Ana Teresa Azevedo Sachetto

Novos mecanismos de patogênese da sepse e do envenenamento botrópico: potencial da rutina e rutina succinil como agentes terapêuticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,

Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2022

Ana Teresa Azevedo Sachetto

Novos mecanismos de patogênese da sepse e do envenenamento botrópico: potencial da rutina e rutina succinil como agentes terapêuticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,

Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sachetto, Ana Teresa Azevedo

Novos mecanismos de patogênese da sepse e do envenenamento botrópico : potencial da rutina e rutina succinil como agentes terapêuticos / Ana Teresa Azevedo Sachetto. -- São Paulo, 2022. Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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

Descritores: 1.Bothrops jararaca 2.Fator tissular 3.Flavonoides 4.Hemostasia 5. Sepse 6.Venenos

USP/FM/DBD-066/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A cada um que tem coragem de sorrir e sonhar.

Agradecimentos

A minha família por ser minha base. Ao meu pai, por me ensinar o valor do conhecimento e da ética e sempre me apoiar em todas as decisões. À minha mãe, por demonstrar com ações a força da bondade, do amor e da verdade. Ao meu irmão André por ser a melhor pessoa que já conheci e o maior orgulho da minha vida. Ao Lucky, Depp e Espião por fazerem cada momento ser inesquecível. À vó Lena, por toda a paciência de me ouvir e a sensibilidade de me sentir sempre abraçada. Aos meus sobrinhos e meus irmãos pela diversão constante de laços puros. Ao Gian por ser meu companheiro, agradeço pela paciência, por me fazer rir, me apoiar, tornar a vida mais leve e me impulsionar a ir além. Ao Flamel e a Marie, que me fizeram entender o que realmente importa e como cada segundo é preciso. A Deus, por tudo, sempre.

Ao tio Homero e tia Marli por sempre estarem comigo e por todo o apoio. À Dra. Iara Laporta, que me permitiu começar essa linda jornada. À Cris e Aldo pela amizade verdadeira e por sempre me lembrarem de que a vida é uma constante aventura e o dia-adia é precioso. À Hellô por me possibilitar momentos de calmaria e alegria pura.

Aos meus amigos por sempre estarem comigo. Em especial, à Luciana por ser uma amiga dedicada e atenciosa, pelas conversas, os melhores cafés, a sincronia de pensamentos e as infinitas risadas. Ao Gabriel por ser um anjo na minha vida e conseguir me compreender quando nem eu me compreendo. Ao Sávio por todas as conversas estimulantes e uma amizade que ultrapassa distâncias. Ao Fábio por ter me ajudado a seguir meus sonhos. Ao Renan, Luana, Carlos, Igor e Isabela por mais de uma década de parceria constante e incontáveis alegrias.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Larami Santoro, por sete anos de uma convivência frutífera que tanto me ensinou e permitiu que eu crescesse como cientista. Agradeço por ter me instruído em cada passo desse caminho sendo exemplo de inteligência, ética e competência.

Aos colaboradores e alunos do Laboratório de Fisiopatologia pela convivência e suporte diários. À Natacha, por ser a melhor companheira de bancada (e "snacks") que eu poderia imaginar. À Neusa por toda a ajuda e risadas.

Aos colaboradores desse projeto de pesquisa pelo suporte inestimável.

Aos integrantes do Mackman Lab por discussões científicas enriquecedoras e ao Dr. Nigel Mackman pela colaboração e por expandir meu mundo.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver meu doutorado.

Ao Instituto Butantan, por permitir a realização desse projeto de pesquisa, mas em especial por despertar em mim desde criança o interesse pela Ciência e pelo conhecimento.

A FAPESP (processo 2018/26015-8), CAPES e Fundação Butantan pelo suporte financeiro.

"Pequenas coisas feitas com grande amor mudarão o mundo." Madre Teresa de Calcutá

Normalização

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA I	DE FI	GURAS	. 12
LISTA I	DE TA	ABELAS	. 18
LISTA I	DE Al	BREVIATURAS	. 19
RESUM	[O		. 21
ABSTR	ACT.		. 23
1. IN	ГRОІ	DUÇÃO	1
1.1.	Infl	amação e coagulação sanguínea	1
1.2.	Sep	se	5
1.3.	Env	renenamento botrópico	7
1.4.	Rut	ina	. 12
VENEN	O DI	JLO 1: A RUTINA E RUTINA SUCCINIL INIBEM ATIVIDADES DO E Bothrops jararaca IN VITRO E NEUTRALIZAM A AÇÃO TÓXICA DO E VIVO	
2.1. N	MATI	ERIAIS E MÉTODOS	. 20
2.1.	.1.	Animais	. 20
2.1.	.4.	Caracterização da rutina succinil	. 21
2.1.	.5.	Ação da rutina e rutina succinil na hemostasia in vitro	
2.1.	. <i>7</i> .	Envenenamento in vivo	. 40
2.1.7.	1.	Soluções de veneno de <i>B. jararaca</i> e rutinas	. 41
2.1.7.	2.	Grupos e procedimentos experimentais	. 41
2.1.7.	3.	Análise de sobrevivência	. 42
2.1.7.	4.	Coleta de sangue e órgãos	. 42
2.1.7.	5.	Hemograma	. 43
2.1.7.	6.	Dosagem de fibrinogênio plasmático	. 44
2.1.	.8.	Análise estatística	. 45
3. RE	SUL	TADOS E DISCUSSÃO	. 46
3.1.	Sínt	tese e caracterização da rutina succinil	. 46
3.2.	A r	utina succinil altera parâmetros hemostáticos in vitro	. 57
3.4.	A r	utina e a rutina succinil neutralizam as atividades tóxicas do BjV <i>in vivo</i>	. 74
3.4.	.1.	Envenenamento moderado	. 75
		ULO 2: NOVOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO DA HEMOSTASIA- ÃO NO ENVENANAMENTO PELA SERPENTE <i>Bothrops jararaca</i>	. 87

4.1. MA	ATERIAIS E MÉTODOS	89
4.1.1.	Animais	89
4.1.5.	Envenenamento e endotoxemia in vivo	90
4.1.5.1.	Soluções de veneno de B. jararaca, LPS, rutinas e inibidores	90
4.1.5.2.	Grupos e procedimentos experimentais	91
4.1.5.3.	Coleta de sangue e tecidos	95
4.1.5.4.	Hemograma	95
4.1.5.5.	Atividade de TF em vesículas extracelulares (EV)	95
4.1.5.6.	Dosagem de fibrinogênio plasmático	96
4.1.5.7.	Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT)	97
4.1.5.8.	Dosagem de IL-6 plasmática	97
4.1.5.9.	Análise de hemorragia local	97
4.1.5.10	Expressão gênica	98
4.1.6.	Análise estatística	99
4.2. RE	SULTADOS	100
4.2.1. e hemor	O envenenamento induz rápida resposta inflamatória, ativação da co ragia local	
4.2.2. pelo env	A inibição de TF agrava os distúrbios hemostáticos e a hemorragia invenenamento	
4.2.3.	A inibição de SVSP impede a coagulopatia por consumo e a inibição a inflamação e lesão local hemorrágica	de SVMP
4.2.4. hemorra	A rutina e rutina succinil diminuem os distúrbios hemostáticos, infla ágicos induzidos pelo BjV na fase aguda do envenenamento	
4.2.5. gênica d	A endotoxemia induz a ativação de TF, resposta inflamatória e expre le proteínas de fase aguda	
4.3. DIS	SCUSSÃO	125
EFICAZE	TULO 3: OS BIOFLAVONÓIDES RUTINA E RUTINA SUCCINIL S S NO TRATAMENTO DE ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL araraca	POR
	ATERIAIS E MÉTODOS	
5.1.1.		
5.1.4.	Envenenamento in vivo	
5.1.4.1.	Soluções de veneno de <i>B. jararaca</i> e rutinas	
5.1.4.2.	Grupos e procedimentos experimentais	
5.1.4.3.	Coleta de sangue e órgãos	
5.1.4.4.	Hemograma	
5.1.4.5.	Dosagem de fibrinogênio plasmático	
3.1.4.3.	Dosagem de normogemo piasmatico	135

