Karine Miki Yamashita

**Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos
induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***

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

Programa: Ciências Médicas

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2013

Karine Miki Yamashita

**Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos
induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***

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

Programa: Ciências Médicas

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Diogo e Nilda, por acreditarem em mim, pela confiança, incentivo e amor de sempre.

Às minhas irmãs, Luciana e Cíntia, pela eterna cumplicidade e companheirismo.

À pessoa mais incrível, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Marcelo L. Santoro pelo exemplo de profissional, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação durante esses anos.

Ao André F. Alves pelo auxílio fundamental durante os experimentos.

À Katia C. Barbaro pela enorme colaboração durante este trabalho, pelas dicas e sugestões.

À Fernanda, Karla, Lorraine e Sabrina por deixarem os dias mais alegres, pelas milhares de risadas, pelo apoio durante os experimentos e pela amizade insubstituível.

Aos meus pais, irmãs e a todos os meus familiares, que perto ou longe, sempre estiveram presentes nos meus projetos de vida.

Ao Ricardo, pela força incondicional em todos os momentos durante a realização deste projeto, pelo companheirismo e amor.

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Fisiopatologia pela convivência diária.

Ao Instituto Butantan e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

Ao auxílio financeiro da FAPESP (2010/02568-6, 2010/08162-1), CNPq (475924/2010-0) e CAPES.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando pessoa

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação 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 Annelise 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 estão de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Venenos e envenenamentos botrópicos	1
1.2. Famílias de proteínas do veneno botrópico	6
1.3. Hemostasia	9
1.4. Fator tissular (TF) e Isomerase de dissulfeto proteico (PDI)	13
1.5. Plaquetas e suas funções fisiológicas	14
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	20
3.3. Purificação de fibrinogênio de rato e produção e purificação de anticorpos específicos	20
3.3.1. Purificação de fibrinogênio de rato	21
3.3.2. Imunização de coelho com fibrinogênio de rato	22
3.3.3. Caracterização do anticorpo anti-fibrinogênio de rato	22
3.3.3.1. Titulação de anticorpos	22
3.3.3.2. Reconhecimento de proteínas pela IgG anti-fibrinogênio	23
3.4. Inibição das famílias de proteínas presentes no veneno de <i>B. jararaca</i>	24
3.4.1. Inibição de metaloproteinases	24
3.4.2. Inibição de serinaproteases	25
3.5. Dose mínima coagulante (DMC)	25

3.6. Protocolo de envenenamento	25
3.7. Coleta de Sangue	27
3.8. Coleta de amostras de tecidos	27
3.9. Avaliações da hemostasia	28
3.9.1. Hemograma e contagem plaquetária	28
3.9.2. Dosagem de fibrinogênio	28
3.9.3. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f)	29
3.9.4. Determinação do tempo de protrombina (TP)	30
3.9.5. Dosagem de fator VII	31
3.9.6. Dosagem de fator tissular plasmático, no pulmão e pele	31
3.9.7. Dosagem dos níveis de veneno circulante	32
3.10. Avaliação da lesão local	33
3.10.1. Dosagem de hemoglobina tecidual	33
3.10.2. Expressão proteica de fator tissular (TF) e isomerase de dissulfeto proteico (PDI)	34
3.11. Análises estatísticas	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterização do anticorpo anti-fibrinogênio de rato	36
4.1.1. Titulação de anticorpos anti-fibrinogênio de rato	36
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e verificação do reconhecimento da IgG anti-fibrinogênio de rato	36
4.2. Dose Mínima Coagulante dos diferentes tratamentos sobre o plasma citratado de coelho e fibrinogênio bovino	37
4.3. Hemorragia local	39
4.4. Dosagem dos níveis de veneno circulante	40
4.5. Hemograma e contagem plaquetária	42
4.6. Dosagem de fibrinogênio plasmático	46
4.7. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f)	48
4.8. Tempo de protrombina	49
4.9. Dosagem de fator VII	50

4.10. Dosagem de fator tissular plasmático, no pulmão e pele.....	51
4.11. Expressão de TF e PDI no local da administração s.c. do veneno	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente <i>Bothrops jararaca</i> adulta e distribuição da serpente <i>Bothrops jararaca</i> no Brasil.....	2
Figura 2. Manifestações locais e sistêmicas no envenenamento botrópico...	4
Figura 3. Esquema da cascata de coagulação com ativação pelas vias extrínseca e intrínseca.....	10
Figura 4. Estruturas das plaquetas de coelhos normais	16
Figura 5. Eventos plaquetários em resposta a uma lesão endotelial	17
Figura 6. Esquema do protocolo de envenenamento	26
Figura 7. Perfil eletroforético do fibrinogênio purificado de rato e reconhecimento de proteínas pela IgG anti-fibrinogênio.....	37
Figura 8. Hemorragia local.....	40
Figura 9. Dosagem dos níveis de veneno circulante	41
Figura 10. Contagem de eritrócitos e leucócitos	43
Figura 11. Contagem plaquetária e volume plaquetário médio (VPM).....	46
Figura 12. Níveis de fibrinogênio plasmático.	48
Figura 13. Dosagem de PDF/f	49
Figura 14. Tempo de protrombina.....	50
Figura 15. Dosagem de fator VII	51
Figura 16. Dosagem de fator tissular plasmático	52
Figura 17. Dosagem de fator tissular na pele e no pulmão.....	53
Figura 18. Análise densitométrica das bandas imunoreativas para expressão de fator tissular plasmático e PDI	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores da coagulação..... 11

Tabela 2. Efeito do tratamento do veneno de *B. jararaca* com inibidores de metaloproteinases ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) e serinaproteases (AEBSF), sobre a sua atividade coagulante..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AEBSF	“4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride”
ATP	Trifosfato de adenosina
ATIII	Antitrombina III
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Tetra-hidrocloreto de 3,3' diaminobenzidina
DMC	Dose mínima coagulante
DMC-P	Dose mínima coagulante sobre o plasma de coelho citratado
DMC-F	Dose mínima coagulante sobre o fibrinogênio bovino
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato-desidrogenase
GP	Glicoproteína;
Na ₂ -EDTA	Ácido etileno diamino tetracético, sal dissódico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDF/f	Produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina
PDI	Isomerase de dissulfeto proteico
s.c.	Subcutâneo
TF	Fator tissular
TP	Tempo de protrombina
VBj	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>
VMP	Volume médio plaquetário
vWF	Fator de von Willebrand

RESUMO

Yamashita K.M. *Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente Bothrops jararaca*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Acidentes pela serpente *Bothrops jararaca* (Bj) causam distúrbios hemostáticos em pacientes. Sabe-se que a fisiopatologia desses distúrbios é complexa, porém não se conhece a relevância das duas principais famílias de enzimas presentes no veneno de Bj com atividade anti-hemostática, as metaloproteinases e serinaproteases, para promover esses distúrbios. Além disso, a injúria local induzida no local da inoculação do veneno poderia estimular a liberação de fator tissular (TF) na circulação sanguínea, favorecendo a coagulopatia. Assim, o objetivo deste projeto foi investigar a contribuição das metaloproteinases e serinaproteases do veneno de Bj e a expressão de TF para a gênese dos distúrbios hemostáticos, utilizando um modelo experimental em ratos. O veneno de Bj foi previamente incubado com Na₂-EDTA 13 mM ou AEBSF 4 mM para inibir as metaloproteinases e serinaproteases, respectivamente, e administrado pelas vias s.c. ou i.v. Após 3 e 6 h, os parâmetros hemostáticos e de expressão proteica de TF e isomerase de dissulfeto proteico (PDI) foram avaliados. Os níveis de veneno circulante se elevaram mais rapidamente no grupo injetado pela via i.v., e o tratamento do veneno com Na₂-EDTA ou AEBSF não reduziu os níveis circulantes de veneno em comparação ao grupo controle com veneno. Em comparação com animais tratados com salina, houve uma queda abrupta na contagem plaquetária em todos os grupos e tempos administrados com veneno de Bj, sendo o grupo administrado pela via i.v. o que apresentou uma queda de maior intensidade. O pré-tratamento do veneno com o AEBSF não impediu o consumo plaquetário e somente o Na₂-EDTA parcialmente reverteu a plaquetopenia. Por outro lado, o veneno não tratado causou consumo de fibrinogênio plasmático, geração de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina, prolongamento do tempo de protrombina (TP) e hemorragia no local de inoculação do veneno. No entanto, o Na₂-EDTA, e não o AEBSF, bloqueou completamente esses parâmetros. Não houve redução dos níveis de fator VII ao longo do envenenamento, e seus níveis apresentou um notável aumento nos animais envenenados no grupo 6 h s.c. Ratos envenenados apresentaram notável aumento dos níveis do TF plasmáticos, que foi inibido pelo pré-tratamento com o Na₂-EDTA. Houve também aumento da expressão de TF no pulmão e pele. Nos grupos injetados com veneno de Bj em 6 h ocorreu uma redução da expressão de PDI. Os resultados mostram que as metaloproteinases são componentes essenciais para o desencadeamento da coagulopatia do envenenamento. No entanto, as metaloproteinases e serinaproteases não estão diretamente envolvidas na gênese da plaquetopenia induzida pelo veneno de Bj e outros mecanismos/toxinas parecem estar envolvidos. Os resultados também demonstraram o aumento dos níveis de TF plasmático durante o envenenamento, similar àquele observado na coagulação intravascular disseminada, o que sugere a importância da geração de TF como um mecanismo para promover distúrbios sistêmicos da coagulação.

Descritores: coagulação sanguínea; fator tissular; plaquetas; veneno, *Bothrops jararaca*.

ABSTRACT

Yamashita K.M. *Pathogenesis of systemic hemostatic disturbances in Bothrops jararaca snake envenomation*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Bites by *Bothrops jararaca* (Bj) snakes evoke hemostatic disturbances in patients. The pathophysiology of such disturbances is complex, but the importance of the major enzyme families with anti-hemostatic activity, found in Bj venom, i.e., metalloproteinases and serine proteinases, to promote them is not known. Moreover, the local injury induced at the site of venom inoculation might also stimulate tissue factor (TF) release into bloodstream, favoring the coagulopathy. The aim of this study was to investigate the contribution of metalloproteinases and serine proteinases of Bj venom, as well the TF expression to the genesis of hemostatic disturbances, using an experimental model in rats. Crude Bj venom was previously incubated with 13 mM Na₂-EDTA or 4 mM AEBSF to inhibit metalloproteinases and serine proteinases, respectively, and administered s.c. or i.v. into rats. After 3 and 6 h, hemostatic parameters and TF and protein disulfide isomerase (PDI) expression were evaluated in plasma and samples of skin and lungs. Circulating venom levels increased more rapidly in i.v. group, and neither Na₂-EDTA nor AEBSF treatment reduced the circulating venom levels in comparison with the control group. Platelet counts showed a marked decrease in all groups administered with Bj venom in comparison with saline-treated rats; the fall in platelet counts was more intense in animals administered i.v. with Bj venom. The pre-treatment of venom with AEBSF failed to block the fall in platelets count, and only Na₂-EDTA minimally reversed thrombocytopenia. Nonetheless, non-treated venom provoked plasma fibrinogen consumption, generation of fibrin(ogen) degradation products, prolongation of prothrombin time (TP), and hemorrhage at the site of venom inoculation. However, Na₂-EDTA, but not AEBSF, completely blocked these parameters. Factor VII levels were not reduced during envenomation, and they showed a marked increase in envenomed rats at 6 h in the s.c. group. Envenomed rats showed a marked increase in plasma TF levels, which was also blocked by Na₂-EDTA. In addition, TF expression was increased in the lung and skin samples. PDI expression in skin was reduced at 6 h in all groups treated with venom. These findings demonstrate that metalloproteinases are essential venom components involved in the Bj-induced coagulopathy. Nonetheless, metalloproteinases and serine proteases had no direct involvement in the genesis of Bj-induced thrombocytopenia and other venom mechanisms/toxins seem to be associated therein. High levels of TF in plasma may occur during snake envenomation, so that the etiopathogenesis of coagulopathy in snake envenomation resembled that of true disseminated intravascular coagulation syndrome.

Descriptors: blood coagulation; tissue factor; platelets; venom, *Bothrops jararaca*.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos casos notificados de envenenamentos ofídicos, evidenciando a grande relevância dessas serpentes na área médica. O veneno da serpente *Bothrops jararaca* pode induzir efeitos fisiopatológicos graves, incluindo distúrbios hemostáticos que podem causar coagulopatias, alterações da função plaquetária e plaquetopenia, uma das manifestações mais frequentes apresentadas nos indivíduos envenenados (1).

1.1. Venenos e envenenamentos botrópicos

Desde a Antiguidade se reconhece que as serpentes são capazes de alterar o processo hemostático normal. De forma similar, os primeiros cronistas notaram que muitas serpentes presentes no território brasileiro eram capazes de induzir sangramentos. Entre as principais serpentes peçonhentas brasileiras, quatro são consideradas de interesse em saúde pública devido ao elevado número de indivíduos acidentados, destacando-se as dos gêneros *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (coral) (2).

As serpentes estão classificadas no reino Animalia, filo Chordata, classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Ophidia, existindo uma ampla variedade de espécies no Brasil (3). Segundo dados do Ministério da Saúde, a incidência é de 15,5 acidentes por serpentes peçonhentas a cada 100 mil habitantes, sendo que 29.635 casos de acidentes por serpentes foram registrados somente no ano de 2010. Essas altas taxas resultam em mais de 100 mortes anualmente no Brasil e a taxa de sequelas permanentes ainda permanece desconhecida (4).

No país, a maior ocorrência de acidentes ofídicos ocorre na região Sudeste, onde os acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* correspondem ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica (5).

No Estado de São Paulo, acidentes pela serpente *Bothrops jararaca* (Figura 1a) são de grande importância à saúde pública, sendo ela responsável por 97,5% dos casos de envenenamentos (1). Essa serpente está distribuída nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Figura 1b).

A serpente *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) é popularmente conhecida como jararaca e pertencente à família Viperidae. São caracterizadas pela presença de um aparelho inoculador do tipo solenóglifo e cabeça triangular. Possui coloração variada, apresentando tons castanhos claros a preto, com manchas em forma de “v” invertido ao longo do corpo; o tamanho médio dessas serpentes é de um metro aproximadamente, sendo que os maiores exemplares chegam a 1,5 m. É vivípara, possui hábitos terrestres, atividade noturna e alimenta-se de pequenos roedores (5).

Figura 1. (a) Serpente *Bothrops jararaca* adulta. (Foto cedida por Carolina Cavilac, 2008) e (b) Distribuição da serpente *Bothrops jararaca* no Brasil. FONTE: FUNASA, 2001 (3).

Entre as atividades características dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, pode-se citar as atividades (a) coagulante, decorrente da ação dos ativadores de fator X e II (protrombina) da cascata de coagulação e de enzimas trombinas-símbles, (b) proteolítica relacionada à atividade pró-inflamatória e (c) hemorrágica, devida à ação de hemorraginas que

provocam lesões na membrana basal dos capilares, podendo ocasionar sangramento sistêmico (5). Essas atividades apresentam alta complexidade uma vez que diferentes toxinas são capazes de ativar-se sinergicamente para induzir um determinado efeito e deve-se considerar que uma determinada toxina pode apresentar atividades distintas.

Sabe-se que o veneno da serpente *B. jararaca* é constituído por diversos componentes, sendo mais de 80% do peso seco do veneno constituído basicamente por enzimas e toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas (6). As frações não-proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres, porém, a função de cada um desses componentes bem como o mecanismo de sua interação durante o envenenamento humano ainda não é totalmente conhecida (5).

Em geral, a picada nos acidentes ofídicos constitui-se em inoculação subcutânea ou intramuscular de veneno na vítima. Desta forma, tendo em vista as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos picados pelas serpentes *Bothrops* sp., essas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: os sinais locais e sistêmicos (Figura 2). Os sinais locais, manifestados na região próxima ao local da picada, incluem sangramento local, edema, equimose, dor, linfadenomegalia e o aparecimento de bolhas. Distúrbios funcionais permanentes e até mesmo a perda do membro acometido podem ocorrer no caso de necrose local, uma das complicações mais sérias do envenenamento pela *B. jararaca*. Em casos mais graves, há necessidade de amputação, o que gera invalidez permanente (1).

Os sinais sistêmicos, aqueles manifestados à distância do local da picada, incluem os sangramentos (gengivorragia, hematúria, epistaxe, petéquias, equimoses e púrpuras), incoagulabilidade sanguínea e a plaquetopenia (1, 7). A incoagulabilidade sanguínea ocorre devido ao acentuado consumo dos fatores da coagulação, especialmente do fibrinogênio plasmático, causado pela ação de diversas toxinas presentes no veneno da *B. jararaca* (8, 9). Outras manifestações sistêmicas do envenenamento por essa serpente incluem vômitos, sudorese, hipotensão

arterial, insuficiência renal e choque (1, 7, 10). Com base nessas manifestações clínicas e a fim de facilitar a conduta terapêutica a ser empregada, os acidentes botrópicos são classificados em leve, moderado e grave (2). Casos de mortes são raras e são frequentemente associados com hemorragia massiva, choque e insuficiência renal aguda (1).

Figura 2. Manifestações locais e sistêmicas no envenenamento botrópico: (a) Edema; (b) Equimose; (c) Necrose; (d) Hemorragia gengival; (e) Hematúria. (Doação: Dra. Fan Hui Wen, Hospital Vital Brazil, 2009).

No veneno de *B. jararaca*, diversas proteínas e enzimas interferem com as plaquetas, causando distúrbios na função plaquetária e plaquetopenia, tanto em modelos animais como em humanos, contribuindo para o processo de desestabilização da hemostasia que ocorre nesse envenenamento (1, 11-14).

