias por me acompanharem a cada fase.

À minha amada vó Lena, por sempre ter acreditado em mim. A Maria Eduarda e Rafael, meus maiores amores, que me iluminam a cada dia.

Aos meus queridos amigos que me apoiaram tanto nessa jornada, em especial, à família “Sou do Terceiro”. À Ana, Bruno, Carlos, Gisely, Igor, Luana, Marcella e Renato, os melhores amigos que alguém poderia ter.

Às pessoas que tanto me inspiraram ao longo da vida e que com suas palavras e atitudes expandiram meu mundo: Bp. Betão, Cristiane Celeguim, Gilberto Rodriguez, Leonardo Varela, Mário Sérgio Cortella, Patrícia Tavoroni e Paulo Afonso.

Aos alunos, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por todo o companheirismo durante esses anos. Por cada amizade formada dia após dia, marcada por alegrias, cafés, conversas, ajudas, sinceridades e carinho.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan e do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração por todo o auxílio prestado.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por me permitir desenvolver meu mestrado.

Ao Instituto Butantan, marco de uma infância que sempre se inclinou para a Ciência e que me proporcionou a oportunidade de realizar este projeto de pesquisa.

A CAPES e FAPESP pelo importante suporte financeiro.

“Ninguém é. Todos estamos-sendo. Você e eu nada ‘somos’. Estamos-sendo! Basta continuar. Você o pode.”

Paulo Afonso Caruso Ronca

Normalização

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Envenenamento ofídico	1
1.2 Hemostasia	2
1.2.1 TF e PDI.....	9
1.5 Estresse oxidativo/nitrosativo e envenenamentos ofídicos	24
1.6 Rutina	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais e doadores humanos	31
3.2 Soluções de veneno de <i>B. jararaca</i> e rutina	31
3.3 Reagentes e tampões	32
3.4 Ação da rutina <i>in vitro</i> nas atividades do veneno	34
3.4.1 Atividade de metaloproteinases (SVMP)	35
3.4.2 Atividade de serinaproteases (SVSP)	35

3.4.3	Atividade de L-aminoácido oxidases (LAAO)	36
3.4.4	Atividade de fosfolipases A ₂ (PLA ₂).....	36
3.4.5	Dose mínima coagulante (DMC)	37
3.4.6	Agregação plaquetária <i>ex vivo</i>	38
3.5	Grupos e procedimentos experimentais	39
3.6	Coleta de sangue e órgãos.....	40
3.7	Hemograma e contagem diferencial	42
3.8	Dosagem de ERO/ERN.....	42
3.9	Capacidade antioxidante total (TAC)	43
3.10	Dosagem de hemoglobina livre plasmática	44
3.11	Dosagem de fibrinogênio plasmática	45
3.12	Tempo de protrombina (TP)	46
3.13	Dosagem de TF plasmático	46
3.14	Atividade de TF plasmático	46
3.15	Expressão proteica do TF e PDI	47
3.16	Atividade de TF em tecidos	49
3.17	Análise estatística	50
4.	RESULTADOS	52
4.1	Ação da rotina <i>in vitro</i> nas atividades do veneno	52
4.2	Parâmetros de estado redox	54
4.3	Hemograma	56

4.3.1 Eritrócitos	56
4.3.2 Leucócitos	57
4.3.3 Plaquetas	58
4.4 Parâmetros da coagulação.....	59
4.5 Expressão proteica	61
4.6 Atividade de TF em tecidos.....	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático da cascata de coagulação.....	7
Figura 2 – Domínio extracelular do TF em uma membrana lipídica.....	10
Figura 3 – Representação da possível deciptação do TF pela PS e PDI no envenenamento.....	19
Figura 4 – Representação esquemática da indução da via intrínseca da apoptose pelas espécies reativas.....	23
Figura 5 – Estruturas moleculares da quercetina e quercetina-3-rutinosídeo, e representação esquemática da regulação alostérica da PDI.....	29
Figura 6 – Representação esquemática dos grupos experimentais, tempos de análises e coleta de amostras.....	40
Figura 7 – Agregação plaquetária de plaquetas de camundongos.....	54
Figura 8 – Níveis de espécies reativas e da capacidade antioxidante total.....	55
Figura 9 – Valores de contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e hemoglobina livre plasmática.....	57
Figura 10 – Contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos.....	58
Figura 11 – Contagem de plaquetas, e volume plaquetário médio.....	59
Figura 12 – Fibrinogênio plasmático, tempo de protrombina, atividade de TF, antígeno de TF e razão atividade/antígeno de TF.....	61
Figura 13 – Expressão proteica de TF, PDI, GAPDH e β -actina em tecidos....	63

Figura 14 – Atividade de TF em tecidos.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores da coagulação.....5

Tabela 2 – Ação da rotina *in vitro* em relação às atividades do BjV.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

“4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride”	AEBSF
“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”	DMEM
“N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride”	DL-BAPNA
2',7'-diclorofluoresceína	DCF
2',7'-diclorofluorescina diacetato	DCFH-DA
3,3',5,5'-tetrametilbenzidina	TMB
Ácido bicineconínico	BCA
Ácido épsilon aminocapróico	EACA
Ácido etileno diamino tetracético dissódico	Na ₂ EDTA
Capacidade antioxidante total	TAC
Difosfato de adenosina	ADP
Diidrocloreto de o-fenilenediamina	OPD
Dose mínima coagulante	DMC
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	SDS-PAGE
Espécies reativas de oxigênio/nitrogênio	ERO/ERN
Fator de necrose tumoral alfa	TNF- α
Fator de von Willebrand	vWF
Fator tissular	TF
Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina	NADPH
Fosfatidilserina	PS
Fosfolipases A ₂	PLA ₂
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GADPH
Glicoproteína Ib	GP-Ib

Glutationa reduzida	GSH
Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina	TAFI
Inibidor da via do fator tissular	TFPI
Inibidor do ativador de plasminogênio 1	PAI-1
Interleucina 6	IL-6
Isomerase de dissulfeto proteico	PDI
L-aminoácido oxidases	LAAO
Metaloproteinases do veneno de serpentes	SVMP
Produtos de degradação de fibrina	PDF
Prostaciclina	PGI ₂
Prostaglantina E ₁	PGE ₁
Retículo endoplasmático	RE
Serinaproteases do veneno de serpentes	SVSP
Soro anti-botrópico	SAB
Subcutâneo	s.c.
Tempo de protrombina	TP
Trifosfato de adenosina	ATP
Tromboxano A ₂	TXA ₂
Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	BjV
Volume plaquetário médio	VPM

RESUMO

Sachetto ATA. *Alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento por Bothrops jararaca*: modulação pelo antioxidante natural rutina (quercetina-3-rutinosídeo) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Os acidentes ofídicos são considerados um grande problema de saúde pública e no Estado de São Paulo a serpente *Bothrops jararaca* é o agente considerado mais relevante epidemiologicamente. O antiveneno é o único medicamento oficialmente aprovado para o tratamento de picadas de serpentes e, apesar de ser eficaz em diversos aspectos, mostra-se ineficaz em relação a complicações secundárias do envenenamento, como o estresse oxidativo/nitrosativo, caracterizado por um desequilíbrio no estado redox, que pode ser extremamente deletério aos pacientes. Portanto, vê-se necessária a busca por terapias complementares que possam combater o estresse oxidativo/nitrosativo. Ademais, distúrbios da hemostasia observados em envenenamentos pela *B. jararaca*, tais como a plaquetopenia, a hipofibrinogenemia e o aumento da atividade do fator tissular (TF) plasmático podem ter também como causa indireta o estresse oxidativo/nitrosativo, induzido por componentes do veneno de *B. jararaca* (BjV). Recentemente, demonstrou-se que a regulação da atividade biológica do TF, a proteína responsável pela iniciação da cascata de coagulação *in vivo*, pode ser controlada pela isomerase de dissulfeto proteico (PDI) e que a atividade da PDI é inibida *in vivo* pela quercetina-3-rutinosídeo (rutina), um antioxidante natural encontrado em plantas e alimentos. Considerando essas premissas, o presente trabalho objetivou investigar em camundongos injetados com o veneno de *B. jararaca* (BjV): (a) a ocorrência de distúrbios do estado redox; (b) as alterações hematológicas e hemostáticas (em plasma e tecidos) associadas ao desequilíbrio do estado redox; (c) a atividade da rutina como agente modulador sobre essas alterações. Para isso, camundongos Swiss (30-35 g) foram divididos em 4 grupos experimentais: *controle salina* (salina, controle negativo),

controle rutina (rutina+salina), *BjV+salina* (BjV+salina, controle positivo) e *BjV+rutina* (BjV+rutina, tratamento). Após 3, 6 e 24 h da administração dos tratamentos (via s.c.), foram coletados sangue e fragmentos de tecidos para posteriores análises. O envenenamento induziu um aumento de espécies reativas, diminuição da capacidade antioxidante total, alterações hematológicas (plaquetopenia, neutrofilia e diminuição de eritrócitos), distúrbios hemostáticos (hipofibrinogenemia, prolongamento do tempo de protrombina e aumento da atividade de TF no plasma), além de diminuir a expressão proteica de PDI no coração. A rutina não inibiu *in vitro* a atividade biológica de proteínas presentes no BjV (metaloproteinases, serinaproteases, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases) e nem mesmo a agregação plaquetária induzida pelo veneno. No entanto, a administração do veneno incubado com rutina foi capaz de reduzir os níveis de espécies reativas, impedir a queda de eritrócitos, normalizar os níveis de fibrinogênio e o tempo de protrombina e alterar a atividade de TF e expressão proteica de TF e PDI em tecidos. Desse modo, concluímos que a rutina foi capaz de favoravelmente modular importantes alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento por *B. jararaca*, o que indica seu grande potencial como agente terapêutico complementar em envenenamentos.

Descritores: *Bothrops jararaca*; estresse oxidativo; fator tissular; hemostasia; isomerase de dissulfetos de proteína; venenos.

ABSTRACT

Sachetto ATA. *Hemostatic and redox status alterations during Bothrops jararaca envenomation: modulation by the natural antioxidant rutin (quercetin-3-rutinoside)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Snakebites are a major public health issue and in São Paulo State, and *Bothrops jararaca* snakes are considered the most important agents epidemiologically. Antivenom is the only officially approved treatment for snakebites and although effective in many aspects, it is ineffective in combating secondary complications induced by envenomation, e.g. oxidative/nitrosative stress (ONS), which can be extremely deleterious to patients. Therefore, it is necessary to search for new complementary therapies that could attenuate ONS. Furthermore, the hemostatic disturbances in *B. jararaca* envenomation – characterized by the presence of thrombocytopenia, hypofibrinogenemia and increased tissue factor (TF) activity in plasma – could be indirectly evoked by ONS induced by *B. jararaca* venom (BjV) components. Recently, the biological activity of TF – the protein responsible for initiating the extrinsic pathway of the coagulation cascade – was demonstrated to be regulated by protein disulfide isomerase (PDI), which in turn, can be inhibited *in vivo* by quercetin-3-rutinoside (rutin), a natural antioxidant found in plants and diet. Based on that, the present study aimed to investigate in mice injected with BjV: (a) the alterations in redox status in plasma and tissues; (b) the hematological/hemostatic disturbances (in plasma and tissues) associated with the imbalance in redox status; (c) the activity of rutin as a modulatory agent on those alterations. Swiss mice (30-35 g) were divided in four experimental groups: *saline control* (saline, negative control), *rutin control* (rutin+saline), *BjV+saline* (BjV+saline, positive control) and *BjV+rutin* (BjV+rutin, treatment) and after 3, 6 and 24 h of the injection of treatments (s.c. route), blood and tissues were collected to further analyses. Envenomation induced an increase in reactive species, a decrease in total antioxidant capacity, hematological alterations (thrombocytopenia, neutrophilia and a decrease in red blood cell counts), hemostatic disturbances

(hypofibrinogenemia, prolonged prothrombin time and an increase in the TF activity in plasma), and a decrease in protein expression of PDI in the heart. *In vitro*, rutin failed to inhibit the biological activity of the main BjV enzymes (metalloproteinases, serine proteases, phospholipases A₂ and L-amino acid oxidases) and BjV-induced platelet aggregation. However, when the venom was incubated with rutin, there were reduced reactive species levels, less intense red blood cell drops, recovery of fibrinogen levels and prothrombin time, and alteration of TF activity and protein expression of TF and PDI in tissues. Therefore, we conclude that rutin favorably modulated important hemostatic and redox status alterations in *B. jararaca* envenomation, indicating its great potential as a complementary therapeutic agent for snakebites.

Descriptors: *Bothrops jararaca*; hemostasis; oxidative stress; protein disulfide-isomerase; tissue factor; venoms.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento ofídico

Os acidentes ofídicos são considerados um grande problema de saúde pública mundial pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo estimados 5,4 milhões de picadas de serpentes por ano, com até 2,7 milhões de envenenamentos (1). Deste modo, o envenenamento ofídico é considerado pela OMS como uma prioridade dentre as Doenças Tropicais Negligenciadas (1). No Brasil, o gênero *Bothrops* (família Viperidae) é responsável por aproximadamente 20000 acidentes ofídicos/ano (2). As serpentes *Bothrops* possuem hábitos noturnos e crepusculares em sua maioria e mostram-se agressivas se ameaçadas. Dentre deste gênero, existem as serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (jararaca) que podem ser encontradas principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil em áreas diversas, como as silvestres, agrícolas, suburbanas e urbanas. As *B. jararaca* são consideradas as serpentes mais importantes epidemiologicamente no Estado de São Paulo e são classificadas pela OMS na categoria 1 de serpentes venenosas que abrange as serpentes com alta relevância médica por causarem um grande número de acidentes em diversas localidades, levando a altos níveis de injúria, morbidade e mortalidade (2-4).

O veneno ofídico é uma complexa mistura de componentes, sendo composto de 90% a 95% de seu peso seco por proteínas (enzimas e não enzimas, tóxicas e atóxicas) e o restante por outras substâncias orgânicas e inorgânicas (carboidratos, lipídeos, nucleosídeos, cátions metálicos, aminas e aminoácidos livres) (5). Dentre os diversos componentes do veneno botrópico é

possível elencar alguns de grande importância, como as metaloproteinases (SVMP), serinaproteases (SVSP), fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas do tipo-C, e L-aminoácido oxidases (LAAO) (6-10). Essas proteínas são fundamentais para as atividades do veneno botrópico que induzem uma gama de manifestações clínicas (5, 11-13). Os distúrbios clínicos causados pelo envenenamento podem ser separados em dois grupos, considerando-se a proximidade ao local da picada: locais e sistêmicos. Os distúrbios locais são causados principalmente pela reação inflamatória local intensa, com edema, equimose e hemorragia pelos orifícios formados pelas presas da serpente. Já os distúrbios sistêmicos são mais variados, tais como aqueles associados à distúrbios hemostáticos, como: gengivorragia, hematúria, sangramentos diversos e nos casos mais graves acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos, insuficiência renal aguda e choque (13).

Assim, o envenenamento por serpentes *Bothrops* induz distúrbios importantes na hemostasia e a fim de compreender essas alterações, faz-se necessário apresentar os mecanismos fundamentais da hemostasia.

1.2 Hemostasia

A hemostasia é composta por uma série de processos fisiológicos complexos que tem por finalidade manter o sangue em um estado fluído e impedir a perda de sangue quando há lesão vascular. Para isso, após uma lesão, é necessário que ocorra a formação do coágulo e após endotélio ser reparado, o coágulo é desfeito (14). Os mecanismos hemostáticos incluem interações entre células sanguíneas, particularmente as plaquetas, endotélio vascular (e componentes subendoteliais), fatores da coagulação, fibrinólise,

inibidores plasmáticos e fluxo sanguíneo, e podem ser divididos em duas fases: a hemostasia primária e hemostasia secundária.

A hemostasia primária se inicia quando o endotélio vascular – que possui características antitrombóticas – é lesionado, o que acarreta o contato de componentes da matriz subendotelial – como colágeno, fator de von Willebrand (vWF), laminina, trombospondina e vitronectina – com as plaquetas. Essa interação permite que seja formado um agregado plaquetário e para isso são necessárias três etapas: adesão, secreção e agregação. Após a lesão vascular, as plaquetas aderem ao colágeno subendotelial com a mediação do vWF que se liga à glicoproteína Ib (GP-Ib) plaquetária, o que é seguido por uma mudança da forma da plaqueta, que emite pseudópodes, aumentando sua superfície de contato e formando um agregado plaquetário instável. As plaquetas ativadas secretam os grânulos plaquetários (grânulos α , corpos densos e lisossomos) e sintetizam prostanóides, como o tromboxano A_2 (TXA₂), que é um forte estímulo da agregação plaquetária (15-18). Após esse processo, ocorrem mecanismos de amplificação, como a ação do TXA₂ e do ADP (adenosina difosfato) que resultam no recrutamento e ativação de um número maior de plaquetas. A ativação plaquetária induz uma importante mudança conformacional no sítio de ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), que se torna mais exposto, permitindo a ligação de fibrinogênio, que forma pontes interplaquetárias, levando à formação de um agregado plaquetário estável. (15-17)

Durante a ativação plaquetária há também o aumento do Ca^{2+} intracelular, que induz a exposição da fosfatidilserina (PS), um fosfolípido de

membrana negativamente carregado, o que caracteriza uma superfície pró-coagulante ideal para a ligação de fatores da coagulação e o início da hemostasia secundária (16).

A hemostasia secundária se inicia com a ativação da cascata de coagulação que leva à formação de uma rede de fibrina insolúvel, essencial para manter a hemostasia após uma lesão vascular. A cascata de coagulação é composta por fatores da coagulação, listados na Tabela 1, que foram numerados de acordo com a ordem de sua descoberta. A maioria dos fatores da coagulação são sintetizados no fígado, com exceção do fator tissular (TF) – sintetizado no meio extracelular e em células sanguíneas – e o fator VIII – sintetizado por células endoteliais. Em situações fisiológicas, os fatores se encontram na sua forma inativa (zimogênios) e sob estímulo, são ativados. Ademais, os fatores II, VII, IX e X pertencem ao grupo de fatores dependentes de vitamina K, pois dependem da modificação pós-traducional em que há uma carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico do amino terminal. Essa modificação é essencial para a interação desses fatores com o cálcio e com sua ligação à fosfolipídeos negativamente carregados e desse modo, os complexos que incluem esses fatores dependem da ligação com membranas celulares (15, 19).