5.1.4.6.	Dosagem de capacidade antioxidante total	135
5.1.4.7.	Análise de hemorragia local	136
5.1.4.8.	Expressão gênica	136
5.1.5.	Análise estatística	136
5.2. RES	ULTADOS	138
	Os tratamentos com as rutinas e/ou SAB normalizam os parâmetros cos e de estado redox	138
5.3. DISC	CUSSÃO	154
5. CONCI	LUSÃO	157
6. REFER	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da decriptação do fator tissular
Figura 2 – Estrutura da quercetina, rutina e isomerase dissulfeto proteico14
Figura 3 – Representação da síntese da rutina succinil
Figura 4 – Representação esquemática dos grupos experimentais, tempos de análises e
coleta de amostras dos envenenamentos moderado e grave
Figura 5 – Perfis de absorção de luz pela rutina e rutina succinil
Figura 6 - Perfis de absorção de luz por soluções de rutina, rutina succinil, metanol,
piridina, anidrido succínico e ácido succínico
Figura 7 – Perfis de eluição da rutina e rutina succinil analisados por cromatografia
líquida de alta performance de fase reversa (HPLC)49
Figura 8 – LC-MSE cromatograma e CID-MS/MS espectro da rutina50
Figura 9 – Proposta de rotas de fragmentação da rutina e rutina succinil por ESI-CID-
MS/MS
Figura 10 – LC-MSE cromatograma e CID-MS/MS espectro da rutina succinil53
Figura 11 – Capacidade antioxidante total, e dosagens de cálcio, magnésio e zinco54
Figura 12 – Atividade e perfis de fluorescência da PDI
Figura 13 – Tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de
trombina59
Figura 14 – Formação de complexos com o fibrinogênio

Figura 15 – Perfis de fluorescência do fibrinogênio e albumina
Figura 16 – Perfis de fluorescência do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> e jararagina62
Figura 17 – Atividades enzimáticas de L-aminoácido oxidases, hialuronidases,
serinaproteases e metaloproteinases
Figura 18 – Atividade gelatinolítica67
Figura 19 – Atividade caseinolítica
Figura 20 – Atividade fibrinolítica69
Figura 21 – Atividade de ativador de protrombina71
Figura 22 – Atividade coagulante
Figura 23 – Contagem de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito
(envenenamento moderado)76
Figura 24 – contagem de plaquetas, volume plaquetário médio e fibrinogênio plasmático
(envenenamento moderado)77
Figura 25 – curvas de sobrevivência de camundongos
Figura 26 – Contagem de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito
(envenenamento grave)80
Figura 27 – contagem de plaquetas, volume plaquetário médio e fibrinogênio plasmático
(envenenamento grave)82
Figura 28 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina,
veneno, anticorpo IgG controle ou anticorpo inibidor de TF 1H1, tempo de análise e
coleta de amostras93

Figura 29 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina,
rutina, rutina succinil ou veneno, tempo de análise e coleta de amostras93
Figura 30 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com veneno
e inibidores das metaloproteinases e serinaproteases do veneno, tempo de análise e coleta
de amostras94
Figura 31 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com rutina,
rutina succinil ou veneno, tempo de análise e coleta de amostras94
Figura 32 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com rutina,
rutina succinil ou LPS, tempo de análise e coleta de amostras95
Figura 33 – Contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e eritrócitos em
camundongos 3 h após a administração de salina ou BjV100
Figura 34 – Contagem de plaquetas, volume plaquetário médio, níveis do complexo TAT
e fibrinogênio plasmático em camundongos 3 h após a administração de salina ou
BjV101
Figura 35 – Atividade de TF, atividade de FXa independente de TF e atividade de FXa
total em vesículas extracelulares em camundongos 3 h após a administração de salina ou
BjV102
Figura 36 -área hemorrágica local e hemorragia local em camundongos 3 h após a
administração de salina ou BjV
Figura 37 – contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e níveis de IL-6
plasmática em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, IgG controle ou
anticorpo 1H1
Figura 38 – contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas,
níveis de TAT e fibrinogênio plasmático em camundongos 6 h após a administração de
salina, BjV, IgG controle ou anticorpo 1H1106

Figura 39 – Área hemorrágica e intensidade de hemorragia local em camundongos 6 h
após a administração de salina, BjV, IgG controle ou anticorpo 1H1108
Figura 40 – Contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, eritrócitos,
plaquetas e volume plaquetário médio em camundongos 6 h após a administração de
salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF ou BjV+o-phe+AEBSF110
Figura 41 – níveis de fibrinogênio plasmático, TAT e IL-6 plasmática em camundongos
6 h após a administração de salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF
ou BjV+o-phe+AEBSF112
Figura 42 – Área hemorrágica e intensidade de hemorragia local em camundongos 6 h
após a administração de salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF ou
BjV+o-phe+AEBSF113
Figura 43 – contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, eritrócitos,
plaquetas e volume plaquetário médio em camundongos 6 h após a administração de
salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina115
Figura 44 – níveis de fibrinogênio plasmático, TAT e IL-6 plasmática em camundongos
6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina117
Figura 45 – Área hemorrágica e intensidade de hemorragia local em camundongos 6 h
após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina119
Figura 46 – contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e níveis de IL-6
plasmática e fibrinogênio plasmático em camundongos 6 h após a administração de
salina, rutina, rutina succinil ou LPS
Figura 47 – contagens de eritrócitos e plaquetas, e níveis de atividade de FXa e TF em
vesículas extracelulares em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina,
rutina succinil ou LPS

Figura 48 – quantidade relativa de mRNA (fígado) dos genes F2, Fga, Proc, Plg, Stat3
e Nfkb1 em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil ou
LPS
Figura 49 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina,
veneno, rutina ou rutina succinil, tempos de análises e coleta de amostras133
Figura 50 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina,
veneno, rutina ou rutina succinil, tempos de análises e coleta de amostras134
Figura 51 – Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina,
veneno, rutina, rutina succinil ou SAB, tempos de análises e coleta de amostras134
Figura 52 – Contagem de leucócitos totais em camundongos 24 h após a administração
de salina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico
Figura 53 – Contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em camundongos 24 h
após a administração de salina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico140
Figura 54 – Contagem de plaquetas, fibrinogênio plasmático e capacidade antioxidante
total em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV
ou soro antibotrópico
Figura 55 – Área hemorrágica e hemorragia local em camundongos 24 h após a
administração de salina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico144
Figura 56 – Imagens representativas da hemorragia em camundongos 24 h após a
administração de salina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico145
Figura 57 – Quantidade relativa de RNA dos genes <i>Fga</i> (fígado), <i>Stat3</i> (fígado) e <i>Hmox1</i>
(pele) em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV
ou soro antibotrópico
Figura 58 – Contagem de leucócitos em camundongos 48 h após a administração de
salina, rutina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico

Figura 59 – Contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em camundongos 48 h
após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico150
Figura 60 – Contagem de plaquetas, fibrinogênio plasmático e capacidade antioxidante
total em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV
ou soro antibotrópico
Figura 61 – Área hemorrágica e hemorragia local em camundongos 48 h após a
administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico152
Figura 62 – imagens representativas da hemorragia em camundongos 48 h após a
administração de salina, rutina succinil, BjV ou soro antibotrópico153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose mínima coagulante e atividade coagulante	73
Tabela 2 – Hemorragia abdominal e no diafragma de camundongos	83

LISTA DE ABREVIATURAS

"4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride" AEBSF

"Nα-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride" DL-BAPNA

Ácido épsilon aminocapróico EACA

Ácido etileno diamino tetracético dissódico Na₂EDTA

Capacidade antioxidante total TAC

Diidrocloreto de *o*-fenilenediamina OPD

Dose mínima coagulante DMC

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE

Fator de necrose tumoral alfa TNF-α

Fator de von Willebrand vWF

Fator tissular TF

Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina NADPH

Fosfatidilserina PS

Fosfolipases A₂ PLA₂

Glutationa reduzida GSH

Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina TAFI

Inibidor da via do fator tissular TFPI

Inibidor do ativador de plasminogênio 1 PAI-1

Interleucina 6 IL-6

Isomerase de dissulfeto proteico PDI

L-aminoácido oxidases LAAO

Metaloproteinases do veneno de serpentes SVMP

Produtos de degradação de fibrina PDF

Retículo endoplasmático	RE
Serinaproteases do veneno de serpentes	SVSP
Soro anti-botrópico	SAB
Subcutâneo	s.c.
Tempo de protrombina	TP
Tempo de tromboplastina parcial ativada	TTPA
Veneno de Bothrops jararaca	BjV
Volume plaquetário médio	VPM