A plaquetopenia é caracterizada pela redução no número de plaquetas circulantes e consiste em uma importante causa de sangramento generalizado. Os valores de referência para a contagem normal de plaquetas no homem variam entre $150-400 \times 10^9/L$. Visto que as plaquetas apresentam participação importante no processo hemostático, no caso de acidente ofídico causado por serpentes do gênero *Bothrops*, as plaquetas

apresentam extrema importância no período que segue o envenenamento. Vários graus de plaquetopenia podem ser comumente observados em pacientes envenenados por espécies de viperídeos e alguns elapídeos e colubrídeos, podendo ser classificados como leve, moderado ou grave (1).

A ação do veneno botrópico sobre a secreção plaquetária é temporária, porém sua ação sobre o processo de agregação plaquetária é duradoura (11). Ainda sabe-se que a relação entre plaquetopenia e sangramento sistêmico espontâneo depende particularmente do veneno envolvido, da inativação da função plaquetária e da gravidade da plaquetopenia. Porém, a associação entre a plaquetopenia e o tempo prolongado de coagulação tem sido sugerida com o aumento do risco de sangramento nos indivíduos envenenados (1, 15).

O tratamento específico para os envenenamentos ofídicos consiste na administração intravenosa do antiveneno o mais precocemente possível considerando as manifestações clínicas do paciente. Cada ampola do soro antibotrópico contém 10 mL e é capaz de neutralizar 50 mg de veneno. O soro é produzido a partir da imunização de cavalos com a mistura de venenos de cinco espécies do gênero *Bothrops*: *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%), *B. neuwiedi* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%) (16). Além disso, atualmente já é bastante conhecido que o tempo decorrido entre o acidente e a soroterapia é o fator prognóstico mais importante e geralmente está relacionado à gravidade do envenenamento (5).

No entanto, apesar da existência do soro antibotrópico, o tratamento soroterápico não é 100% eficaz no controle das manifestações locais, como é o caso do edema, da hemorragia local e de lesões necróticas, que se desenvolvem no local da inoculação do veneno. Porém, o tratamento se mostra eficaz para controle dos sintomas sistêmicos (17), sendo que a administração intravenosa do antiveneno específico melhora a contagem plaquetária dos pacientes dentro de seis horas e os níveis de fibrinogênio dentro de dezoito horas, uma vez que são capazes de neutralizar as toxinas

presentes no veneno responsável pela plaquetopenia e pela incoagulabilidade sanguínea (1).

Exames laboratoriais como o tempo de coagulação, hemograma (contagem plaquetária), exame de urina e a técnica imunoenzimática ELISA (detecção de antígenos do veneno botrópico) (2, 5) podem ser extremamente úteis para o prognóstico do paciente ao auxiliar a conduta médica. O quadro de plaquetopenia, por exemplo, pode caracterizar a possibilidade de futuras complicações locais. Já a contagem total e diferencial de leucócitos é também extremamente útil no suporte clínico dos pacientes envenenados, que revelam leucocitose e neutrofilia, quadro que está ligado diretamente à gravidade do envenenamento. Também é possível utilizar a avaliação da contagem absoluta de neutrófilos e eosinófilos para acompanhar a progressão de complicações locais, tal como a necrose (1).

1.2. Famílias de proteínas do veneno botrópico

As principais famílias de proteínas presentes nos venenos da serpente *B. jararaca* são as metaloproteinases, serinaproteases, lectinas do tipo C e fosfolipases A₂ (18), que em grande medida são responsáveis pelo desencadeamento dos distúrbios observados no envenenamento por esta espécie. Na maioria dos venenos do gênero *Bothrops*, a ação coagulante ocorre devido à ação de enzimas capazes de hidrolisar o fator X (metaloproteinases), a protrombina (metaloproteinases) e/ou o fibrinogênio (serinaproteases) (9). Essas enzimas prejudicam o processo de coagulação normal e causam distúrbios hemostáticos, caracterizados pelo consumo dos fatores da coagulação e pela geração de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f), o que leva à incoagulabilidade sanguínea (1, 10, 19). Já a ação hemorrágica e pró-inflamatória são decorrentes da ação das metaloproteinases do veneno (18, 20, 21).

As metaloproteinases presentes no veneno botrópico pertencem a uma superfamília de enzimas cuja estrutura secundária é estabilizada pela ligação a um átomo de zinco (6) e são responsáveis por diversas atividades biológicas de venenos ofídicos. Estima-se que aproximadamente 53% da

composição do veneno de viperídeos são metaloproteínases, o que sugere um potencial papel dessa classe de proteínas nas patologias associadas ao envenenamento (18). Entre suas principais atividades nos venenos botrópicos, pode-se citar a fibrinogenolítica, a colagenolítica e a hemorrágica (22). As metaloproteínases são classificadas em P-I, P-II e P-III, de acordo com a presença ou ausência de determinados domínios não-proteínases, como observado através da transcrição de mRNA e de proteínas isoladas presentes no veneno. As metaloproteínases do tipo P-III, por exemplo, são mais hemorrágicas que as metaloproteínases do tipo P-I, sendo que as do tipo P-III são capazes de induzir sangramentos sistêmicos mesmo sem a necessidade da ação simultânea de componentes que promovam distúrbios na coagulação. No entanto, provavelmente, enzimas e toxinas que promovam a desfibrinação e desordens plaquetárias potencializam o efeito hemorrágico iniciado pelas metaloproteínases (23); diferentemente, as do tipo P-I são incapazes de induzir sangramento sistêmico (24). Além disso, as metaloproteínases também são responsáveis pela atividade pró-coagulante (ativadores de fator II e X) do veneno botrópico (25). Agentes quelantes como o EDTA e a o-fenantrolina, ao retirarem o íon zinco que dá estabilidade às metaloproteínases, eliminam completamente a atividade biológica das metaloproteínases (26).

As serinaproteases do veneno botrópico são enzimas que apresentam um resíduo serina altamente reativo, sendo a segunda classe de toxinas mais abundantes presente no veneno de *B. jararaca*, depois das metaloproteínases (18). As serinaproteases são capazes de agir na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (9), possuindo grande diversidade de isoformas, de tal forma que pequenas mudanças em suas sequências ou mesmo em suas estruturas têm um grande impacto sobre sua atividade (27). Os principais componentes desta classe no veneno de *B. jararaca* são: (a) a PA-BJ, uma potente enzima pró-agregante plaquetária (28, 29); (b) as enzimas trombina-símbles, que são caracterizadas por apresentarem uma única cadeia proteica e por hidrolisarem diretamente o fibrinogênio circulante em monômeros de fibrina,

sem a necessidade de geração de trombina (10). Entre as enzimas trombina-símbies podem-se citar a KN-BJ 1 e 2 (30), a TL-BJ 1, 2 e 3 (31) e a botrombina (32); (c) as α -fibrinogenases, que são serinaproteases não-coagulantes e termoestáveis, e que degradam a cadeia A α do fibrinogênio (33). Inibidores dessa classe de enzimas incluem o 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), diisopropilfluorofosfato (DFP) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), que reagem com a serina do sítio ativo, inativando irreversivelmente essas proteases (25, 30).

Outra classe de toxina presente no veneno botrópico são as lectinas do tipo C, que são proteínas não-enzimáticas, capazes de ligações específicas e não-covalentes com carboidratos, e que interferem no processo de reconhecimento célula-célula e célula-moléculas. Apresentam ampla variedade de propriedades biológicas e podem apresentar atividade anticoagulante, pró-coagulante e agonista ou antagonista da ativação plaquetária (34). As lectinas do tipo C mais abundantes no veneno de *B. jararaca* são: (a) o inibidor dos fatores IX/X da coagulação (35); (b) a botrojaracina, um antagonista da trombina (9, 36); (c) as proteínas que agem na inibição da agregação plaquetária, como a proteína ligadora de glicoproteína Ib (37); e (d) proteínas que aglutinam as plaquetas, como a botrocetina, anteriormente denominada de coaglutinina, que causa agregação das plaquetas sanguíneas na presença do fator de von Willebrand (38).

Outra classe de enzimas descrita recentemente, tanto em glândulas de veneno como em venenos de serpentes, são as isomerases de dissulfeto proteico (PDI) (39-43), que são similares às PDI de mamíferos. As PDI estão envolvidas no processo de ativação do TF, e são imprescindíveis para promover o dobramento e estabilidade de proteínas ricas em pontes de dissulfeto. No entanto, até o momento não se sabe se essas proteínas existentes no veneno desempenham alguma função durante o envenenamento. Uma das funções hipotéticas da PDI do veneno seria a

ativação do TF presente no tecido subcutâneo, contribuindo para a atividade pró-coagulante do veneno.

1.3. Hemostasia

A hemostasia é um sistema complexo – que envolve a participação de fatores reológicos, parede vascular, plaquetas e outras células sanguíneas, fatores da coagulação, fibrinólise e diversos inibidores da coagulação e fibrinólise – que é responsável tanto por manter o sangue fluido em condições fisiológicas, quanto interromper a perda de sangue quando há uma lesão vascular (44).

Quando a monocamada de células endoteliais que recobre os vasos sanguíneos é rompida e a matriz subendotelial é exposta, inicia-se uma série de eventos que entram em funcionamento visando minimizar a perda de sangue e manter a circulação sanguínea. Inicialmente as plaquetas se aderem às proteínas da matriz subendotelial, o que leva à ativação plaquetária, com a formação de um agregado plaquetário instável. Graças à ativação simultânea do sistema de coagulação durante esse processo, forma-se uma rede de fibrina capaz de estabilizar o agregado plaquetário, formando o tampão hemostático definitivo (45).

Desta forma, a hemostasia pode ser dividida em hemostasia primária e hemostasia secundária. A primária ocorre quando há interação entre os componentes celulares, tais como a parede do vaso lesado e as plaquetas, envolvendo uma série de eventos que incluem a adesão das plaquetas ao subendotélio, ativação, mudança de forma e a liberação do conteúdo granular das plaquetas. Já os fatores plasmáticos, cofatores, proteínas tissulares, serinaproteases, fosfolípidos e íons cálcio participam da hemostasia secundária (46, 47).

A ativação do sistema de coagulação simultaneamente à lesão é de fundamental importância durante o reparo hemostático. A cascata de coagulação sanguínea (Figura 3) foi didaticamente dividida em duas vias, a extrínseca (principal via para o início da sua ativação) e a intrínseca, sendo que as duas vias são fisiologicamente interdependentes, e suas proteínas

plasmáticas pró-coagulantes referidas como fatores e designadas por numerais romanos (Tabela 1) (48), em sua maioria, são enzimas que circulam normalmente na sua forma inativa, denominadas zimogênios (49). De um modo geral, a cascata ocorre na superfície da membrana fosfolipídica e durante esse processo o cálcio age como um importante fator que juntamente com outros fatores ativam as etapas subsequentes da cascata com o objetivo de estancar o sangramento com a formação da rede de fibrina (50).

Figura 3. Esquema da cascata de coagulação com ativação pelas vias extrínseca e intrínseca. FONTE: Mann, K.G., 2003 (51).

Tabela 1. Fatores da coagulação. FONTE: Dacie e Lewis, 1991.

Fator	Nome
I	Fibrinogênio
II	Protrombina
V	Pró-acelerina
VII	Pró-convertina
VIII	Fator anti-hemofílico
IX	Fator de Christmas
X	Fator de Stuart
XI	-
XII	Fator de Hageman
XIII	Fator estabilizador de fibrina

A descrição desse modelo didático da cascata foi extremamente útil nos estudos clínicos, como para interpretações de testes laboratoriais para anormalidades plasmáticas. Desta forma, deficiências na via extrínseca ou comum da coagulação podem ser avaliadas utilizando o tempo de protrombina (TP), enquanto que deficiências na via intrínseca podem ser avaliadas utilizando o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) (50).

Assim, para a formação da rede de fibrina em resposta a uma injúria vascular, a exposição e a ativação de uma proteína iniciadora, o fator tissular (TF), é um componente crucial no local do dano vascular para ativação da via extrínseca. O processo de coagulação inicia-se com a formação de um complexo com o fator VIIa circulante, pertencente ao grupo das proteínas dependentes da vitamina K (incluem também os fatores IX, X, protrombina e a proteína C) (45). Esse complexo ativa o fator X (via comum) que, por sua vez, leva à formação de pequenas quantidades de trombina, através do complexo protrombinase (52). Essa enzima apresenta diversas atividades biológicas, já que é a principal enzima envolvida na coagulação sanguínea, agregação plaquetária (é o agonista plaquetário mais potente) e no estímulo mitogênico e secretor para uma variedade de tipos celulares (53). Por outro

lado, a via intrínseca da coagulação ou via de ativação por contato promove uma via independente do fator VII da cascata da coagulação. Esta via inicia-se quando a pré-caliceína, o cininogênio de alto peso molecular, o fator XI e XII são expostos a uma superfície de carga negativa, transformando a pré-caliceína em caliceína que age na ativação do fator XII, XI, IX e consequentemente no fator X, que levará a geração de fibrina (45, 50).

O fator VII é uma vitamina K dependente com papel central uma vez que sua associação com o fator tissular dá início à coagulação sanguínea. O fator VII é sintetizado pelo fígado e secretado na forma de cadeia única de glicoproteína de aproximadamente 48 kDa, sendo sua maioria circulante no plasma na forma de zimogênio e apresenta a meia-vida mais curta dentre os fatores pró-coagulantes de cerca de 3 a 6 h (54). Ainda na cascata de coagulação, o fator FVII mostra-se importante não só para ativação da via extrínseca, o complexo TF/FVIIa também pode ativar o fator IX da via intrínseca que levará a geração de fibrina (51).

No entanto, diversos estudos subsequentes surgiram demonstrando a importância da contribuição da superfície celular para o processo de formação de fibrina *in vivo*, sugerindo um modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares, composto por dois componentes celulares: o fator tissular e as plaquetas. Esse modelo foi dividido em fases, visto que a formação de trombina ocorre em etapas. A primeira delas é a iniciação (ocorre na célula expressora de TF); assim, quando há uma injúria o fator VIIa se liga rapidamente ao TF (complexo TF-VIIa), resultando na geração de pequenas quantidades de fator Xa e trombina que se difundem pela superfície da célula para as plaquetas. A segunda fase é a amplificação: a pequena quantidade de trombina gerada na superfície celular faz com que as plaquetas se ativem, levando a ativação de fator V, VIII e XI, e concomitantemente, a adesão plaquetária ao colágeno e a outros componentes da matriz extracelular. O complexo TF-VIIa também ativa fator IX levando a propagação da cascata e a grande produção de trombina. A última fase consiste na propagação, que ocorre na superfície das plaquetas ativadas: a liberação do conteúdo granular resulta no recrutamento de

plaquetas para o local de lesão e as enzimas geradas nas fases iniciais se reúnem na superfície da membrana pró-coagulante da plaqueta ativada para a formação do complexo protrombinase, levando à geração de grandes quantidades de trombina na plaqueta (rede de fibrina estável) (50, 55). Além do mais, anticoagulantes naturais também agem a fim de controlar a disseminação da ativação da coagulação, são eles: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C, proteína S e antitrombina.

Com o objetivo de manter o sistema hemostático em equilíbrio, o sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é intimamente relacionado à ativação da coagulação. A fibrinólise nada mais é que a degradação da fibrina em produtos de sua degradação, mediada pela plasmina. O sistema é composto por proteases plasmáticas responsáveis pela hidrólise da cadeia peptídica do plasminogênio, resultando em plasmina, uma enzima em sua forma ativa, gerada a partir de uma proenzima inativa (plasminogênio). As enzimas desse sistema são o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). Por outro lado, a inibição do sistema fibrinolítico ocorre pela ação do inibidor de ativador de plasminogênio (PAI), a α_2 -antiplasmina e o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) (45).

1.4. Fator tissular (TF) e Isomerase de dissulfeto proteico (PDI)

O TF é uma glicoproteína integral da membrana celular, normalmente sem acesso ao compartimento vascular. Ele está localizado, sob condições basais, no músculo liso, fibroblasto e macrófagos e é expresso pelos macrófagos e pelas células endoteliais pela indução de endotoxinas e citocinas, tais como interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF). É composto por uma única cadeia polipeptídica de 47 kDa que funciona como cofator para o fator VII na via extrínseca e para o fator V no final da “via comum” (45, 56).

Existem várias formas do TF, conforme o *splicing* dos éxons e íntrons do seu gene. A forma mais expressa é uma proteína transmembrânica (57). O TF é constitutivamente expresso em várias células extravasculares, no

entanto, tem sido demonstrado que apenas uma pequena fração encontra-se na superfície celular na forma funcionante, sendo sua maioria presente na forma não-funcional (inativa ou encriptada). Ainda, permanece desconhecido como o TF funcionante na coagulação difere da forma inativa, ou quais mecanismos estão envolvidos durante essa ativação. Estudos sugerem que sua forma inativa contém duas cisteínas reduzidas localizadas na porção Cys 186-Cys 209 e que sua ativação envolve a formação de pontes dissulfeto nesse par (58). Altos níveis de TF foram observados no pulmão e cérebro; níveis intermediários foram observados no rim e coração; baixos níveis foram observados no rim e timo; já no baço, intestino e músculo esquelético não foram detectados expressão de mRNA para TF (59).

A promoção da atividade coagulante do TF é mediada pela isomerase de dissulfeto proteico (PDI), uma enzima capaz de catalisar todas as reações envolvendo a formação, clivagem e isomerização de pontes dissulfeto. A PDI pertence à família das oxiredutases e é liberada pelas plaquetas aderidas e pelas células da parede vascular rompida, após o desnudamento endotelial causado por lesões em vasos sanguíneos (56, 60-63). Os membros da família PDI são encontrados no retículo endoplasmático, onde desempenham importante função durante a síntese protéica. Contudo, as plaquetas estão entre as células que expressam e secretam PDI e outras tiol-isomerases em sua superfície após a ativação plaquetária em resposta ao estímulo da trombina (64). No entanto, um estudo demonstrou que a maioria das PDI das plaquetas é intracelular, onde estão localizadas exclusivamente no sistema tubular denso (65).