Tabela 1: Fatores da coagulação. Fonte: modificado de Laffan, *et al.*, 2011 (19).

Fator	Nome	Função	Biossíntese
I	Fibrinogênio	Formação de coágulo	Fígado
II	Protrombina	Ativação dos fatores I, V, VII, VIII, XI, XIII, proteína C e plaquetas	Fígado (dependente de vitamina K)
III	Fator tissular	Cofator do FVIIa, inicia a cascata de coagulação	Extravascular
V	Proacelerina	Cofator do FX (complexo protrombinase)	Fígado
VII	Proconvertina	Ativa fatores IX e X (complexo com TF)	Fígado (dependente de vitamina K)
VIII	Fator anti-hemofílico A	Cofator do FIX (complexo tenase)	Células endoteliais (ligado ao vWF)
IX	Fator de Christmas	Ativa FX (complexo tenase)	Fígado (dependente de vitamina K)
X	Fator de Stuart	Ativa FII (complexo protrombinase)	Fígado (dependente de vitamina K)
XI	--	Ativa FIX	Fígado
XII	Fator de Hageman	Ativa FXII, FXI e pré-caliceína	Fígado
XIII	Fator estabilizador de fibrina	Estabiliza a fibrina	Fígado

É preciso compreender que o modelo tradicional da cascata de coagulação foi descrito na década de 1960 (20, 21) e era dividido em uma via extrínseca, iniciada pelo complexo TF/FVIIa (FVII ativado) e uma via intrínseca, iniciada pelo FXII. Essas vias convergiam na via comum em que havia a formação do complexo protrombinase (FXa/FVa), levando à geração de trombina e formação da rede de fibrina. A via intrínseca era considerada a via mais importante para a geração de trombina, no entanto, esse modelo não era capaz de explicar os mecanismos hemostáticos que ocorriam *in vivo*.

Já o atual modelo da cascata de coagulação (15, 22-25) é baseado no controle por componentes celulares, é iniciado pelo TF e pode ser dividido em 3 fases principais: (1) a iniciação, que ocorre em superfícies que expressam TF e em que há a geração de pequenas quantidades de trombina, (2) a amplificação, que ocorre na superfície de plaquetas, em que a trombina já gerada ativa fatores da coagulação e plaquetas, induzindo um aumento da formação de trombina, (3) a propagação, que também ocorre na superfície plaquetária e que tem como finalidade a formação da rede de fibrina.

Nesse modelo, a iniciação da cascata de coagulação ocorre principalmente pela ativação do TF, como pode ser observado na Figura 1. O TF está presente em abundância no meio extravascular e também em células endoteliais e monócitos. Quando há uma lesão vascular ou ativação das células, o TF é exposto e ativado e assim, inicia a cascata de coagulação. O TF forma um complexo com o FVIIa que ativa o FX. O FXa por sua vez, forma o complexo protrombinase com o FVa, que cliva a protrombina, gerando pequenas quantidades de trombina. De forma mais importante, o complexo TF/FVIIa ativa o FIX, que se liga ao FVIIIa e ativam o FX com uma magnitude maior, o que gera maiores quantidades de trombina. É importante ressaltar que esses complexos somente são formados na presença de fosfolipídeos e Ca^{2+} já que possuem fatores da coagulação dependentes de vitamina K. A trombina (o mais potente agonista plaquetário) ativa os fatores da coagulação e as plaquetas, potencializando a coagulação. A trombina também é responsável por clivar o fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B, o que permite que os monômeros de fibrina se polimerizem, gerando uma rede de fibrina instável.

Posteriormente, com a ação do FXIIIa, a rede de fibrina se torna insolúvel e assim, dá estabilidade ao agregado plaquetário (22, 24, 25).

Além da via iniciada pelo TF, também há a via intrínseca, que se inicia em uma superfície com carga negativa (sistema de contato). Ao se ligar nessa superfície, o FXII passa por uma mudança conformacional e se auto-ativa, o que possibilita a formação de um complexo com a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular. Esse complexo é capaz de ativar o FXI, que posteriormente ativa o IX, estimulando a geração de trombina (14, 26, 27). No entanto, o sistema de contato possui outras ações fundamentais, como participação em respostas inflamatórias e imunes (interação com o sistema complemento); ativação do cininogênio de alto peso molecular e da pré-caliceína (em caliceína), o que leva a produção de cininas, como a bradicinina, que tem função pró-inflamatória e vasodilatadora (27, 28).

Figura 1: modelo esquemático da cascata de coagulação. Modificado de Mann, 2003 (22).

Assim como são necessários mecanismos que induzam a cascata de coagulação, para manter o equilíbrio da hemostasia, concomitante à ativação da coagulação, mecanismos anticoagulantes são ativados. Dentre os anticoagulantes, pode-se citar: a antitrombina, um inibidor de serinaproteases que é capaz de inibir a trombina e outros fatores da coagulação (29); o inibidor da via do fator tissular (TFPI), que é capaz de inibir o FXa e também o complexo TF/FVIIa (30); a proteína C ativada, que na presença de proteína S, é capaz de inativar por proteólise o FV e FVIII (29).

Além dos componentes anticoagulantes, o sistema fibrinolítico também é ativado concomitantemente à coagulação, tanto para limitar o tamanho do coágulo quanto para dissolvê-lo assim que o endotélio se recupera da lesão. A fibrinólise tem como base a degradação da rede de fibrina pela plasmina, originando produtos de degradação de fibrina (PDF). Para isso, é necessário que os ativadores de plasminogênio (t-PA e u-PA) hidrolisem o plasminogênio em plasmina, que por sua vez, cliva a fibrina, gerando D-dímeros (PDF). A plasmina também é capaz de degradar o fibrinogênio e para manter o equilíbrio hemostático, são necessários componentes que controlem a fibrinólise, como: o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI), que inibe irreversivelmente os ativadores de plasminogênio; o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que diminui a ativação do plasminogênio em plasmina; α_2 -antiplasmina e a α_2 -macroglobulina que são inibidoras da plasmina (15, 29, 31).

Como apresentado, a hemostasia é um sistema complexo, formado pela interação de diversos mecanismos e componentes. Dentre esses

componentes, o TF se destaca pelo seu papel essencial, já que é o responsável por iniciar a cascata de coagulação.

1.2.1 TF e PDI

O TF possui diversas atividades, tendo ação, por exemplo, na hemostasia, trombose, câncer, inflamação, angiogênese e embriogênese (32-34). O TF é uma glicoproteína transmembrana de 47kDa e é composto por três domínios: um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. O domínio extracelular (representado na Figura 2) é composto pelos resíduos 1-219, possui dois domínios fibronectina tipo III e representa a parte N-terminal do TF. Este domínio está envolvido principalmente na formação do complexo do TF com o FVIIa e na ativação das pró-enzimas FVII, FIX e FX. Já o domínio transmembrana (resíduos 220-242) tem o papel de ligar-se à membrana. Por fim, o domínio intracelular com os resíduos 243-263 está envolvido na transdução de sinal. O gene do TF humano está localizado no cromossomo 1, p21-22 e é composto por seis éxons. Em relação aos éxons, sabe-se que o éxon 1 contém um sítio de iniciação da tradução e pró-peptídeo, já os éxons 2 a 5 são compostos por sítios de tradução do domínio extracelular e o éxon 6 é responsável pelos domínios transmembrana e intracelular (32). Bogdanov *et al.* (35, 36) demonstraram que o TF pode sofrer alterações pós-transcricionais, como o *splicing* alternativo, sendo que as formas de TF de *splicing* alternativo (asTF) já foram demonstradas no TF humano e no TF de camundongo. Os asTF não apresentam o éxon 5 e há perda de alguns nucleotídeos do éxon 6, o que gera um *frame shift* que altera os códons do

mRNA e sua tradução. Essa forma de TF não possui o domínio transmembrana, possui diferenças no domínio intracelular quando comparada à forma completa do TF, é solúvel, circula no sangue, possui funções pró-coagulantes, e sua atividade vem sendo relacionada com a ocorrência de diversas situações patológicas (35-38).

Figura 2: domínio extracelular do TF em uma membrana lipídica. A figura indica pontes dissulfeto (Cys⁴⁹⁻⁵⁷ e Cys¹⁸⁶⁻²⁰⁹), sítios de glicosilação (resíduos Asn), resíduos importantes para interação com FVIIa (em verde), com FX (em rosa) e com membranas celulares (azul claro). Modificado de Krudysz-Amblo, et. al, 2011 (39).

O TF está presente em células como plaquetas, monócitos, macrófagos, células endoteliais e é liberado na corrente sanguínea quando essas células são estimuladas por mediadores inflamatórios. Além disso, pode estar presente no sangue como proteína solúvel e também em micropartículas (MPs) liberadas, por exemplo, por monócitos, e que podem ser incorporadas por diversas outras células. Em relação à presença de TF em plaquetas, isso pode

ocorrer através da síntese *de novo*, armazenamento em grânulos α e absorção de micropartículas (32-34, 40).

Em condições fisiológicas normais, o TF se encontra em sua forma encriptada. A encriptação do TF pode ser definida como um mecanismo de supressão pós-traducional da sua atividade pró-coagulante, caracterizada pelos resíduos de cisteína Cys¹⁸⁶ e Cys²⁰⁹ não estarem ligados covalentemente por ponte dissulfeto, i.e., estarem reduzidos. Porém, após estímulos pró-inflamatórios e de lesão, o TF sofre decriptação e as cisteínas Cys¹⁸⁶ e Cys²⁰⁹ sofrem uma modificação (oxidação), formando uma ponte dissulfeto, o que faz com que o TF assuma a forma ativa, pró-coagulante. A formação rápida do trombo após uma lesão é uma evidência da exposição ou ativação do TF decriptado no local da lesão, pois esta forma do TF tem afinidade muito maior pelos fatores de coagulação do que sua forma encriptada. O TF encriptado consegue se ligar ao FVIIa, porém com pouca afinidade e o equilíbrio do complexo leva horas para ser atingido, além de que não é capaz de clivar outros fatores; já a forma decriptada do TF forma o complexo TF/FVIIa rapidamente com total funcionalidade e atinge o equilíbrio em poucos minutos. Porém, essa ativação/decriptação do TF ainda não está completamente elucidada, embora tenha sido atribuída à exposição da fosfatidilserina (PS) e à ação da PDI (isomerase de dissulfeto proteico) (32-34, 40).

É preciso considerar que são necessários mecanismos para manter o TF em sua forma encriptada, para que possa ser ativado somente nos momentos corretos em que há dano vascular. Diversos mecanismos têm sido propostos e entre eles pode-se citar mudanças conformacionais e o sequestro de TF em microdomínios glicoproteicos ou ricos em colesterol, inibindo a ativação do FX

em algumas células. Outro mecanismo é a dimerização e oligomerização do TF em superfícies de células, o que possivelmente não permite a interação do TF com o FX. Além desses mecanismos, um ambiente neutro e anticoagulante seria capaz de manter o TF encriptado, o que pode ter relação com a importância da exposição da PS na superfície de células sanguíneas e vasculares para o início da coagulação e também com a necessidade de uma superfície fosfolipídica (40).

Assim como mecanismos de encriptação, são necessários mecanismos de decriptação do TF e sabe-se que a atividade pró-coagulante do TF aumenta quando há lesões celulares. Porém, estudos têm demonstrado que membranas celulares alteradas de alguma forma, mas com estrutura conservada, são superfícies melhores para a ativação do TF. Algumas mudanças nas células, como a elevação do cálcio intracitoplasmático, causam alterações na membrana celular que podem levar à exposição de PS e, conseqüentemente, induzir a decriptação do TF. Essa indução pode acontecer pela influência da PS em relação à estrutura quaternária do TF, pois fosfolípeos carregados negativamente (como a PS) interagem com os resíduos do domínio extracelular do TF que possuem ações pró-coagulantes (33, 40).

Outro mecanismo que tem sido relacionado à decriptação do TF são as suas mudanças pós-traducionais envolvendo uma das suas ligações dissulfeto. O TF possui um resíduo de cisteína acilada (Cys²⁴⁵) no C-terminal do domínio intracelular e quatro cisteínas no domínio extracelular (Cys⁴⁹, Cys⁵⁷, Cys¹⁸⁶ e Cys²⁰⁹) que podem formar as ligações dissulfeto Cys⁴⁹-Cys⁵⁷ e Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹. Alguns estudos mutagênicos demonstraram um papel funcional da ligação dissulfeto Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹ na atividade pró-coagulante do TF, o que não foi

observado para a ligação dissulfeto N-terminal Cys⁴⁹-Cys⁵⁷. Uma das formas de mudanças pós-traducionais é no estado redox das ligações dissulfetos em proteínas maduras, o que pode ocorrer com a ligação Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹ do TF. Sendo assim, ela pode ser considerada uma ligação dissulfeto alostérica, já que além de função estrutural, possui a capacidade de controlar a função proteica do TF por meio de uma mudança conformacional via reações de óxido-redução (32).

Um dos agentes envolvidos nessas mudanças do TF é a isomerase de dissulfeto proteico (PDI) (41-43). A PDI faz parte da família das tiol-isomerases proteicas (PDI), possui 57k Da, está envolvida na síntese de proteínas e possui os domínios a-b-b'-x-a' arranjados em forma de U (44, 45). Essa enzima pode realizar reações de óxido-redução de pontes dissulfeto que são catalisadas por seus domínios tioredoxina tipo a, que contêm um motivo CXXC. Além de suas ações como oxidoreductase, a PDI possui atividade chaperona por seus domínios de tioredoxina tipo b, responsáveis pela ligação a diferentes substratos (33, 34, 44-46). Já o *x-linker* é um peptídeo formado por 19 aminoácidos que conecta os domínios b' e a'. A PDI é encontrada em altos níveis no retículo endoplasmático (RE), onde permanece graças a mecanismos de retenção por meio do reconhecimento da sua sequência KDEL, por receptores específicos no RE. Apesar desses mecanismos, a PDI ainda possui a capacidade de escapar desse local por mecanismos ainda não completamente elucidados, sendo essa uma possível explicação para sua presença em superfícies celulares e grânulos secretórios (46).

A PDI pode ser encontrada e secretada por algumas células, como plaquetas, células endoteliais, leucócitos e hepatócitos. Em relação à presença

de PDI nas plaquetas, um estudo de Crescente *et al.* (47) demonstrou que em megacariócitos as tiol-isomerases (como a PDI) destinadas a permanecer nas plaquetas saem do retículo endoplasmático e se associam às membranas destinadas a formar o sistema tubular denso de plaquetas e superfície celular. Quando as plaquetas estão maduras, as tiol-isomerases se localizam perto da membrana plasmática e no sistema tubular denso e são mobilizadas para a superfície externa da plaqueta por meio de polimerização de actina e alterações na membrana e no citoesqueleto. Já em células endoteliais, a PDI é encontrada no RE, mas também está presente na superfície dessas células e é secretada quando há estímulos agonistas, podendo estar em grânulos secretórios (48). Um estudo realizado por Sharda *et al.* (49) utilizou um modelo experimental de síndrome de Hermansky-Pudlak para demonstrar que a PDI se encontra nos grânulos de células endoteliais (como os corpos de Weibel-Palade) e que a deficiência na secreção desses grânulos está relacionada com a inibição da formação de trombo mediada pela PDI.

Estudos demonstraram que a PDI é necessária para a ativação de diferentes isoformas da oxidase de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH oxidase, Nox) (50, 51) e também é capaz de regular a internalização de óxido nítrico (52). No meio extracelular ou quando se encontra na superfície das células, a PDI também é capaz de regular a ativação de integrinas de plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Por essa regulação de integrinas, a PDI se mostra importante na reorganização do citoesqueleto de células (51, 53), ativação e agregação plaquetárias (relacionada principalmente com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) (54) e no recrutamento de

leucócitos quando há uma situação inflamatória (dependente da integrina $\alpha_M\beta_2$) (55).

Além de sua ação em relação à decriptação do TF, a PDI também é capaz de interagir com outros componentes fundamentais da hemostasia. Já foi demonstrado que a PDI é capaz de: iniciar a dimerização do fator de von Willebrand (vWF) (56); regular a ativação da vitronectina – uma proteína importante para a formação do trombo após injúria vascular (57); regular a geração do fator V plaquetário e assim, regular a geração de trombina (58); e aumentar a atividade pró-coagulante do fator XI, que cliva mais rapidamente o fator IX (59). De fato, já foi demonstrado que a PDI é importante para a regulação da ligação de fatores da coagulação – como os fatores II, V, VII, FVIII e IX – à superfície plaquetária e para a amplificação da geração de trombina (60). Ademais, a PDI é necessária para a formação de trombo após lesão vascular, tanto para o acúmulo de plaquetas no local e quanto para a deposição de fibrina intravascular (33, 44-46). Outros membros da família das PDI – como a PDla3 (ERp57), PDla4 (ERp72) e PDla6 (ERp5) – vêm sendo estudados em relação às suas funções na hemostasia, e já foi demonstrado que interferem na ativação e agregação plaquetárias e na ligação das plaquetas ao fibrinogênio (49, 61-64).

1.3 Envenenamento botrópico e hemostasia

Como mencionado anteriormente, o veneno botrópico possui propriedades farmacológicas que induzem ações fisiopatológicas afetando principalmente a hemostasia e a inflamação, podendo ser relacionados com as três ações características dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. A

primeira é a ação coagulante, que consegue ativar fatores da cascata de coagulação e leva à formação *in vitro* de coágulos. Isso pode ocorrer por meio de (a) ativadores pró-coagulantes que ativam o fator X e/ou a protrombina, que assim geram trombina e que, por sua vez, hidrolisa o fibrinogênio em fibrina; por (b) ativadores trombina-símile que realizam a hidrólise de fibrinogênio em fibrina sem o intermédio da trombina. A segunda ação do veneno é a pró-inflamatória, que possui mecanismo complexo e pode ser induzida por diversos fatores, como a ação das fosfolipases, LAAO, hialuronidases e proteases presentes no veneno, que induzem a liberação de citocinas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio e também pela atividade das hemorraginas sobre as células endoteliais. A terceira ação característica do veneno botrópico é a hemorrágica, que contribui para o agravamento do quadro de envenenamento e é causada principalmente pelas hemorraginas (metaloproteinases) que possuem a capacidade de romper o endotélio vascular, degradar componentes da matriz celular e agir como desintegrinas, impedindo, por exemplo, a ligação do fibrinogênio com a integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$, o que leva à inibição da agregação plaquetária (5, 9, 10, 65-68).