RESUMO

Sachetto ATA. *Novos mecanismos de patogênese da sepse e do envenenamento botrópico*: potencial da rutina e rutina succinil como agentes terapêuticos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O veneno da serpente Bothrops jararaca (BjV) induz diversas alterações deletérias para o organismo como plaquetopenia, hipofibrinogenemia, intensa hemorragia local, estresse oxidativo/nitrosativo e uma resposta inflamatória exacerbada. O tratamento de pacientes picados ainda apresenta desafios, já que a soroterapia possui limitações quanto às suas ações. Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado o potencial da rutina como possível composto terapêutico complementar para o envenenamento. Sabe-se que a rutina possui uma ampla gama de atividades, no entanto seu uso apresenta limitações por ser um composto pouco hidrossolúvel. Desse modo, os estudos desse projeto foram iniciados com a realização de uma modificação química na rutina (succinilação), resultando no composto hidrossolúvel rutina succinil, que demonstrou possuir atividades características da rutina in vitro, como antioxidante e inibidora da isomerase dissulfeto proteico (PDI). A seguir foram realizados testes in vitro comparativos entre a rutina e a rutina succinil para avaliar as suas atividades de inibição de diferentes atividades do BiV. Diferentemente da rutina, a rutina succinil demonstrou potencial inibitório em relação a atividades da família majoritária do veneno (metaloproteinases). Visto o potencial da rutina e rutina succinil, experimentos in vivo foram iniciados com camundongos utilizando 2 e 3 DL₅₀ (dose letal 50%) de BjV, os quais demonstraram que as rutinas induzem uma melhor recuperação de parâmetros hemostáticos alterados pelo envenenamento. Ademais, a rutina e rutina succinil foram capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do BjV e impedir a mortalidade de camundongos induzida pelo envenenamento. Posteriormente, foram realizados ensaios in vivo com uma dose subletal do BjV para a avaliação de parâmetros da coagulação, inflamação e hemorragia local. Congruentemente com os resultados in vitro, quando pré-incubada com o BjV, a rutina succinil inibiu importantes ações das metaloproteinases do veneno, abolindo completamente a hemorragia local e diminuindo os níveis da citocina próinflamatória IL-6. Os resultados também demonstraram que o fator tissular (TF) apresenta um papel protetor pró-hemostático no envenenamento. Diferentemente, a endotoxemia – um modelo experimental com mecanismos melhor elucidados – induz estados prócoagulante e pró-inflamatório dependente da atividade de TF. Apesar da diferença entre os dois modelos, foi observado aumento de genes que codificam proteínas de fase aguda tanto no envenenamento quanto endotoxemia. Assim como no envenenamento, as rutinas apresentaram ação anti-inflamatória na endotoxemia, porém de forma mais limitada. Portanto, a rutina e rutina succinil demonstram ter diferentes mecanismos de ação em relação ao veneno e efeitos benéficos ao serem administradas como tratamento do envenenamento e da endotoxemia. Ademais, a administração da rutina e rutina succinil – associadas ou não ao soro antiofídico — auxiliaram na recuperação da contagem plaquetárias e dos níveis de fibrinogênio plasmático, além de diminuir a hemorragia local, demonstrando grande potencial como tratamentos de envenenamentos por serpentes.

Descritores: Bothrops jararaca; Fator tissular; Flavonoides; Hemostasia; Sepse; Venenos.

ABSTRACT

Sachetto ATA. *Novel mechanisms of the pathogenesis of sepsis and Bothrops envenomations*: potential of rutin and rutin succinate as therapeutic agents [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Bothrops jararaca snake venom (BjV) induces several deleterious alteration to the organism, as thrombocytopenia, hypofibrinogenemia, intense local hemorrhage, oxidative/nitrosative stress and an exacerbated inflammatory response. Patient tratement still presents challenges since antivenom therapy presents limitation regarding its actions. On a previous study, rutin potential was demonstrated as a possible complementary agent to snakebites. Rutin possessed a range of activities, however its use presents limitations due to its low hydrosolubility. Therefore, this project was initiated by modifying rutin chemically by succinylation, resulting in the water-soluble compound rutin succinate. Rutin succinate demonstrated similar characteristic activities as rutin in vitro, as an antioxidant and inhibitor of protein disulfide isomerase (PDI). Tests in vitro were performed to compared rutin and rutin succinate to evaluate possible inhibitory activities against BjV. Differently from rutin, rutin succinate showed inhibitory potential regarding the major protein family in BjV (metalloproteinases). In vivo experimental envenomation tests were carried out using 2 and 3 LD₅₀ (lethal dose 50%) of BjV, which showed that rutins induce an improved recovery of hemostatic parameters altered by envenomation. Furthermore, rutin and rutin succinate were able to neutralize BjV toxic effects and prevent venom-induced mortality of mice. Posteriorly, in vivo tests were perfomed with a sublethal dose of BjV to assess coagulation and inflammation parameters and local hemorrhage. Rutin succinate pre-incubated with BįV inhibited important metalloproteinases activities, completely abolished local hemorrhage and decreased levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6. Results also demonstrated that tissue factor (TF) has a protective hemostatic role in envenomation. Differently, endotoxemia – an experimental model with better elucidated mechanism – induces pro-coagulant and proinflammatory states dependent of TF. In despite of differences between the two models, an increase in genes that code acute phase proteins was observed in envenomation and endotoxemia. As on envenomation, rutins presented an anti-inflammatory activity on endotoxemia, however in a more limited manner. Therefore, rutin and rutin succinate demonstrated different mechanisms of action regarding venom and beneficial effects when administrated as treatments in both envenomation and endotoxemia. In addition, the administration of rutin and rutin succinate – associated or not to antivenom – improved the recovery of thrombocytopenia and fibrinogen levels and diminished local hemorrhage, showing great potential as treatments for snakebites.

Descriptors: Bothrops jararaca; Flavonoids; Hemostasis; Sepsis; Tissue factor; Venoms.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Inflamação e coagulação sanguínea

A hemostasia e inflamação são sistemas complexos e fundamentais para a defesa do organismo contra lesões teciduais e invasões por patógenos. Apesar de diversas vezes serem vistos separadamente, esses sistemas possuem interações constantes e seu equilíbrio é necessário para manter o organismo fisiologicamente saudável. No entanto, sabe-se que alterações na regulação de componentes da inflamação ou hemostasia são características de diversas enfermidades e que compreender os mecanismos de interações desses sistemas é fundamental para ampliar o conhecimento sobre os distúrbios patológicos e assim, poder traçar melhores abordagens terapêuticas.

Dentre os mecanismos de interação entre a coagulação sanguínea e inflamação, podem-se citar alguns de grande importância, como a ação da trombina, da proteína C ativada (APC) e do fator tissular (TF). A trombina, gerada pela ativação da cascata de coagulação, é o mais potente agonista plaquetário, é responsável por ativar fatores da coagulação e clivar o fibrinogênio em fibrina – processo necessário tanto para o controle de sangramentos, como para a ocorrência de trombose. Além das ações na coagulação, a trombina também possui ações pró-inflamatórias, mediadas pela ativação dos receptores ativados por proteases (PARs) e das vias do fator nuclear kappa B (NF-κB), ativa leucócitos e induz a produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8). Por sua vez, a APC é um anticoagulante importante, já que é capaz de inibir os fatores da coagulação Va e VIIIa (FVa e FVIIIa), assim como neutraliza o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), potencializando o processo de fibrinólise. Já foi demonstrado que a APC é capaz de suprimir os fatores de transcrição

NF-κB e proteína ativadora 1 (AP-1), reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, inibir a ativação e migração de leucócitos, preservar o endotélio vascular e diminuir a expressão de TF (1-3).

Desde a clonagem do cDNA de TF em 1987, houve um aumento crescente dos estudos sobre a regulação e ação do TF em situação fisiológicas e patológicas, sendo considerado um dos links principais entre a coagulação e inflamação. O TF é uma glicoproteína transmembrana de 47 kDa responsável pelo início da cascata de coagulação e é expresso em tecidos, células endoteliais, monócitos, plaquetas e vesículas extracelulares (EVs) dessas células, que podem ser incorporadas por outras células sanguíneas (4-6). É preciso considerar que já foi demonstrado que as células hematopoéticas, especialmente células mononucleares, são importantes fontes de TF em condições com estímulos pró-coagulantes (7, 8). O primeiro nível de regulação do TF é transcricional, de modo que a expressão gênica do TF varia de maneira dependente do tipo de célula e órgão, o que é relacionado com a necessidade de proteção hemostática dos tecidos (4, 9). Já o segundo nível de regulação do TF é pós-traducional e é caracterizado pela encriptação e decriptação do TF (Figura 1). Em situações fisiológicas, o TF é encontrado na sua forma encriptada, que possui baixa atividade pró-coagulante, porém a ativação ou lesão celular é capaz de induzir uma rápida decriptação do TF, aumentando a sua atividade. Dentre os diversos mecanismos de decriptação do TF, destaca-se a ação de fosfolipídeos de membrana carregados negativamente, como a fosfatidilserina e esfingomielina, e também a ação da isomerase de dissulfeto proteico (PDI) (4, 6, 10, 11). Diversos estudos já relacionaram a indução da expressão ou atividade de TF com graves doenças, como infecções bacterianas e virais, sepse, doença cardiovascular, trombose, câncer, coagulação intravascular disseminada (CID), diabetes, entre outros (12). Foi observado que a indução de TF pode ser ocasionada não somente

por lesões vasculares, porém também por estímulos pró-inflamatórios como TNF-α, lipopolissacarídeos (LPS), interleucinas, proteína C reativa (CRP), interferons, espécies reativas e hipóxia. Essa indução é mediada pela ação dos fatores de transcrição do TF (AP-1 e NF-κB) ou pela decriptação do TF, o que resulta na ativação da coagulação, que quando não regulada, pode ocasionar condições patológicas como trombose e CID, além de potencializar ainda mais a resposta inflamatória (4, 12-15).