1.5. Plaquetas e suas funções fisiológicas

As plaquetas são discos bicôncavos e anucleados, oriundas do processo da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos e estão presentes em quantidades superiores a todos os leucócitos na circulação. São liberadas na circulação pela ação das citocinas, tais como a interleucina (IL)-6 e trombopoetina e circulam no sangue humano durante 7 a 10 dias (45). As plaquetas são compostas por grânulos α , corpos densos,

lisossomos, mitocôndrias e glicogênio, um sistema tubular denso, um sistema de canais abertos, microtúbulos e citoesqueleto (Figura 4), que foram divididas em quatro regiões morfológicamente distintas: zona periférica, zona sol-gel, sistema de membranas e zona de organelas (66, 67).

A zona periférica representa a região mais externa da plaqueta, que está em contato com o meio extracelular. A zona sol-gel consiste na matriz do citoplasma plaquetário, sendo responsável pelo sistema contrátil relacionado com a mudança de forma, emissão de pseudópodes, contração interna e secreção. O sistema de membranas é composto pelo sistema de canais abertos e pelo sistema tubular denso, que estão distribuídos de forma uniforme por todo o citoplasma plaquetário (67) e permite a rápida liberação do conteúdo granular para o meio extracelular (45). Já a zona de organelas é constituída pelos grânulos α , corpos densos, peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias.

O papel mais estudado das plaquetas é sua participação na hemostasia, especialmente aquele relacionado à formação do tampão plaquetário com intuito de cessar o sangramento (45). As plaquetas são capazes de expressar diversos receptores de membrana e de secretar considerável quantidade de substâncias biologicamente ativas. Elas apresentam em sua estrutura diferentes tipos de grânulos – grânulos α , lisossomos e corpos densos (45). Dentre os fatores armazenados pelos grânulos plaquetários pode-se citar: (a) dos corpos densos, ADP, ATP, serotonina, cálcio e pirofosfato; (b) dos grânulos α – organelas presentes em maior número no citoplasma plaquetário, caracterizadas por apresentarem proteínas de estoque em seu interior -, proteínas de adesão (fibrinogênio, fibronectina, vWF, trombospondina, vitronectina e P selectina), fatores de crescimento (PDGF e TGF- β), quimiocinas (RANTES, fator plaquetário 4, SDF-1, CXCL5), fatores semelhantes a citocinas (IL1- β , CD40L, β -tromboglobulina) e fatores da coagulação e fibrinólise (fatores V, XI, inibidor do ativador de plasminogênio 1, plasminogênio, proteína S) (68).

Figura 4. Estruturas das plaquetas de coelhos normais, em (a) corte longitudinal e (b) transversal. α -grânulo α ; DB- corpo denso, DTS- sistema tubular denso, G- partículas de glicogênio, M- mitocôndria, MT- microtúbulos, OCS- sistema de canais abertos. Barras = 0,5 μ m. FONTE: Santoro, 1994 (12).

Desta forma, durante a resposta a uma lesão endotelial (Figura 5), as plaquetas são ativadas pela interação com substratos trombogênicos e com diversos agonistas liberados ou gerados no local da lesão, perdem sua forma discóide e emitem pseudópodos em questão de segundos. Inicialmente as plaquetas se aderem às proteínas da matriz subendotelial, especialmente ao colágeno (componente mais trombogênico da matriz extracelular), ligando-se diretamente a receptores plaquetários que medeiam a adesão, ativação e agregação plaquetárias. Neste momento, a ligação do

fator de von Willebrand (vWF) ao colágeno é de extrema importância para o recrutamento plaquetário ao local lesado, que forma uma ponte entre a glicoproteína Ib (GPIb) da sua membrana e o colágeno subendotelial exposto (44, 45).

Nesse processo de ativação plaquetária, o complexo glicoproteico GP IIb/IIIa, o receptor mais abundante na membrana plaquetária e existente exclusivamente em plaquetas, sofre uma modificação estrutural, promovendo a ligação do fibrinogênio à membrana plaquetária e levando à agregação plaquetária (45). A secreção do conteúdo granular plaquetário durante a adesão e a agregação plaquetárias, e a geração de tromboxano A_2 (um potente agonista plaquetário e vasoconstritor secretado pelas plaquetas) são importantes estímulos à agregação plaquetária e formação do tampão hemostático primário (1).

Figura 5. Eventos plaquetários em resposta a uma lesão endotelial. Ancoramento e deslocamento plaquetário, adesão ao subendotélio, secreção do conteúdo granular, agregação e formação da rede de fibrina.

Apesar do papel chave das plaquetas na hemostasia, estudos têm evidenciado que as plaquetas promovem ativamente o processo inflamatório, por serem as primeiras células a serem recrutadas em locais de lesão e infecção tecidual e por promoverem ativamente o processo inflamatório (69-71). Além do mais, estudos mostram a participação das plaquetas durante processos hiperalgésicos induzido pela carragenina e pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, onde animais plaquetopênicos ou com inibição da função plaquetária apresentaram uma drástica redução da hiperalgesia (72).

Recentemente, tem-se demonstrado que as plaquetas são também capazes de processar pré-mRNA e traduzir o mRNA em proteínas, inclusive sintetizar TF (73-76).

2. OBJETIVOS

Os acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* apresentam grande relevância epidemiológica, uma vez que representam os acidentes ofídicos de maior incidência no país. Tendo em conta que os distúrbios hemostáticos são os distúrbios sistêmicos mais frequentes em indivíduos envenenados pela *B. jararaca*, este estudo teve como principal objetivo investigar os mecanismos fisiopatológicos que induzem plaquetopenia e coagulopatia neste acidente, utilizando o rato como modelo experimental. Assim:

- (1) Para compreender a importância de metaloproteinases e serinaproteases - as duas principais classes de toxinas presentes no veneno de *B. jararaca* - que estão intrinsecamente ligadas à patogênese dos distúrbios hemostáticos, este veneno foi incubado especificamente com inibidores para estas duas famílias de enzimas e parâmetros hemostáticos foram avaliados durante o envenenamento;
- (2) Para avaliar a importância da lesão local na indução da plaquetopenia e coagulopatia, duas vias de inoculação (intravenosa e subcutânea) de veneno foram utilizadas;
- (3) Para testar se há geração de TF durante o envenenamento, ensaios quantitativos de TF e PDI em amostras de plasma, pulmão e pele foram realizados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos, com peso entre 220 a 250 g, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos com livre acesso à ração e água. Coelhos New Zealand, com peso de 2,5-3,0 kg, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (Protocolo nº 685/09) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 123/11).

Quando necessário, os animais foram anestesiados com uma solução composta por cloridrato de xilazina (2%) (Calmiun) (1 parte) e quetamina (50 mg/mL) (Holliday) (4 partes), utilizando-se uma dose de 1 mL dessa solução/kg peso/volume pela via intraperitoneal. O coelho imunizado foi anestesiado com tiopental sódico (30 mg/kg) pela via intravenosa.

3.2. Veneno de *Bothrops jararaca*

O *pool* de veneno liofilizado de espécimes adultos da serpente *Bothrops jararaca* foi obtido do Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. O veneno foi mantido a -20 °C e no momento do uso pesado e dissolvido em solução salina estéril (1 mg/mL).

3.3. Purificação de fibrinogênio de rato e produção e purificação de anticorpos específicos

Abaixo, apresenta-se inicialmente (itens 3.3.1 a 3.3.3) a purificação de fibrinogênio de rato, produção, purificação e a caracterização de anticorpos específicos anti-fibrinogênio de rato utilizado no protocolo para

avaliação dos níveis circulantes de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f).

3.3.1. Purificação de fibrinogênio de rato

O fibrinogênio de rato foi purificado segundo a metodologia descrita por Jakobsen & Kierulf (77). O sangue foi obtido da coleta de sangue de 5 ratos pela punção da artéria aorta abdominal, após anestesia, utilizando como anticoagulante o citrato de sódio 3,8% na diluição de 1/10. No momento da purificação do fibrinogênio, o pool de plasma foi descongelado e incubado com sulfato de magnésio e sulfato de bário para a retirada dos fatores da coagulação dependentes da vitamina K. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1900 *g* durante 15 min a 4 °C. Do sobrenadante, fez-se a purificação do fibrinogênio por meio da precipitação com a β -alanina 6 M e o sobrenadante foi dialisado contra NaCl 0,27 M. O fibrinogênio purificado foi submetido à dosagem proteica pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (78), e utilizado na imunização do coelho para produção de anticorpos específicos anti-fibrinogênio de rato, como descrito a seguir.

Após a obtenção da proteína (fibrinogênio purificado) e previamente à imunização do coelho para produção de anticorpos específicos, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em gel de acrilamida 12% (79), das amostras reduzidas (β -mercaptoetanol, Sigma), para verificação da pureza da proteína obtida. Aplicou-se 4,32 μ g por poço do fibrinogênio purificado e a corrida eletroforética foi realizada com amperagem inicial de 15 mA até o momento da saída das amostras do gel de aplicação de amostra; nesse momento, a amperagem foi aumentada para 30 mA e mantida constante até o final da corrida. Em seguida à corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi corado pelo método de prata, de acordo com o método anteriormente descrito (80). Por fim, realizou-se a análise densitométrica das bandas presentes com o programa TotalLab TL100 (versão 1.10, EUA).

3.3.2. Imunização de coelho com fibrinogênio de rato

Para a produção de anticorpos policlonais específicos anti-fibrinogênio de rato, foi utilizado um coelho albino com peso entre 2,5 a 3,0 kg. O coelho foi imunizado i.m. com 0,5 mL de uma suspensão de fibrinogênio de rato purificado (4,32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), emulsificada em 0,5 mL de adjuvante de Marcol-Montanide. Desta forma, o animal recebeu quatro injeções intramusculares dessa mistura a cada 14 dias, até que os títulos de anticorpos alcançassem níveis elevados. Imediatamente antes de cada injeção de imunização, coletou-se uma amostra de sangue (1,5 mL) da veia marginal auricular do coelho para obtenção de soro, utilizado para acompanhamento da titulação de anticorpos. As amostras de sangue foram mantidas a 37 °C por 1 h para formação do coágulo e centrifugadas por 15 min a 5000 rpm para a obtenção de soro e mantidas a -80 °C. Após a quarta imunização, o coelho foi anestesiado com tiopental sódico (50 mg/kg, i.v.) e exsanguinado por punção da artéria carótida (11). As amostras de sangue obtidas do coelho foram mantidas a 37 °C por 2 h e centrifugadas a 4000 rpm por 15 min e o soro obtido ao final do processo de imunização foi utilizado para purificação de IgG anti-fibrinogênio de rato (81). Ao final, o sobrenadante foi diluído em glicerol (1:1) e a solução de IgG purificada anti-fibrinogênio de rato (2,20 mg/mL) foi submetida à dosagem proteica pelo método de BCA (78) e mantida a -20 °C até o momento do uso. Para o ELISA para quantificação de PDF/f circulantes, uma porção deste anticorpo foi conjugado com biotina, segundo protocolo anteriormente descrito (82).

3.3.3. Caracterização do anticorpo anti-fibrinogênio de rato

3.3.3.1. Titulação de anticorpos

A titulação dos níveis de anticorpos foi realizada por meio do método enzimático de ELISA, utilizando placas MaxiSorp (Nunc). As placas foram sensibilizadas com 100 μL por poço de fibrinogênio de rato purificado (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4 °C,

em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05%) em um lavador de placas automático, e foi adicionado 200 µL por poço da solução bloqueadora (albumina bovina 3% em tampão carbonato; pH 9,6) por 2 h a 37 °C, em câmara úmida. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem em um lavador de placas automático. Em seguida, os poços foram incubados com 100 µL de diluições seriadas dos soros obtidos das coletas durante as imunizações, na razão de 2 (1/4.000 a 1/4.096.000), diluídos em tampão de incubação (PBS pH 7,4 contendo albumina bovina 1% e Tween 20 0,05%); a placa foi incubada por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 5 vezes, seguidas de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e adicionado 100 µL de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma, A6154, EUA), na diluição 1/1000 em tampão de incubação, por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. As placas foram lavadas 5 vezes, seguidas de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e reveladas com 100 µL do substrato (o-fenilenodiamina 1 mg/mL; H₂O₂ 0,03%, dissolvidos em tampão citrato 0,1 M; pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL por poço de H₂SO₄ 30%. As absorbâncias dos poços da placas foi lida em um leitor de placas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific), com comprimento de onda em 492 nm.

3.3.3.2. Reconhecimento de proteínas pela IgG anti-fibrinogênio

Para a verificação das proteínas plasmáticas reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-fibrinogênio de rato, foi realizado um ensaio de Western blotting. Amostras de plasma de rato (15 µg) e de fibrinogênio de rato purificado (5 µg), tratadas sob condições redutoras (com 2-mercaptoetanol) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) (79). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas sob condições de voltagem constante de 15 V durante 2 h para uma membrana de

nitrocelulose (poro de 0,2 μm , Bio-Rad) em uma cuba de transferência semi-seca (Bio-rad Trans-blot, SD transfer cell). Em seguida, a membrana foi bloqueada (leite desnatado 0,5% em solução de lavagem) *overnight* a 4 °C, lavada e incubada com os anticorpos específicos para fibrinogênio de rato conjugado com biotina (1,59 mg/mL) (82) na diluição de 1/500. As membranas foram incubadas por 2 h, sob agitação constante, à temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se à membrana solução de avidina-peroxidase na diluição de 1:20000 (Sigma, A3151, EUA), e incubou-se por 1 h, sob agitação constante, à temperatura ambiente. A revelação da reação imunológica foi feita utilizando o substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D5637, EUA) (5 mg de DAB; 10 mL tampão imidazol 0,1 M; 125 μL de CoCl_2 ; 3,4 μL de H_2O_2 30%) (83). A reação foi interrompida lavando-se a membrana exaustivamente em água corrente. As membranas foram escaneadas e a análise densitométrica das bandas foi realizada com o programa TotalLab TL100 (versão 1.10, EUA).

3.4. Inibição das famílias de proteínas presentes no veneno de *B. jararaca*

3.4.1. Inibição de metaloproteínases

O veneno de *B. jararaca* foi incubado com o sal sódico do ácido etileno diamino tetracético ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$, Bio-Rad), composto que quela os metais divalentes de metaloenzimas (26), na concentração final de 13 mM. Para a inibição dessa classe de enzimas, uma alíquota de 52 μL da solução de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 269 mM em solução salina foi adicionada à solução de veneno de *B. jararaca* (1 mg/mL, 1 mL) e incubada por 1 h a 37 °C. Como controle da inibição, uma alíquota do veneno foi incubada com o mesmo volume de salina, sob as mesmas condições, sem a adição de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

3.4.2. Inibição de serinaproteases

O veneno de *B. jararaca* foi incubado com AEBSF (“4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride”) 4 mM (Sigma), que sulfona o resíduo de serina do sítio ativo de serinaproteases (84), inativando-as irreversivelmente. Para a inibição dessa classe de enzimas, uma alíquota de 19 µL da solução de AEBSF 200 mM em solução salina foi adicionada à solução de veneno de *B. jararaca* (1 mg/mL, 1 mL) e incubado por 1 h a 37 °C. Como controle da inibição, foram utilizados os mesmos animais do grupo anterior, com veneno incubado com o mesmo volume de salina, como descrito anteriormente.

3.5. Dose mínima coagulante (DMC)

A fim de verificar a real eficácia da inibição dessas famílias de proteínas presente no veneno botrópico (metaloproteinases e serinaproteases) pelo Na₂-EDTA e AEBSF, respectivamente, utilizou-se a DMC (85) para avaliar a eficiência dos diferentes tratamentos de inibição do veneno, como descrito acima, sobre o plasma de coelho citratado (DMC-P) e sobre o fibrinogênio bovino (DMC-F) (25). A DMC é definida como a menor concentração de veneno necessária para coagular a solução de plasma ou fibrinogênio em 60 s a 37 °C. Concentrações de 2,0 a 0,015 mg/mL das soluções do veneno de *B. jararaca* tratado foram testadas em um coagulômetro Start4 (Stago, França). Dos resultados obtidos, confeccionaram-se gráficos utilizando o tempo de coagulação versus a concentração de veneno, as análises foram realizadas no software CurveExpert versão 1.40 (<http://curveexpert.webhop.net/>), e a DMC foi calculada através da análise de regressão.

3.6. Protocolo de envenenamento

Os animais (n= 5-6/ grupo) foram injetados pela via subcutânea (s.c.) (1,6 mg de veneno/kg p.v.) ou intravenosa (i.v.) (1 mg/mL, 100 µL/animal) com as soluções de veneno tratadas como descrito acima. Animais tratados

com salina ou solução de veneno incubada com salina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após 3 ou 6 h, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção da artéria aorta abdominal em seringas plásticas, para avaliar a função hemostática. Dos animais administrados pela via s.c., também foi retirado um fragmento circular da pele, de 4 cm de diâmetro, cujo centro foi o local de inoculação do veneno, utilizado para averiguar a intensidade de lesão local induzida pelo veneno. Já para avaliação da expressão de TF e PDI, também foram retirados fragmentos do pulmão que foram utilizados em ensaios de Western blotting.

Figura 6. Esquema do protocolo de envenenamento. Animais foram injetados pela via subcutânea (1,6 mg/kg) ou intravenosa (100 µg/ animal) com soluções de veneno tratadas com Na₂-EDTA, AEBSF ou salina. Após 3 ou 6 h foi feita a coleta de sangue e órgãos para avaliação hematológica.