Devido à alta diversidade de componentes no veneno podem ser observados em pacientes picados por *Bothrops* distúrbios hemostáticos que variam segundo a casuística, espécie e idade da serpente, quantidade de veneno inoculado e a gravidade da picada. A respeito das alterações laboratoriais da hemostasia induzidas pelo envenenamento, é frequente a coagulopatia, principalmente o prolongamento do tempo de coagulação sanguínea e até mesmo a incoagulabilidade sanguínea, que são atribuídos ao consumo de fibrinogênio. Apesar dos venenos botrópicos possuírem atividade

coagulante *in vitro*, quando são inoculados pelas vias subcutânea ou muscular *in vivo*, os venenos atingem a corrente sanguínea de forma gradual e contínua, o que induz o consumo de fibrinogênio e de outros fatores da coagulação. Assim, o fibrinogênio é hidrolisado em fibrina que rapidamente sofre fibrinólise, transformando-se em produtos de degradação de fibrina (PDF) (13, 69, 70). O consumo do fibrinogênio e dos fatores da coagulação V, VIII e X e protrombina é bem evidenciado em pacientes envenenados e pode ocorrer tanto pela ação das enzimas trombina-símbles ou pela formação de trombina intravascular (69-72). Em pacientes envenenados, o fator de Von Willebrand (vWF), PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio 1) e t-PA (ativador do plasminogênio tecidual) mostram-se elevados, o que demonstra a indução de células endoteliais a secretarem seu conteúdo granular (73, 74). Além dessa indução, o veneno também pode ser capaz de lesar as células endoteliais, o que é evidenciado pelo aumento do nível trombomodulina (75). Já a α_2 -antiplasmina, um inibidor natural da plasmina mostrou-se diminuída no plasma, indicando a produção intravascular de plasmina (70, 76).

No caso de envenenamentos por *Bothrops jararaca*, estudos demonstraram diversas alterações relacionadas com as plaquetas, como plaquetopenia, hipoagregação plaquetária e aumento de plaquetas ativadas na circulação sanguínea, o que pode favorecer o quadro de sangramentos. No envenenamento por *B. jararaca*, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da plaquetopenia não estão completamente elucidados. Yamashita *et al.*, 2014 (34) demonstraram que a plaquetopenia não está relacionada com a ação de SVMMP, SVSP e nem mesmo com a lesão local hemorrágica ocasionada pelo envenenamento. Apesar da plaquetopenia não

estar diretamente relacionada com o consumo de fibrinogênio, observou-se que os pacientes que apresentam simultaneamente afibrinogenemia e plaquetopenia possuíam maior propensão a desenvolver sangramentos sistêmicos (13, 34, 69, 73). Outra alteração hemostática causada pelo veneno de *B. jararaca* é a indução do aumento da atividade de fator tissular (TF), sendo atribuída a ação das SVMP e que resulta na ativação da cascata de coagulação e possivelmente agrava a hemorragia (16).

Considerando a influência do TF e PDI na hemostasia, Yamashita *et al.*, 2014 (34) realizaram um estudo experimental *in vivo* para analisar sua relação ao envenenamento pela serpente *B. jararaca*. Foi observado aumento da atividade de TF em tecidos e sangue de animais envenenados, cuja causa pode estar ligada à atividade inflamatória local das SVMP, liberação de citocinas e necrose/apoptose celular. Além disso, nesse estudo notou-se diminuição da expressão proteica de PDI e concomitante aumento de expressão de TF em amostras de pele de ratos envenenados. É preciso ressaltar que um fator preocupante no envenenamento é sua associação com a coagulação intravascular disseminada (CID) que se dá pela ativação da coagulação induzida por TF, diminuindo os níveis dos fatores de coagulação e plaquetas, causando trombose microvascular e elevando o risco de hemorragia. Desse modo, a indução da atividade de TF que ocorre no envenenamento poderia estar relacionada com a ação da PDI, como demonstrado na Figura 3.

Figura 3: representação da possível influência decriptação do TF pela PS e pela PDI no envenenamento, que possibilita a ligação do TF ativo (decriptado) ao FVIIa, iniciando a cascata de coagulação. Fonte: Modificado de Chen & Hogg, 2013 (40).

Além das alterações na hemostasia, já foi demonstrado que o envenenamento botrópico é capaz de induzir outros efeitos patológicos importantes, como o estresse oxidativo/nitrosativo, caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (77).

1.4 Estresse oxidativo/nitrosativo e hemostasia

A geração de radicais-livres e/ou espécies reativas não-radicaais no organismo faz parte de processos fisiológicos importantes, como a transferência de elétrons envolvida na geração de energia (ATP), ativação de genes, participação em mecanismos de defesa e inflamação, geração de eicosanoides, entre outros. Essa geração de espécies reativas ocorre principalmente nas mitocôndrias (através da cadeia transportadora de elétrons), membranas celulares e citoplasma, sendo favorecida pela interação

com íons de cobre e ferro, que são potentes catalisadores de reações de óxido-redução. As espécies reativas possuem existência independente e podem ser radicais-livres (possuem um ou mais elétrons desemparelhados, cuja representação gráfica é um ponto sobrescrito) ou não radicais (não possuem elétrons desemparelhados). As espécies reativas provocam ou são resultado de reações de óxido-redução, ou seja, ou oxidam-se por doar um elétron ou reduzem-se por recebê-lo (78-81). São denominados ERO as espécies reativas de oxigênio, como superóxido ($O_2^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($HO^{\bullet}$) e oxigênio singlete (O_2). Já as ERN, são as espécies reativas de nitrogênio, como peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico ($\bullet NO$), dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (81, 82).

Para manter o equilíbrio homeostático, é fundamental a existência de um sistema fisiológico que regule a geração de ERO e ERN: o sistema antioxidante. Antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou impedir a oxidação através de diversos mecanismos: (a) doação de átomos de hidrogênio ou elétrons às espécies reativas, transformando os radicais-livres em substâncias estáveis; (b) quelação de íons metálicos, impedindo que algumas reações químicas ocorram; (c) remoção de ERO e ERN do organismo; (d) reparo de lesões realizadas por essas espécies; (e) estímulo da produção e atividade de antioxidantes enzimáticos (7, 12, 78, 80-82). O sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático caracteriza-se pela participação de enzimas na prevenção ou impedimento da formação de ERO e ERN. Entre essas enzimas, pode-se destacar a superóxido dismutase, que é capaz de dismutar o superóxido; a catalase, que é responsável pela hidrólise do peróxido de hidrogênio; e a

glutathione peroxidase e a glutathione reductase, que na presença de glutathione reduzida (GSH) catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos. Já o sistema não enzimático é composto por uma diversa gama de substâncias, de origem endógena ou exógena (dietética), como algumas vitaminas, cobre, zinco, entre outros (78, 80).

No entanto, as ERO e ERN podem ser extremamente deletérias quando são produzidas em quantidades excessivas ou quando há deficiências no sistema antioxidante, gerando o estresse oxidativo/nitrosativo. Ele ocorre quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidantes no organismo, gerando um aumento na produção de espécies reativas e/ou uma redução do potencial do sistema antioxidante de remover essas espécies. A oxidação excessiva é prejudicial ao organismo, podendo fazer com que biomoléculas percam suas funções biológicas, entrem em desequilíbrio homeostático e desencadeiem diversos eventos patológicos (78, 83).

Dentre as células altamente suscetíveis a influências do estresse oxidativo/nitrosativo, pode-se destacar as plaquetas, que são células sanguíneas anucleadas derivadas de megacariócitos e fundamentais para a hemostasia. Os distúrbios induzidos pelo estresse oxidativo/nitrosativo em plaquetas podem levar à plaquetopenia e alterações na adesão e agregação das mesmas (84). De fato, o estresse oxidativo/nitrosativo em doenças cardiovasculares (85), leptospirose (86), malária (87) e dengue (88) tem sido relacionado com o desenvolvimento de plaquetopenia nessas enfermidades.

Ademais, o aumento da produção de espécies reativas está relacionado à indução de apoptose pela via intrínseca em plaquetas (Figura 4). A apoptose é caracterizada como morte celular programada e é induzida por

estímulos pró-apoptóticos, como ligação de moléculas a receptores de membrana, danos ao DNA, diminuição na quantidade de nutrientes, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, entre outros. O aumento desses estímulos pró-apoptóticos leva à apoptose precoce de plaquetas, diminuindo seu tempo de vida útil, o que resulta na plaquetopenia (89, 90). Assim, o estresse oxidativo/nitrosativo induz a geração de ERO/ERN que causam danos às mitocôndrias, que são potencializados por altos níveis de Ca^{2+} intracitoplasmático. Isso altera a permeabilidade da membrana das mitocôndrias, por meio da formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, levando à despolarização do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que é o passo inicial da via intrínseca/mitocondrial da apoptose. O desequilíbrio entre proteínas pró- e anti-apoptóticas leva à formação de poros na membrana mitocondrial, o que permite que o citocromo c seja liberado para o citoplasma, onde se liga ao fator de ativação de proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1) e ao ATP. Esse complexo ativa a caspase-9 que por sua vez ativa a enzima caspase-3, dando início a cascata proteolítica que é uma via importante de sinalização apoptótica, levando à rápida morte celular (85, 89).

Figura 4: representação esquemática da indução da via intrínseca da apoptose pela espécies reativas. Modificado de Grivicich, Regner, Rocha, 2007 (89).

Além dos mecanismos de indução da via intrínseca da apoptose, as ERO, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são capazes de induzir a exposição da PS que normalmente se encontra voltada para dentro da célula. A PS é um importante marcador de superfície, que permite um maior reconhecimento da célula ativada por fagócitos, levando à fagocitose. A exposição de PS, negativamente carregada, em micropartículas torna-as pró-inflamatórias e sua superfície adequada para a deposição de fibrina e formação de trombo, influenciando a hemostasia (79, 84).

Além da plaquetopenia, o estresse oxidativo/nitrosativo também induz agregação e adesão plaquetárias. Espécies reativas de oxigênio danificam as células endoteliais e isso se intensifica em situações pró-inflamatórias, em que leucócitos ativados liberam ainda mais ERO. O dano às células endoteliais permite o contato das plaquetas com componentes da matriz subendotelial,

normalmente o colágeno, induzindo a adesão das plaquetas e posteriormente, sua agregação (84).

1.5 Estresse oxidativo/nitrosativo e envenenamentos ofídicos

A presença de estresse oxidativo/nitrosativo também já foi demonstrada em envenenamentos por diversas serpentes, como *Bothrops jararaca* (77), *Bothrops jararacussu* (91), *Vipera russelli* (92), *Naja haje* (93), *Echis pyramidum* (94), *Echis carinatus* (95) e *Crotalus durissus terrificus* (96-98). Os venenos dessas serpentes são capazes de aumentar a produção de ERO e ERN *in vitro* e também em modelos de envenenamento e pacientes picados. Essa indução de espécies reativas pode estar relacionada principalmente com a lesão tecidual e inflamação que se seguem ao envenenamento. Assim, durante a estase sanguínea e consequente hipóxia induzida pelos componentes pró-hemostáticos do veneno, inicialmente pode haver uma diminuição acentuada nos níveis de produção de ERO, sendo aumentados abruptamente quando há reperfusão tecidual. Outro mecanismo que tenta explicar o aumento de espécies reativas no envenenamento é a produção de mediadores pró-inflamatórios durante o processo de inflamação, que induzem a expressão de NADPH oxidase em leucócitos ativados, o que induz a produção de mais espécies reativas. Além disso, algumas PLA₂ presentes em venenos ofídicos demonstraram induzir a geração de espécies reativas, principalmente por meio de peroxidação lipídica, que destrói as membranas celulares e ocasiona a liberação do ácido araquidônico. Isso dá início à cascata desse ácido, levando à formação de eicosanoides, além de altos níveis de ERO e ERN (80, 99-101). Outro componente do veneno ofídico que tem relação com o

estresse oxidativo são as LAAO que são flavoenzimas oxidoreduases que catalisam a desaminação de L-aminoácidos. Durante esta reação, um L-aminoácido sofre oxidação pela LAAO e concomitantemente o cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo) da LAAO é reduzido em FADH_2 e depois é reoxidado para completar a catálise, liberando H_2O_2 . O H_2O_2 gerado nesta reação de óxido-redução é capaz de interferir em membranas de células plasmáticas, em proteínas e em ácidos nucleicos e essas ações podem estar relacionadas com os processos de necrose e apoptose induzidos pelo envenenamento (9, 10). Ademais, espécies reativas como o H_2O_2 são capazes de induzir a decriptação do TF (102, 103), até mesmo por aumentarem a exposição da PS, o que poderia contribuir para o agravamento dos distúrbios hemostáticos do envenenamento.

Outro fator que pode induzir o estresse oxidativo/nitrosativo no envenenamento é a PDI, pois como já mencionado anteriormente, a PDI possui a capacidade de controlar a síntese de espécies reativas, como o óxido nítrico e as ERO. Quando a PDI se encontra na superfície das células possui a capacidade de transferir óxido nítrico do ambiente extracelular para o citoplasma das células e, posteriormente, pode transferir o óxido nítrico para o citoplasma de plaquetas, regulando sua ativação. Além disso, a PDI secretada durante a formação do trombo pode acoplar ou remover óxido nítrico em proteínas específicas. A PDI também é capaz de regular a NADPH oxidase, o que pode alterar a produção de ERO (45, 50).

Com o intuito de analisar o estresse oxidativo/nitrosativo em envenenamentos, Strapazzon *et al.* (77, 91) realizaram um estudo em que foram demonstrados os danos associados ao estresse oxidativo/nitrosativo e

os níveis das defesas antioxidantes em pacientes que foram picados por *B. jararaca* e *B. jararacussu* e tratados com soro anti-botrópico. As coletas de sangue para os ensaios foram realizadas durante a internação do paciente e também uma semana e um mês após o acidente. Uma das análises do estudo foi sobre as atividades das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, que apresentou atividade diminuída em eritrócitos, sendo possível atribuir esta mudança às ações proteolítica, hemorrágica e de indução do TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) do veneno. Já a catalase e a glutathione peroxidase mostraram-se com maior atividade, o que pode estar relacionado com o aumento da geração de peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos durante o envenenamento por serem substratos destas enzimas. Para que a glutathione peroxidase possa exercer sua função antioxidante, utiliza e oxida a glutathione reduzida que então passa para sua forma oxidada. Congruentemente, os níveis da atividade da glutathione peroxidase estavam aumentados em pacientes envenenados e os níveis quantitativos da GSH diminuídos. Além disso, os níveis de glutathione reductase estavam altos, o que pode ser relacionado com uma tentativa de normalizar os níveis de GSH através da conversão de da glutathione na forma oxidada para a forma reduzida. Outra alteração observada foi a inibição da glutathione S-transferase causada pelo envenenamento, enzima importante como antioxidante e nas respostas inflamatória e imune (77). Além das defesas enzimáticas, foi analisada a vitamina E, que é um potente antioxidante e sua quantidade estava diminuída no plasma dos pacientes que sofreram o acidente botrópico. Estes dados indicam um maior consumo dessa vitamina para o combate à peroxidação lipídica de membranas, visto que a vitamina E protege os ácidos graxos poli-

insaturados das ERO. Os níveis de TNF- α e IL-6 (interleucina 6) também estavam maiores nos pacientes do que no grupo controle. Essas citocinas possuem ação pró-inflamatória e podem causar lesão hepática e aumento de espécies reativas de oxigênio. Um dado de muita importância obtido neste estudo foi que não houve mudança significativa de nenhum dos parâmetros analisados desde o início da internação do paciente até um mês após o acidente, o que mostra a continuidade do estresse oxidativo/nitrosativo e dos danos causados por ele (91).

Devido à alta relevância do estresse oxidativo/nitrosativo, a busca por compostos terapêuticos é constante, e dentre a diversa gama de substâncias antioxidantes, destacam-se os antioxidantes naturais.

1.6 Rutina

O início comprovado do uso de plantas em favor da saúde data de mais de 60 mil anos pelos neandertais e tem um histórico antigo em diversas civilizações, como os indígenas, sumérios, egípcios, chineses, indianos, gregos, entre outros. No entanto, foi somente em 1978, por meio da Declaração de Alma-Ata, que a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu oficialmente o uso de plantas medicinais e fitoterápicos para profilaxia, cura, tratamento e diagnóstico (104). Dentre a gama de antioxidantes encontrados em alimentos pode-se citar a quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$), um flavonóide insolúvel em água com estrutura molecular 3,5,7,3'-4'-pentahidroxil flavona, como pode ser observado na Figura 5a. Ela está presente em alimentos em sua forma glicosilada, o que aumenta a eficiência de sua absorção (Figura 5b). Pode ser encontrada em diversas plantas e alimentos, como frutas (maçã, uva

e morango), vegetais (cebola, vagem, brócolis e couve), grãos, nozes, sementes, especiarias, flores, chá preto e vinho tinto (105).

A quercetina possui amplo potencial terapêutico como antioxidante, anticarcinogênico e protetor dos sistemas renal, cardiovascular e hepático. Dentre as ações antioxidantes da quercetina está a quelação de íons metálicos, como o ferro, e assim ela impede que reações de óxido-redução ocorram. Ela também promove sequestro de radicais-livres, como a hidroxila, o superóxido e o óxido nítrico e a inibição de reações e sistemas de geração e controle de ERO e ERN (105-109). Em relação a esta última ação é necessário enfatizar a inibição das reações de peroxidação lipídica, que são caracterizadas pela ação de radicais-livres em ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, destruindo sua estrutura e podendo levar à morte celular. Além disso, como anteriormente mencionado, a peroxidação lipídica é fundamental para a ativação e desenvolvimento da cascata do ácido araquidônico (via da ciclooxygenase e lipoxigenase), gerando altos níveis de espécies reativas e produtos, como PGI_2 e TXA_2 , que podem interferir na hemostasia (105, 106).