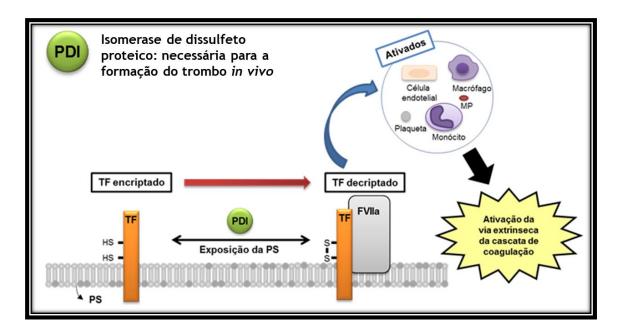


Figura 1: representação da possível influência decriptação do TF pela PS e pela PDI no envenenamento, que possibilita a ligação do TF ativo (decriptado) ao FVIIa, iniciando a cascata de coagulação. Fonte: Modificado de Chen & Hogg, 2013 (40).

De fato, estudos já demonstraram que a desregulação da coagulação e inflamação, como as alterações nos níveis circulantes e celulares de TF, pode induzir quadros trombóticos/hemorrágicos e danos irreversíveis a tecidos, podendo levar ao comprometimento funcional dos órgãos e até mesmo a desfechos fatais. Um dos eventos patológicos associados a essa desregulação é o desenvolvimento da CID, que pode ser induzida por estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, levando a um aumento da expressão e atividade de TF na circulação (14, 16). A CID é caracterizada pela ativação

sistêmica da coagulação e redução de mecanismos anticoagulantes e da fibrinólise, que levam à formação de fibrina intravascular, oclusão de vasos sanguíneos, alteração do suprimento de sangue nos tecidos e consequente falência de órgãos. Além da deposição de fibrina intravascular, a CID também pode induzir plaquetopenia e coagulopatia por consumo, marcada por diminuição de fatores da coagulação, o que pode ocasionar sangramentos sistêmicos diversos, agravando ainda mais esse quadro (12, 14, 16).

É bem estabelecido que a oclusão vascular e consequente diminuição do suprimento sanguíneo podem induzir uma hipóxia tecidual, e que a lesão tecidual e uma resposta inflamatória exacerbada ocorrem após a reperfusão sanguínea (17). Ademais, a lesão por isquemia-reperfusão está diretamente relacionada com o desequilíbrio no estado redox – balanço entre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e antioxidantes, já que o aumento de espécies reativas é extremamente tóxico e pode induzir perda de função biológica e apoptose celular (17-19).

A indução da resposta inflamatória e consequente aumento do TNF-α são capazes de induzir a expressão e ativação do complexo da NADPH oxidase, uma conhecida fonte de espécies reativas presente em células inflamatórias, cuja regulação também é feita pela PDI (17, 20, 21). Ademais, o TNF-α também é capaz de regular a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e, consequentemente, a produção de óxido nítrico (NO), um gás com ação vasodilatadora, porém que reage com outras espécies reativas, gerando subprodutos altamente oxidantes, como o peroxinitrito (21). Além disso, é preciso considerar que o TNF-α é fundamental na indução de produção de outras citocinas, que por sua vez são importantes para a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado (22); essas proteínas e citocinas são conhecidos indutores do TF, sendo que já foi demonstrado que em situações de lesão renal, pulmonar, hepática ou cardíaca, há o aumento da expressão ou atividade de TF (4, 23-26).

Devido à complexidade dos mecanismos da coagulação e inflamação, a busca pela melhor compreensão dessa interação se torna uma necessidade cada vez maior para reduzir a mortalidade e morbidade de pacientes. Um modelo frequente de estudo dessa interação é o desenvolvimento da sepse bacteriana, que ainda persiste como um problema grave.

1.2.Sepse

A sepse, caracterizada pela resposta desregulada do organismo a infecções, é considerada um problema de saúde pública e afeta aproximadamente 30 milhões de pessoas por ano, ocasionando potencialmente 6 milhões de mortes (27). Já foi demonstrado que em modelos de sepse por bactérias Gram-negativas ou modelos de endotoxemia, os órgãos que apresentam danos graves também possuem um acúmulo de deposição de fibrina (3, 28). Observou-se, que em pacientes com sepse e modelos experimentais de endotoxemia, a indução da expressão e atividade de TF mostrava-se como um importante biomarcador de distúrbios associados à sepse - como lesão pulmonar aguda – e de prognóstico de mortalidade (7, 29, 30). Desse modo, é postulado que a regulação do TF, assim como da ativação da coagulação seria uma estratégia fundamental para o controle do desenvolvimento da CID e a diminuição dos danos induzidos pela sepse ou endotoxemia. Estudos já demonstraram que em modelos de sepse ou endotoxemia induzida por LPS, há aumento da expressão gênica e proteica do TF, assim como o aumento de sua atividade, o que está associado à ativação da coagulação nesses modelos, e sugere que o complexo TF-FVIIa é fundamental na interação entre a coagulação e inflamação na sepse (31-35). O uso de modelos experimentais com depleção ou deleção do TF é uma estratégia eficaz para a análise da influência do TF na patogênese desses distúrbios. A depleção é realizada pelo uso do anticorpo anti-TF 1H1 – que é capaz de inibir a formação do complexo TF-FVIIa –, enquanto que a deleção do TF é feita por meio da utilização de modelos de camundongos geneticamente modificados, como os camundongos *low-TF* (que expressam aproximadamente 1% da quantidade habitual de TF) (4, 7, 8, 34, 36).

O modelo de endotoxemia, induzido pela administração de LPS, induz a ativação e influxo de leucócitos, assim como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNFα, IL-1 e IL-6. Ademais, são observados distúrbios da coagulação na circulação e em órgãos (como rins e pulmão), como indução do TF e PAI-1 e supressão da APC. Um dos mecanismos em comum dessas alterações é a indução de fatores de transcrição como o NF-κB e AP-1, que são responsáveis pela regulação gênica de citocinas e componentes da coagulação, como o TF(37, 38). É preciso considerar que interleucinas antiinflamatórias podem influenciar no desenvolvimento das alterações induzidas pelo LPS, como a ação da IL-10 que é capaz de mediar a inibição do IFN-γ e do TF, podendo contribuir para a estabilização dessas alterações (39). No entanto, já foi demonstrado que as alterações na inflamação e coagulação induzida pelo LPS apresentam diferenças nas fases aguda e crônica. Apesar dos extensos estudos sobre os mecanismos da sepse, seu tratamento ainda representa uma grande dificuldade, o que culmina numa alta taxa de mortalidade (30 a 70% da mortalidade em unidades de tratamento intensivo) (7, 35, 40). Diversas estratégias terapêuticas têm sido estudadas com o intuito de minimizar os efeitos deletérios da sepse, como o uso de agentes anti-inflamatórios e anticoagulantes (35, 41-43). No entanto, ainda se faz necessário compreender melhor os mecanismos das alterações induzidas na sepse, assim como a busca por um agente terapêutico que possa combater a ativação desregulada da inflamação e coagulação, sem comprometer processos fisiológicos importantes, como a hemostasia.

Ademais, outras situações patológicas apresentam alterações similares às induzidas pela sepse mesmo possuindo mecanismos etiológicos diferentes, como o envenenamento por serpentes Viperidae, que induz resposta inflamatória, desregulação da hemostasia e lesões teciduais.

1.3. Envenenamento botrópico

Dentre os diversos envenenamentos por toxinas animais, pode-se destacar o envenenamento ofídico, que é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma prioridade dentre as doenças tropicais negligenciadas (44). A incidência de picadas por serpentes é subestimada, já que nem todos os acidentes são devidamente registrados. No entanto, a cada ano são notificados 5,4 milhões de picadas de serpentes, 1,8 - 2,7 milhões de envenenamentos ofídicos e 81000-138000 mortes ocasionadas por esses acidentes. A população mais afetada é composta por crianças e trabalhadores rurais de países em desenvolvimento, que também sofrem outras consequências do envenenamento, como morbidade, trauma psicológico e até mesmo amputação de membros ou falanges (44, 45).