3.7. Coleta de Sangue

O sangue obtido por punção da aorta abdominal de ratos foi distribuído imediatamente após a coleta em frascos contendo anticoagulantes e foi utilizado para a realização de testes que avaliassem a função hemostática durante o envenenamento experimental:

- 500 µL de sangue + 5 µL de Na₂-EDTA 10% + 5 µL de soro antibotrópico (Instituto Butantan, Lote: 1005107/C). Essa amostra foi utilizada para realização de hemograma e contagem plaquetária.
- 4,3 mL de sangue + 700 µL de anticoagulante CTAD – contendo teofilina 15 mM (Sigma), adenosina 3,7 mM (Sigma), dipiridamol 0,2 mM (Medley), diluídos em anticoagulante ACD) (11) – + 50 µL de soro antibotrópico. Essa amostra foi centrifugada a 2500 g por 15 min a 4 °C para obtenção de plasma e utilizada nos ensaios de dosagem de fibrinogênio e PDF/f, tempo de protrombina, níveis de fator VII e dosagem de fator tissular.
- 500 µL de sangue sem a adição de anticoagulante ou antiveneno. Essa amostra foi mantida a 37 °C por 2 h e centrifugada a 13.000 g por 10 min para obtenção de soro, utilizado no ensaio de dosagem dos níveis de veneno circulante.

3.8. Coleta de amostras de tecidos

O local de inoculação do veneno (via s.c.) e um fragmento do pulmão (vias s.c. e i.v.) foram coletados dos animais 3 ou 6 h após o envenenamento, e utilizados para a avaliação dos tratamentos de inibição do veneno de *B. jararaca* sobre a lesão local e a consequente atividade pró-coagulante desses órgãos. A metade do fragmento de pele (6,3 cm²) e fragmentos do pulmão (100 mg) foram imediatamente colocados em tampão de homogeneização RIPA [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: Na₂-EDTA 2 mM (Bio-Rad), AEBSF 2 mM (Sigma), aprotinina 2 µM (Sigma), bestatina 130 µM (Sigma), E-64 28 µM (Sigma) e leupeptina 22 µM (Sigma)].

Os fragmentos coletados de pulmão e pele foram triturados em um homogeneizador de tecidos IKA® T10 basic (Staufen, Alemanha), congelados e descongelados (gelo seco/ banho maria a 37 °C) 3 vezes, centrifugados a 13.000 g por 10 min, e os sobrenadantes obtidos foram utilizados nos ensaios de Western blotting (expressão de TF e PDI).

Um quarto do fragmento da derme (3,1 cm²), cujo centro foi o local de inoculação do veneno, foi adicionado a 2 mL de líquido de Drabkin e triturado para dosagem de hemoglobina tecidual.

3.9. Avaliações da hemostasia

3.9.1. Hemograma e contagem plaquetária

Para determinação da contagem de plaquetas, eritrócitos e leucócitos, hematócrito, hemoglobina e índices hematimétricos [volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)] no sangue dos animais, as amostras de sangue foram analisadas utilizando um contador de células automático BC-2800 Vet (Mindray, China), utilizando as amostras de sangue coletadas com o anticoagulante Na₂-EDTA 10%.

3.9.2. Dosagem de fibrinogênio

A dosagem de fibrinogênio foi realizada utilizando amostras de plasma citratado, seguindo a técnica colorimétrica anteriormente descrita (86). Em tubos plásticos falcon, foram adicionados 0,5 mL de vidro moído, 200 µL de amostras de plasma, 50 µL de EACA 10%, 10 mL de NaCl 0,85% e 35 µL de trombina bovina (720U/mL, Sigma). Os tubos foram mantidos a

37 °C (5 a 10 min) até a formação de coágulos (rede de fibrina), e centrifugados a 2000 rpm por 5 min. Então, o coágulo foi cuidadosamente espremido e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Adicionou-se a fibrina 1 mL de NaOH 10% e os tubos cobertos com papel alumínio foram aquecidos em banho maria fervente por 10 min. Logo após o resfriamento dos tubos, adicionou-se 7 mL de água destilada, 3 mL de Na₂CO₃ 20% e 1 mL de reagente fenólico (Sigma). A leitura de absorbância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro (UtroSpec 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer) a 650 nm, contra o branco. Os dados foram analisados no software CurveExpert versão (1.40) e, a partir de uma curva padrão de tirosina foram obtidos os resultados em mg/dL de fibrinogênio.

3.9.3. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f)

Para a dosagem de PDF/f, alíquotas de cada amostra de plasma (200 µL) foram misturadas com 10 µL de aprotinina (10.000 U/mL; Bayer-Translol) e 200 µL de trombina (30 U/mL, Sigma) e incubadas por 15 min a 37 °C para a remoção do fibrinogênio residual do plasma. Depois de formado o coágulo, as amostras foram centrifugadas 10.000 *g* por 15 min e o sobrenadante utilizado na reação imunoenzimática.

Assim, utilizaram-se placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) sensibilizadas com 100 µL por poço de IgG anti-fibrinogênio de rato (10 µg/mL) diluída em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4 °C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo Tween 20 0,05%) em um lavador de placas automático, e foi adicionado 200 µL por poço da solução bloqueadora (albumina bovina 3% em tampão carbonato; pH 9,6) por 2 h a 37 °C, em câmara úmida. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem em um lavador de placas automático. Em seguida, os poços foram incubados com 100 µL das amostras, na diluição de 1/2000, diluídas em tampão de incubação (solução salina 1% BSA); a curva padrão foi realizada utilizando

fibrinogênio de rato purificado com diluição seriada na razão de 2, a partir de 1 µg/mL, considerando o limite de detecção de 3,9 ng/mL. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 5 vezes, seguidas de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e adicionado 100 µL de IgG anti-fibrinogênio de rato conjugado com biotina (1,59 mg/mL) na diluição 1/10000 por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. As placas foram lavadas 5 vezes, seguida de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e incubadas com 100 µL de solução de conjugado avidina-peroxidase (Sigma. A3151, EUA) na diluição de 1/10000 por 1 h a 37 °C. A reação foi revelada com 100 µL do substrato (o-fenilenodiamina 1 mg/mL e H₂O₂ 0,03%, dissolvidos em tampão citrato 0,1 M; pH 5,0). A reação foi interrompida com a adição de 50 µL por poço de H₂SO₄ 30%. A absorbância dos poços das placas foram lidas em um leitor de placas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific), com comprimento de onda em 492 nm.

3.9.4. Determinação do tempo de protrombina (TP)

Para a avaliação do tempo de protrombina primeiramente foi necessária a obtenção de tromboplastina de rato, obtida a partir de cérebros de ratos (87). Desta forma 0,6 g de tromboplastina foi diluída em 15 mL de solução salina, mantida em banho seco a 50 °C por 20 min, homogeneizando a cada 5 min. Em seguida, a tromboplastina foi mantida a 4 °C *overnight* para sedimentação e o sobrenadante utilizado no teste. A dosagem foi realizada em amostras de plasma citratado em um coagulômetro Start4 (Stago, França). Assim, amostras de plasmas (80 µL) foram incubadas, em duplicata, com 40 µL de tromboplastina de rato e pré-aquecidas durante 1 min a 37 °C; adicionou-se a seguir 40 µL de CaCl₂ 0,05 M e imediatamente o cronômetro foi acionado. Os resultados do tempo de coagulação foram expressos pela relação 1/tempo de protrombina (segundos).

3.9.5. Dosagem de fator VII

A dosagem foi realizada em amostras de plasma citratado em um coagulômetro Start4 (Stago, França). Assim, amostras (40 µL) de plasma deficiente em fator VII (HemosIL, EUA) foram incubadas, em duplicata, com 40 µL de plasma na diluição 1/50 (em Tyrode, pH 7,4) e 40 µL de tromboplastina de rato, e pré-aquecidas durante 1 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 40 µL de CaCl₂ 0,05 M e imediatamente o cronômetro foi acionado. Para a confecção de uma curva padrão utilizou-se um pool de plasma de rato normal nas diluições de 1/10 a 1/800, sendo considerada a diluição de 1/50 correspondente a 100% de fator VII. Dos resultados obtidos, confeccionou-se um gráfico utilizando o tempo de coagulação versus a concentração de FVII (%), as análises foram realizadas no software CurveExpert e a porcentagem de fator VII (%) foi calculada através da análise de regressão.

3.9.6. Dosagem de fator tissular plasmático, no pulmão e pele

A dosagem foi realizada seguindo as instruções do kit Actichrome TF (American Diagnostica, EUA) em amostras de plasma citratado de animais administrados com veneno não tratado, tratado com Na₂-EDTA, AEBSF ou salina. Também foram testadas amostras de pulmão - nos grupos administrados com veneno não tratado e salina após 6 h s.c. e 3 h i.v. - e pele - no grupo administrado com veneno não tratado ou salina após 6 h s.c. Para a dosagem utilizou-se placas de ELISA com fundo em “U” nas quais pipetou-se 50 µL de tampão, 25 µL da curva padrão de 30 pM a 0 pM ou 25 µL das amostras. As amostras de pele e pulmão diluídas para a mesma concentração de proteína de 1,95 mg/mL. A seguir adicionou-se 25 µL do fator VIIa e 25 µL do fator X por poço, e incubou-se durante 15 min a 37 °C. A seguir, pipetou-se 25 µL do substrato para fator Xa e incubou-se por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido acético glacial e a leitura realizada em um leitor de placas (Spectra MAX 190, Molecular Devices), com comprimento de onda em 405 e 490 nm

($\Delta\text{Abs}_{405-490}$) para amostras de plasmas e a 405 nm para lisados, segundo recomendações do fabricante.

3.9.7. Dosagem dos níveis de veneno circulante

A venenemia foi avaliada utilizando-se a técnica de ELISA. Placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μL por poço de soro antibotrópico (100 $\mu\text{g/mL}$) (Instituto Butantan, Lote: 1001003/D), diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* a 4 °C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo Tween 20 0,05%) em um lavador de placas automático, e foi adicionado 200 μL por poço da solução bloqueadora (albumina bovina 3% em tampão carbonato, pH 9,6) por 2 h a 37 °C, em câmara úmida. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem em um lavador de placas automático. Em seguida, os poços foram incubados com 100 μL dos soros obtidos das coletas durante os experimentos, na diluição de 1/10, diluídos em tampão de incubação (PBS pH 7,4 contendo albumina bovina 1% e Tween 20 0,05%); a curva padrão foi realizada utilizando um pool de veneno de *B. jararaca* em tampão de incubação contendo 10% de um pool de soro de rato normal, com diluições seriadas na razão de 2, a partir de 500 ng/mL, considerando o limite de detecção de 1,9 ng/mL. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas 5 vezes, seguidas de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e depois foi adicionado 100 μL de soro anti-botrópico produzido em coelho na diluição de 1/1000 por 1 h a 37 °C, em câmara úmida. As placas foram lavadas 5 vezes, seguidas de agitação durante 10 segundos, com tampão de lavagem em um lavador de placas automático e incubadas com 100 μL de conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma, A6154, EUA) na diluição de 1/1000 por 1 h a 37 °C e reveladas com 100 μL do substrato (o-fenilenodiamina 1 mg/mL e H_2O_2 0,03%, dissolvidos em tampão citrato 0,1 M; pH 5,0). A reação foi interrompida com a adição de 50 μL por poço de H_2SO_4 30%. As absorbâncias dos poços das placas foram lidas em um leitor

de placas de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific), com comprimento de onda em 492 nm.

3.10. Avaliação da lesão local

3.10.1. Dosagem de hemoglobina tecidual

De cada animal injetado pela via subcutânea foi retirado um fragmento circular da pele, de 4 cm de diâmetro, cujo centro foi o local de inoculação do veneno. Um quarto do fragmento de pele (3,1 cm²) foi triturado e utilizado para a dosagem de hemoglobina tecidual no local da administração do veneno, realizada por meio do método colorimétrico de detecção de cianometahemoglobina (17). Os fragmentos foram colocados em tubos contendo 2 mL de reagente de Drabkin (Bioclin) e as amostras permaneceram protegidas da luz por 24 h a 37 °C. As suspensões foram centrifugadas a 13.000 g por 5 min e os sobrenadantes lidos no espectrofotômetro a 540 nm, sendo a concentração de hemoglobina expressa em mg de hemoglobina por cm²:

$$[\text{Hb}]/\text{cm}^2 = \frac{(A_{540 \text{ nm}} \times 64458) \times 2}{44 \times 1000 \times 1}$$

Onde: [Hb] = concentração de hemoglobina (mg/ cm²); A_{540 nm} = absorbância obtida; 64458 = peso molecular da hemoglobina; 44 = 44 mmol⁻¹/cm = coeficiente de extinção da hemoglobina; 1000 = fator de conversão (litro para mililitro); 1 = espessura da cubeta; 2 (mL) = volume de reagente Drabkin.

3.10.2. Expressão proteica de fator tissular (TF) e isomerase de dissulfeto proteico (PDI)

Após a normalização das dosagens proteicas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (78) das amostras pele e pulmão, a expressão de TF e PDI foi avaliada por Western blotting. A expressão proteica de TF foi avaliada em amostras de pele (50 µg por poço) e pulmão (12 µg por poço) e a expressão de PDI foi avaliada somente na pele através da técnica de Western blotting. Para isso, quantidades iguais de proteínas dos sobrenadantes foram submetidas à eletroforese em géis 12% de SDS-PAGE (79) em condições reduzidas (com 2-mercaptoetanol). A corrida eletroforética foi realizada com amperagem inicial de 15 mA até o momento da saída das amostras do gel de aplicação de amostra, quando a amperagem foi alterada para 30 mA e mantida constante até o final da corrida.

Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20%; SDS 0,037%) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,2 µm, Bio-Rad) em uma cuba de transferência semi-seca (Bio-Rad) realizada com voltagem constante de 15 V durante 2 h. Em seguida, as membranas foram levadas à estufa a 37 °C para melhor fixação das proteínas transferidas, umedecidas com água destilada e coradas com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,2%; ácido tricloroacético 0,18 M; ácido sulfossalicílico 3%) para verificar a eficiência da transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, e escaneadas para posterior análise densitométrica.

Em seguida, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado 0,5% em solução de lavagem) *overnight* a 4 °C, lavadas com solução de lavagem (PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,1%). A seguir as membranas foram incubadas com anticorpos específicos para TF (anticorpo monoclonal anti-fator tissular de camundongo, Calbiochem, TF9-10H10, mantido em glicerol 50%), na diluição de 1/500 ou para PDI (anticorpo anti-isomerase de dissulfeto proteico de coelho, Sigma, P7372,

mantido em glicerol 50%), na diluição de 1/5000, ambos em solução de bloqueio. As membranas foram incubadas por 2 h, sob agitação constante, à temperatura ambiente. Subsequentemente, após lavagem, adicionaram-se às membranas os anticorpos anti-IgG de camundongo (para a revelação de TF, Sigma, A4416) ou anti-IgG de coelho (para a revelação de PDI, Sigma A0545), conjugados com peroxidase, na diluição de 1/10000. Como controle de expressão proteica, foi utilizado um anticorpo específico para GAPDH conjugado com peroxidase (Sigma G9295) na diluição de 1/20000, seguida da incubação com anti-IgM de camundongo na diluição de 1/10000 (Sigma, A8786).

A revelação das reações imunológicas foi feita utilizando o substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina (tetra-hidrocloreto) (DAB) (Sigma, D5637, EUA) (7,5 mg de DAB; 15 mL tampão imidazol 0,1 M; 188 µL de CoCl₂; 5,1 µL de H₂O₂ 30%) (83). A reação foi interrompida lavando-se a membrana exaustivamente em água corrente. As membranas foram escaneadas (Escaner Image Scanner III, GE) e a análise densitométrica das bandas foi realizada com o programa TotalLab TL100 (versão 1.10, EUA). Os valores relativos às unidades arbitrárias de cada amostra foram obtidos pela relação entre: a marcação da banda de interesse obtida após a revelação com DAB e a quantidade de proteína total da amostra (obtida pela coloração da membrana após a transferência, com Ponceau), ou seja, banda/Ponceau, considerando o valor relativo 1 (um) para as amostras controles injetado com salina (88).

3.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat versão 3.5. Para verificar se os tratamentos propostos eram capazes de alterar os parâmetros estudados foi utilizada a ANOVA de três vias, seguida de teste de Bonferroni. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do anticorpo anti-fibrinogênio de rato

4.1.1. Titulação de anticorpos anti-fibrinogênio de rato

Títulos crescentes de anticorpo anti-fibrinogênio de rato foram observados ao longo da imunização do coelho, até que os títulos se mantivessem constantes, na quarta imunização. O título na quarta imunização foi de 1.024.000.

4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e verificação do reconhecimento da IgG anti-fibrinogênio de rato

O perfil eletroforético da amostra do fibrinogênio purificado no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) após a coloração pelo método de AgNO_3 e análise densitométrica, revelou a presença de 3 bandas que apresentaram massas moleculares relativas de 59, 53 e 48 kDa (Figura 7a), similares, respectivamente, às três cadeias polipeptídicas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ e γ do fibrinogênio de humano e bovino (64, 56 e 47 kDa) (89, 90). Para a verificação do reconhecimento de proteínas pelo anticorpo produzido, o plasma de rato (15 μg) e o fibrinogênio de rato purificado (5 μg) foram submetidos ao Western blotting. Observou-se que a IgG anti-fibrinogênio é capaz de reconhecer as 3 cadeias polipeptídicas que compõe a estrutura do fibrinogênio (Figura 7b); assim, mostrou-se a funcionalidade deste anticorpo para dosar os produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF/f) em amostras de plasma.

Figura 7. (a) Perfil eletroforético do fibrinogênio purificado de rato em gel SDS-PAGE (12%) em condições reduzidas. Na raia 1, mostram-se três bandas predominantes de 59, 53 e 48 kDa (seta), correspondentes às massas moleculares das cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio. Na raia 2, mostra-se o padrão de massa molecular. **(b)** Western blotting para verificação do reconhecimento de proteínas pela IgG anti-fibrinogênio; este anticorpo foi capaz de reconhecer as 3 cadeias polipeptídicas do fibrinogênio em plasma de rato e fibrinogênio de rato nas raias 2 e 3, respectivamente. Na raia 1, mostra-se o padrão de massa molecular.