Outra ação importante da quercetina é a inibição da PDI (34, 45, 46). Estudos demonstraram que dentre os diversos tipos de quercetina (Figura 5a), as únicas que são capazes de inibir a PDI são as quercetinas com glicosídeos na posição 3' do anel C, como a quercetina-3-rutinosídeo (rutina), demonstrada na Figura 5b (44, 110). Foi demonstrado que a rutina se liga específica e reversivelmente ao domínio b' da PDI e que isso faz com que a PDI fique mais compacta e menos flexível, diminuindo sua atividade de redutase e interferindo na formação de trombo em modelo *in vivo*, tanto em relação ao acúmulo de

plaquetas quanto à deposição de fibrina no local de injúria (111). Um estudo recente demonstrou que a conformação da PDI está relacionada não somente com o ambiente redox em que a PDI se apresenta, mas também com a ligação de substratos no bolso hidrofóbico do domínio b', que resulta em um deslocamento do *x-linker* e um aumento da atividade catalítica dos domínios a e a', como demonstrado na Figura 5c (112).

Figura 5: estrutura molecular da quercetina **(a)**; estrutura molecular da quercetina-3-rutinosídeo **(b)**; representação esquemática da regulação alostérica da PDI pela ligação de substratos **(c)**. Fontes: Cai *et al.* (113); Furie & Flaumenhaft (46) e Bekendam *et al.* (112), modificado.

2. OBJETIVOS

Considerando os efeitos deletérios que o envenenamento pela serpente *B. jararaca* causa em pacientes e que até o presente momento, o antiveneno é o único medicamento oficialmente aprovado para o tratamento de envenenamentos por serpentes e mostra-se ineficaz contra o desequilíbrio do estado redox, uma complicação secundária do envenenamento que persiste mesmo com a administração da soroterapia (11, 92, 114), vê-se necessária a busca por terapias complementares. Desse modo, o presente trabalho objetivou investigar em um modelo experimental, camundongos injetados com o veneno de *B. jararaca*: (a) a ocorrência de distúrbios do estado redox; (b) as alterações hematológicas e hemostáticas (em plasma e tecidos) correlacionadas ao desequilíbrio do estado redox; (c) a atividade da rutina como agente modulador sobre essas alterações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e doadores humanos

Foram utilizados camundongos Swiss machos (30-35 g) obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais com esses animais passaram pela análise do Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo n°. 4388061115, aprovado em 18 de novembro de 2015) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo n°. 188/15, aprovado em 23/03/2016). Já os procedimentos dependentes de doadores humanos foram aprovados pela Plataforma Brasil (CAAE: 51368615.5.0000.0065) e todos os doadores estavam cientes do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Soluções de veneno de *B. jararaca* e rotina

Foi obtido do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan um *pool* de veneno liofilizado de indivíduos adultos de *B. jararaca*, mantido na temperatura de -20°C. O veneno foi dissolvido no momento de uso em solução salina estéril na concentração de 0,8 mg/mL. Foi empregada a dose de 1,6 mg/kg p.v. de veneno de *B. jararaca*, que em testes prévios se mostrou capaz de causar plaquetopenia e hipofibrinogenemia em camundongos semelhantes às aquelas descritas para ratos (34, 115) e seres humanos (116).

A rotina (Sigma, código R5143) foi diluída no momento do uso em propilenoglicol (117) na concentração de 7,2 mg/mL e a dose de 14,4 mg/kg p.v. foi empregada, baseada em testes prévios que demonstraram sua efetividade em modular parâmetros hemostáticos e de estado redox.

3.3 Reagentes e tampões

Rutina, trombina, ácido etileno diamino tetracético dissódico (Na_2EDTA), “EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets”, teofilina, adenosina, dipiridamol, Triton X-100, deoxicolato de sódio, imipramina, 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), neocuproína, L-glutathiona reduzida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), colágeno azocoll, “ $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride” (DL-BAPNA), diidrocloreto de *o*-fenilenediamina (OPD), “4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride” (AEBSF), “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão de hemoglobina foi obtido da Bioclin (Brasil). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico. Os anticorpos anti- β -actina (A5316), anti-GADPH (G8795) e anti-PDla1 (P7372) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O anti-TF (ab151748) foi obtido da Abcam (EUA). Os anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (A11001) e anti-IgG de coelho conjugado com AlexaFluor 647 (A21245) foram obtidos da Thermo Fisher Scientific (EUA).

Para a realização dos ensaios, foram utilizados os seguintes tampões e soluções:

- Tampão de Tyrode (atividade de SVMP): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH_2PO_4 3.0 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5.6 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2 mM, pH 7.4;
- Solução de Tris (atividade de SVSP): Tris-HCl 0,05 M, CaCl_2 20 mM, pH= 8,2;

- Tampão borax (atividade de LAAO): borax 50 mM, pH= 8,5, sendo que o pH deve ser acertado com HCl 1M a 37°C;
- Solução de uso (atividade de LAAO): solução de OPD 2 mM (em tampão borax), solução de peroxidase 0,81 U/mL (peroxidase, Sigma cód. P6782, em tampão borax), solução de L-leucina 5 mM (em H₂O);
- Solução reativa (atividade de PLA₂): lecitina de soja 0,265%, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, triton X-100 0,44% e vermelho de fenol 100 µM, pH 7,6;
- Anticoagulante ACD (agregação plaquetária): citrato trissódico 85 mM, ácido cítrico 71,4 mM, dextrose 111 mM, pH 6,2;
- Solução de lavagem (agregação plaquetária): 6 partes de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, cod. D1152, pH 7,4) e uma parte de ACD;
- Anticoagulante CTAD (coleta de sangue): teofilina 15 mM, adenosina 3,7 mM, dipiridamol 0,2 mM em anticoagulante ACD;
- Tampão RIPA (coleta de tecidos para expressão proteica): Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sódio 1%; SDS 0,1%; pH 7,5, contendo um coquetel de inibidores proteicos (AEBSF 2 mM, aprotinina 0,2 µM, bestatina 130 µM, E-64 14 µM, leupeptina 1 µM, pepstatina 10 µM e fosforamidon 1 µM, Sigma, cod. S8830) e Na₂-EDTA 2 mM;
- Tampão HBSA (coleta de tecidos para atividade e TF): tampão HBS (tampão HEPES-NaOH 20mM, pH 7,5; NaCl 100mM; NaN₃ 0,02%) contendo 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA);

- Solução de Locke (dosagem de ERO): NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, NaHCO₃ 3,6 mM, HEPES 5,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM e glicose 10 mM, pH 7,4;
- Mistura reativa 1 (capacidade antioxidante total): 1 parte da solução de cloreto de cobre (II) 10 mM; 1 parte de solução de neocuproína (Sigma, cód. 72090) 7,5 mM; 1 parte da solução de acetato de amônio 1 M, pH 7,0;
- Mistura reativa 2 (capacidade antioxidante total): 2 partes de água destilada e 1 parte de solução de acetato de amônio;
- Solução reativa (dosagem de hemoglobina livre plasmática): 3 partes da solução de TMB (Sigma, cód. T0565, 0,111% em ácido acético) e 1 parte de solução de H₂O₂ 0,332%;

3.4 Ação da rutina *in vitro* nas atividades do veneno

Para avaliar se a rutina possui alguma ação direta nas enzimas que compõem o veneno, foram realizados ensaios da atividade biológica de quatro classes de proteínas presentes no BjV: SVMP, SVSP, LAAO e PLA₂. Para os ensaios de SVMP, SVSP e LAAO foi utilizada uma diluição seriada de BjV nas concentrações 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL e uma concentração constante de rutina de 0,25 mg/mL. Já para o ensaio de PLA₂, o BjV foi diluído nas concentrações de 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125 mg/mL e a rutina foi utilizada na concentração de 1,25 mg/mL. As soluções de BjV e rutina foram diluídas em tampões específicos para cada ensaio contendo 2,5-5% de propilenoglicol.

3.4.1 Atividade de metaloproteinases (SVMP)

A atividade das SVMP foi analisada realizando um ensaio quantitativo de atividade colagenolítica, utilizando o colágeno azocoll como substrato (118). Para as diluições de BjV e rutina foi utilizado o tampão de Tyrode. Como controle positivo, o BjV (1 mg/mL) foi incubado com Na₂EDTA 13 mM, um inibidor de SVMP, por 1 h a 37°C. Foram incubados 600 µL de cada amostra (BjV, BjV+rutina, BjV + Na₂EDTA) ou dos brancos de reação (somente tampão de Tyrode ou rutina 0,25 mg/mL) com 150 µL de solução de azocoll (5 mg/mL, em tampão de Tyrode) por uma hora a 37°C, com homogeneização em vortex a cada 5 minutos. A reação foi finalizada colocando as soluções no gelo e então, foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 g. Foram retirados 175 µL de sobrenadante de cada solução e pipetados em cada poço de placa de 96 poços para a leitura de absorbância a 540 nm, em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade enzimática pela rutina.

3.4.2 Atividade de serinaproteases (SVSP)

Para esse ensaio, foi utilizado o substrato sintético DL-BAPNA (Sigma, cod. B4875), que ao sofrer hidrólise por enzimas proteolíticas como as SVSP, libera o cromóforo *p*-nitroanilina que é detectável colorimetricamente (119). Para isso, as amostras foram diluídas em solução de Tris nas concentrações já descritas anteriormente. Como branco de reação, foi utilizada a solução de Tris e também foi realizado o branco rutina (0,25 mg/mL). Como controle positivo, o BjV (1 mg/mL) foi incubado com AEBSF 8 mM (Sigma, cod. A8456), um inibidor de SVSP, por 1 h a 37°C. Foram pipetados em placa de 96 poços (em

triplicata) 30 μ L de cada amostra/branco e 140 μ L da mistura reativa [1 parte de BAPNA 100 mM em DMSO + 99 partes de solução de Tris]. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C e foram adicionados 50 μ L de ácido acético 30% para parar a reação. A leitura de absorbância foi feita a 405 nm e resultados expressos como porcentagem de inibição da atividade enzimática pela rutina.

3.4.3 Atividade de L-aminoácido oxidases (LAAO)

As LAAO podem co-generar H_2O_2 ao desaminar aminoácidos em sistemas biológicos. Nesse ensaio, as LAAO desaminam a L-leucina e geram H_2O_2 , o que é detectável por sondas sensíveis como o OPD (118, 120). Para a curva padrão, foi realizada uma diluição seriada de H_2O_2 nas concentrações: 51,2; 25,6; 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 mM em tampão borax. Em microplacas de 96 poços foram pipetados em triplicata 10 μ L/ poço de amostra (BjV+salina ou BjV+rutina), brancos de reação (tampão borax ou rutina) ou das soluções da curva padrão. A seguir, foram adicionados 90 μ L/ poço de solução de uso. Após incubar a placa por 60 minutos a 37°C, foram adicionados 50 μ L de H_2SO_4 2M e a leitura de absorbância foi realizada a 492 nm. Os resultados foram analisados com base na curva padrão utilizando o software CurveExpert (versão 1.4) e expressos como porcentagem de inibição da atividade enzimática pela rutina.

3.4.4 Atividade de fosfolipases A_2 (PLA₂)

A atividade das PLA₂ foi avaliada pela sua capacidade de clivar fosfolipídeos como a lecitina de soja (118), liberando ácidos graxos. Para isso,

foram adicionados 2 μ L das amostras (BjV, BjV+rutina) ou branco de reação (salina ou rutina), seguidos de 200 μ L da solução reativa, em triplicata. As soluções foram pipetadas em placa de 96 poços pré-aquecida a 37°C e devido à rapidez da reação, a leitura foi realizada uma coluna por vez e a cinética da absorbância foi monitorada a 558 nm a cada 15 s durante 5 minutos. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade enzimática pela rutina.

3.4.5 Dose mínima coagulante (DMC)

A fim de testar a inibição da atividade coagulante do BjV pela rutina, foi empregada a técnica da dose mínima coagulante (34), definida como a concentração de veneno capaz de coagular o plasma em 60 s a 37°C. Para isso, foi coletado sangue humano ou de camundongos em citrato de sódio (9 partes de sangue e 1 parte de citrato de sódio 3,2%) e após a centrifugação (para o sangue de camundongo, 2500 g, 15 min à 4 °C; para sangue humano, 2500 g, 15 min à T.A.), o plasma foi coletado. O BjV (1 mg/mL) foi adicionado à rutina (9 mg/mL), Na₂EDTA 13 mM ou AEBSF 8 mM, incubado a 37°C por 30 min (BjV e BjV+rutina) ou 1 h (BjV + Na₂EDTA e BjV + AEBSF) e então foi realizada uma diluição seriada na razão de 2. Foram pipetados 100 μ L de plasma em tubos de coagulômetro e aquecidos por 2 min a 37°C. Após a adição de 25 μ L de cada diluição das soluções de veneno, foi determinado o tempo de coagulação do plasma, até o tempo de 300 s. Foram realizadas duplicatas para cada diluição do veneno e o valor da DMC foi determinado baseado na concentração de veneno capaz de coagular o plasma em 60 s, utilizando o software CurveExpert (versão 1.4).

3.4.6 Agregação plaquetária *ex vivo*

Para verificar se a rutina poderia inibir a agregação plaquetária induzida pelo veneno, o sangue de camundongo (6 partes) foi coletado em 1 parte anticoagulante ACD e mantido a 37°C. O sangue (2 partes) foi diluído em 1 parte da solução de lavagem. A mistura foi colocada gentilmente (200 µL a cada vez) sobre 1 mL de Histopaque 1077 (Sigma, cod. 10771) e centrifugada a 700 g por 30 min à T.A. (desaceleração zero). A camada superior contendo plaquetas e leucócitos (400 µL) foi retirada e a ela foram adicionados 1,6 mL de DMEM/ACD e 0,5 µL de PGE₁ (prostaglantina E₁, 200 µg/mL). Após a centrifugação a 9500 g por 90 s T.A., o sobrenadante foi descartado e o pellet de plaquetas foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM/ACD (contendo PGE₁). A centrifugação e ressuspensão de plaquetas foram realizadas mais duas vezes, sendo que para a última ressuspensão foi utilizado somente DMEM. A contagem plaquetária foi realizada em contador hematológico automático BC-2800 Vet (Mindray, China) e as plaquetas foram ajustadas para 5×10^5 plaquetas/µL. Para a agregação plaquetária, soluções de BjV (1 mg/mL) e BjV+rutina (BjV 1 mg/mL e rutina 9 mg/mL) foram incubadas a 37°C por 30 min. Foram adicionadas alíquotas de 400 µL das plaquetas lavadas em agregômetro pré-aquecido a 37°C e as plaquetas foram estimuladas com trombina, BjV ou BjV+rutina. Em outra série de experimentos, 400 µL de plaquetas lavadas foram pré incubadas com rutina por 15 min a 37°C e então estimuladas com trombina ou BjV. As concentrações finais utilizadas nos ensaios foram: trombina 0,1 U/mL, BjV 24,4 µg/mL e rutina 219,6 µg/mL (360 µM). A agregação plaquetária foi analisada por 5 min a 37°C sob agitação constante (1000 rpm) em agregômetro Chono-log (EUA). Os resultados (em duplicatas)

foram analisados utilizando o software Aggro/Link (versão 4.75), utilizando a calibração do DMEM como 100% de transmitância de agregação. Os resultados foram expressos como porcentagem de agregação plaquetária.

3.5 Grupos e procedimentos experimentais

Para investigar a ação modulatória da rutina sobre as alterações hemostáticas e de estado redox, os seguintes grupos experimentais foram analisados (n=6 animais/grupo/tempo de análise). Os grupos e procedimentos experimentais estão demonstrados na Figura 6. Os animais receberam por via subcutânea (região dorsal):

- Controle salina (controle negativo): 4,0 mL/kg p.v. de salina;
- Controle rutina: 4,0 mL/kg p.v. de uma solução de 1 parte de rutina (7,2 mg/mL) e 1 parte de salina;
- BjV+salina (controle positivo): 4,0 mL/kg p.v. de uma solução de 1 parte de veneno (0,8 mg/mL) e 1 parte de salina;
- BjV+rutina (tratamento): 4,0 mL/kg p.v. de uma solução de 1 parte de veneno (0,8 mg/mL) e 1 parte de rutina (7,2 mg/mL);

No momento de coleta de amostras (3, 6 ou 24 h), os animais foram anestesiados pela administração de isoflurano (indução e manutenção a 2,5%) por via inalatória. Após a coleta, os animais foram submetidos a uma superdose de anestésico e para certificarmos da eutanásia dos animais, o deslocamento cervical foi realizado.

Figura 6: Representação esquemática dos grupos experimentais, tempos de análises e coleta de amostras.

3.6 Coleta de sangue e órgãos

Após 3, 6 ou 24 h da administração das soluções, foi realizada a coleta de sangue e tecido dos animais. O sangue foi coletado por punção da veia cava caudal de camundongos anestesiados com seringas plásticas. Para o hemograma e esfregaços sanguíneos foi utilizada uma alíquota de sangue de 100 μ L em tubo plástico contendo 1,0 μ L de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 269 mM e 1,0 μ L de soro antibotrópico (doado pelo Instituto Butantan, lote 1305077). Para obtenção de plasma em CTAD (para os ensaios de estado redox, fibrinogênio e hemoglobina plasmática), uma alíquota de sangue (6 volumes) foi adicionada a

tubo plástico contendo 1 volume de CTAD e soro anti-botrópico (SAB) (na proporção de 1:100 do volume total), e posteriormente, essas alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 2500 g a 4°C. Para obtenção do plasma em Na₂-EDTA (para o ensaio de ELISA de TF), uma alíquota de sangue (99 volumes) foi adicionada a tubo plástico contendo 1 volume de Na₂-EDTA 269 mM e soro anti-botrópico (SAB) (1:100) e centrifugada por 15 min a 1000 g a 4°C no máximo em 30 min após a coleta do sangue. Já o plasma citratado utilizado para avaliar a atividade de TF em plasma foi obtido coletando uma alíquota de sangue (9 volumes) em tubo plástico contendo 1 volume de citrato de sódio 3,2% e soro anti-botrópico (SAB) (1:100), que foi centrifugado por 15 min a 1500 g à temperatura ambiente (T.A.). Após as centrifugações, as alíquotas do plasma foram armazenadas a -80°C para posteriores análises.