No Brasil, o gênero de serpentes *Bothrops* (família Viperidae) é responsável por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos causados por serpentes peçonhentas, atingindo a média de 20000 acidentes por ano. No Estado de São Paulo, a espécie *Bothrops jararaca* (jararaca) é considerada a mais relevante epidemiologicamente e é considerada pela OMS como uma espécie com alta relevância médica (46-48). O veneno das serpentes tem por finalidade a predação e defesa, o que culminou em uma evolução natural de alta complexidade e especificidade (45). O veneno das serpentes *Bothrops* é composto majoritariamente por proteínas (90% do peso seco), que podem ser divididas em diferentes famílias, como as metaloproteinases (SVMP), serinaproteases (SVSP),

fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas do tipo-C e proteínas semelhantes a lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases (LAAO), entre outras (49-53).

O envenenamento ocasionado pelas serpentes do gênero *Bothrops*, denominado envenenamento botrópico, induz distúrbios clínicos relacionados à hemostasia e à inflamação. O acompanhamento das alterações clínicas é um fator importante a ser considerado no diagnóstico, na classificação da gravidade do envenenamento e, desse modo, no tratamento apropriado do paciente. Os distúrbios locais, isto é, próximos ao local da picada, são consequências das graves reações inflamatória e hemorrágica, que por sua vez, contribuem para o dano tecidual local, a dor intensa, o edema, a equimose e a hemorragia. Já os distúrbios clínicos sistêmicos estão mais relacionados com manifestações de alterações hemostáticas, como sangramentos e hemorragias diversos – como gengivorragia, hematúria, epistaxe, petéquias e, em casos mais graves, acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos – e doença renal e choque (45, 54-57). É importante salientar que os distúrbios clínicos locais são um motivo de preocupação no tratamento de pacientes picados, já que não são efetivamente combatidos com a administração do soro antibotrópico (SAB) – o tratamento oficial para acidentes botrópicos –, o que pode resultar em sequelas permanentes e/ou amputações.

Acompanhando os distúrbios clínicos, o envenenamento botrópico também é capaz de induzir importantes alterações laboratoriais, que estão diretamente relacionadas com as ações do veneno nos sistemas hemostático e inflamatório. É preciso elucidar que, devido à via de inoculação do veneno – normalmente intramuscular ou subcutânea – o veneno atinge a corrente sanguínea de maneira lenta e gradual. Desse modo, ocorre uma ativação contínua da coagulação, que é seguida por uma hiperfibrinólise secundária, evidenciada pela diminuição de α₂-antiplasmina e aumento dos produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF/f) e de D-dímeros. Desse modo, há a ocorrência de uma

coagulopatia por consumo no envenenamento, marcada pela diminuição de fatores da coagulação como a protrombina, os fatores V, VIII, X e principalmente, o fibrinogênio plasmático (57-60), o que gera consequências, como o prolongamento do tempo de coagulação e a incoagulabidade sanguínea (54, 61).

Além das alterações na coagulação e fibrinólise, o envenenamento por B. jararaca também induz importantes alterações hematológicas em pacientes picados e em modelos experimentais, como plaquetopenia, diminuição da contagem de eritrócitos e leucocitose leve a moderada. De fato, já foi demonstrado que a análise dos parâmetros hematológicos é importante para avaliar a gravidade do envenenamento, assim como o risco de ocorrência de complicações locais e sangramentos sistêmicos (45, 62). Os mecanismos responsáveis pela plaquetopenia no envenenamento por B. jararaca não estão completamente elucidados até o momento, porém, observou-se que pacientes que apresentam plaquetopenia e hipofibrinogenemia simultaneamente são mais propensos ao desenvolvimento de sagramentos sistêmicos (57, 58, 63, 64). Já a queda na contagem eritrocitária já foi relacionada à ocorrência de anemia microangiopática em ratos envenenados (65) e aos sangramentos locais e sistêmicos em camundongos envenenados (66), sendo que em pacientes picados já foi demonstrado que a ocorrência tanto de anemia microangiopática (67, 68) quanto de sangramentos pode induzir a queda de eritrócitos (62). Ademais, a leucocitose – marcada principalmente por neutrofilia leve a moderada – induzida pelo envenenamento é observada tanto em pacientes picados quanto em modelos experimentais nas primeiras horas após o envenenamento (fase aguda, 3 a 6 horas) e é ocasionada pela reação inflamatória aguda que segue o envenenamento (62, 69, 70).

A inflamação local induzida pelo envenenamento é causada por diversos fatores, como a ação direta de componentes do veneno botrópico nos tecidos, que gera adesão e influxo de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios e de espécies reativas que

potencializam a resposta inflamatória (71-73). Estudos já demonstraram que o veneno de *B. jararaca* ou componentes isolados desses venenos são capazes de induzir alterações nos níveis de importantes mediadores endógenos, como o aumento do TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10, óxido nítrico e IFN-γ (74-79). Além disso, foi demonstrado que SVMP clivam o TNF-α de seu precursor e que essa ativação do TNF-α tem participação no dano tecidual local induzido pelo veneno (80).

Como mencionado anteriormente, o desequilíbrio no estado redox no envenenamento por *B. jararaca* (66, 81, 82) poderia agir como mediador do dano tecidual local e da inflamação sistêmica (74, 83). Um dos possíveis mecanismos indutores do aumento de espécies reativas no envenenamento está relacionado com a hipóxia que segue a estase sanguínea induzida pelos componentes pró-hemostáticos do veneno e a consequente reperfusão tecidual, assim como a liberação de mediadores oxidativos e inflamatórios devido ao dano tecidual e celular induzido pelo veneno (84, 85). Ademais, as alterações de estado redox, resposta inflamatória, dano tecidual e hemorragia são conhecidas moduladoras de importantes proteínas, como a heme oxigenase 1 (HO-1, codificada pelo gene *Hmox1*). A HO-1 age como uma proteína antioxidante, anti-inflamatória e citoprotetora e está envolvida no catabolismo de heme, gerando biliverdina, que posteriormente é convertida no antioxidante bilirrubina (86). A HO-1 também é apontada como uma defesa contra o excesso de heme, melhorando a recuperação tecidual (87).

É preciso considerar que a compreensão dos mecanismos do processo inflamatório e hemostático é importante para o entendimento da complexidade da fisiopatologia do envenenamento e, consequentemente, para possibilitar a melhoria do atendimento clínico a pacientes (88). Além disso, também é preciso ressaltar que até o presente momento, os estudos realizados sobre os distúrbios dos sistemas hemostático e inflamatório no envenenamento botrópico possuíram um enfoque específico nas alterações somente de

um desses sistemas e não na interação entre os mesmos. Vê-se então a necessidade de um estudo que vise compreender os mecanismos fisiopatológicos do envenenamento tendo em vista a resposta inflamatória e hemostática, local e sistêmica.

Visto a relevância do complexo TF-FVIIa na interação entre a coagulação e inflamação, é preciso ressaltar que já foi demonstrado que o veneno botrópico e SVMP isoladas são capazes de induzir o aumento da atividade e das expressões proteica e gênica do TF in vitro e em modelos experimentais (66, 76, 89-92). Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa (63, 66) foi demonstrado o aumento da atividade do TF circulante na fase aguda do envenenamento por B. jararaca, o que caracteriza uma importante resposta sistêmica ao envenenamento, tornando-se uma causa de preocupação já que a ativação da coagulação pelo TF pode levar ao desencadeamento da CID. Desse modo, mostra-se necessário compreender os mecanismos que levam ao aumento do TF, assim como sua importância no desenvolvimento dos distúrbios hemostáticos e sua relação com as alterações inflamatórias e complicações locais e sistêmicas que seguem o envenenamento (73, 93). Ademais, além da ação das toxinas hemorrágicas e mediadores inflamatórios, o desencadeamento do quadro hemorrágico no envenenamento por B. jararaca poderia ser agravado ainda mais pela plaquetopenia e migração neutrofílica características do envenenamento botrópico (70, 93-95). E para que essas interações possam ser melhor compreendidas, também é necessário analisar não somente os efeitos do veneno, como também do tratamento do envenenamento, considerando tanto sua efetividade quanto suas limitações.

A soroterapia, isto é, o uso de soros antitoxinas animais como tratamento para acidentes provocados por animais peçonhentos, é utilizada há mais de um século (96). Dentre esses soros, é possível destacar o SAB, que possui ação específica em relação a venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e é o único medicamento oficial para o

tratamento de envenenamentos botrópicos. A administração intravenosa do SAB em pacientes picados é realizada de acordo com o quadro clínico apresentado (96, 97). A especificidade da soroterapia permite a neutralização eficiente das toxinas presentes no veneno e, assim, os pacientes picados por *B. jararaca* apresentam uma rápida recuperação (6 – 18h) dos parâmetros hemostáticos após a administração do SAB (98). No entanto, não se sabe como esse processo de recuperação ocorre, especialmente a velocidade e regulação da síntese hepática de fatores da coagulação em resposta ao envenenamento e à soroterapia. A avaliação da recuperação hemostática e seus mecanismos podem possibilitar o melhor entendimento da regulação da síntese hepática de fatores da coagulação tanto em situações fisiológicas e patológicas. De fato, nosso grupo de pesquisa já demonstrou (99) que após o envenenamento, há alterações da expressão gênica de fatores da coagulação, como o aumento da síntese hepática das três cadeias de fibrinogênio, demonstrada também em ratos injetados com a enzima trombina-símile do veneno de *Calloselasma rhodostoma* (100).