4.2. Dose Mínima Coagulante dos diferentes tratamentos sobre o plasma citratado de coelho e fibrinogênio bovino

A dose mínima coagulante (DMC) foi utilizada para verificar a eficácia da inibição das metaloproteinases e serinaproteases, principais famílias de proteínas presentes no veneno de *B. jararaca* sobre sua atividade coagulante e, assim, determinar se os pré-tratamentos com inibidores estava sendo efetivo para neutralizar essas famílias de enzimas. Sabe-se que a atividade coagulante do veneno de *B. jararaca* ocorre devido à ação de

enzimas capazes de hidrolisar o fator X (metaloproteinases), a protrombina (metaloproteinases) e/ou o fibrinogênio (serinaproteases) (9).

Quando se utiliza o plasma de coelho para determinar a DMC é possível avaliar somente a atividade de componentes do tipo pró-coagulante do veneno (ativadores de fator II e X). Já quando se utiliza o fibrinogênio bovino purificado, é possível avaliar apenas a atividade das enzimas trombinasímbles (25). A Tabela 2 mostra que os valores obtidos de DMC-F e DMC-P do veneno de *B. jararaca* controles são similares àqueles obtidos anteriormente (91). Contudo, a atividade coagulante foi notavelmente inibida quando o Na₂-EDTA e o AEBSF foram utilizados especificamente para inibir metaloproteinases e serinaproteases, respectivamente, do veneno. A inibição das metaloproteinases pelo Na₂-EDTA foi maior sobre o plasma de coelho citratado devido à atividade pró-coagulante dessas enzimas (ativadores do fator II e X) do veneno botrópico; assim, uma maior quantidade de veneno foi necessária para coagular a solução de plasma de coelho em 60 s a 37 °C. Já a inibição da atividade coagulante pelo AEBSF foi notavelmente maior sobre o fibrinogênio bovino, não interferindo com a atividade coagulante sobre o plasma de coelho.

Tabela 2. Efeito do tratamento do veneno de *B. jararaca* com inibidores de metaloproteinases (Na₂-EDTA) e serinaproteases (AEBSF), sobre sua atividade coagulante. A atividade foi expressa sob a forma de dose mínima coagulante (DMC), determinada em plasma de coelho (DMC-P) e fibrinogênio bovino (DMC-F).

Grupos	Tratamentos	DMC-P (µg/mL)	DMC-F (µg/mL)
Controle	Salina	3,71	107,7
Inibição de metaloproteinases	Na ₂ -EDTA	238,21	Incoagulável
Inibição de serinaproteases	AEBSF	3,64	222,12

4.3. Hemorragia local

Uma alta atividade hemorrágica foi observada no dorso de ratos 3 e 6 h após a administração s.c. do veneno de *B. jararaca* não tratado (1,6 mg/kg), quando comparada àquela ocorrida pela injeção de salina (Figura 8). O gráfico mostra um aumento da hemorragia no local de inoculação do veneno no grupo injetado com veneno botrópico, de aproximadamente 14 e 9 vezes em 3 e 6 h, respectivamente, quando comparada àquela do grupo controle, administrados somente com solução salina ($p < 0,001$).

Quando o veneno foi pré-tratado com o AEBSF houve uma redução ao redor de 30% na atividade hemorrágica do veneno quando comparada ao grupo administrado somente com veneno de *B. jararaca* ($p > 0,05$). No entanto, quando o veneno foi pré-tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 3 e 6 h após o envenenamento, houve uma redução de aproximadamente 85% da atividade hemorrágica do veneno quando comparada ao grupo inoculado somente com veneno de *B. jararaca* ($p < 0,01$). Assim, ao comparar a intensidade de hemorragia local 3 e 6 h após a inoculação de veneno de *B. jararaca* s.c., observou-se uma redução de 30% no grupo avaliado 6 h após o envenenamento. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar animais envenenados em 3 e 6 h após a inoculação do veneno e de seus diferentes tratamentos ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento do veneno com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ inibiu quase completamente a hemorragia local em 3 e 6 h após a inoculação do veneno, quando comparada àquela do grupo salina, sugerindo um papel essencial das metaloproteinases na indução da atividade hemorrágica pelo veneno.

Figura 8. Hemorragia local em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo). * $p < 0,05$ quando comparados com animais tratados com salina. # $p < 0,01$ quando comparados com animais controles tratados com veneno de *B. jararaca*.

4.4. Dosagem dos níveis de veneno circulante

A fim de comparar a venenemia nos animais injetados pela via subcutânea e intravenosa, com os diferentes pré-tratamentos do veneno com os inibidores e a fim de avaliar igualmente se os diferentes tratamentos estavam alterando a absorção do veneno do tecido para a corrente sanguínea quando administradas pela via s.c. realizou-se a dosagem dos níveis de veneno circulante em amostras de soro dos animais por meio do método enzimático de ELISA.

Como pode ser observado na Figura 9, ratos administrados com veneno de *B. jararaca* pela via s.c. e i.v. após 3 e 6 h, independentemente do tratamento utilizado, exibiram altos níveis de veneno circulante em comparação com o grupo controle tratado apenas com solução salina ($p < 0,001$), confirmando assim o envenenamento dos animais nos diferentes grupos.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de veneno entre os diferentes tempos nos grupos injetados com veneno de *B. jararaca* pela via s.c. ($p= 0,897$), confirmando assim que não houve alteração da absorção do veneno do tecido para a corrente sanguínea entre os grupos administrados pela via s.c. Porém, ao comparar grupos administrados com veneno de *B. jararaca* pela via i.v. observa-se que os níveis de veneno circulante após 3 h foi aproximadamente 4 vezes maior quando comparado ao mesmo grupo após 6 h, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p< 0,001$).

Ainda, ao comparar grupos envenenados após 6 h observou-se uma queda dos níveis de veneno circulante no grupo administrado pela via i.v. quando comparado aos níveis do grupo s.c., sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p= 0,002$). Diferentemente, após 3 h não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as duas vias ($p= 0,701$).

Figura 9. Dosagem dos níveis de veneno circulante em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n= 5-6$ /grupo). * $p < 0,001$ em relação ao grupo salina.

4.5. Hemograma e contagem plaquetária

Três e seis horas após a administração de veneno s.c. e i.v., avaliaram-se os parâmetros hematológicos dos animais. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para os valores hematológicos de contagem de eritrócitos (Figura 10a), hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) ($p > 0,05$) (dados não mostrados).

A contagem de leucócitos totais nos grupos 3 e 6 h i.v. apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes somente no grupo administrado com veneno de *B. jararaca* em comparação ao grupo controle administrado com salina, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 10b). Animais administrados com veneno pré-tratado com inibidor de serinaproteases (AEBSF) também apresentaram aumento da contagem leucocitária, porém não foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo salina ($p > 0,05$). Por outro lado, animais administrados com veneno pré-tratado com inibidor de metaloproteinases ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) mantiveram os níveis de leucócitos totais semelhantes ao grupo controle (salina).

Figura 10. Contagem de (a) eritrócitos; (b) leucócitos em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 μ g/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

Em relação à contagem plaquetária (Figura 11a), o hemograma mostrou uma importante redução, ao redor de 85%, em ratos inoculados com veneno de *B. jararaca* independentemente da via de administração utilizada e do tempo decorrido do envenenamento dos animais em comparação ao grupo controle administrado com solução salina ($p < 0,001$). A mesma intensidade

na queda da contagem plaquetária, aproximadamente 80%, foi observada em animais injetados com veneno pré-tratado com AEBSF quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$). No entanto, quando os ratos foram administrados s.c. com veneno pré-tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ observou-se um menor consumo plaquetário de cerca de 70%, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo inoculado com veneno de *B. jararaca* ($p > 0,05$). Somente no grupo 3 h i.v., quando os animais foram pré-tratados com inibidor de metaloproteinases ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), houve uma inibição parcial no consumo plaquetário desses animais em comparação ao grupo tratado com veneno de *B. jararaca* (controle positivo), apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,022$). Após 6 h, quando os animais foram administrados pela via s.c., o pré-tratamento do veneno com o $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ não preveniu a queda da contagem plaquetária, sendo sua contagem semelhante ao grupo injetado com veneno não tratado (controle positivo).

Ainda, o gráfico mostra um maior consumo plaquetário nos animais inoculados com veneno de *B. jararaca* pela via i.v. após 3 h, sendo esse consumo plaquetário de aproximadamente 90% quando comparado ao grupo controle (salina). Já 6 h após a administração do veneno i.v., o grupo administrado somente com veneno de *B. jararaca* demonstrou uma pequena recuperação do número de plaquetas circulantes, apresentando um consumo de cerca de 75% em comparação ao grupo salina. Ao se comparar animais injetados com veneno não tratado (controle positivo), após 3 h observou-se um maior consumo plaquetário no grupo i.v. quando comparado ao grupo s.c., sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,013$). Também observou-se uma recuperação mais rápida ($p < 0,001$) da contagem plaquetária no grupo i.v. (controle positivo) após 6 h, quando comparada ao grupo i.v. após 3 h; esta recuperação não ocorreu quando os animais foram injetados com veneno pela via s.c.

No entanto, nenhum dos tratamentos de inibição das metaloproteinases e serinaproteases do veneno foi capaz de inibir completamente o consumo plaquetário induzido pelo veneno de *B. jararaca*. Porém, *in vivo*, os dados

sugerem que o pré-tratamento do veneno com o Na₂-EDTA foi aquele que minimamente promoveu alguma redução neste consumo, mas não a inibição completa da contagem plaquetária frente ao envenenamento botrópico.

Diferenças no volume médio plaquetário (VMP) (Figura 11b) foram observadas nos grupos 6 h s.c., nos quais houve um aumento de cerca de 20% do VMP nos grupos envenenado e tratados em comparação ao grupo salina ($p < 0,05$). Já no grupo 6 h i.v. os volumes plaquetários nos grupos envenenados se mantiveram normais em relação ao grupo salina. Após 3 h i.v. observou-se um aumento de aproximadamente 30% do VMP somente no grupo administrado com veneno de *B. jararaca* em relação ao grupo salina ($p = 0,007$).

Figura 11. (a) Contagem plaquetária (b) volume plaquetário médio (VPM) em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 μ g/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo). * $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparados com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

4.6. Dosagem de fibrinogênio plasmático

A fim de determinar a intensidade de ativação da coagulação sanguínea promovida pelo envenenamento, foi realizada a dosagem de fibrinogênio. O consumo de fibrinogênio plasmático induzido pelo envenenamento s.c. e i.v. em 3 e 6 h, mostrou um importante consumo nos níveis de fibrinogênio

plasmático em todos os grupos de ratos administrados com veneno não tratado de *B. jararaca*, em comparação com os grupos controles, administrados com salina. Observou-se uma queda de aproximadamente 80% em todos os animais envenenados independentemente da via de inoculação utilizada ($p < 0,001$) (Figura 12).

Em ratos administrados com veneno pré-tratado com AEBSF foi observada uma redução similar à induzida pelo veneno não tratado nos níveis de fibrinogênio plasmático, de aproximadamente 85%, em comparação com ratos administrados com salina ($p < 0,001$). No entanto, a pré-incubação do veneno com o $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ inibiu quase completamente o consumo de fibrinogênio dos ratos, em comparação com o grupo controle tratado somente com veneno de *B. jararaca*, 3 ou 6 h após o envenenamento s.c. ou i.v. ($p < 0,05$). Porém, observou-se uma inibição quase completa do consumo de fibrinogênio no grupo 6 h s.c. que foi de aproximadamente 98%, diferentemente do que ocorreu no grupo avaliado 3 h após o envenenamento i.v., que apresentou uma inibição de apenas 38% ($p = 0,034$) quando comparado ao grupo tratado somente com veneno de *B. jararaca*.

Ao comparar os diferentes tempos e vias de administração do veneno, não foi observada diferença estatística na intensidade do consumo de fibrinogênio plasmático entre animais envenenados após 3 h pelas vias s.c. e i.v. ($p = 0,475$) e 6 h pelas vias s.c. ou i.v. ($p = 0,449$). Também se observou que os níveis de fibrinogênio plasmático foram estatisticamente diferentes em grupos administrados pela mesma via, porém nos dois diferentes tempos ($p = 0,005$), apresentando um menor consumo de fibrinogênio após o envenenamento pela via subcutânea. Assim, os resultados da avaliação dos níveis de fibrinogênio sugerem que as metaloproteinases apresentam uma função essencial na indução do consumo de fibrinogênio em ratos.

Figura 12. Níveis de fibrinogênio plasmático em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo). * p< 0,001 quando comparados com animais tratados com salina. # p< 0,001 ou Δ p< 0,05 quando comparados com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

4.7. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio efibrina (PDF/f)

Os PDF/f são uma medida da intensidade de ativação do sistema fibrinolítico no envenenamento pela *B. jararaca*. Os níveis de PDF/f plasmáticos apresentaram um notável aumento nos animais inoculados com veneno pré-tratado com salina ou AEBSF, pelas vias s.c. e i.v., após 3 e 6 h, do envenenamento em comparação com o grupo controle tratado apenas com solução salina (p< 0,001) (Figura 13).

No entanto, a inibição das metaloproteinases do veneno com o Na₂-EDTA foi capaz de inibir completamente a geração de PDF/f durante o envenenamento s.c. após 3 e 6 h e i.v. após 6 h, sendo estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle tratado somente com veneno de *B. jararaca* (p< 0,001). Animais injetados com veneno pré-tratado com o Na₂-EDTA pela via i.v. após 3 h apresentaram uma pequena geração de PDF/f na circulação decorrente do envenenamento, sendo de

aproximadamente 17 vezes menor em comparação ao grupo tratado somente com veneno de *B. jararaca* ($p=0,001$).

Ao comparar os grupos inoculados com veneno de *B. jararaca* observou-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre diferentes vias de administração ($p>0,05$). Porém, ao comparar a intensidade de geração de PDF/f após 3 e 6 h do envenenamento observou-se maiores níveis no grupo após 3 h. Desta forma, os resultados demonstram o papel das metaloproteinases na geração de PDF/f.

Figura 13. Dosagem de PDF/f em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n=5-6$ /grupo). * $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,001$ quando comparado com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

4.8. Tempo de protrombina

O tempo de protrombina (TP) foi utilizado como medida da ativação da via extrínseca da coagulação sanguínea promovida pelo envenenamento. O tempo de protrombina está apresentado como o inverso do tempo de coagulação na Figura 14. O TP foi mais longo nos grupos inoculados com veneno de *B. jararaca* em relação ao grupo salina. Contudo, apenas em 6 h s.c. e 3 h i.v. foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), sendo que no grupo

envenenado pela via i.v. após 3 h houve maior prolongamento do tempo de coagulação.

Os animais pré-tratados com AEBSF também apresentaram prolongamento no tempo de protrombina, de forma similar ao grupo inoculado apenas com veneno de *B. jararaca*. No entanto, o pré-tratamento do veneno com Na₂-EDTA foi capaz de manter o tempo de protrombina de forma similar ao grupo controle (salina). Ao se comparar animais administrados pela mesma via e diferentes tempos após o envenenamento observou-se diferença estatisticamente significativa apenas quando os ratos foram inoculados pela via i.v. ($p = 0,002$).

Figura 14. Tempo de protrombina em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca*- VBj). Dados expressos como 1/tempo de protrombina; os valores estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. ($n = 5-6$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

4.9. Dosagem de fator VII

A fim de avaliar se ocorre consumo de fator VII nos animais envenenados com os diferentes tratamentos propostos foi realizada a dosagem de fator VII (Figura 15). Este fator, quando complexado com o fator

tissular dá início a via extrínseca da coagulação sanguínea. Os níveis de fator VII não foram consumidos durante o envenenamento, porém tenderam a apresentar níveis elevados nos animais que receberam veneno. Os níveis de fator VII 6 h após o envenenamento s.c. apresentou um notável aumento nos animais envenenados, tanto no grupo administrado com o veneno de *B. jararaca* como nos diferentes tratamentos do veneno em comparação com animais controles administrados com salina ($p < 0,001$). Já em 3 h após administração i.v. observou-se um aumento importante dos níveis de fator VII no grupo pré-tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ em comparação com os demais grupos.

Figura 15. Dosagem de fator VII em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca* - VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 5-6/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

4.10. Dosagem de fator tissular plasmático, no pulmão e pele

A fim de investigar se a inoculação do veneno de *B. jararaca* induz aumento dos níveis de fator tissular plasmático em ratos, foi dosado o fator tissular plasmático, o iniciador da coagulação sanguínea. A dosagem do fator tissular no plasma (Figura 16) mostrou que os animais inoculados com

veneno de *B. jararaca* pelas vias s.c. e i.v. após 3 e 6 h apresentaram notável aumento nos níveis de fator tissular plasmático, em comparação ao grupo salina ($p < 0,01$). Porém, quando as metaloproteinases do veneno foram inibidas pelo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ observou-se que ele impediu o aumento dos níveis de fator tissular ($p < 0,05$). No grupo administrado após 3 h pela via s.c. foi capaz de inibir aproximadamente 50% o aumento dos níveis do fator tissular contra 65% nos demais grupos.

Três horas após o envenenamento, observou-se diferença estatisticamente significativa entre as vias de administração s.c. e i.v. ($p = 0,032$). Já ao comparar a mesma via de inoculação entre diferentes tempos não se observou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Assim, os resultados demonstraram a importância das metaloproteinases do veneno na indução no aumento dos níveis de fator tissular em casos de acidentes botrópicos pela serpente *B. jararaca*.

Figura 16. Dosagem de fator tissular plasmático em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e veneno de *B. jararaca*- VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n = 5\text{-}6/\text{grupo}$). * $p < 0,01$ em relação ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado com animais tratados veneno de *B. jararaca* (VBj).