Para os ensaios de expressão proteica, fragmentos de pele (ao redor do local de inoculação das soluções, dimensão: 0,5-0,75 cm²) (34) e tecidos (fígado, pulmão e coração, 50-100 mg) foram imersos em 500 µL de tampão de homogeneização RIPA. Para os ensaios de atividade de TF, foram coletados fragmentos dos mesmos órgãos (50-100 mg) e imersos em 500 µL de tampão HBSA (121). Os fragmentos de tecidos foram triturados com auxílio do homogeneizador FastPrep-24 (modelo #6004-500, MP Biomedicals) por 60 segundos a 6,5 m/s, congelados/ descongelados (gelo seco/ banho-maria a 37°C) por 3 vezes e centrifugados a 13.000 g por 10 min. Os sobrenadantes obtidos foram congelados a -80°C para posteriores análises.

3.7 Hemograma e contagem diferencial

O sangue coletado com Na₂-EDTA foi utilizado para contagem total das células sanguíneas. As análises foram realizadas em contador hematológico automático BC-2800 Vet (Mindray, China). A análise morfológica de eritrócitos e a contagem diferencial de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com corante pancromático. Para a coloração dos esfregaços, 15 gotas do corante Rosenfeld foram adicionadas priorizando o esfregaço por 1 min e 30 s, seguido pela adição de 30 gotas de tampão fosfato (NaH₂PO₄ 32 mM, Na₂HPO₄ 28 mM, pH 6,8) e após 10 min as lâminas foram lavadas com água e armazenadas até a contagem diferencial.

3.8 Dosagem de ERO

A dosagem dos níveis de ERO tem como base o método de Driver *et al.* (122) e Keston & Brand (123). Cada amostra de plasma (5 µL) foi incubada com 135 µL da mistura reativa [199 partes de solução de Locke e 1 parte de solução de DCFH-DA 5 µM (Sigma, cód. D6883) por 30 minutos a 37°C. Como branco reativo **1**, 5 µL de salina foram incubados com 135 µL de mistura reativa; como branco reativo **2**, 5 µL de salina foram incubados com 135 µL de solução de Locke. Para os brancos das amostras, cada amostra (5 µL) foi incubada somente com 135 µL de solução de Locke. Para a curva padrão, a solução estoque de DCF 100 µM (Sigma, cód. 410217) foi preparada em etanol 100% e mantida sob refrigeração. A curva padrão de DCF foi diluída em solução de Locke no momento de uso nas seguintes concentrações: 0,097; 0,195; 0,391; 0,781; 1,56; 3,125 e 6,250 nM, sendo que foram adicionados 140 µL/ poço; como branco da curva foi somente utilizada a solução de Locke. O

ensaio foi realizado em triplicata em placas pretas (Costar, EUA) de 96 poços. A leitura foi feita por fluorescência, com excitação a 480 nm e emissão a 530 nm em leitor de placas SpectraMax M2 e com software SoftMax Pro 5.4.1.

Para a análise, a média de leitura do branco reativo **1** foi descontada das leituras das amostras e a média da leitura do branco reativo **2** foi descontada das leituras dos brancos de amostras. A quantificação de DCF foi baseada nas leituras ópticas do espectrofluorímetro, dadas em valores de RFU (unidades relativas de fluorescência) e na curva padrão de DCF por meio do software CurveExpert (versão 1.4). Os resultados foram expressos em equivalentes de DCF (nM). Para a normalização dos resultados, para eliminar a variação de leitura entre ensaios, foi utilizado um *pool* de plasma normal de camundongos como amostra referência, dosada todas as vezes que as reações foram realizadas. Essa amostra foi adicionada em todas as placas e ao final da análise, seu valor em nM de DCF foi considerado como 1 unidade arbitrária, os valores das demais amostras foram normalizados a partir desse valor e expressos como unidades arbitrárias.

3.9 Capacidade antioxidante total (TAC)

A capacidade antioxidante das amostras de plasma foi avaliada por ensaio colorimétrico (124). Para isso, foram preparadas a mistura reativa **1** e a mistura reativa **2** e mantidos em banho-seco a 37°C. Alíquotas de plasma (5 µL, diluição 1:20) foram adicionadas em cada poço da placa, seguidas por 95 µL de água destilada e 150 µL da mistura reativa **1**. Os brancos de amostras consistiram de 5 µL de cada plasma, 95 µL de água destilada e 150 µL da mistura reativa **2**. Para o branco reativo **1** foram adicionados 100 µL de salina e

150 μL da mistura reativa **2**, já para o branco reativo **2** foram adicionados 100 μL de salina e 150 μL da mistura reativa **2**. Como padrão para a curva, foi preparada uma solução de L-glutathione reduzida (GSH, Sigma G4251) 1mM, pH 7,0, alíquotada e mantida a -20°C até a hora do uso para evitar perda de atividade. Essa solução estoque de GSH foi diluída em água destilada para a obtenção das concentrações da curva padrão de GSH: 12,5; 25; 50; 100; 150 e 300 μM ; como branco da curva foi utilizada água destilada. Posteriormente, 100 μL de cada concentração foram adicionados e 150 μL da mistura reativa **1**. O ensaio foi realizado em duplicatas e a cinética da absorbância foi monitorada a 450 nm a cada minuto durante 30 minutos.

Para a obtenção das absorbâncias finais das amostras, a média de cada branco de amostra (com o valor do branco reativo **2** já descontado) foi subtraída da respectiva amostra (com o valor do branco reativo **1** já descontado). Esses valores foram analisados no software CurveExpert (versão 1.4) utilizando a curva padrão de GSH e multiplicados por 20 (fator de diluição da amostra) para obter o valor em capacidade antioxidante, expresso em μM de GSH. A normalização dos resultados foi realizada como descrito acima para o método DCF.

3.10 Dosagem de hemoglobina livre plasmática

A dosagem de hemoglobina livre plasmática foi realizada pelo método peroxidase (125, 126) em microplacas. A solução padrão de hemoglobina foi diluída nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 $\mu\text{g/mL}$ e como branco de reação foi utilizada a solução salina. Foram adicionados a cada poço (em triplicata) 1 μL das amostras/soluções da curva padrão/branco e 200 μL da

solução reativa. Após agitação por 30 s e incubação por 15 min, a leitura foi realizada a 655 nm e os resultados foram normalizados como para o método de DCF.

3.11 Dosagem de fibrinogênio plasmática

A dosagem de fibrinogênio foi realizada por técnica colorimétrica (127). Em tubos Falcon foram adicionados 0,50 g de vidro moído (correspondente a 0,5 mL), 5 mL de NaCl 0,85%, 25 µL de EACA 10%, 50 µL de plasma e 34,5 µL de trombina a 720 NIH-U. Os tubos foram homogeneizados, mantidos em banho-maria a 37°C por 15 minutos para a formação de coágulos, centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e a seguir o coágulo foi espremido e o sobrenadante será descartado. Após adicionar 5 mL de salina, a centrifugação e o descarte de sobrenadante foram realizados por mais duas vezes. Foi acrescentado 1,0 mL de NaOH 10%, os tubos foram cobertos com papel alumínio e aquecidos em banho-maria fervente por 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foram acrescentado 7,0 mL de água destilada, 3,0 mL de Na₂CO₃ 20% e 1,0 mL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu (Sigma, cód. F9252). O branco foi preparado adicionando 1,0 mL de NaOH 10%, 7,0 mL de água destilada, 3,0 mL de Na₂CO₃ 20% e 1,0 mL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu a um tubo. Os tubos foram homogeneizados e após 30 minutos, a leitura da absorbância das amostras foi realizada a 650 nm em espectrofotômetro (Utrospec 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer). O resultado da leitura foi analisado com base na curva padrão de tirosina (0,125 a 0,0125 mg), utilizando o software CurveExpert (versão 1.4), e esse valor foi multiplicado pelo fator de correção do volume de plasma (50 µL de plasma:

fator de correção 23400) para se obter a concentração de fibrinogênio plasmático (mg/dL).

3.12 Tempo de protrombina (TP)

Para analisar mais profundamente as alterações na via extrínseca da coagulação, foi determinado o tempo de protrombina na fase aguda do envenenamento (3 h), utilizando um kit comercial (DiaPlastin, DiaMed). Para isso, foram adicionados 100 µL de plasma citratado (diluído 1:10 em salina, em duplicatas) em cubas pré-aquecidas em coagulômetro e incubados por 2 min a 37°C. Após a adição de 200 µL de tromboplastina cálcica pré-aquecida, o tempo de coagulação foi marcado (até no máximo 300 s).

3.13 Dosagem de TF plasmático

Foi realizada dosagem de antígeno de TF plasmático utilizando um kit comercial de ELISA (mouse-TF ELISA kit, Elabscience, EUA), com a modificação de que a cada poço foram adicionados 75 µL de amostra/solução da curva padrão/branco (em duplicata)

3.14 Atividade de TF plasmático

A atividade de TF também foi avaliada no plasma utilizando o kit Actichrome (Sekisui, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Os resultados desse ensaio e de antígeno de TF também foram utilizados para obter a razão de atividade de TF/antígeno de TF.

3.15 Expressão proteica do TF e PDI

Foram analisadas as expressões proteicas de TF, PDI e proteínas endógenas (GAPDH e β -actina) em amostras dos homogenatos de fígado, pulmão, coração e pele 24 h após o envenenamento.

Inicialmente, as proteínas das amostras foram dosadas pela técnica BCA (128) para que quantidades iguais de proteínas fossem submetidas à eletroforese. Para isso, 10 μ L das amostras (diluídas 1:50 em salina) ou do branco da reação (tampão RIPA diluído 1:50 em salina) ou das soluções da curva padrão foram adicionados em cada poço da placa (em triplicata), seguidos pela adição de 200 μ L da mistura reativa (1 parte da solução de sulfato de cobre(II) + 50 partes da solução de ácido bicinconínico, Sigma, cód. B9643 e C2284). Após a homogeneização por 30 s, a placa foi aquecida em micro-ondas por 25 s na presença de erlenmeyer contendo 200 mL de água destilada e incubada por 5 min a 37°C. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm e os resultados foram analisados com base na curva padrão de albumina bovina sérica (Sigma) nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL.

Após a dosagem de proteína, as amostras foram reduzidas com 2-mercaptoetanol e submetidas à SDS-PAGE em géis de 10% (100 μ g de amostra/poço para fígado, coração e pele, e 150 μ g de amostra/poço para pulmão) (129). A corrida de eletroforese foi realizada a 15mA até a saída das amostras do gel de aplicação de amostra e a 20-30 mA até o término da corrida. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (poro de 0,2 μ m) foi realizada em cuba de transferência semi-seca (BioRad) a 15 V por 2 h, sendo que os papéis filtro e membrana foram umedecidos previamente

por 20 minutos em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,037%). Após o término da transferência, as membranas foram levadas a uma estufa a 37°C para fixação das proteínas, umedecidas com água destilada e coradas com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,2%, ácido tricloroacético 0,18 M, ácido sulfossalicílico 3%) para verificação da eficácia da transferência (34).

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio [leite desnatado 0,5% em solução de lavagem (PBS pH 7,4; Tween 20 0,5%)] por 1 h à T.A., sob agitação constante e posteriormente lavadas com solução de lavagem. As membranas foram incubadas por 2 h à T.A. sob agitação constante com os seguintes anticorpos primários na concentração de 1:5000: anti-TF, monoclonal (47 kDa, Abcam, ab151748), anti-PDI policlonal (57 kDa, Sigma, P7372), anti-GAPDH (37 kDa, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Sigma, G8795) e anti- β -actina (42 kDa, Sigma, A5316). Subsequentemente, as membranas foram lavadas com solução de lavagem por 3 vezes de 5 minutos e incubadas por 1 h à T.A. sob agitação constante com os anticorpos secundários na concentração de 1:5000: anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (Invitrogen, A11001) e anti-IgG de coelho conjugado com AlexaFluor 647 (Invitrogen, A21245). As expressões de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e de β -actina foram utilizadas como controles internos. Todas as análises das amostras foram realizadas em triplicata. Para a detecção da fluorescência das bandas, obtenção de imagens e análise densitométrica foi utilizado o sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad) e o software ImageLab (versão 5.2.1, Bio-Rad). A quantificação relativa das bandas foi analisada dividindo-se o volume das bandas pelo volume total da

respectiva amostra na membrana corada com Ponceau S. A normalização foi feita com base nos valores de quantificação das bandas da amostra referência (*pool* normal de sobrenadante de tecido, sempre analisada concomitantemente com as outras amostras), cujas intensidades foram consideradas como 1 unidade arbitrária (34, 130).

3.16 Atividade de TF em tecidos

A atividade do TF foi mensurada realizando um ensaio de coagulação do plasma, visto que o TF é o responsável por iniciar a via extrínseca da cascata de coagulação (121). Para isso, foi realizada a dosagem de proteína das amostras coletadas com tampão HBSA (sobrenadantes dos lisados) utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA) para normalização das quantidades de proteínas nas amostras usadas no ensaio, como descrito previamente (128). Para preparar a solução de tromboplastina, fonte de TF para a curva padrão, 2 mL de tromboplastina de cérebro de coelho cálcica (DiaPlastin, código 300120) foi centrifugada a 17000 *g* por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de tampão HBSA. Esse processo foi repetido mais uma vez e a tromboplastina foi armazenada sob refrigeração e também teve seu conteúdo proteico dosado por BCA. Para preparar a curva padrão de TF, foi realizada uma diluição seriada na razão de 2 da tromboplastina (121; 60,5; 30,25; 15,12; 7,56; 3,78; 1,89; 0,94; 0,47; 0,236 µg/mL). O ensaio foi realizado em coagulômetro Start4 (Stago, França) em cubas pré-aquecidas a 37°C, em duplicatas. Foram adicionados 50 µL das amostras ou dos padrões de tromboplastina e 50 µL de pool de plasma normal citratado (contendo 90% de plasma humano e 10% de plasma de ratos). Após

uma incubação de 2 minutos a 37°C, foram adicionados 50 µL de CaCl₂ 25 mM pré-aquecido a 37°C e o tempo de coagulação foi medido. A atividade de TF foi analisada no software CurveExpert (versão 1.4) com base na curva padrão de tromboplastina. Os resultados foram normalizados com base nos valores dos *pools* normais de sobrenadantes de tecidos, analisados em cada experimento e considerados como 1 unidade arbitrária.

Os resultados da atividade e expressão proteica de TF foram utilizados para obter a razão de atividade de TF/expressão proteica de TF.

3.17 Análise estatística

A distribuição normal e homocedasticidade dos resultados foram analisadas no programa estatístico STATATM versão 10. Sempre que necessário, os dados foram transformados por algoritmos desse programa para obter distribuição normal e homocedasticidade. Para análise estatística posterior dos resultados foram utilizados os softwares SPSS (versão 22) ou SigmaPlot (versão 12.0). Para observar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos, foram empregados os testes análise de variância (ANOVA) de duas vias (para resultados de hemograma, hemoglobina plasmática, espécies reativas, TAC, fibrinogênio) ou ANOVA de uma via (para resultados de antígeno de TF plasmático, atividade/antígeno de TF plasmático, expressão proteica e atividade de TF em tecidos), seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni para comparação de médias. Para os demais resultados, foi empregado o teste Kruskal-Wallis e para a comparação de médias foi realizado o teste *post-hoc* Student-Newman (para resultados de TP e atividade de TF plasmático) ou teste

de Dunn (para atividade/expressão proteica de TF). As correlações foram realizadas utilizando o teste de Pearson com o software SigmaPlot (versão 12.0). Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$ e os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (e.p.m.).

4. RESULTADOS

4.1 Ação da rutina *in vitro* nas atividades do veneno

Ao avaliar a ação *in vitro* da rutina em relação às atividades do BjV foi verificado que a rutina interfere minimamente na atividade catalítica de SVMP, SVSP, PLA₂ e LAAO e na atividade coagulante do veneno (representado pelos valores de DMC), como demonstrado na Tabela 2. A incubação do BjV com Na₂EDTA (inibidor de SVMP) inibiu 86% da atividade colagenolítica das SVMP, inibiu completamente a capacidade coagulante do BjV em plasma de camundongo e diminuiu 3 vezes a capacidade coagulante do veneno em plasma humano (DMC: 137,8 µg/mL). Já a incubação do BjV com AEBSF (inibidor de SVSP) inibiu 98,4% a atividade amidolítica das SVSP, além de reduzir a capacidade coagulante do veneno em cerca de 2 vezes, tanto para o plasma de camundongo quanto o plasma humano (DMC do plasma de camundongo: 642,3 µg/mL; DMC do plasma humano: 102,5 µg/mL).

Tabela 2: Ação da rutina *in vitro* em relação às atividades do BjV.

Ensaio	Tratamentos (atividade relativa)	
	BjV+salina	BjV+rutina
Ensaio enzimático		
Atividade de SVMP (%)	100,0	93,8
Atividade de SVSP (%)	100,0	98,1
Atividade de PLA ₂ (%)	100,0	98,3
Atividade de LAAO (%)	100,0	89,7
Ensaio coagulante		
DMC em plasma humano (µg/mL)	44,3	45,8
DMC em plasma de camundongo (µg/mL)	262,7	246,4

A rotina também foi testada *ex vivo* em relação à capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida pelo BjV (Fig. 7), tanto quando foi pré-incubada com as plaquetas, quanto adicionada concomitantemente ao veneno. Como controle da agregação plaquetária, foi utilizado o agonista trombina e a capacidade inibitória da rotina também foi testada em relação à trombina. Foi observado que quando a rotina foi pré-incubada com plaquetas lavadas de camundongos e após 15 min as plaquetas foram estimuladas com trombina ou BjV houve a mesma intensidade de agregação plaquetária que plaquetas sem a pré-incubação (agregação de aproximadamente 70% com trombina e 60% com BjV). No entanto, quando as plaquetas foram estimuladas com BjV pré-incubado com rotina por 30 min, a mudança da forma plaquetária foi prolongada, o que ocasionou uma leve diminuição da intensidade de agregação plaquetária (aproximadamente 50%). Esse resultado indica que a rotina possivelmente faz uma ligação a algum componente do BjV importante para a indução da ativação plaquetária, no entanto, essa frágil ligação é rapidamente rompida quando em contato com plaquetas, o que permite que a agregação plaquetária ocorra normalmente.