Apesar da eficácia da soroterapia no tratamento dos distúrbios sistêmicos, o SAB se mostra ineficaz no combate ao envenenamento em relação a complicações secundárias, como o desbalanço no estado redox e também aos graves distúrbios locais induzidos pelo veneno (82, 97, 98, 101). Visto que os efeitos deletérios dessas alterações persistem mesmo após a administração da soroterapia, estudar compostos terapêuticos complementares pode auxiliar na recuperação dos pacientes e diminuição da morbidade associada ao envenenamento.

1.4.Rutina

Um estudo pioneiro realizado por Seba em 1949 (102) analisou os efeitos locais inflamatórios e hemorrágicos do envenenamento botrópico, assim como a necessidade da

análise de compostos que visassem combater essas alterações locais. Para isso, foi utilizado o flavonóide quercetina-3-rutinosídeo (rutina), que se mostrou efetivo em diminuir ou retardar os distúrbios locais induzidos pelo veneno. Outros estudos da mesma década se focaram no potencial da rutina no tratamento de distúrbios vasculares e relacionaram os resultados positivos obtidos com o uso da rutina com sua capacidade de conferir uma maior proteção vascular e diminuir a fragilidade capilar (103).

A rutina é uma quercetina com a estrutura molecular 3,5,7,3'-4'-pentahidroxil flavona com dois glicosídeos na posição 3' do seu anel C (Figura 2), presente em diversas plantas e alimentos, como frutos cítricos, vegetais, grãos, sementes, especiarias, chá preto e, principalmente, trigo sarraceno. Assim como outras quercetinas, o potencial da rutina como antioxidante já foi demonstrado por diversos estudos, por promover a quelação de íons metálicos e o sequestro ou neutralização de espécies reativas (104-108). No entanto, foi somente na última década que os estudos sobre a rutina ganharam uma nova perspectiva, o que ampliou sua evidência como composto terapêutico. Foi demonstrado que a utilização da rutina (e análogos) era capaz de inibir a atividade da PDI (Figura 2), assim como impedir a formação de trombo *in vivo*, tanto em relação ao acúmulo de plaquetas quanto à deposição de fibrina, e desse modo, esses compostos têm sido considerados como uma nova classe de agentes antitrombóticos (109).

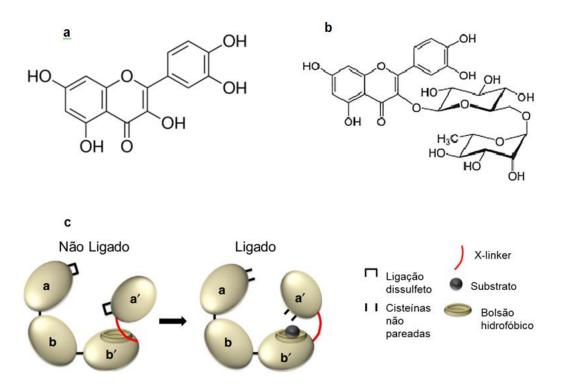


Figura 2: estrutura molecular da quercetina (**a**); estrutura molecular da quercetina-3-rutinosídeo (**b**); representação esquemática da regulação alostérica da PDI pela ligação de substratos (**c**). Fontes: Cai *et al.* (113); Furie & Flaumenhaft (46) e Bekendam *et al.* (112), modificado.

Atualmente, produtos contendo rutina já são comercializados em alguns países, como os Estados Unidos, como suplemento alimentar, sendo que a rutina foi considerada segura e de baixa toxicidade pela Food and Drug Administration (FDA), podendo ser recomendada com doses de até 2 g por dia para consumo oral por seres humanos. No entanto, o uso da rutina possui algumas limitações, como sua biodisponibilidade e solubilidade aquosa, e como alternativas, estudos têm sido realizados com compostos análogos à rutina (como a isoquercetina e troxerutina), assim como a rutina tem sido modificada quimicamente para aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade, como a conjugação da rutina com íons metálicos ou a succinilação das hidroxilas dos glicosídeos da rutina (110-113).

Esses compostos (análogos ou modificados quimicamente) também já estão disponíveis comercialmente e alguns deles (como Varemoid®, Relvene®, Venoruton® e

Paroven®) são indicados para tratamentos de distúrbios venosos, como varizes e hemorroidas, desde a década de 1960. Além da comercialização desses compostos, testes clínicos em humanos vêm sendo realizados para averiguar a ação da administração da quercetina e isoquercetina como terapia auxiliar para pacientes com quadros de trombose associada a câncer e outras doenças (114-119).

É necessário destacar a importância de analisar o potencial terapêutico da rutina considerando sua ampla gama de atividades, como ações anti-inflamatória, anti-trombótica, anti-hemorrágica, antioxidante, inibidora de trombina e PDI, moduladora do tônus vascular, entre outras (107-109, 120-126). Essas diversas ações fazem com que a rutina seja um composto com grande potencial no tratamento de desordens complexas, que envolvam alterações da coagulação, inflamação e até mesmo estresse oxidativo/nitrosativo, como a sepse e o envenenamento botrópico. Contudo, ainda há muito a se estudar para entender seu potencial terapêutico e os mecanismos pelos quais atua.

Estudos já demonstraram que a administração de rutina em modelos de endotoxemia por LPS (e outros modelos inflamatórios) possui efeitos protetores, como diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6, inibição de iNOS e consequentemente inibição da produção de NO, proteção da integridade vascular e diminuição da adesão e migração de leucócitos. Foi demonstrado também que a rutina é capaz de inibir a expressão e ativação do NF-κB, o que foi relacionado com a diminuição de citocinas e iNOS nesses modelos experimentais (127-129). No entanto, visto a influência dos eventos inflamatórios no desencadeamento dos distúrbios da coagulação na sepse, mostra-se necessário um estudo mais abrangente que vise compreender os mecanismos da rutina no tratamento da endotoxemia, o que também permite o esclarecimento de vias essenciais da patogênese desse modelo.

Assim como na endotoxemia, o uso da rutina (e compostos análogos) já foi estudado no envenenamento botrópico e apresentou atividades benéficas, como a ação antihemorrágica (130, 131). No entanto, demonstramos em um estudo recente (66) que a ação da rutina no envenenamento é mais extensa do que o demonstrado previamente. A administração da rutina em animais envenenados impediu o estabelecimento da coagulopatia por consumo, diminuiu o tempo de sangramento, impediu a queda característica na contagem de eritrócitos, reduziu o aumento de espécies reativas e demonstrou um efeito local relevante, diminuindo a intensidade e extensão da hemorragia induzida pelo envenenamento. Desse modo, a rutina demonstra um grande potencial terapêutico, e, assim, é mister investigar seus mecanismos de ação em relação ao envenenamento, assim como a análise da ação da rutina quando administrada como terapia complementar à soroterapia.

OBJETIVOS

Doenças que induzem alterações simultâneas na coagulação e inflamação são complexas. Considerando a importância epidemiológica dos envenenamentos botrópicos na América do Sul e Central, mostra-se necessário empreender um estudo mais aprofundado da interação entre a coagulação e a inflamação nesse agravo, almejando a compreensão dos mecanismos que causam tais alterações, para assim ampliar a compreensão da patogênese e determinar os alvos mais relevantes para uma intervenção terapêutica. Por sua vez, a sepse – uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, causada por uma infecção de base que pode produzir alterações hemostáticas graves – já bem descritas na literatura – pode nos servir como um guia para comparar a cinética das alterações no envenenamento pela *B. jararaca* e assim melhor dissecar seus mecanismos fisiopatológicos, especialmente em relação à participação do TF na patogênese de ambas. Ademais, como a sepse e as complicações do envenenamento ainda carecem de tratamento eficaz, é importante a busca por novos compostos terapêuticos, como a rutina – um composto natural, barato, de fácil acesso e já disponível comercialmente –, que possui uma (i) ampla gama de atividades benéficas anti-inflamatórias, pró-hemostáticas e anti-trombóticas, e (ii) que já se mostrou segura na prevenção dos distúrbios hemorrágicos, inflamatórios e hemostáticos observados no envenenamento ofídico (66, 132) e na sepse (127). Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos gerais investigar em modelos experimentais:

(a) A atividade terapêutica e o modo de ação da rutina e seu derivado hidrossolúvel rutina succinil em relação às alterações induzidas pelo BjV ou LPS *in vitro* e *in vivo*. A ação da rutina já foi estudada em trabalho recente nosso em

envenenamento experimental por *B. jararaca* (66), e mostrou ser um agente terapêutico coadjuvante promissor para o envenenamento experimental pelo BjV.