A dosagem de TF no pulmão (Figura 17) 6 e 3 h após a administração s.c. e i.v., respectivamente, do veneno mostrou um aumento nos grupos

envenenados administrados com veneno não tratado (controle positivo); no entanto, apenas no grupo após 6 h s.c. a diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,015$) quando comparado ao grupo salina. Já na pele, no local de lesão, a dosagem de TF apresentou um aumento significativo ($p= 0,048$) no grupo administrado com veneno não tratado, em relação ao grupo salina.

Figura 17. Dosagem de fator tissular na pele em ratos 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) do veneno de *B. jararaca* não tratado ou salina e no pulmão em ratos 6 e 3 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca* não tratado ou salina. Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. ($n= 5-6$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.11. Expressão de TF e PDI no local da administração s.c. do veneno

A expressão de TF e PDI no local de inoculação de veneno, demonstrou, por meio do Western blotting, uma banda com massa molecular relativa de 47 kDa correspondente ao fator tissular e uma banda com massa molecular aproximada de 57 kDa correspondente ao PDI em amostras de

pele em ratos administrados com veneno de *B. jararaca*, venenos pré-tratados e salina após 3 e 6 h do envenenamento.

O gráfico mostra que 3 h após o envenenamento dos animais houve uma queda na expressão do fator tissular nos grupos administrados com veneno em relação ao grupo salina ($p < 0,001$) (Figura 18a). Inversamente, 6 h após o envenenamento, observou-se um aumento estatisticamente significativo da expressão de fator tissular no local de lesão de cerca de 2 vezes no grupo administrado com veneno de *B. jararaca* em relação a animais injetados com salina ($p = 0,014$). Além disso, os resultados da expressão do TF dos grupos inoculados com veneno de *B. jararaca*, Na₂-EDTA e AEBSF mostraram-se estatisticamente significativos entre 3 e 6 h após o envenenamento.

Já a expressão da PDI 3 h após o envenenamento se manteve de maneira constante em todos os grupos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,717$) (Figura 18b). Porém, o mesmo não foi observado após 6 h, quando se observou uma diminuição na expressão de PDI nos grupos administrados com veneno não tratado, tratado com Na₂-EDTA e AEBSF, sendo estatisticamente significativa ao comparar com o grupo controle, administrado somente com solução salina ($p < 0,001$). A expressão comparativa de PDI mostrou que os grupos envenenados e pré-tratados com o Na₂-EDTA ou AEBSF apresentaram diferença entre os diferentes tempos ($p < 0,05$). Como controle de expressão proteica, foi utilizado um anticorpo específico para a GAPDH, e como esperado, não houve grandes variações em sua expressão entre os diferentes grupos em 3 e 6 h ($p > 0,05$) (dados não mostrados). Também foi realizada a expressão de TF em amostras de pulmão de animais inoculados com veneno não tratado ou salina, porém, devido à baixa quantidade proteica presente nesse órgão não foi possível sua revelação.

Figura 18. Análise densitométrica das bandas imunoreativas para expressão de (a) fator tissular plasmático, (b) PDI em ratos 3 e 6 h após a administração s.c. (1,6 mg/kg) ou i.v. (100 µg/animal) do veneno de *B. jararaca*, previamente tratado com Na₂-EDTA ou AEBSF, em comparação com animais controles (salina e VBj). Dados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n= 5-6/grupo). * p< 0,05 quando comparados com animais tratados com salina.

5. DISCUSSÃO

O veneno da serpente *B. jararaca* é rico em enzimas e proteínas que desestabilizam a hemostasia. A plaquetopenia, desordens plaquetárias e distúrbios na coagulação são os principais distúrbios hemostáticos observados em pacientes picados pela *B. jararaca* (1, 11, 13), e têm sido descritos como sendo multifatorial. Da mesma maneira ao observado em pacientes (1, 10, 19), foi demonstrado no presente estudo que ratos administrados com veneno botrópico também apresentam os mesmos distúrbios decorrentes do envenenamento, como plaquetopenia, consumo de fibrinogênio plasmático, geração de PDF/f, prolongamento do tempo de protrombina e hemorragia local. Além disso, nossos resultados mostram aumento dos níveis de TF plasmático durante o envenenamento que pode ser mais uma causa na patogênese de distúrbios hemostáticos.

As principais classes de enzimas presentes no veneno botrópico foram de fato inibidas especificamente ao observar os resultados obtidos pela DMC. O Na₂-EDTA e o AEBSF inibiram as metaloproteinases e serinaproteases, respectivamente, do veneno de *B. jararaca*, que em grande parte são responsáveis pelo desencadeamento de distúrbios hemostáticos no envenenamento botrópico. Assim, a incoagulabilidade do fibrinogênio bovino quando incubado com o veneno tratado com Na₂-EDTA poderia ser explicado por uma possível interferência do Na₂-EDTA com a estrutura do fibrinogênio, que é dependente de cálcio (45) ou pela presença de alguma metaloproteinase ainda não descrita que poderia estar agindo sobre o fibrinogênio, tornando-o incoagulável. Até o momento foram descritas na literatura duas metaloproteinases ativadoras de protrombina, uma isolada do veneno de *Bothrops atrox* com massa molecular de 70 kDa e outra do veneno de *Bothrops neuwiedi* com massa molecular de 60 kDa. Já ativadores de fator X foram isolados do veneno de *B. atrox*, sendo duas enzimas dependentes de cálcio, com massa molecular de 65 kDa e 14-15

kDa. Ativadores de fator X dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *B. jararaca* também já foram purificados e mostraram ser dependentes de cálcio (9). Ainda foi possível observar que devido à presença da atividade de enzimas trombina-símbles (serinaproteases) no veneno de *B. jararaca* – enzimas capazes de hidrolisar o fibrinogênio diretamente em fibrina sem a necessidade de geração de trombina – a inibição da atividade pelo AEBSF foi notavelmente maior sobre o fibrinogênio bovino, não interferindo com a atividade coagulante sobre o plasma de coelho. Sabe-se que as principais enzimas trombina-símbles presentes no veneno de *B. jararaca* são as KN-BJ 1 e 2 (30), TL-BJ 1, 2 e 3 (31) e a botrombina (32). Para tanto, os pré-tratamentos do veneno com esses inibidores foram utilizados para avaliar o envolvimento dessas duas principais famílias de enzimas na gênese dos distúrbios hemostáticos, utilizando ratos como modelo experimental.

Duas vias de inoculação distintas, subcutânea e intravenosa, foram utilizadas nos experimentos, mesmo considerando que a inoculação do veneno em acidentes por serpentes peçonhentas ocorrem de maneira mais frequente pelas vias subcutânea e intramuscular (5). Ademais, pela via intravenosa, a ação do veneno sobre a hemostasia ocorre de maneira instantânea. Desta forma, utilizaram-se essas vias a fim de avaliar se existem diferenças no mecanismo de ação do veneno sobre os parâmetros hemostáticos, e também para avaliar a contribuição da lesão local induzida pelo envenenamento na indução de coagulopatias, avaliando o envolvimento do TF durante a ativação da coagulação sanguínea promovida pelo envenenamento.

De fato, a escolha das doses de veneno utilizada para o envenenamento subcutâneo (1,6 mg/kg) e intravenoso (100 µg/animal) dos animais foram baseadas na capacidade dessas doses em reproduzir o quadro laboratorial de distúrbios hemostáticos decorrentes do envenenamento pela *B. jararaca in vivo*, sem que causasse a morte dos ratos. A dose de 1,6 mg/kg, que foi previamente eleita após experimentos preliminares utilizando outras concentrações de veneno (0,8 mg/kg a 3,2, mg/kg), foi a que melhor reproduziu o quadro de distúrbios hemostáticos do

envenenamento humano. Já a dose de 100 µg/animal foi baseada em dados já existentes no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, tendo sido utilizada anteriormente pelo grupo para o envenenamento intravenoso de ratos. A menor dose intravenosa quando comparada à dose subcutânea pode ser explicada devido aos animais apresentarem maior sensibilidade à inoculação sistêmica do veneno, já que os roedores, as presas naturais de serpentes, apresentam inúmeros inibidores em seu tecido subcutâneo. De fato, trabalhos mostram que coelhos, por exemplo, são mais sensíveis à administração intravenosa podendo administrar uma dose de 70 µg/kg, enquanto que cães podem receber doses de 100 µg/kg (12, 14).

Efetivamente, através da avaliação da venenemia dos animais pode-se observar primeiramente que realmente ocorreu o envenenamento de todos os grupos administrados com veneno não tratado (controle positivo - VBj) ou tratados com inibidores, como já esperado, comprovado pelo alto nível de veneno circulante. Também foi possível confirmar que o pré-tratamento do veneno com inibidores específicos para metaloproteínases ou serinaproteases (Na₂-EDTA ou AEBSF, respectivamente) não alteraram a absorção do veneno do tecido para a circulação sanguínea, no caso do envenenamento subcutâneo. Contudo, devido à ação instantânea do veneno quando este é administrado pela via intravenosa, observou-se um aumento exacerbado da venenemia no grupo controle positivo (VBj) 3 h após sua avaliação. No entanto, o veneno é rapidamente metabolizado e eliminado 6 h após sua administração intravenosa. Já quando ocorre o envenenamento local (subcutâneo) é necessário um maior tempo decorrido após a inoculação do veneno para que ocorra a absorção do veneno do tecido para a circulação sanguínea. Dessa forma, os resultados demonstram que a velocidade de absorção do veneno varia de acordo com o tempo, local e a via da administração que determina diferentes níveis nos soros dos animais.

De fato, o acompanhamento da eliminação do veneno inoculado em pacientes envenenados por meio da realização de cinética permite uma correlação mais precisa com gravidade, auxiliando no prognóstico e

tratamento mais adequado do paciente. Assim, corroborando com os nossos resultados, sabe-se que existe uma correlação direta entre a gravidade do envenenamento e os níveis de veneno presente em fluidos corporais; desta forma, pacientes com quadro de envenenamento botrópico grave apresentam maior concentração de veneno no soro (92). Da mesma maneira, os dados mostram que 3 h após o envenenamento intravenoso foi aquele que os animais apresentaram quadro de envenenamento mais grave e conseqüentemente apresentou maior nível de veneno circulante presente no soro. Também é possível acompanhar a cinética de desaparecimento do soro antibotrópico administrado, avaliando sua eficácia na eliminação de toxinas do veneno, um estudo observou-se que independente da dose de soro antibotrópico administrado (40 ou 80 mL), o veneno circulante não foi detectado após 4 dias (93).

Em pacientes humanos picados por serpentes brasileiras, a técnica de ELISA para dosagem de veneno sérico, também utilizada neste projeto, não é rotineiramente utilizada nos laboratórios, pela falta de disponibilidade e pelo tempo de execução do método. Assim, estudos já demonstraram que pacientes atendidos tardiamente ao envenenamento podem não apresentar venenemia, pois a maior parte de veneno inoculada pode já estar no tecido extravascular. Em pacientes humanos, apesar da rápida metabolização do veneno 6 h após administração intravenosa, como demonstrada, o tratamento com antiveneno é recomendado mesmo tardiamente no acidente botrópico, uma vez que já foi visto a presença de níveis séricos de veneno botrópico em um período superior a 72 h após o acidente (94).

Dentre as células sanguíneas, as plaquetas são aquelas que sofrem claras alterações quantitativas e qualitativas durante o envenenamento, ao se comparar ratos envenenados e administrados com salina. Sabe-se que a plaquetopenia é uma das manifestações sistêmicas mais frequentes observadas em pacientes picados pela *B. jararaca* e que a depleção de plaquetas pode ocasionar complicações graves ao paciente envenenado, já que as plaquetas exercem papel primordial durante a hemostasia normal. As modificações plaquetárias podem ser observadas rapidamente nas primeiras

horas após o envenenamento e persistir por dias (1). No veneno botrópico, diversas metaloproteínases e serinaproteases, além de outras classes de proteínas (18) são capazes de interferir com as plaquetas, causando alterações da função plaquetária e plaquetopenia, contribuindo para o processo de desestabilização da hemostasia que ocorre no envenenamento. Para averiguar tal fenômeno foi analisado nos experimentos se a classe das metaloproteínases e serinaproteases participam diretamente da gênese da plaquetopenia em envenenamentos *in vivo*, uma vez que quadros de plaquetopenia moderada são comumente encontrados em envenenamentos graves, porém uma drástica redução plaquetária não é um quadro raro (1).

No modelo experimental apresentado aqui demonstrou que há maior consumo plaquetário em 3 h quando os animais foram injetados pela via intravenosa, pela ação do veneno de forma sistêmica. Assim, o consumo plaquetário ocorre de forma mais rápida devido à ação direta das toxinas do veneno sobre as plaquetas circulantes, diferentemente de quando o veneno é inoculado pela via subcutânea. Em 6 h, pela via intravenosa a contagem plaquetária se mostrou parcialmente recuperada após o envenenamento, devido à rápida absorção do veneno nesses animais, corroborando com os resultados de venenemia neste grupo. No envenenamento local (subcutâneo) observou-se maior consumo plaquetário 6 h após a inoculação do veneno, já que o veneno precisa ser absorvido do local de sua inoculação para a circulação sanguínea, para então ocorrer o consumo de plaquetas circulantes. A intensa ação do veneno quando administrado sistemicamente também já foi observada em outros trabalhos utilizando coelhos envenenados pela serpente *B. jararaca* 3 h após sua administração (11). O veneno da serpente *B. caribbaeus* também é capaz de induzir notável plaquetopenia em camundongos 3 h após a administração intravenosa do veneno com consumo plaquetário de 95% quando comparado a animais controles e, corroborando com os nossos resultados, a inibição das metaloproteínases desse veneno não inibe a plaquetopenia induzida pelo envenenamento. Ademais, a metaloproteínase P-III isolada desse veneno

não induz a diminuição significativa do número de plaquetas, o que sugere que as metaloproteinases não contribuem com a plaquetopenia (95).

A fisiopatologia das desordens plaquetárias é bastante complexa e múltiplos fatores podem estar envolvidos na gênese da plaquetopenia no envenenamento botrópico (11, 21, 96). Sabe-se que sua associação com distúrbios da coagulação e lesões das células endoteliais certamente contribui para o desenvolvimento de sangramento sistêmico no envenenamento ofídico (1). De fato, o surgimento de sangramentos sistêmicos tem uma relação mais direta com a plaquetopenia do que com a incoagulabilidade sanguínea (11).

No entanto, no presente trabalho, nenhum dos tratamentos inibiu completamente o consumo plaquetário induzido pelo veneno de *B. jararaca*, apesar de a literatura descrever que as metaloproteinases e serinaproteases presentes no veneno botrópico são as principais responsáveis pelo desencadeamento dos distúrbios observados no envenenamento por esta espécie *in vitro* (9). Porém, *in vivo*, os dados sugerem que a inibição das metaloproteinases com o pré-tratamento do veneno com o Na₂-EDTA foi aquela que promoveu uma menor redução, mas não a inibição completa da contagem plaquetária frente ao envenenamento. Corroborando com os nossos dados, outro trabalho demonstrou que a jararagina, uma metaloproteinase P- III, é capaz de induzir plaquetopenia e que sua inibição específica não diminui o consumo plaquetário causada pela *B. asper* (96).

Como visto, dentre as principais famílias de enzimas presentes no veneno, as metaloproteinases parecem estar parcialmente envolvidas na gênese da plaquetopenia durante o envenenamento, sua participação pode ser explicada pela inibição dos componentes pró-coagulantes existentes no veneno, tais como as metaloproteinases ativadoras de fator II e X que induzem a formação de trombina intravascular (97). Além disso, a geração de trombina intravascular em pacientes picados pela *B. jararaca*, comprovada pelos altos níveis de complexo trombina-antitrombina (TAT) circulantes, poderia ativar as plaquetas e retirá-las da circulação (11). Em coelhos envenenados pela via intravenosa, a geração de trombina

intravascular pelos ativadores de fatores II e X presentes no veneno parecem desempenhar importante função no desencadeamento de distúrbios plaquetários. As plaquetas desses coelhos apresentam hipoagregação, aumento da expressão de P-selectina e de LIBS1 na superfície plaquetária, indicando ativação plaquetária *in vivo*, diminuição da secreção de ATP e sequestro plaquetário no pulmão (11). Diferentemente do que é observado após a administração do veneno de *B. jararaca* (11), estudos realizados em coelhos com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, que apresenta somente enzimas com atividade trombina-símile (98), observou-se a ausência de trombos pulmonares (99).

Dentre os demais motivos que poderiam causar plaquetopenia no envenenamento, poderia-se citar a injeção de botrocetina, principal componente da família das lectinas do tipo-C presente no veneno, induz a plaquetopenia em animais acompanhada pela rápida diminuição dos níveis circulantes de vWF (100). No entanto, estudos demonstraram que não há redução dos níveis plasmáticos do vWF em coelhos no período que segue o envenenamento, mesmo quando a contagem plaquetária alcança o ponto mais baixo, o que sugere que a botrocetina pode não ser considerada como a principal causa de plaquetopenia em envenenamentos pela *B. jararaca* (11). Da mesma maneira, observou-se que os pacientes envenenados, apresentaram um aumento dos níveis de vWF, que parece ocorrer devido à geração de trombina intravascular, que promove a secreção de corpos Weibel-Palade das células endoteliais. No entanto, a aspercetina, uma lectina do tipo C isolada do veneno de *B. asper*, semelhante à botrocetina do veneno de *B. jararaca*, induz plaquetopenia *in vivo*, sendo que após a inibição específica da aspercetina foi observado uma inibição do consumo plaquetário nos animais (96).

Ademais, há trabalhos que demonstram o sequestro de plaquetas e fibrina no rim e no pulmão durante o envenenamento botrópico, tanto em seres humanos quanto em modelos experimentais, podendo explicar o consumo de plaquetas circulantes (11, 99, 101).