Figura 7: Agregação plaquetária de plaquetas de camundongos (5×10^5 plaquetas/ μ L) estimuladas com trombina, BjV, BjV+rutina ou plaquetas pré-incubadas por 15 min a 37°C e então estimuladas com trombina (Rutina $\rightarrow$ trombina) ou BjV (Rutina $\rightarrow$ BjV). Concentrações finais: trombina 0,1 U/mL, BjV 24,4 μ g/mL e rutina 219,6 μ g/mL (360 μ M). Dados expressos como porcentagem de agregação plaquetária, representativos dos ensaios realizados em duplicata.

4.2 Parâmetros de estado redox

As análises de parâmetros de estado redox (Fig. 8) demonstraram que o envenenamento foi capaz de induzir um aumento nos níveis de espécies reativas (Fig. 8a) em até 24 h quando comparados ao controle salina, principalmente em 3 h, em que os grupos BjV+salina e BjV+rutina tiveram um aumento de ERO/ERN de aproximadamente 130% comparado aos valores do controle salina ($p < 0,05$). A administração da rutina induziu uma tendência de diminuição de espécies reativas em 6 e 24 h, no entanto as diferenças entre os grupos BjV+salina e BjV+rutina não foram estatisticamente significativas ($p = 0,178$ em 6 h e $p = 0,238$ em 24 h). Concomitantemente, porém não em paralelo direto como aumento de ERO/ERN, houve uma diminuição de

aproximadamente 30% nos níveis de TAC (Fig. 8b) em animais envenenados ao longo dos tempos analisados, sendo que o grupo BjV+salina apresentou alterações em 3 e 6 h ($p < 0,05$) e o grupo BjV+rutina, em 3 e 24 h ($p < 0,05$).

Apesar da variação inversamente proporcional entre o aumento de espécies reativas e diminuição de TAC nos animais envenenados, esses dois parâmetros demonstraram somente uma moderada correlação ($r = -0,284$, $p = 0,0163$, $n = 71$), que apesar de estatisticamente significativa, indica que cada parâmetro avalia um aspecto diferente do estresse oxidativo. A rutina não se mostrou eficaz para modular as alterações da TAC no envenenamento, mesmo com a diminuição das espécies reativas. Ademais, em 6 h, os animais do grupo controle rutina apresentaram uma diminuição de 30% da TAC ($p < 0,05$).

Esses dados demonstram que o BjV foi capaz de induzir a geração de espécies reativas, principalmente os radicais hidroxila e peroxinitrito, detectáveis pelo método de DCF (79) e também que antioxidantes não enzimáticos são consumidos durante o envenenamento.

Figura 8: Níveis de espécies reativas (a) e da capacidade antioxidante total (b) em amostras de plasma em camundongos 3, 6 e 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 4-6/\text{grupo}$).

4.3 Hemograma

4.3.1 Eritrócitos

Os valores eritrocitários (contagem de eritrócitos (Fig. 9a), hemoglobina (Fig. 9b) e hematócrito (Fig. 9c)) do grupo BjV+salina diminuíram somente em 24 h, em cerca de 25-30% comparados aos controles negativos ($p < 0,001$). De forma importante, a administração da rotina foi capaz de impedir a queda desses parâmetros, apresentando valores similares aos controles. Ademais, a análise morfológica dos eritrócitos em esfregaços sanguíneos demonstrou que em 24 h o grupo BjV+salina apresentou anisocitose e policromasia nas amostras de metade dos animais, o que não foi observado no grupo BjV+rotina. Esses dados demonstram que o envenenamento foi capaz de induzir alterações importantes nos eritrócitos que foram prevenidas pela administração da rotina.

Para verificar a possível ocorrência de hemólise intravascular no envenenamento, foi realizada a dosagem de hemoglobina livre plasmática (Fig. 9d), no entanto, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) desse parâmetro nos tempos analisados. Congruentemente, a análise morfológica dos eritrócitos não demonstrou evidências de fragmentação eritrocitária, e o plasma e urina dos animais envenenados apresentaram coloração similar aos animais controles.

É importante ressaltar que houve somente uma fraca correlação entre as contagens de eritrócitos e hemoglobina plasmática ($r = 0,109$, $p = 0,390$, $n = 64$), contagens de eritrócitos e espécies reativas ($r = -0,0183$, $p = 0,880$, $n = 71$) e contagens de eritrócitos e TAC ($r = -0,193$, $p = 0,104$, $n = 72$), o que evidencia

que a diminuição de eritrócitos não está relacionada com hemólise intravascular e alterações de estado redox.

Figura 9: Valores de contagem de eritrócitos (a), hemoglobina (b), hematócrito (c) e hemoglobina livre plasmática (d) em camundongos 3, 6 e 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 4-6/grupo).

4.3.2 Leucócitos

Além das alterações em eritrócitos, também foram observadas alterações nos leucócitos (Fig. 10) nos animais envenenados, como a neutrofilia em 6 h ($p < 0,001$) (Fig. 10b), característica do envenenamento botrópico. Já os animais que receberam rutina demonstraram aumento de neutrófilos (3 e 6 h, $p < 0,05$) (Fig. 10b), linfócitos (somente controle rutina, 6 h, $p < 0,05$) (Fig. 10c) e

monócitos (6 h, $p < 0,05$) (Fig. 10d), o que acarretou um aumento na contagem total de leucócitos (6 h, $p < 0,001$) (Fig. 10a).

Figura 10: Contagem de leucócitos totais (a) e contagem absoluta de neutrófilos (b), linfócitos (c) e monócitos (d) em camundongos 3, 6 e 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 5-6/\text{grupo}$).

4.3.3 Plaquetas

O envenenamento induziu plaquetopenia (Fig. 11a) nos três tempos analisados ($p < 0,001$) com um concomitante aumento do volume plaquetário médio (VPM) ($p < 0,05$) (Fig. 11b), o que indica o consumo de plaquetas circulantes e a liberação precoce de plaquetas jovens na circulação. No grupo BjV+rotina, a plaquetopenia foi mais intensa em 3 e 6 h e, congruentemente, esse grupo apresentou um maior VPM em 3 e 6 h quando comparado ao

controle salina ($p < 0,001$); já em 24 h, não houve diferenças significativas ($p = 0,890$). Ademais, foi observada uma correlação significativa entre a contagem plaquetária e parâmetros de estado redox (espécies reativas: $r = -0,352$, $p = 0,00259$, $n = 71$; TAC: $r = 0,457$, $p = 0,0000248$, $n = 72$).

Figura 11: Contagem de plaquetas (a), e volume plaquetário médio (b) em camundongos 3, 6 e 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$).

4.4 Parâmetros da coagulação

Após a avaliação dos parâmetros hematológicos, foi analisada a ação do BjV em parâmetros hemostáticos, a começar pelos níveis de fibrinogênio a fim de confirmar a coagulopatia induzida pelo envenenamento.

O grupo BjV+salina apresentou uma diminuição significativa nos níveis de fibrinogênio plasmático (Fig. 12a) quando comparado ao controle salina ($p < 0,001$ em 3 h e $p < 0,05$ em 6 e 24 h). A rutina impediu o consumo de fibrinogênio durante o envenenamento, já que não houve diferenças

significativas entre o grupo BjV+rutina e o controle salina ($p= 0.935$ em 3 h, $p= 0.233$ em 6 h, e $p= 1.000$ em 24 h).

Visto que a rutina impediu a queda dos níveis de fibrinogênio já em 3 h após sua administração, foram avaliadas as alterações na via extrínseca da cascata de coagulação nesse tempo. Como esperado, o grupo BjV+salina apresentou um prolongamento do TP (>300 s) ($p< 0,05$) (Fig. 12b) e apesar das diferenças entre o grupo BjV+rutina e o controle salina ($p< 0,05$), a rutina foi capaz de encurtar significativamente o TP ($p< 0,05$ comparado com o BjV+salina).

Também foi observado um aumento da atividade do TF plasmático (Fig. 12c) no grupo BjV+salina ($p< 0,05$), sem alteração dos níveis de antígeno de TF ($p= 1,000$) (Fig. 12d), induzindo uma tendência de aumento da razão de atividade de TF/antígeno de TF (Fig. 12e). Já o grupo BjV+rutina apresentou aumento tanto na atividade quanto no antígeno de TF ($p< 0,05$), o que levou a uma tendência de diminuição da razão de atividade de TF/antígeno de TF quando comparado ao grupo BjV+salina.

O envenenamento induziu a ativação da cascata de coagulação, não somente pela ativação de fatores da coagulação, mas também pela decriptação do TF, ocasionando uma coagulopatia por consumo. E apesar de ineficaz em relação às alterações no TF, a rutina foi capaz de impedir o consumo de fibrinogênio e o estabelecimento da coagulopatia.

Figura 12: Níveis de fibrinogênio plasmático (a) em camundongos 3, 6 e 24 h após a administração dos tratamentos. Os dados de tempo de protrombina (b), atividade de TF (c), antígeno de TF (d) e atividade/antígeno de TF (e) referem-se às amostras de plasma de camundongos 3 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 4-6$ /grupo).

4.5 Expressão proteica

A expressão proteica (Fig. 13) de TF, PDI e de proteínas endógenas (GAPDH e β -actina) foi analisada em amostras de fígado, pulmão, coração e pele na fase crônica do envenenamento (24 h) e apresentou diferentes resultados dependendo do órgão analisado. O envenenamento induziu alterações somente na expressão proteica de PDI no coração ($p < 0,05$ comparado ao controle salina, Fig. 13c) e de GAPDH na pele ($p < 0,0001$ comparado ao controle salina, Fig. 13d). No entanto, os grupos administrados com rutina apresentaram alterações na expressão proteica em todos os tecidos

analisados. No fígado (Fig. 13a), o controle rotina demonstrou aumento de TF e PDI e diminuição de GAPDH e β -actina comparado tanto com o controle salina ($p < 0,05$) quanto ao grupo BjV+salina ($p < 0,05$). No pulmão, os grupos controle rotina e BjV+rutina apresentaram aumento de TF, GAPDH, β -actina e diminuição de PDI ($p < 0,05$). As expressões de todas as proteínas do controle rotina estavam diminuídas no coração ($p < 0,05$, Fig. 13c), porém no grupo BjV+rutina, a expressão de TF estava aumentada em relação ao grupo BjV+salina ($p < 0,05$) e a expressão de PDI diminuída em relação do controle salina ($p < 0,05$). Os grupos administrados com rotina demonstraram diminuição de GAPDH na pele ($p < 0,05$, Fig. 13d). Ao analisar as expressões proteicas foi observado uma correlação entre a expressão de TF e PDI em fígado ($r = 0,726$, $p = 0,0000583$, $n = 24$), pulmão ($r = -0,606$, $p = 0,00218$, $n = 23$) e pele ($r = 0,426$, $p = 0,0379$, $n = 24$).

Esses resultados demonstram que o BjV exerce pouca influência em relação à expressão proteica em 24 h, no entanto, de forma surpreendente, a rotina foi capaz de alterar drasticamente as expressões proteicas de TF e PDI, assim como de proteínas endógenas.

Figura 13: Expressão proteica de TF, PDI, GAPDH e β -actina em amostras de fígado (a), pulmão (b), coração (c) e pele (d) em camundongos 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo).

4.6 Atividade de TF em tecidos

Após avaliar a expressão proteica de TF em tecidos, foi analisada a ação do BjV e da rutina na atividade de decriptação (razão da atividade/expressão proteica) de TF em tecidos em 24 h.

Assim como na expressão proteica de TF, o BjV não induziu alterações na atividade (Fig. 14a) e decriptação (Fig. 14b) de TF em 24 h. No entanto, os grupos que receberam rutina apresentaram uma diminuição ($p < 0,05$) na atividade de TF no pulmão, coração e pele (somente controle salina). Em relação à razão de atividade/expressão proteica de TF, o controle rutina

demonstrou diminuição em relação ao controle salina e BjV+salina no pulmão ($p < 0,05$) e já o grupo BjV+rutina demonstrou diminuição da decriptação de TF tanto no pulmão quanto no coração quando comparado ao grupo BjV+salina ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que tanto a decriptação de TF quanto sua expressão proteica parecem influenciar na atividade total de TF e que essas alterações diferem conforme o tecido analisado. Ademais, durante o envenenamento a rotina foi capaz de diminuir a decriptação do TF em pulmão e coração, o que ocasionou uma diminuição na atividade total de TF nesses tecidos apesar do aumento de sua expressão proteica.

Figura 14: Atividade de TF (a) e razão de atividade/expressão proteica de TF em amostras de fígado, pulmão, coração e pele em camundongos 24 h após a administração dos tratamentos. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle salina no respectivo tempo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo BjV+salina no respectivo tempo. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 4-6$ /grupo).

5. DISCUSSÃO

O veneno de *B. jararaca* possui ações diversas, incluindo ações anti-hemostáticas, hemorrágicas e pró-inflamatórias. No entanto, além das alterações diretas induzidas por componentes do BjV, existem complicações secundárias não elucidadas completamente até o momento, como o estresse oxidativo/nitrosativo e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da plaquetopenia e da coagulopatia por consumo. Desse modo, o presente trabalho buscou analisar as complexas interações entre os distúrbios hemostáticos e hematológicos do envenenamento com uma de suas complicações secundárias, o desequilíbrio do estado redox, investigando também o potencial da rutina como possível agente terapêutico complementar ao envenenamento.

No protocolo experimental, tendo em conta que a rutina foi pré-incubada com o BjV e posteriormente a mistura foi administrada aos camundongos, foi estudado se a rutina seria capaz de inibir *in vitro* as atividades de algumas das principais famílias de proteínas presentes no BjV. Nas doses testadas, a rutina foi incapaz de inibir as atividades de SVMP, SVSP, LAAO e PLA₂, assim como não alterou a capacidade coagulante do veneno, indicando que a atividade da rutina está relacionada com sua ação *in vivo*, como já observado anteriormente em envenenamento por *Botrops atrox* (131), e não por sua ação direta sobre o BjV *in vitro*. Estudos já demonstraram o potencial da quercetina e também de seus derivados (como a rametina) como inibidores de PLA₂ de venenos de *B. jararacussu* (132), *Crotalus durissus terrificus* (133) e *Naja naja atra* (134) ao modificarem as PLA₂ estruturalmente e também suas atividades biológicas. No

entanto, foi demonstrado que alguns flavonoides glicosilados, como a rutina, são incapazes de inibir a atividade de PLA₂ de veneno de serpente (135), o que está de acordo com os resultados aqui apresentados. Isso demonstra que as ações modulatórias da rutina não estão relacionadas com uma inibição direta do BJV, mas sim com sua atividade nos eventos fisiopatológicos induzidos pelo envenenamento *in vivo*.

Dentre as ações fisiopatológicas do envenenamento ofídico, o estresse oxidativo/nitrosativo é frequentemente estudado (77, 93-96, 98, 114, 136-143), assim como potenciais compostos terapêuticos complementares (144), como os antioxidantes, já que esse desequilíbrio não é combatido por antivenenos. Um desses estudos foi realizado por Santhosh *et al.* em 2013 (92) e foi observado que o veneno de *Daboia russelli* quando injetado em camundongos é capaz de induzir o estresse oxidativo/nitrosativo e também alterações hematológicas importantes. Ademais, a administração de crocina, um antioxidante natural, foi capaz de reverter as alterações no estado redox e as disfunções em leucócitos, eritrócitos e plaquetas, indicando uma relação entre o estresse oxidativo/nitrosativo e as alterações hematológicas nesse modelo de envenenamento.

De fato, o aumento de espécies reativas e a diminuição da capacidade antioxidante total demonstrados no presente estudo indicam que o envenenamento por *B. jararaca* induz um importante desequilíbrio no estado redox, tanto pelo aumento de espécies reativas quanto pelo consumo de defesas antioxidantes, como já demonstrado em modelos experimentais (145, 146) e também em pacientes picados (77). É preciso considerar que a sonda DCFH-DA, utilizada no ensaio para detectar espécies reativas, reage

preferencialmente com a hidroxila e o peroxinitrito (79) e que o ensaio de capacidade antioxidante total identifica preferencialmente antioxidantes não-enzimáticos, como glutathione e ácido ascórbico, além de antioxidantes exógenos, como flavonoides (147). A administração da rutina induziu uma tendência de diminuição das espécies reativas no plasma ao longo do tempo, o que pode estar relacionado com suas ações antioxidantes, como sequestro/neutralização de radicais livres e quelação de íons metálicos (148). Ademais, estudos já demonstraram que tanto a quercetina como a rutina podem ocasionar a diminuição nos níveis de glutathione, o que já foi atribuído tanto à sua atividade dual como pró- e antioxidante (dependente da concentração e tempo), quanto a sua interação com espécies reativas e posterior redução pela glutathione (149, 150).

Visto que o envenenamento por *B. jararaca* induz um importante desequilíbrio no estado redox, foi avaliado se esse distúrbio poderia estar relacionado com alterações hemostáticas e hematológicas características do envenenamento botrópico.