(b) A patogênese das alterações da interface inflamação-hemostasia da sepse e do envenenamento botrópico, induzidas pela injeção de LPS e veneno de *B. jararaca* (BjV), respectivamente. Foi avaliada a indução de mediadores inflamatórios sistêmicos, assim como a indução da coagulação nesses modelos. A participação do TF nos distúrbios inflamatórios e hemostáticos foi avaliada, assim como a participação de serinaproteases e metaloproteinases no envenenamento.

Para isso, este projeto de pesquisa foi dividido em capítulos:

- Capítulo 1: são apresentados os resultados sobre a (1) síntese e caracterização da rutina succinil; (2) caracterização comparativa das atividades da rutina e rutina succinil com relação às principais atividades tóxicas do veneno e outras proteínas; (3) caracterização da atividade protetora da rutina e rutina succinil contra a letalidade e outras ações tóxicas induzidas pela administração de BjV em camundongos;
- ❖ Capítulo 2: (1) análise da participação do TF nas alterações induzidas pelo envenenamento; (2) estudo da participação das famílias majoritárias do BjV na indução da ativação da coagulação e inflamação; (3) verificação das ações das rutinas pré-incubadas com o veneno ou administradas, como tratamento, após a administração do BjV a camundongos; (4) resultados de alterações locais e sistêmicas observadas na fase aguda do envenenamento; realização de experimentos com modelo de endotoxemia in vivo, para melhor compreensão dos

mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e análise do potencial terapêutico das rutinas nesse modelo.

Capítulo 3: investigação do potencial das rutinas como agentes terapêuticos complementares à soroterapia na fase crônica do envenenamento, com a análise de parâmetros hemostáticos e inflamatórios em sangue e em tecidos de camundongos envenenados;

2. CAPÍTULO 1: A RUTINA E RUTINA SUCCINIL INIBEM ATIVIDADES DO VENENO DE *Bothrops jararaca IN VITRO* E NEUTRALIZAM A AÇÃO TÓXICA DO VENENO *IN VIVO*

2.1.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (18-22 g) obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais com esses animais foram aprovados pelos Comitês de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo n°. 4491070319, aprovado em 20 de março de 2019) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo n°. 1334/2019, aprovado em 26 de junho de 2019).

2.1.2. Veneno de B. jararaca e rutina

Foi utilizado um *pool* de veneno liofilizado de indivíduos adultos de *B. jararaca* obtido do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (autorização: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SisGen AF375C2), mantido na temperatura de -20°C.

A rutina foi obtida da Sigma (EUA, código R5143).

2.1.3. <u>Síntese da rutina succinil</u>

Visto que a rutina apresenta limitações quanto a sua solubilidade em água, a rutina foi modificada quimicamente pelo tratamento com anidrido succínico (111). Essa técnica altera somente as hidroxilas do rutinosídeo pela adição de um grupo succinil, como demonstrado na Figura 3. Para isso, uma solução de rutina (2,5 g), anidrido succínico

(3,75 g, Sigma, EUA) e piridina (100 mL) foi aquecida a 70 °C por 24 horas em banhoseco. A solução foi rotaevaporada para remoção de piridina, solubilizada em butanol aquecido, previamente resfriada e filtrada com éter resfriado. A rutina succinil foi novamente rotaevaporada para remoção dos outros reagentes utilizados, solubilizada em metanol, secada em equipamento Speed-Vac e armazenada à temperatura ambiente, assim como a rutina.

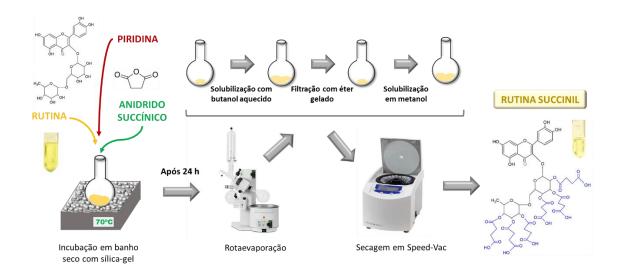


Figura 3: Representação da síntese da rutina succinil (111).

2.1.4. Caracterização da rutina succinil

2.1.4.1. Análise por espectrofotometria de absorção UV-visível

A análise por espectrofotometria de absorção UV-visível foi realizada a fim de verificar se o tratamento químico da rutina com o anidrido succínico havia modificado somente as hidroxilas do rutinosídeo, sem alterações à estrutura básica do flavonoide, como esperado. Para isso, soluções de rutina e rutina succinil (205 μM em metanol) foram analisadas em relação a sua absorbância em espectro visível (240-450 nm) em leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices), em placa de quartzo.

Assim como a análise das rutinas, foi verificada a qualidade da purificação da rutina succinil por espectrofotometria de absorção UV-visível. Desse modo, os espectros de absorbância de comprimentos de onda 200-450 nm das seguintes soluções foram testados: metanol com ou sem piridina (5 µL/mL), anidrido succínico (diluído em metanol nas concentrações de 0,5 e 4,0 mg/mL), rutina e rutina succinil (diluídas em metanol na concentração de 0,125 mg/mL). Para esse ensaio foi utilizada placa de quartzo e as leituras foram realizadas em leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices).

2.1.4.2.Análise por HPLC

A rutina succinil foi analisada comparativamente à rutina, para verificação do perfil químico por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC). Para a análise por HPLC, a rutina e rutina succinil foram solubilizadas em metanol (5 mg/mL) e 10 μL da solução foram injetados no sistema de HLPC para análise com uso de coluna C18, fluxo de 1 mL/min e gradiente 45 a 70% B em 25 min (fase móvel A: H₂O 99,9% / ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%; fase móvel B: metanol 90,0% / H₂O 9,9% / TFA 0,1%). A rutina succinil também foi testada em relação à qualidade de sua purificação e possíveis resquícios de contaminantes, como piridina e anidrido succínico livre. Para isso, foram avaliados o anidrido succínico (10 μL de solução a 5 mg/mL), ácido succínico (10 μL de solução a 5 mg/mL), piridina (3 μL) e éter (40 μL) de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

2.1.4.3. Análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As análises por LC-MS^E foram realizadas utilizando o espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters) acoplado ao sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters). A rutina e rutina succinil foram dissolvidas em metanol e diluídas em ácido

fórmico 0.1% concentrações finais de 10 ng/µL ng/μL, respectivamente. Amostras de rutina (10 ng) e rutina succinil (500 ng) foram inseridas em coluna C-18 (Acquity UPLC M-Class Symmetry C18 Trap Column, 100 Å, 5 µm, 300 μm x 25 mm, Waters) a 8 μL/min de fase A (ácido fórmico 0.1%) por 5 min. Amostras foram eluídas em coluna analítica (Acquity UPLC M-Class HSS T3 Column, 1.8 µm, 300 μm x 150 mm, Waters) com gradiente de 20-60% de fase B (ácido fórmico 0.1%) por 15 minutos a 3 µL/min. As análises foram realizadas pelo método de aquisição independente de dados (DIA) MS^E (133, 134) em intervalo m/z de 50-2000 e programado para modo de resolução. Íons precursores foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID-MS/MS), mudando a energia de colisão de baixa (4 eV) para alta (20 a 30 eV) e utilizando tempos de escaneamento de íons de 1.0 s. A fonte ESI foi operada em modo positivo com voltagem capilar de 3.0 kV, temperatura de bloqueio de 100 °C, e voltagem, de cone de 15 V. A temperatura da coluna foi estabelecida em 55 °C. Para correção de massa de bloqueio, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol/mL em metanol 50%, ácido fórmico 0,1%; Peptide 2.0) foi infundida no sprayer de referência a 2 μL/min e amostrada a cada 60 s para calibração externa (135).