A interpretação da contagem de células hematológicas é extremamente útil no suporte clínico dos pacientes envenenados. O quadro de plaquetopenia, por exemplo, pode caracterizar a possibilidade de futuras complicações locais. Deste modo, um estudo observou uma relação entre a intensidade da plaquetopenia versus a intensidade de edema, onde pacientes que apresentaram acentuada plaquetopenia decorrente do envenenamento botrópico, consequentemente também apresentaram maior intensidade no edema (1). Já a contagem total e diferencial de leucócitos geralmente revela leucocitose, semelhante ao que ocorreu nos grupos administrados com veneno não tratado (VBj) pela via intravenosa, onde o grupo avaliado após 3 h foi aquele que apresentou maiores distúrbios hemostáticos, este quadro está ligado diretamente à gravidade do envenenamento. Também é possível utilizar a avaliação da contagem absoluta de neutrófilos e eosinófilos para acompanhar a progressão de complicações locais, tal como a necrose (1).

Assim, como em nossos achados, aumentos no volume plaquetário também foram observados em outros trabalhos, onde coelhos envenenados apresentam aumento do VMP, que precede a recuperação da contagem plaquetária e o aumento de plaquetas reticuladas (102). Corroborando estas observações, também já foi observado o aumento do VMP anterior à elevação da contagem plaquetária, em modelos de plaquetopenia induzida por anticorpos anti-plaquetários ou pela injeção de trombopoetina (103). Por outro lado, pacientes com envenenamento grave ou pacientes com sangramento tanto sistêmico quanto local apresentaram redução do VMP (1). Em humanos, o aumento do VMP é relatado em casos de hipercolesterolemia, diabetes melito, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral agudo, pré-eclâmpsia, púrpura trombocitopênica idiopática e estenose artéria renal (104).

Interessantemente, não houve relação direta entre a plaquetopenia e o consumo de fibrinogênio em pacientes picados pela *B. jararaca*, porém uma alta incidência de sangramentos sistêmicos é registrada em pacientes que apresentam simultaneamente plaquetopenia e afibrinogenemia (11).

Os dados obtidos demonstram a participação fundamental das metaloproteinases do veneno no consumo de fibrinogênio plasmático nos animais envenenados, visto que sua inibição específica com o Na₂-EDTA protegeu os animais contra o consumo, enquanto que as serinaproteases do veneno parecem não ter maior participação, apresentando níveis de fibrinogênio semelhante ao grupo administrado com veneno não tratado. Semelhantemente, quando camundongos foram inoculados com veneno da serpente *B. caribbaeus* apresentaram diminuição dos níveis de fibrinogênio 3 h após a administração pela via intravenosa e da mesma forma, a atividade fibrinogenolítica do veneno foi completamente bloqueada quando as metaloproteinases foram inibidas especificamente (95).

O consumo de fibrinogênio durante o envenenamento, como observado nos resultados, tem sido atribuído à presença de metaloproteinases, com atividade pró-coagulante (ativadores do fator II e X), no veneno de *B. jararaca*. A geração de trombina intravascular e a atividade direta de enzimas do tipo trombina-símbles podem também estar envolvidas no consumo de fibrinogênio (25). Este processo desestabiliza todo o processo de coagulação normal, causando distúrbios hemostáticos, caracterizados pelo consumo dos fatores da coagulação, principalmente do fibrinogênio plasmático, o que induz frequentemente a quadros de incoagulabilidade sanguínea nos pacientes envenenados.

Além do mais, trabalhos mostram uma associação inversa entre a venenemia e os níveis de fibrinogênio (105). Assim, apesar dos baixos níveis de venenemia apresentado pelo grupo administrado com veneno não tratado (controle positivo) pela via intravenosa após 6 h, o mesmo não é observado para a intensidade de fibrinogênio, que ainda mostra-se bastante alterado. Da mesma forma, após o tratamento soroterápico em humanos, observa-se que os níveis de fibrinogênio plasmático retornam ao normal somente após 18 h do início da soroterapia contra apenas 6 h para normalização da contagem plaquetária (10). Ademais, outros trabalhos mostram que a recuperação dos níveis de fibrinogênio em cães com afibrinogenemia ocorre após 24 h da administração do soro antibotrópico (106), no entanto, quando

os mesmos não receberam tratamento, os níveis de fibrinogênio retornam ao normal somente 72 h após o envenenamento (14). Já em coelhos envenenados que apresentaram hipofibrinogenemia os níveis se reestabeleceram no mesmo intervalo, porém, sem o tratamento com o antiveneno, provavelmente pela hipofibrinogenemia não ter sido tão acentuada (11).

Da mesma forma como é observado no envenenamento em ratos e semelhantemente ao envenenamento humano e de coelhos, logo após a administração de veneno e concomitante à diminuição do fibrinogênio ocorre um acentuado aumento nos níveis de PDF/f na circulação (12, 19).

A geração de PDF/f e o tempo de protrombina prolongado são importantes fatores que caracterizam os distúrbios da coagulação decorrentes do envenenamento botrópico. O quadro ocorre pelo consumo dos fatores da coagulação e pela geração de PDF/f, levando a alterações da coagulação sanguínea. Assim, corroborando com estas observações, os animais administrados com veneno não tratado (controle positivo) apresentaram altos níveis de PDF/f e prolongamento do TP. Ainda, o tempo prolongado de coagulação nos animais é consistente com o quadro de hipofibrinogenemia, observado nos ratos envenenados, que ocorre em envenenamentos ofídicos, inclusive nos botrópicos (8, 10).

Foi demonstrado que após a administração da fração coagulante do veneno de *B. jararaca* alterações do tempo de coagulação ocorre em duas fases, inicialmente, ocorre um encurtamento do tempo de coagulação e subsequentemente um prolongamento, tal fato é explicado pela ativação lenta e contínua dos fatores da coagulação (107). Devido à ação do veneno sobre a circulação sanguínea, o grupo administrado com veneno não tratado pela via intravenosa após 3 h apresentaram maior geração de PDF/f e maior prolongamento do TP, comparado aos demais grupos. Trabalhos realizados com veneno de *B. asper* mostram as mesmas alterações laboratoriais similares ao envenenamento pela *B. jararaca* no tempo de coagulação e ao mesmo tempo os níveis de fibrinogênio reduzem drasticamente, já os níveis de PDF/f aumentam, como consequência da ativação do sistema fibrinolítico

(108, 109). Da mesma forma, camundongos administrados com veneno da serpente *B. caribbaeus* também apresentaram aumento dos níveis de PDF/f 3 e 24 h após a inoculação intravenosa (95).

Desta forma, os dados evidenciam a participação das metaloproteinases na gênese de distúrbios hemostáticos induzida pelo veneno de *B. jararaca* em ratos uma vez que a inibição das metaloproteinases foi capaz de inibir o consumo de fibrinogênio, a geração de PDF/f e o prolongamento do tempo de coagulação. Similarmente, em experimentos realizados com o veneno de *B. asper* utilizando inibidores de metaloproteinases e serinaproteases evidenciaram claramente que as metaloproteinases são os componentes pró-coagulantes *in vitro* e desfibrinogenante *in vivo* mais importantes (96, 110).

Já durante a avaliação dos níveis de fator VII circulante, dado o papel desse fator no início a via extrínseca da coagulação sanguínea, quando complexado com o fator tissular, era esperado que ocorresse o consumo desse fator, devido à ação das toxinas presentes no veneno que ativam os fatores da coagulação sanguínea, assim como ocorreu para os níveis de fibrinogênio plasmático. Sabe-se que os níveis de fator VII plasmáticos são determinados por fatores ambientais e genéticos, ou mesmo por sua interação (111, 112). Além disso, tem sido demonstrada uma forte contribuição do genótipo F7 para os níveis de fator VII, sendo que polimorfismos na região regulatória 5' é associada com os níveis de fator VII e com diferenças em sua atividade *in vitro* (113). Sua diminuição está associada com tendência a sangramentos, porém nenhuma relação foi observada entre a gravidade da hemorragia e os níveis de fator VII (114). Por outro lado, o fator VII é uma proteína de fase aguda assim, apresenta-se elevado em casos como o infarto do miocárdio (115, 116), tal fato poderia estar mascarando o consumo do fator VII decorrente do envenenamento botrópico devido à produção excessiva desse fator pelo fígado. Similarmente aos nossos resultados, pacientes picados pelas serpentes *B. asper* (108), *Echis carinatus* (117), *Vipera russelli siamensis* (118) e pacientes picados por serpentes australianas (119) não apresentaram alterações significativas

no consumo do fator VII. Diferentemente, baixos níveis de fator VII foram observados em uma descrição de caso clínico de envenenamento humano pela serpente *B. neuwiedi* (120).

Outro fator importante que também pode assumir papel preponderante como local de sequestro plaquetário em casos corriqueiros de envenenamento, quando a inoculação do veneno ocorre no tecido subcutâneo ou muscular esquelético é a lesão local (121). A hemorragia local induzida pelo veneno é uma manifestação bastante frequente observada nos animais envenenados e é atribuída à atividade hemorrágica das metaloproteinases do tipo P-III presentes no veneno da *B. jararaca*, como a jararagina, capazes de provocar lesões na membrana basal dos capilares e vênulas (23). Sabe-se que a jararagina é uma potente metaloproteinase presente no veneno de *B. jararaca* capaz de promover o sangramento local ou sistêmico. Outros estudos demonstram que é também capaz de promover a inflamação e a inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (122, 123). Tem sido proposto que o rápido dano causado *in vivo* nas células endoteliais pelas metaloproteinases é resultado de forças hemodinâmicas sobre a vasculatura que distende a integridade dessas células após lesões na membrana basal, consequência da clivagem proteolítica de seus componentes (124). O acentuado efeito hemorrágico do veneno induzida pela classe P-III se dá pelo acúmulo de altas concentrações dessa enzima próximo aos vasos sanguíneos acarretando na rápida degradação dos componentes da membrana basal. Desta forma, autores sugerem a administração de inibidores de metaloproteinases como um complemento do antiveneno na melhoria da neutralização da injúria local causada no tecido (125).

Devido à sua intensa atividade proteolítica, o veneno botrópico provoca destruição tecidual e morte celular no local de sua inoculação e consequente formação de um processo inflamatório no local de administração do veneno, o que poderia desempenhar um papel decisivo para induzir plaquetopenia nos ratos, pela promoção de sequestro das plaquetas circulantes no local da lesão (126). O mesmo ocorre em lesões

causadas por traumas mecânicos em seres humanos, em que há plaquetopenia pela liberação/exposição de substâncias trombogênicas e serotonina dos tecidos lesados e plaquetas (126). Como conhecido há longa data, as enzimas proteolíticas do veneno de *B. jararaca* degradam muitas proteínas vasculares e perivasculares, além de liberarem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tecidual α (TNF- α) e a IL-1 β , que são também citocinas pró-coagulantes (22, 102, 127). Os nossos resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que a inibição das metaloproteinases, classe de enzimas responsáveis pela atividade hemorrágica local, abole a atividade hemorrágica do veneno (128). Assim, os dados obtidos demonstram que o pré-tratamento do veneno com Na₂-EDTA inibiu quase completamente a hemorragia local quando comparada ao grupo salina, sugerindo um papel essencial das metaloproteinases na indução da atividade hemorrágica, como já demonstrado em outros trabalhos (6, 128).

Os animais administrados pela via subcutânea após 6 h com o veneno de *B. jararaca* apresentaram uma redução nos níveis de hemoglobina tecidual provocada no local de inoculação do veneno quando comparada ao mesmo grupo envenenado após 3 h, devido à maior absorção da hemoglobina após a inoculação do veneno. Ainda, estudos mostram que ratos administrados com jararagina apresentaram plaquetopenia dose-dependente (15), porém, a dose de veneno utilizada nos ratos, no presente estudo, foi capaz de induzir plaquetopenia com a presença de lesão local. Desta forma, os dados sugerem que a lesão local parece pouco contribuir como um local de sequestro plaquetário durante o envenenamento, uma vez que a inibição das metaloproteinases pelo Na₂-EDTA inibiu a hemorragia local, porém, os animais ainda apresentaram um alto consumo de plaquetas. Diferentemente, um estudo observou que ao administrar a fração hemorrágica do veneno de *Vipera palestinae* em cobaias, não houve plaquetopenia, apesar da hemorragia generalizada (129).

Durante o envenenamento, a lesão local tem sido subestimada como um mecanismo de origem que promova distúrbios na coagulação, uma vez

que o TF pode estar envolvido nesse mecanismo. A exposição, expressão e/ou liberação de fator tissular induzido pelo veneno de serpentes, pode ocorrer no local de inoculação do veneno ou sistemicamente, como demonstrado na dosagem de TF plasmático, em virtude da distância do local do dano provocado pelas toxinas do veneno. Vale ressaltar a importância de avaliar a expressão em 3 e 6 h após a administração do veneno já que a expressão do fator tissular e da PDI podem ocorrer de forma mais precoce em 3 h após o envenenamento ou tardia 6 h após o envenenamento. Como os resultados mostram, a expressão de TF no plasma ocorre de forma mais precoce, já que apresentou maior expressão após 3 h independentemente da via de inoculação utilizada. No entanto, a via subcutânea parece ter maior importância no aumento dos níveis de TF sendo que mesmo tardiamente, após 6 h, os níveis de TF plasmáticos continuaram elevados.

Em nossos resultados observamos altos níveis de TF no pulmão em animais administrados pela via subcutânea e intravenosa, após 6 e 3 h, respectivamente, com veneno não tratado (controle positivo). De fato, a escolha do pulmão para a dosagem dos níveis de TF foi baseada em estudo anterior que mostra que o pulmão apresenta altos níveis de TF (59), corroborando com os nossos resultados. Ademais, é o órgão onde ocorre frequentemente o depósito de plaquetas observadas em envenenamentos humanos e experimentais (99, 130).

Independentemente da localização onde o TF é liberado, nossos resultados demonstraram que, além das enzimas pró-coagulantes do veneno, a expressão de TF também pode ser um mecanismo que ative a cascata da coagulação sanguínea durante o envenenamento por serpentes. Na pele, a expressão de TF mostrou-se notavelmente aumentada tardiamente, após 6 h em animais envenenados; simultaneamente, a PDI, enzima responsável pela ativação do TF, estava diminuída nesses mesmos grupos, possivelmente devido à apoptose/necrose do tecido após o envenenamento local. De fato, o silenciamento gênico da PDI é tóxico para células em cultura (131). Em vários modelos trombóticos *in vivo*, há acúmulo de PDI no local da injúria vascular, o que sustenta o papel da PDI na

regulação da coagulação (59-61). Outros trabalhos mostram que a inibição da PDI, utilizando anticorpos específicos ou flavonóides, inibe a formação de trombos em vários modelos de trombose. Essa inibição impede tanto o acúmulo plaquetário no local da injúria, mas também a geração de fibrina, demonstrando o papel crítico da PDI extracelular no início da formação do trombo (59, 60, 132, 133). Ainda, utilizando um modelo de célula endotelial *in vitro* observou-se que ao inibir a PDI da superfície celular induz a um notável aumento da função pró-coagulante do TF, enquanto a adição exógena de PDI inibe o processo de decriptação do TF (134). Assim, a diminuição notada da expressão proteica de PDI em 6 h pode ser também uma causa de intensificação dos distúrbios hemostáticos durante o envenenamento.

Além disso, confirmando com os dados de dosagem de TF no local de lesão, os resultados da expressão proteica corroboram com a dosagem de TF no local de lesão após 6 h, onde observou um notável aumento do TF, evidenciando a importância da lesão local para indução de coagulopatias. A exposição/liberação de TF nos locais de lesão pode ser um mecanismo que tanto fomenta o sequestro plaquetário no local de inoculação do veneno como ativa a via extrínseca da coagulação, contribuindo, por conseguinte, para a promoção dos sinais sistêmicos do envenenamento (plaquetopenia e coagulopatia).

A coagulação intravascular disseminada (CID) é caracterizada pela ativação iniciada por citocinas da coagulação dependente do TF, controle insuficiente da coagulação por anticoagulantes fisiológicos e atenuação da fibrinólise mediada pelo inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) (135). Devido aos elevados níveis de D-dímeros, plaquetopenia, prolongamento do tempo de protrombina e baixos níveis de fibrinogênio, observados em nossos experimentos, as manifestações decorrentes do envenenamento são frequentemente associadas com a CID. Demonstrou-se aqui o aumento dos níveis de TF, plasmáticos e teciduais, apesar de nenhum trabalho anterior na literatura tê-lo mostrado anteriormente durante o envenenamento ofídico. Mecanismos distintos de ativação da coagulação têm sido descritos para

ocasionar a CID, que é resultante da interação de diferentes mecanismos que culminam na deposição de fibrina no leito vascular, mediada pelo complexo TF/FVIIa. Até a presente data, achava-se somente a ativação da coagulação durante o envenenamento se dava diretamente pela ação de toxinas pró-coagulantes, sem expressão/geração de TF (136). Contudo, nossos resultados sugerem que a ativação da coagulação no envenenamento local pode também ocorrer por meio da formação do complexo TF/FVIIa.

O TF é o principal iniciador da cascata da coagulação, e a expressão anormal pode ser responsável por episódios trombóticos em pacientes com desordens clínicas (59) e na CID (137, 138). Diversos estudos têm demonstrado o aumento dos níveis de TF circulante em pacientes com fatores de risco cardiovascular, tais como a diabetes, onde foi observado um aumento dos níveis de TF de mais de 4 vezes em pacientes diabéticos, quando comparados a indivíduos normais (139) e hipertensão, onde foi demonstrado uma redução de aproximadamente 22% dos níveis de TF após 6 meses de tratamento em relação a pacientes hipertensos (140). Ademais, estudos mostram que a liberação de TF proveniente de pacientes com síndrome aguda coronariana provoca trombose venosa em modelos de ratos (141, 142) e que há aumentos da expressão de TF em pacientes com câncer com risco de eventos tromboembólicos (142, 143).