Um dos distúrbios de grande importância do envenenamento botrópico é a plaquetopenia, que é recorrentemente descrita em envenenamentos experimentais e também em pacientes picados (34, 72, 115). No entanto, os mecanismos responsáveis pela plaquetopenia no envenenamento por *B. jararaca* ainda não estão completamente elucidados. Estudos já demonstraram que a plaquetopenia não está relacionada com o consumo de fibrinogênio, ação das metaloproteinases e serinaproteases, e nem mesmo com a lesão local hemorrágica induzida pelo veneno (34). O desequilíbrio do estado redox já foi relacionado com distúrbios plaquetários, e de fato, os resultados

demonstraram que o desequilíbrio do estado redox está relacionado com a plaquetopenia no envenenamento. No entanto, mesmo quando a rutina foi administrada nos animais envenenados e os níveis de espécies reativas e capacidade antioxidante total estavam normalizados, não houve reversão do quadro de plaquetopenia, o que indica que o desequilíbrio do estado redox não contribui de forma direta para a diminuição das plaquetas no envenenamento. De fato, quando administrada no envenenamento, a rutina induziu uma plaquetopenia mais acentuada e um aumento no VPM na fase aguda do envenenamento. No entanto, apresentou uma recuperação mais acentuada da contagem plaquetária em 24 h após o envenenamento, marcada pela normalização do VPM, o que indica que a liberação precoce de plaquetas na circulação foi importante para o aumento da contagem plaquetária. Congruentemente, apesar da rutina já ter sido estudada como inibidora da ativação plaquetária induzida por diferentes agonistas (110, 151, 152), ela se mostrou ineficaz frente à ativação e agregação plaquetárias induzidas pelo BjV (na concentração de 24,4 µg/mL) e também pela trombina (na concentração de 0,1 U/mL). Baseando-se nos resultados obtidos, é possível inferir que outros mecanismos devem ser responsáveis pela plaquetopenia, além do estresse oxidativo/nitrosativo proposto pelo presente estudo.

Outra alteração hematológica característica do envenenamento botrópico observada foi a neutrofilia, que é decorrente da resposta inflamatória aguda induzida pelo BjV (71, 72, 153). No entanto, a rutina sozinha também induziu um aumento de leucócitos. Esses resultados podem estar relacionados com a capacidade da rutina de diminuir a expressão da integrina β_2 durante a resposta inflamatória, o que acarreta uma diminuição da adesão, rolamento,

migração e influxo de leucócitos (154), podendo ser uma explicação para o aumento do *pool* de neutrófilos circulantes na corrente sanguínea. Desse modo, a rutina é considerada como um composto anti-inflamatório já que é capaz de diminuir a resposta inflamatória mediada por neutrófilos, o que poderia ser de grande auxílio no tratamento dos efeitos locais inflamatórios induzidos pelo envenenamento botrópico, que não são completamente combatidos pelo soro antibotrópico.

A rutina também se mostrou eficiente para impedir a queda de parâmetros eritrocitários em 24 h após o envenenamento. Essa alteração já tinha sido observada no envenenamento por *B. jararaca* em pacientes picados (72) e em modelos experimentais (115). Em humanos (72), a queda de eritrócitos foi associada ao surgimento de sangramentos locais e sistêmicos, já que pacientes que apresentavam sangramentos possuíam uma contagem de eritrócitos menor que pacientes sem sangramentos. Ademais, mesmo 48 h horas após a soroterapia, os pacientes ainda apresentavam essa alteração. Já em ratos (115), além da ocorrência de sangramentos, a diminuição de eritrócitos também foi relacionada com o quadro de anemia microangiopática, marcada por alterações na morfologia de eritrócitos e aumento da hemoglobina livre plasmática. Além desses mecanismos, a ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo é frequentemente associada à diminuição da contagem de eritrócitos, tanto pelo fato de espécies reativas deformarem eritrócitos, induzindo sua eliminação da circulação (155), quanto por induzirem a apoptose de eritrócitos (156). Em envenenamentos ofídicos, o estresse oxidativo/nitrosativo já foi relacionado com alterações eritrocitárias (92) e também pelo surgimento de metemoglobinemia (157). É importante ressaltar

que mesmo que os resultados apresentados indiquem que no envenenamento em camundongos a hemólise intravascular e o desequilíbrio do estado redox não estejam diretamente relacionados com os distúrbios eritrocitários apresentados, a rutina demonstrou ser capaz de impedir a queda de eritrócitos, o que pode estar relacionado com seu potencial como um composto anti-hemorrágico. De fato, já foi demonstrado que flavonoides como a quercetina e a rutina possuem ação anti-hemorrágica em envenenamentos botrópicos (131, 158, 159), o que foi relacionado principalmente com a proteção vascular pela diminuição da fragilidade de vasos sanguíneos. Dentre esses trabalhos, inclui-se um estudo pioneiro realizado por Seba, R.A. em 1949 (131), em que foi demonstrado que a administração de rutina foi capaz de retardar ou diminuir (parcial ou totalmente) efeitos locais inflamatórios e hemorrágicos induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox*, sugerindo a rutina como potencial fármaco na prevenção dos graves efeitos do envenenamento. Também é necessário considerar que a ação protetora da rutina em relação aos eritrócitos pode estar associada com sua ação na hemostasia durante o envenenamento.

A coagulopatia por consumo é bem caracterizada no envenenamento botrópico (13, 34) e inclui diminuição de fibrinogênio plasmático, hiperfibrinólise secundária – marcada por aumento de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina, D-dímeros e diminuição da α_2 -antiplasmina – e diminuição moderada de fatores da coagulação, como fator II, V, VIII e X. A coagulopatia é decorrente da constante ativação da coagulação, que pode ocorrer tanto de forma direta por componentes do veneno (enzimas trombina-símbles que hidrolisam o fibrinogênio em fibrina), quanto de forma indireta, mediada por componentes do veneno que ativam fatores da coagulação (como fator II e

fator X), que por sua vez ativam a cascata de coagulação gerando trombina, que hidrolisa o fibrinogênio em fibrina. Um estudo de Yamashita *et. al* (34) demonstrou que a atividade das SVMP no envenenamento por *B. jararaca* é crucial para a coagulopatia e o aumento dos níveis de TF, o que poderia agravar ainda mais os distúrbios hemostáticos.

De fato, o envenenamento por *B. jararaca* induziu hipofibrinogenemia em todos os tempos analisados, como já observado em outros modelos experimentais (34, 71, 115) e, congruentemente, o tempo de protrombina se mostrou prolongado, já que, como bem estabelecido, a diminuição dos níveis de fibrinogênio circulante é a causa principal do prolongamento do tempo de coagulação observado nos pacientes picados (13). Os níveis de fibrinogênio plasmático em humanos picados somente retornam aos níveis normais 18 h após a administração da soroterapia (116) e em envenenamentos de cães, o reestabelecimento do fibrinogênio somente ocorre 24 h após a soroterapia e após 72 h sem a soroterapia (71, 160). De modo importante, a administração da rutina no envenenamento impediu a diminuição dos níveis de fibrinogênio, tanto na fase aguda quanto na fase crônica do envenenamento, encurtando expressivamente o tempo de protrombina e impedindo assim, o estabelecimento da coagulopatia no envenenamento. Considerando os efeitos da soroterapia e da rutina na hipofibrinogenemia do envenenamento, a rutina poderia ser um complemento terapêutico importante, pois poderia acelerar a recuperação do fibrinogênio e assim, colaborar para o reestabelecimento da hemostasia e até mesmo possibilitar a diminuição da dose de antiveneno administrada.

Considerando que a rotina foi capaz de modular parâmetros da coagulação e que já foi demonstrado que o veneno botrópico é capaz de aumentar a atividade de TF *in vitro* e *in vivo* (34, 161-163), foi verificado se a rotina seria capaz de interferir com o aumento da atividade de TF que ocorre no envenenamento. O envenenamento induziu o aumento da atividade de TF plasmático, porém sem alterações na concentração de antígeno de TF, o que indica que o envenenamento induz a decriptação do TF plasmático. Apesar de os mecanismos de ação do veneno no TF não estarem completamente elucidados, já foi demonstrado que as SVMP são capazes de induzir o aumento da atividade de TF por estimularem células mononucleares e células endoteliais (161, 162), fontes de TF na circulação sanguínea. O aumento da atividade de TF é um fator preocupante já que a coagulação intravascular disseminada (CID) é caracterizada pela ativação da coagulação induzida por TF e, sendo assim, o envenenamento pode acarretar o desenvolvimento ou a associação com a CID. Diferentemente do esperado, a rotina não alterou a atividade do TF plasmático e ainda aumentou os níveis plasmáticos de antígeno de TF, o que comprova mais uma vez que não somente a PDI, mas que diversos mecanismos são responsáveis pela dinâmica de encriptação-decriptação do TF (33). É importante ressaltar, que já foi demonstrado que há uma sinergia entre os mecanismos de decriptação do TF, como a interação entre a PDI e a PS, em que a inibição da PDI pode acarretar uma exposição maior da PS, levando à decriptação do TF (33). Mesmo sem interferir diretamente na atividade do TF plasmático, a rotina foi eficiente na normalização de parâmetros da coagulação, o que indica que mesmo com o estímulo da atividade de TF, e conseqüentemente, da cascata de coagulação,

a rutina foi capaz de inibir o desenvolvimento da coagulopatia no envenenamento.

Alguns mecanismos de ação da rutina na coagulopatia podem estar relacionados com sua ação em relação à PDI, uma vez que essa enzima é essencial para a formação do trombo *in vivo* (acúmulo de fibrina e agregação plaquetária) (110), regulação de fatores da coagulação (56-59) e ativação endotelial de plasminogênio (164). Além disso, estudos já demonstraram a ação da rutina (e outras formas de quercetina) em relação a componentes importantes da hemostasia, como a trombina (165), os fatores da coagulação V (58), VIII e IX (166), o plasminogênio (164) e o receptor endotelial de proteína C (167). Choi *et. al* (165) analisaram a atividade anti-trombótica da rutina e foi demonstrado que a rutina é capaz de inibir a formação de coágulos de fibrina e coágulos sanguíneos por sua ação como inibidora direta da atividade da trombina. Visto que a geração intravascular de trombina e sua atividade têm papel fundamental no consumo de fibrinogênio no envenenamento, a atividade direta da rutina como inibidora da trombina pode ser um dos mecanismos pelo qual a rutina impediu a coagulopatia induzida pelo BjV.

É preciso considerar que o BjV é capaz de alterar não somente parâmetros sanguíneos, como a atividade de TF plasmático, mas também pode alterar a PDI e o TF local e sistemicamente. Já foi demonstrado que na fase aguda do envenenamento por *B. jararaca*, no local da injeção do veneno bruto, há diminuição da expressão de TF em 3 h e aumento em 6 h, com a concomitante diminuição de PDI em 6 h e aumento da atividade de TF (34). Em outro estudo foi demonstrado que uma SVMP – a patagonfibrase – não altera parâmetros hemostáticos e hematológicos, porém induz um aumento da expressão

proteica de TF e diminuição de PDI na pele (local de injeção) após 3 h. Por outro lado, os resultados apresentados aqui demonstraram que em 24 h após o envenenamento já não são observadas alterações significativas da expressão e atividade de TF em tecidos. Assim, a estabilização de TF e PDI já em 24 h após o envenenamento parece ser uma estratégia conservativa do organismo, visto a importância dessas proteínas em situações fisiopatológicas. No entanto, exceção à essa regra, houve uma diminuição da expressão proteica de PDI no coração, o que é um dado relevante visto que a PDI é tida como uma proteína com grande estabilidade de expressão (51). Esses resultados indicam a capacidade do envenenamento de induzir alterações sistêmicas importantes, mesmo na fase crônica do envenenamento, assim como indicam que a diminuição de PDI não é suficiente para alterar a atividade de TF no coração.

Foi observado também que o BjV e a rutina alteraram as expressões proteicas das proteínas endógenas GAPDH e β -actina, tanto na comparação entre grupos quanto entre réplicas de um mesmo grupo. De fato, apesar de essas proteínas serem amplamente utilizadas para a normalização da quantificação de *western blottings*, estudos demonstram que essas proteínas são suscetíveis a alterações em suas expressões mesmo em situações fisiológicas normais, não sendo indicadas como base de uma normalização (168). No entanto, o método de normalização utilizando a análise da proteína total de cada amostra se mostra cada vez mais recomendável por ser um método com mais acurácia, especialmente em métodos que envolvam fluorescência por sua grande sensibilidade e maiores limites de detecção (169). Por esse motivo, esse foi o método utilizado para a normalização dos *western blottings* realizados nesse trabalho.

De forma inesperada, a rotina induziu alterações não somente na atividade de TF nos tecidos, porém também na expressão de TF e PDI. A ação da PDI em relação à atividade do TF é frequentemente estudada, porém ainda controversa. No entanto, os resultados demonstraram que a rotina foi capaz de inibir a atividade do TF local e sistemicamente, com exceção do fígado, tanto em animais envenenados quanto em animais controles. Foi possível observar que as alterações de atividade de TF variaram de acordo com o tecido analisado e que são dependentes tanto da decriptação do TF quanto da sua expressão proteica, como avaliado pelo cálculo da razão entre atividade e expressão proteica de TF. A diminuição da decriptação do TF, além de diminuir a atividade total de TF nos tecidos, parece estar associada a uma diminuição de PDI e aumento de TF. O aumento da expressão proteica de TF pode ser devido a um mecanismo compensatório, já que a atividade de TF se encontra diminuída. Órgãos como o pulmão e coração apresentam uma alta expressão gênica de TF, previamente relacionada à necessidade desses órgãos de uma proteção adicional da hemostasia (170, 171), por serem órgãos vitais altamente ativos mecanicamente. Apesar de a rotina ser estudada com frequência em relação a seu potencial como antitrombótico e como inibidora da atividade da PDI, sua influência como moduladora da expressão de TF e PDI em tecidos foi pouco estudada, porém, como os resultados demonstraram, é um aspecto fundamental a ser considerado em futuras investigações.

O presente estudo demonstrou que o envenenamento por *B. jararaca* induziu distúrbios hemostáticos característicos, desequilíbrio do estado redox, decriptação de TF plasmático e diminuição da expressão proteica de PDI no coração. Em 24 horas, a administração da rotina no envenenamento foi eficaz

em coibir parcialmente importantes alterações hematológicas, hemostáticas e de estado redox. Nesse ínterim, é mister ressaltar que alterações na hemostasia no envenenamento possuem ampla variedade e complexidade, induzindo diversos distúrbios deletérios aos pacientes picados (13). Da mesma forma, as alterações de estado redox podem induzir complicações secundárias, que não são neutralizadas pela soroterapia, o único tratamento oficial para picadas de serpentes (77). Desse modo, por ser capaz de interferir com as alterações hemostáticas e de estado redox, a rutina demonstrou grande potencial como agente terapêutico complementar. Estudos futuros são necessários para compreender os mecanismos de ação da rutina, assim como para estudar os efeitos da rutina quando administrada concomitantemente à soroterapia.

6. CONCLUSÕES

1. O veneno de *B. jararaca* induziu desequilíbrio do estado redox sistêmico, com aumento de espécies reativas e diminuição da capacidade antioxidante total. As alterações foram observadas até 24 h após o envenenamento, porém foram mais intensas na fase aguda. Apesar de concomitantes, as alterações dos dois parâmetros de estado redox analisados não possuem correlação direta, demonstrando que o envenenamento possui diferentes mecanismos de ação.
2. Os distúrbios de estado redox são frequentemente associados a alterações hematológicas e hemostáticas, porém no envenenamento de camundongos pelo veneno de *B. jararaca*, o desequilíbrio no estado redox não parece estar relacionado diretamente com os distúrbios hematológicos e hemostáticos.
3. A rutina (quercetina-3-rutinosídeo) foi capaz de reduzir espécies reativas, impedir a diminuição tardia de eritrócitos e a coagulopatia por consumo, além de diminuir a atividade de TF e alterar a sua expressão proteica nos tecidos estudados. Desse modo, a rutina possui diversas ações terapêuticas benéficas, o que indica que sua administração como agente terapêutico complementar à soroterapia pode ser de grande valia na recuperação mais rápida de pacientes envenenados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Snakebite envenoming: World Health Organization; [citado em 3 jan. 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>.
2. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação [citado em 9 nov. 2017]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
3. Melgarejo AR. *Serpentes Peçonhentas do Brasil*. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 33-61.
4. World Health Organization. Venomous snakes distribution and species risk categories: World Health Organization; [citado em 22 set. 2017]. Disponível em: <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/default.htm>
5. França FOS, Málaque CMS. *Acidente Botrópico*. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 72-86.
6. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(24):3030-41.
7. Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011;57(5):627-45.

8. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(1):164-76.
9. Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, DaMatta RA, Alves EW. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Toxicon*. 2010;56(6):944-55.
10. Izidoro LF, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*. 2014;2014:196754.
11. Girish KS, Kemparaju K. Overlooked issues of snakebite management: time for strategic approach. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(20):2494-508.
12. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Goncalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*. 2010;55(2-3):227-34.
13. Sano-Martins IS, Santoro ML. *Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil*. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 289-309.
14. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J*. 2004;168(3):238-51.
15. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-23.

16. Broos K, De Meyer SF, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Blood platelet biochemistry. *Thromb Res.* 2012;129(3):245-9.
17. Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88:186–93.
18. Triplet D. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem.* 2000;46(8):1260–9.
19. Laffan M, Manning R. *Investigation of haemostasis*. Em: Bain B, Bates I, Laffan M, Lewis S, editores. *Dacie and Lewis practical haematology*. 11 ed. Churchill Livingstone; 2011. p. 393-445.
20. Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature.* 1964;202:498-9.
21. Davie E, Ratnoff O. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
22. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost.* 2003;1:1504–14.
23. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):108-17.
24. Hoffman M, Monroe D. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:958-65.
25. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
26. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.
27. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J.* 2015;13:17.

28. Colman R, Schmaier A. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. 1997;90(10):3819-43.
29. Colvin B. Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis*. 2004;87:S43–S6.
30. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S200-S7.
31. Colman R, Clowes A, George J, Goldhaber S, Marder V. Overview of hemostasis. Em: Colman R, Hirsh J, Marder V, Salzman E, editores. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3 ed. Philadelphia: 2005. p. 3-16.
32. Butenas S. Tissue factor structure and function. *Scientifica*. 2012;2012:964862.
33. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost*. 2014;111(4):590-7.
34. Yamashita KM, Alves AF, Barbaro KC, Santoro ML. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2814.
35. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med*. 2003;9(4):458-62.
36. Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C, Hathcock JJ, Vele S, Gazdciu M, et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2006;4:158-67.

37. Rousseau A, Larsen AK, Van Dreden P, Sabbah M, Elalamy I, Gerotziafas GT. Differential contribution of tissue factor and factor XII to thrombin generation triggered by breast and pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2017;51(6):1747-56.
38. Ünlü B, Bogdanov VY, Versteeg HH. Interplay between alternatively spliced tissue factor and full length tissue factor in modulating coagulant activity of endothelial cells. *Thromb Res.* 2017;156:1-7.
39. Krudysz-Amblo J, Jennings ME, Matthews DE, Mann KG, Butenas S. Differences in the fractional abundances of carbohydrates of natural and recombinant human tissue factor. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(4):398-405.
40. Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1:277-84.
41. Kiouptsi K, Reinhardt C. Protein disulfide-isomerase - a trigger of tissue factor-dependent thrombosis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(3):279-86.
42. Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1110-22.
43. Ruf W. Role of thiol pathways in TF procoagulant regulation. *Thromb Res.* 2012;129 Suppl 2:S11-2.
44. Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. *Trends Cardiovasc Med.* 2013;23(7):264-8.

45. Flaumenhaft R, Furie B, Zwicker JI. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):16-23.
46. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014;114(7):1162-73.
47. Crescente M, Pluthero FG, Li L, Lo RW, Walsh TG, Louriero S, et al. Intracellular trafficking, localization, and mobilization of platelet-borne thiol isomerases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(6):1164-73.
48. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014;114(7):1162-73.
49. Sharda A, Kim SH, Jasuja R, Gopal S, Flaumenhaft R, Furie BC, et al. Defective PDI release from platelets and endothelial cells impairs thrombus formation in Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood.* 2016;125(10):1633-42.
50. Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1101-13.
51. Moretti AIS, Laurindo FRM. Protein disulfide isomerases: redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:106-19.
52. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(17):9539-44.

53. Sobierajska K, Skurzynski S, Stasiak M, Kryczka J, Cierniewski CS, Swiatkowska M. Protein disulfide isomerase directly interacts with beta-actin Cys³⁷⁴ and regulates cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem*. 2014;289(9):5758-73.
54. Manickam N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex DW. Protein disulphide isomerase in platelet function. *Br J Haematol*. 2008;140(2):223-9.
55. Hahm E, Li J, Kim K, Huh S, Rogelj S, Cho J. Extracellular protein disulfide isomerase regulates ligand-binding activity of $\alpha M\beta_2$ integrin and neutrophil recruitment during vascular inflammation. *Blood*. 2013;121(19):3789-800.
56. Lippok S, Kolšek K, Löf A, Eggert D, Vanderlinden W, Müller JP, et al. von Willebrand factor is dimerized by protein disulfide isomerase. *Blood*. 2016;127:1183-91.
57. Bowley SR, Fang C, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Protein disulfide isomerase secretion following vascular injury initiates a regulatory pathway for thrombus formation. *Nat Commun*. 2017;8:14151.
58. Stopa JD, Neuberg D, Puligandla M, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker JL. Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation. *JCI Insight*. 2017;2(1):e89373.
59. Zucker M, Seligsohn U, Yeheskel A, Mor-Cohen R. An allosteric disulfide bond is involved in enhanced activation of factor XI by protein disulfide isomerase. *J Thromb Haemost*. 2016;14(11):2202-11.
60. Jurk K, Lahav J, Van Aken H, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of

- platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2278-90.
61. Butera D, Cook KM, Chiu J, Wong JWH, Hogg PJ. Control of blood proteins by functional disulfide bonds. *Blood.* 2014;123(13):2000-7.
 62. Holbrook LM, Sandhar GK, Sasikumar P, Schenk MP, Stainer AR, Sahli KA, et al. A humanized monoclonal antibody that inhibits platelet-surface ERp72 reveals a role for ERp72 in thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):367-77.
 63. Wang L, Wu Y, Zhou J, Ahmad S, Mutus B, Garbi N, et al. Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the α IIb β 3 integrin. *Blood.* 2013;122(22):3642-50.
 64. Zhou J, Wu Y, Chen F, Wang L, Rauova L, Hayes VM, et al. The disulfide isomerase ERp72 supports arterial thrombosis in mice. *Blood.* 2017;130(6):817-28.
 65. Petricevicha VL, Teixeira CFP, Tambourgia DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon.* 2000;38:1253-66.
 66. Scarborough R, Rose J, Naughton M, Phillips D, Nannizzi L, Arfsten A, et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J Biol Chem.* 1993;268(2):1058-65.
 67. Gould R, Polokoff M, Friedman P, Huang T, Holt J, Cook J, et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1990;195(2):168-71.

68. Gutierrez JM. Understanding and confronting snakebite envenoming: the harvest of cooperation. *Toxicon*. 2016;109:51-62.
69. Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Braz J Med Biol Res*. 1986;19(2):199-204.
70. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thromb Haemost*. 1990;63(3):449-53.
71. Sano-Martins IS, Santoro ML, Morena P, Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Antonio LC, et al. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Braz J Med Biol Res*. 1995;28(3):303-12.
72. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*. 2008;51(8):1440-8.
73. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*. 1991;29(8):961-72.
74. Klöcking HP, Hoffmann A, Markwardt F. Release of plasminogen activator by batroxobin. *Haemostasis*. 1987;17(4):235-7.
75. Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RD, Franca FO, Ishii H, Hay CR. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. *Thromb Haemost*. 1992;67(4):484-8.

76. Santoro ML, Sano-Martins IS, Chamone DA. *In vivo* platelet activation induced by *bothrops jararaca* venom in rabbits. Platelets. 1994;5(3):162-70.
77. Strapazzon JO, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Bastos J, Zimmermann IR, et al. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. J Appl Biomed. 2014;13(2):161-7.
78. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RdCG, Paula SOd, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev Nutr. 2010;23(4):629-43.
79. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol. 2004;142(2):231-55.
80. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia Of Life Sciences: Nature Publishing Group; 2001. p. 1-9.
81. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. 2006;141(2):312-22.
82. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutr Rev. 2012;70(5):257-65.
83. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Soc. 1998;75(2):199-212.
84. Pietraforte D, Vona R, Marchesi A, de Jacobis IT, Villani A, Del Principe D, et al. Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. Antioxid Redox Signal. 2014;21(1):1771-93.
85. Rakesh KS, Jagadish S, Vinayaka AC, Hemshekhar M, Paul M, Thushara RM, et al. A new ibuprofen derivative inhibits platelet

- aggregation and ROS mediated platelet apoptosis. PLoS One. 2014;9(9):e107182.
86. Araujo AM, Reis EA, Athanazio DA, Ribeiro GS, Hagan JE, Araujo GC, et al. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(4):719-23.
 87. Araujo CF, Lacerda MVG, Abdalla DSP, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. Mem Int Oswaldo Cruz. 2008;103(6):517-21.
 88. Soundravally R, Sankar P, Bobby Z, Hoti SL. Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. Platelets. 2008;19(6):447-54.
 89. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. Rev Bras Cancer. 2007;53(3):335-43.
 90. Kile BT. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. Br J Haematol. 2014;165(2):217-26.
 91. Strapazzon JO. *Análise do dano oxidativo e monitoramentodo status antioxidante de pacientes de acidente botrópico* [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
 92. Santhosh MS, Hemshekhar M, Thushara RM, Devaraja S, Kemparaju K, Girish KS. *Vipera russelli* venom-induced oxidative stress and hematological alterations: amelioration by crocin a dietary colorant. Cell Biochem Funct. 2013;31(1):41-50.

93. Al-Quraishy S, Dkhil MA, Abdel Moneim AE. Hepatotoxicity and oxidative stress induced by *Naja haje* crude venom. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2014;20(1):42.
94. Al Asmari AK, Khan HA, Manthiri RA, Al Yahya KM, Al Otaibi KE. Effects of *Echis pyramidum* snake venom on hepatic and renal antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2014;28(9):407-12.
95. Katkar GD, Sundaram MS, Hemshekhar M, Sharma DR, Santhosh MS, Sunitha K, et al. Melatonin alleviates *Echis carinatus* venom-induced toxicities by modulating inflammatory mediators and oxidative stress. J Pineal Res. 2014;56(3):295-312.
96. Silva JG, Soley BS, Gris V, Pires ARA, Caderia SM, Eler GJ, et al. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. J Biochem Mol Toxicol. 2011;25(3):195-203.
97. Yamasaki SC, Villarroel JS, Barone JM, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. Toxicon. 2008;52(3):445-54.
98. Alegre VS, Barone JM, Yamasaki SC, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. Toxicon. 2010;56(3):402-10.
99. Dray A. Inflammatory mediators of pain. Br J Anaesth. 1995;75:125-31.
100. Cobb JP, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Mechanisms of cell injury and death. Br J Anaesth. 1996;77(1):3-10.

101. Cho J, Furie BC, Coughlin SR, Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1123-31.
102. Spronk HM, ten Cate H, van der Meijden PE. Differential roles of tissue factor and phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thromb Res.* 2014;133 Suppl 1:S54-6.
103. Penn MS, Patel CV, Cui MZ, DiCorleto PE, Chisolm GM. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation.* 1999;99(13):1753-9.
104. Haraguchi LMM, Carvalho OB. *Plantas medicinais*: do curso de plantas medicinais. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente; 2010.
105. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MdLP. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim Nutr.* 2004;15(3):285-92.
106. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001;37(3):293-303.
107. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
108. Kandaswami C, Middleton EJR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv Exp Med Biol.* 1994;366:351-76.
109. Afanas'ev IB. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1763-9.

110. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2104-13.
111. Lin L, Gopal S, Sharda A, Passam F, Bowley SR, Stopa J, et al. Quercetin-3-rutinoside inhibits protein disulfide isomerase by binding to its b'x domain. *J Biol Chem*. 2015;290(39):23543-52.
112. Bekendam RH, Bendapudi PK, Lin L, Nag PP, Pu J, Kennedy DR, et al. A substrate-driven allosteric switch that enhances PDI catalytic activity. *Nat Commun*. 2016;7:12579.
113. Cai X, Fang Z, Dou J, Yu A, Zhai G. Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Curr Med Chem*. 2013;20(20):2572-82.
114. Santhosh MS, Sundaram MS, Sunitha K, Kemparaju K, Girish KS. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. *Inflamm Res*. 2013;62(7):721-31.
115. Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML. *Bothrops jararaca* envenomation: pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Exp Biol Med* 2015;240(11):1528-36.
116. Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med*. 1993;86(5):315-25.
117. Piskula MK, Terao J. Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J Agric Food Chem*. 1998;46:4313-7.

118. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2010;56(8):1443-58.
119. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
120. Kishimoto M, Takahashi T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. *Anal Biochem*. 2001;298(1):136-9.
121. Morrissey Lab. Clotting assay for measuring tissue factor activity. 2005 [citado em 24 mar. 2016]. Disponível em: <http://tf7.org/clot-assay.pdf>.
122. Driver AS, Kodavanti PS, Mundy WR. Age related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol*. 2000;22:175-81.
123. Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem*. 1965;11:1-5.
124. Ribeiro JPN, Magalhães LM, Reis S, Lima JLFC, Segundo MA. High-throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Anal Sci*. 2011;27(5):483-8.
125. Crosby W, Furth F. A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine. *Blood*. 1956;11(4):380-3.
126. Roper D. *Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias*. Em: Bain B, Bates I, Laffan M, Lewis S, editores. *Dacie and*

Lewis practical haematology. 11th ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2012. p. 229-43.

127. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J Lab Clin Med*. 1951;37(2):316-20.
128. Redinbaugh MG, Turley RB. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem*. 1986;153(2):267-71.
129. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
130. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):250-4.
131. Seba RA. Efeitos vasculares do veneno de "*Bothrops atrox*" sua inibição pela rutina e um antihistaminico. *Revista Fluminense de Medicina*. 1949;14:179-88.
132. Belchor MN, Gaeta HH, Rodrigues CFB, Costa CRC, Toyama DO, Passero LFD, et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A₂. *Molecules*. 2017;22(9):1441-53.
133. Cotrim CA, de Oliveira SC, Diz Filho EB, Fonseca FV, Baldissera L, Jr., Antunes E, et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂. *Chem Biol Interact*. 2011;189(1-2):9-16.
134. Chiou YL, Lin SR, Hu WP, Chang LS. Quercetin modulates activities of Taiwan cobra phospholipase A₂ via its effects on membrane structure

- and membrane-bound mode of phospholipase A₂. J Biosci. 2012;37(2):277-87.
135. Alcaraz MJ, Hoult JR. Effects of hypolaetin-8-glucoside and related flavonoids on soybean lipoxygenase and snake venom phospholipase A₂. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1985;278(1):4-12.
 136. Abdel Moneim AE, Ortiz F, Leonardo-Mendonça RC, Vergano-Villodres R, Guerrero-Martinez JA, Lopez LC, et al. Protective effects of melatonin against oxidative damage induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) crude venom in rats. Acta Trop. 2015;143:58-65.
 137. Al Asmari A, Al Moutaery K, Manthari RA, Khan HA. Time-course of lipid peroxidation in different organs of mice treated with *Echis pyramidum* snake venom. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20(2):93-5.
 138. Kebir-Chelghoum H, Laraba-Djebari F. Cytotoxicity of *Cerastes cerastes* snake venom: involvement of imbalanced redox status. Acta Trop. 2017;173:116-24.
 139. Sharma RD, Katkar GD, Sundaram MS, Swethakumar B, Girish KS, Kemparaju K. Melatonin inhibits snake venom and antivenom induced oxidative stress and augments treatment efficacy. Acta Trop. 2017;169:14-25.
 140. Al-Johany AM, Al-Sadoon MK, Abdel Moneim AE, Bauomy AA, Diab MS. Histological, molecular and biochemical detection of renal injury after *Echis pyramidum* snake envenomation in rats. Saudi J Biol Sci. 2015;22(3):302-11.

141. Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Sundaram MS, Kemparaju K, et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. *Toxicon*. 2015;98:89-97.
142. Mukhopadhyay P, Mishra R, Mukherjee D, Mishra R, Kar M. Snakebite mediated acute kidney injury, prognostic predictors, oxidative and carbonyl stress: a prospective study. *Indian J Nephrol*. 2016;26(6):427-33.
143. Zengin S, Al B, Yarbil P, Guzel R, Orkmez M, Yildirim C, et al. An assessment of oxidant/antioxidant status in patients with snake envenomation. *Emerg Med J*. 2014;31(1):48-52.
144. Mors WB, Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira NA. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry*. 2000;55:627-42.
145. Barone JM, Alponi RF, Frezzatti R, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. *Toxicon*. 2011;57(1):148-56.
146. Barone JM, Frezzatti R, Silveira PF. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. *Toxicon*. 2014;79:1-10.
147. Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Erçağ E, Esin Çelik S, et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal Methods*. 2011;3(11):2439.

148. Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(8):1063-79.
149. Kim GN, Jang HD. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:530-7.
150. Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Lugli E, Nemes E, Nasi M, et al. Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic Res*. 2005;39(11):1249-58.
151. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J*. 2017;25(2):149-64.
152. Zhu S, Welsh JD, Brass LF, Diamond SL. Platelet-targeting thiol reduction sensor detects thiol isomerase activity on activated platelets in mouse and human blood under flow. *J Thromb Haemost*. 2016;14(5):1070-81.
153. Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*. 1997;35(2):185-93.
154. Suyenaga ES, Klein-Junior LC, Passos CS, Marin R, Santin JR, Machado ID, et al. Beyond organoleptic characteristics: the pharmacological potential of flavonoids and their role in leukocyte migration and in L-selectin and β_2 -integrin expression during inflammation. *Phytother Res*. 2014;28(9):1406-11.

155. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol.* 2014;5:84.
156. Lang E, Lang F. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int.* 2015;2015:513518.
157. Sharma RD, Katkar GD, Sundaram MS, Paul M, NaveenKumar SK, Swethakumar B, et al. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin. *J Pineal Res.* 2015;59(2):240-54.
158. Nishijima CM, Rodrigues CM, Silva MA, Lopes-Ferreira M, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. *Molecules.* 2009;14(3):1072-80.
159. Castro O, Gutiérrez J, Barrios M, Castra I, Romera M, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev Biol Trop.* 1999;47(3):605-16.
160. Yamashita K. *Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente Bothrops jararaca* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.
161. Sartim MA, Cezarette GN, Jacob-Ferreira AL, Frantz FG, Faccioli LH, Sampaio SV. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *Int J Biol Macromol.* 2017;103:1077-86.

162. Sartim MA, Costa TR, Laure HJ, Espindola MS, Frantz FG, Sorgi CA, et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. Arch Toxicol. 2016;90(5):1261-78.
163. Peichoto ME, Santoro ML. Patagonfibrase modifies protein expression of tissue factor and protein disulfide isomerase in rat skin. Toxicon. 2016;119:330-5.
164. Smith CL, Shah CM, Kamaludin N, Gordge MP. Inhibition of thiol isomerase activity diminishes endothelial activation of plasminogen, but not of protein C. Thromb Res. 2015;135(4):748-53.
165. Choi JH, Kim DW, Park SE, Lee HJ, Kim KM, Kim KJ, et al. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. J Biosci Bioeng. 2015;120(2):181-6.
166. Kuntic V, Filipovic I, Vujic Z. Effects of rutin and hesperidin and their Al(III) and Cu(II) complexes on *in vitro* plasma coagulation assays. Molecules. 2011;16(2):1378-88.
167. Ku SK, Lee IC, Han MS, Bae JS. Inhibitory effects of rutin on the endothelial protein C receptor shedding *in vitro* and *in vivo*. Inflammation. 2014;37(5):1424-31.
168. Lee HG, Jo J, Hong HH, Kim KK, Park JK, Cho SJ, et al. State-of-the-art housekeeping proteins for quantitative western blotting: revisiting the first draft of the human proteome. Proteomics. 2016;16(13):1863-7.
169. Eaton SL, Roche SL, Llaverro Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, et al. Total protein analysis as a reliable loading control

for quantitative fluorescent Western blotting. PLoS One. 2013;8(8):e72457.

170. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1015-22.
171. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1447-52.