O TF foi descrito como envolvido na inflamação e na trombogênese, uma vez que citocinas, imuno complexos e outros mediadores podem induzir a expressão do TF em monócitos ou células endoteliais (144). No entanto, a beritactivase, uma metaloproteinase PIII isolada do veneno de *B. erytromelas*, mas não a jararagina foi demonstrada como responsável por tornar as células endoteliais altamente trombogênicas devido à estimulação da atividade e expressão do TF (145).

Os nossos dados sugerem que a coagulopatia em envenenamentos por serpentes é multifatorial e essencialmente causada por metaloproteinases e que a expressão e liberação do TF parece estar envolvida neste processo.

6. CONCLUSÕES

1. Os resultados sugerem que as metaloproteínases do veneno são componentes cruciais e estão intrinsicamente envolvidas na gênese da coagulopatia e hemorragia local induzidas pelo envenenamento experimental pela serpente *B. jararaca* em ratos. Contudo, as metaloproteínases e serinaproteases não estão diretamente envolvidas na gênese da plaquetopenia induzida pela *B. jararaca* e outros mecanismos/toxinas do veneno parecem estar envolvidos e ainda precisam ser avaliados.

2. As vias de inoculação do veneno utilizadas, subcutânea e intravenosa, mostraram-se diferentes quanto à intensidade do quadro clínico de distúrbios hemostáticos, sendo que a via intravenosa apresentou as maiores e mais rápidas alterações decorrentes do envenenamento. No entanto, a via subcutânea pode ser um importante mecanismo para a ativação da via extrínseca da coagulação, contribuindo para coagulopatias.

3. O aumento da concentração de fator tissular plasmático e expressão no pulmão e pele durante o envenenamento ocorre similarmente à coagulação intravascular disseminada, o que pode explicar por que em alguns pacientes graves de envenenamentos pela *B. jararaca* os distúrbios hemostáticos não são totalmente prevenidos somente pela soroterapia, necessitando de outras terapias. A expressão de PDI, uma enzima importante para a ativação do fator tissular, também estava alterada durante o envenenamento, demonstrando que ela também pode ser responsável pela promoção de distúrbios hemostáticos no envenenamento.

7. REFERÊNCIAS

1. 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;51:1440-8.
2. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
3. Franco FL. Origem e diversidade das serpentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003.
4. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Brasil2011.
5. França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 81-95.
6. Escalante T, Nunez J, Moura da Silva AM, Rucavado A, Theakston RD, Gutierrez JM. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;193:17-28.
7. França FOS, Málaque CMS. Animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Acidente botrópico*. 1 ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 72-86.
8. 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;19:199-204.
9. Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 289-309.
10. Cardoso JL, Fan HW, Franca FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q J Med*. 1993;86:315-25.

11. Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb Haemost.* 2004;92:369-83.
12. Santoro ML, Sano-Martins IS, Chamone DA. In vivo platelet activation induced by *Bothrops jararaca* venom in rabbits. *Platelets.* 1994;5:162-70.
13. Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SC, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb Res.* 1997;87:183-95.
14. Sano-Martins IS, Santoro ML, Morena P, Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Antonio LC, Nishikawa AK, Goncalves IL, Larsson MH, Hagiwara MK, et al. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Braz J Med Biol Res.* 1995;28:303-12.
15. Kamiguti AS, Theakston RD, Desmond H, Hutton RA. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* 1991;29:1097-105.
16. Cardoso DF, Yamaguchi IK, Silva AMM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 367-79.
17. Gonçalves LR, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2000;9:101-7.
18. Cidade DA, Simão TA, Davila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Bon C, Zingali RB, Albano RM. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon.* 2006;48:437-61.
19. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, Morena P, Tomy SC, Antonio LC, Mihara H, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thromb Haemost.* 1990;63:449-53.
20. Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 1996;34:627-42.
21. Gutierrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon.* 2009;54:976-87.

22. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon*. 1992;30:1387-97.
23. Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J*. 2008;275:3016-30.
24. Gutierrez JM, Romero M, Diaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1995;33:19-29.
25. Santoro ML, Sano-Martins IS. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon*. 1993;31:733-42.
26. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 1994;62:325-72.
27. Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45:1115-32.
28. Santos BF, Serrano SM, Kuliopulos A, Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett*. 2000;477:199-202.
29. Serrano SM, Mentele R, Sampaio CA, Fink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1995;34:7186-93.
30. Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA, Camargo AC, Fink E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur J Biochem*. 1998;251:845-53.
31. Serrano SM, Sampaio CA, Mentele R, Camargo AC, Fink E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. *Thromb Haemost*. 2000;83:438-44.
32. Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, Titani K, Yoshida E, Sugimoto M, Yoshioka A, et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1994;33:1843-9.

33. Paes Leme AF, Prezoto BC, Yamashiro ET, Bertholim L, Tashima AK, Klitzke CF, Camargo AC, Serrano SM. Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1363-72.
34. Morita T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004;4:357-73.
35. Sekiya F, Atoda H, Morita T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry.* 1993;32:6892-7.
36. Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin MC, Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry.* 1993;32:10794-802.
37. Fujimura Y, Ikeda Y, Miura S, Yoshida E, Shima H, Nishida S, Suzuki M, Titani K, Taniuchi Y, Kawasaki T. Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 1995;74:743-50.
38. Fujimura Y, Kawasaki T, Titani K. Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 1996;76:633-9.
39. Rioux V, Gerbod MC, Bouet F, Menez A, Galat A. Divergent and common groups of proteins in glands of venomous snakes. *Electrophoresis.* 1998;19:788-96.
40. Junqueira-de-Azevedo Ide L, Ho PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene.* 2002;299:279-91.
41. Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Masci PP, de Jersey J, Gorman JJ, Lavin MF. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:973-86.
42. Zhang B, Liu Q, Yin W, Zhang X, Huang Y, Luo Y, Qiu P, Su X, Yu J, Hu S, Yan G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. *BMC Genomics.* 2006;7:152.
43. Junqueira-de-Azevedo IL, Ching AT, Carvalho E, Faria F, Nishiyama MY, Jr., Ho PL, Diniz MR. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics.* 2006;173:877-89.

44. Asazuma N, Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Handa M, Fujimura Y, Miura S, Kume S. Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. *Blood*. 1997;90:4789-98.
45. Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 3^a ed. Philadelphia 2005. p. 3-16.
46. Iwanaga S. Primitive coagulation systems and their message to modern biology. *Thromb Haemost*. 1993;70:48-55.
47. Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem*. 2000;46:1260-9.
48. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J*. 2004;168:238-51.
49. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*. 1992;326:800-6.
50. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19:3-10.
51. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*. 2003;1:1504-14.
52. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36:108-17.
53. Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost*. 2001;86:298-307.
54. Pinotti M, Toso R, Girelli D, Bindini D, Ferraresi P, Papa ML, Corrocher R, Marchetti G, Bernardi F. Modulation of factor VII levels by intron 7 polymorphisms: population and in vitro studies. *Blood*. 2000;95:3423-8.
55. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:41-8.
56. Camerer E, Trejo J. Cryptic messages: is noncoagulant tissue factor reserved for cell signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14259-60.
57. Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer*. 2006;118:1713-20.

58. Pendurthi UR, Ghosh S, Mandal SK, Rao LV. Tissue factor activation: is disulfide bond switching a regulatory mechanism? *Blood*. 2007;110:3900-8.
59. Mackman N, Sawdey MS, Keeton MR, Loskutoff DJ. Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am J Pathol*. 1993;143:76-84.
60. Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschielt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest*. 2008;118:1110-22.
61. 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;118:1123-31.
62. Zhou J, May L, Liao P, Gross PL, Weitz JI. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:863-9.
63. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13932-7.
64. Holbrook LM, Watkins NA, Simmonds AD, Jones CI, Ouwehand WH, Gibbins JM. Platelets release novel thiol isomerase enzymes which are recruited to the cell surface following activation. *Br J Haematol*. 2010;148:627-37.
65. van Nispen Tot Pannerden HE, van Dijk SM, Du V, Heijnen HF. Platelet protein disulfide isomerase is localized in the dense tubular system and does not become surface expressed after activation. *Blood*. 2009;114:4738-40.
66. Santoro ML. *Contribuição à investigação das alterações hemostáticas induzidas pelo veneno da serpente Bothrops jararaca em coelhos: estudo das glicoproteínas da membrana, função, secreção e sobrevivência plaquetárias* [tese]: Universidade de São Paulo; 2002.
67. White JG. Ultrastructural analysis of platelet contractile apparatus. *Methods Enzymol*. 1992;215:109-27.
68. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:s5-10.
69. Bergmeier W, Wagner DD. Inflammation. In: Elsevier, editor. *Platelets*. Amsterdam 2007. p. 713-26.

70. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007;100:27-40.
71. Katoh N. Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci*. 2009;53:89-95.
72. Yamashita KM, Nogueira TO, Senise LV, Cirillo MC, Goncalves LR, Sano-Martins IS, Giorgi R, Santoro ML. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. *J Thromb Haemost*. 2011;9:2057-66.
73. Weyrich AS, Schwartz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7:241-6.
74. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwartz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122:379-91.
75. Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006;203:2433-40.
76. Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*. 2007;109:5242-50.
77. Jakobsen E, Kierulf P. A modified beta-alanine precipitation procedure to prepare fibrinogen free of antithrombin-III and plasminogen. *Thrombosis Research*. 1973;3:145-59.
78. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.
79. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
80. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 1987.
81. McKinney MM, Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J Immunol Methods*. 1987;96:271-8.

82. Santoro ML, Barbaro KC, Flores da Rocha TR, Soares Torquato RJ, Hirata IY, Sano-Martins IS. Simultaneous isolation of platelet factor 4 and glycoprotein IIb-IIIa complex from rabbit platelets, and characterization of specific chicken antibodies to assay them. *J Immunol Methods*. 2004;284:55-72.
83. Pukac LA, Carter JE, Morrison KS, Karnovsky MJ. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. *Biotechniques*. 1997;23:385-8.
84. Gold AM, Fahrney D. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin. *Biochemistry*. 1964;3:783-91.
85. Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ*. 1983;61:949-56.
86. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J Lab Clin Med*. 1951;37:316-20.
87. Denson KWE. The preparation of general reagents and coagulation factors. In: Biggs R, editor. *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis*. 2^a ed. Austrália: Oxiford; 1976. p. 655-69.
88. 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;172:250-4.
89. McKee PA, Rogers LA, Marler E, Hill RL. The subunit polypeptides of human fibrinogen. *Arch Biochem Biophys*. 1966;116:271-9.
90. Pizzo SV, Schwartz ML, Hill RL, McKee PA. The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J Biol Chem*. 1972;247:636-45.
91. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2010;56:1443-58.
92. Barral-Netto M, Schrieffer A, Barral A, Almeida AR, Mangabeira A. Serum levels of bothropic venom in patients without antivenom intervention. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45:751-4.
93. Theakston RD, Fan HW, Warrell DA, Da Silva WD, Ward SA, Higashi HG. Use of enzyme immunoassays to compare the effect and assess the dosage regimens of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. The

- Butantan Institute Antivenom Study Group (BIASG). *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:593-604.
94. Labrousse H, Nishikawa AK, Bon C, Avrameas S. Development of a rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon.* 1988;26:1157-67.
 95. Herrera C, Rucavado A, Warrell DA, Gutierrez JM. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribbaeus* in a murine model. *Toxicon.* 2012;63C:19-31.
 96. Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loria GD, Arni R, Gutierrez JM. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thromb Haemost.* 2005;94:123-31.
 97. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, Warrell DA, Hay CR. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon.* 1991;29:961-72.
 98. Santoro ML, Sousa-e-Silva MC, Goncalves LR, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta-Ferreira IL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999;122:61-73.
 99. Amorim MDF, De Mello RF, Saliba F. *Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comaprado das lesões.*: Mem Inst Butantan; 1951.
 100. Sanders WE, Read MS, Reddick RL, Garriss JB, Brinkhous KM. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. *Lab Invest.* 1988;59:443-52.
 101. Benvenuti LA, Franca FO, Barbaro KC, Nunes JR, Cardoso JL. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. *Toxicon.* 2003;42:331-4.
 102. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 1996;81:1-41.
 103. Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y. Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood.* 1987;70:177-85.

104. Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:157-61.
105. Franca FOS. *Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan/SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1997.
106. Rosenfeld G, Kelen EMA, Nahas L. Regeneration of fibrinogen after defibrination by bothropic venom in man and in dogs. Relationships with clotting and bleeding time. *Rev Clin S Paulo*. 1958;34:36-44.
107. Von Klobusitzky D, König P. Estudos bichimicos sobre os venenos das serpentes do genero *Bothrops* - Acção da substancia coagulante *in vivo*. *Mem Inst Butantan*. 1935;10:237-43.
108. Barrantes A, Solis V, Bolanos R. [Alterations in the coagulation mechanisms of patients bitten by *Bothrops asper* (Terciopelo)]. *Toxicon*. 1985;23:399-407.
109. Arroyo O, Rojas G, Gutierrez JM. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Méd Costarricense*. 1999;41:23-9.
110. Rucavado A, Escalante T, Gutierrez JM. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*. 2004;43:417-24.
111. Bernardi F, Marchetti G, Pinotti M, Arcieri P, Baroncini C, Papacchini M, Zeponi E, Ursicino N, Chiarotti F, Mariani G. Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:72-6.
112. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:540-6.
113. Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1996;271:1738-47.
114. Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Banner DW, Tuddenham EG. Inherited factor VII deficiency: molecular genetics and pathophysiology. *Thromb Haemost*. 1997;78:151-60.
115. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results

from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:54-9.

116. Moyssakis I, Vlahodimitris IE, Kanakis MA, Kapsimali V, Tsoucala C, Vaiopoulos GA. Behavior of coagulation factors and normal inhibitors of coagulation during the acute phase of myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010;21:670-3.
117. Warrell DA, Davidson N, Greenwood BM, Ormerod LD, Pope HM, Watkins BJ, Prentice CR. Poisoning by bites of the saw-scaled or carpet viper (*Echis carinatus*) in Nigeria. *Q J Med.* 1977;46:33-62.
118. Than T, Hutton RA, Myint L, Khin Ei H, Soe S, Tin Nu S, Phillips RE, Warrell DA. Haemostatic disturbances in patients bitten by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma. *Br J Haematol.* 1988;69:513-20.
119. Isbister GK, Scorgie FE, O'Leary MA, Seldon M, Brown SG, Lincz LF. Factor deficiencies in venom-induced consumption coagulopathy resulting from Australian elapid envenomation: Australian Snakebite Project (ASP-10). *J Thromb Haemost.* 2010;8:2504-13.
120. Dempfle CE, Kohl R, Harenberg J, Kirschstein W, Schlauch D, Heene DL. Coagulopathy after snake bite by *Bothrops neuwiedi*: Case report and results of *in vitro* experiments. *Blut.* 1990;61:369-74.
121. Simon TL, Grace TG. Envenomation coagulopathy in wounds from pit vipers. *N Engl J Med.* 1981;305:443-7.
122. Clissa PB, Laing GD, Theakston RD, Mota I, Taylor MJ, Moura-da-Silva AM. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon.* 2001;39:1567-73.
123. Kamiguti AS, Hay CR, Zuzel M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J.* 1996;320 (Pt 2):635-41.
124. Lopes DS, Faquim-Mauro E, Magalhaes GS, Lima IC, Baldo C, Fox JW, Moura-da-Silva AM, Clissa PB. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. *Toxicon.* 2012;60:1072-84.
125. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e727.

126. Ordog GJ, Wasserberger J, Balasubramaniam S. Coagulation abnormalities in traumatic shock. *Ann Emerg Med.* 1985;14:650-5.
127. Zamuner SR, Teixeira CF. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm.* 2002;11:351-7.
128. Gutierrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon.* 2005;45:997-1011.
129. Grotto L, Jerushalmy Z, De Vries A. Effect of purified *Vipera palestinae* hemorrhagin on blood coagulation and platelet function. *Thromb Diath Haemorrh.* 1969;22:482-95.
130. Than T, Francis N, Tin Nu S, Myint L, Tun P, Soe S, Maung Maung O, Phillips RE, Warrell DA. Contribution of focal haemorrhage and microvascular fibrin deposition to fatal envenoming by Russell's viper (*Vipera russelli siamensis*) in Burma. *Acta Trop.* 1989;46:23-38.
131. Hashida T, Kotake Y, Ohta S. Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J Toxicol Sci.* 2011;36:1-7.
132. Jasuja R, Furie B, Furie BC. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood.* 2010;116:4665-74.
133. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, Bowley SR, Joshi SS, Dilks JR, Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest.* 2012;122:2104-13.
134. Popescu NI, Lupu C, Lupu F. Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood.* 2010;116:993-1001.
135. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med.* 1999;341:586-92.
136. Isbister GK. Snakebite doesn't cause disseminated intravascular coagulation: coagulopathy and thrombotic microangiopathy in snake envenoming. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:444-51.
137. Shimura M, Wada H, Wakita Y, Nakase T, Hiyoyama K, Nagaya S, Mori Y, Shiku H. Plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol.* 1996;52:165-70.

138. Wada H, Nakase T, Nakaya R, Minamikawa K, Wakita Y, Kaneko T, Ohiwa M, Deguchi K, Shirakawa S. Elevated plasma tissue factor antigen level in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol.* 1994;45:232-6.
139. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004;109:2524-8.
140. Felmeden DC, Spencer CG, Chung NA, Belgore FM, Blann AD, Beevers DG, Lip GY. Relation of thrombogenesis in systemic hypertension to angiogenesis and endothelial damage/dysfunction (a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial [ASCOT]). *Am J Cardiol.* 2003;92:400-5.
141. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2561-8.
142. Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:764-71.
143. Date K, Hall J, Greenman J, Maraveyas A, Madden LA. Tumour and microparticle tissue factor expression and cancer thrombosis. *Thromb Res.* 2012.
144. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989;134:1087-97.
145. Pereira AL, Fritzen M, Faria F, Motta G, Chudzinski-Tavassi AM. Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by Berythracivase and Jararhagin (SVMPs). *Toxicon.* 2006;47:788-96.