2.1.4.4. Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total da rutina e rutina succinil foi avaliada por ensaio colorimétrico (124). Para isso, foram preparadas a mistura reativa **1** [1 parte da solução de cloreto de cobre (II) 10 mM; 1 parte de solução de neocuproína (Sigma, EUA, código N1501) 7,5 mM; 1 parte da solução de acetato de amônio (Sigma, EUA, código A1542) 1 M, pH 7,0] e a mistura reativa **2** [2 partes de água destilada e 1 parte de solução de acetato de amônio] e mantidos em banho-seco a 37°C. As rutinas foram diluídas primeiramente na concentração de 3,6 mg/mL (rutina: 1 volume de propilenoglicol + 1

volume de salina; rutina succinil: somente em salina) e a partir dessa solução foram diluídas em salina nas concentrações de 0,36; 0,18 e 0,72 mg/mL. A cada poço da placa foram adicionados 5 µL das amostras de soluções das rutinas (fator de diluição 1:20), seguidos por 95 µL de salina e 150 µL da mistura reativa 1. Os brancos de amostras consistiram de 5 µL de cada solução das rutinas, 95 µL de salina e 150 µL da mistura reativa 2. Para o branco de reação 1 foram adicionados 100 μL de salina e 150 μL da mistura reativa 2, já para o branco de reação 2 foram adicionados 100 µL de salina e 150 μL da mistura reativa 2. Como padrão para a curva, foi preparada uma solução de Lglutationa reduzida (GSH, Sigma, EUA, código G4251) 1 mM, pH 7,0, aliquotada e mantida a -20°C até o momento do uso para evitar perda de atividade. Essa solução estoque de GSH foi diluída em água destilada para a obtenção das concentrações da curva padrão de GSH: 12,5; 25; 50; 100; 150 e 300 µM; como branco da curva foi utilizada água destilada. Posteriormente, 100 µL de cada concentração foram adicionados e 150 μL da mistura reativa 1. O ensaio foi realizado em duplicatas e leitura da absorbância a 450 nm foi realizada em equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices) após a incubação da placa por 30 minutos a 37°C.

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

2.1.4.5.Dosagem de cálcio, magnésio e zinco

Visto que a atividade antioxidante da rutina está também relacionada com sua ação como quelante de íons metálicos (104-108), foi verificada a possível interação da rutina, rutina succinil e ácido succínico – forma ácida livre do anidrido succínico – em relação ao cálcio, magnésio e zinco.

Para a dosagem de magnésio foi utilizado o kit Magnésio (Labtest, cód. 50) e as rutinas e ácido succínico foram diluídos nas concentrações de 0,84; 0,42; 0,21; 0,105 e 0,0525 mM (em salina contendo DMSO 1%). Foram adicionados 2 μL das seguintes soluções em cada poço da placa de 96 poços: salina (branco de reação), padrão de magnésio (MgCl₂ 2 mg/mL) e soluções de rutina, rutina succinil e ácido succínico + salina ou MgCl₂ 2 mg/mL. Após a adição de 200 μL/poço do reagente de uso (magon sulfonado), a placa foi homogeneizada e a leitura de absorbância a 505 nm foi realizada após 5 min em equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices).

O reagente magon sulfonado também foi utilizado como descrito acima para a dosagem de zinco, com modificações: uso de soluções de ZnCl₂ (25 mM), rutina, rutina succinil e ácido succínico (100; 50; 25; 12,5; 6,25 mM) e Na₂EDTA (100 mM) e leitura de absorbância a 530 nm.

Já a dosagem de cálcio foi realizada com uso do kit CA ARSENAZO Liquiform (Labtest, cód. 95). Os procedimentos foram realizados como descrito para a dosagem de cálcio com as seguintes modificações: as rutinas e ácido succínico foram diluídos a 3,6; 1,8; 0,9; 0,45; 0,225 mM; foi utilizada a solução de CaCl₂ (10 mg/mL); a leitura de absorbância foi realizada a 660 nm.

2.1.4.6. Espectro de fluorescência da PDI

A PDI também foi analisada quanto à sua estrutura pela análise da fluorescência intrínseca de resíduos de triptofano (Trp) (136). Para isso, foram adicionados em microplacas pretas de 96 poços (Costar, EUA) 50 μL/ poço de solução de PDI (300 nM) e 50 μL de soluções de rutina, rutina succinil ou ácido succínico (0,59 mM em tampão Tris-HCl contendo DMSO 1%). Após 15 minutos à temperatura ambiente, foi realizada a leitura de espectro de fluorescência (Ex. 280 nm, Em. 360-510 nm) em leitor de placas SpectraMax M2.

2.1.4.7. Atividade de PDI

A ação inibitória das rutinas em relação à PDI foi testada pelo ensaio de atividade redutora da PDI, utilizando a sonda Di-eosin-GSSG, que ao ser reduzida pela PDI gera um aumento de fluorescência (137-139).

A sonda Di-eosina-GSSG foi preparada em parceria com o Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração. Foram incubados 200 μM de L-glutationa oxidada (GSSG, Sigma, EUA) com 2 mM de eosina-isotiocianato (Thermo-Fisher, EUA) em tampão fosfato [fosfato de potássio 0,1M, EDTA 2mM, pH 8,5] *overnight* à temperatura ambiente no escuro. A mistura foi passada por coluna PD-25 (GE HealthCare) e diferentes frações foram coletadas. A mudança de fluorescência (Ex: 520 nm, Em: 545 nm) foi calculada submetendo as frações a tampão ou DTT (20 mM). Foram utilizadas as frações com mudança de fluorescência maior que 5 vezes. A concentração de Di-eosina-GSSG foi determinada usando o coeficiente de absorção molar para eosina (ε=56.000 M⁻¹ cm⁻¹) a 525 nm em tampão. As 4 frações obtidas (9,4 μM; 6,3 μM; 7,6 μM; 8 μM) foram misturadas para obtenção de pool na concentração de 7,8 μM.

Para a realização do ensaio, foram utilizados: PDI recombinante purificada (doada pelo Dr. Francisco Laurindo do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração) diluída em tampão fosfato na concentração de 300 nM, solução de DTT 1 mM (solução estoque de DTT 100 mM diluída em tampão fosfato) e soluções de rutina e rutina succinil na concentração de 146 μg/mL (correspondente a 240 μM de rutina), diluídas em tampão fosfato contendo DMSO 1%.

Foram adicionados por poço 100 µL da solução de PDI (300 nM) e 50 µL de tampão fosfato (branco da reação) ou de rutina ou rutina succinil (240 µM). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de mistura reativa por poço e foi realizada a leitura cinética de fluorescência por 30 minutos (Ex: 520 nm e Em: 545 nm) em leitor de placas SpectraMax M2. O ensaio foi realizado em duplicata, e os resultados foram expressos como unidades relativas de fluorescência (RFU) e a velocidade máxima da reação (Vmax) também foi analisada.

2.1.5. Ação da rutina e rutina succinil na hemostasia in vitro

Parâmetros da hemostasia foram avaliados para verificar se as rutinas ou ácido succínico poderiam afetar diretamente a coagulação do plasma *in vitro* e interferir com proteínas presentes no sangue como fibrinogênio e albumina.

2.1.5.1. Tempo de protrombina

Para o teste de tempo de protrombina, as soluções de rutina e rutina succinil foram preparadas em salina 0,9% contendo DMSO 1% nas concentrações de 18,0; 9,0; 4,5; 2,25; 1,125 mg/mL. O plasma (5 μL) foi diluído somente em salina (45 μL), ou em salina contendo as soluções de rutinas (44,5 μL salina + 0,5 μL de cada solução de rutinas) e incubado por 10 min a 37°C. O ensaio foi realizado com uso do kit comercial DiaPlastin

(DiaMed, Brasil), em que foram adicionados 50 μL de plasma em cubas pré-aquecidas em coagulômetro (STart 4, Diagnostica Stago) e incubados por 2 min a 37°C. Após a adição de 100 μL de tromboplastina cálcica pré-aquecida, o tempo de coagulação foi determinado (até no máximo 300 s).

2.1.5.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

As soluções de rutinas foram preparadas como descrito acima para o teste de tempo de protrombina e foi utilizado o kit comercial TTPA CLOT (Bios Diagnostica, Brasil). Em cubas pré-aquecidas em coagulômetro (STart 4, Diagnostica Stago) foram adicionados 25 μL de plasma + 25 μL de salina ou salina com rutinas (22,5 μL de salina + 2,5 μL de cada solução de rutinas). Após 2 min de incubação, foram adicionados 50 μL do Reagente TTPA CLOT pré-aquecido e seguidos 4 min, foram adicionados 50 μL de cloreto de cálcio pré-aquecido e o tempo de coagulação foi determinado (até no máximo 300 s).

2.1.5.3. Tempo de trombina

O tempo de trombina foi avaliado utilizando amostras de pool de plasma citratado de camundongos ou solução de fibrinogênio bovino (Sigma, cód. F8630). As soluções de rutina foram preparadas nas concentrações de 18,0; 9,0; 4,5; 2,25 e 1,125 mg/mL e as soluções de ácido succínico preparadas a 3,48; 1,74; 0,87; 0,44; 0,22 mg/mL em tampão de Tyrode [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 3,0 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5,6 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,4] contendo DMSO 1%. O fibrinogênio bovino foi diluído a 4 mg/mL (em tampão de Tyrode) e a solução de trombina-cálcio preparada a 10 U/mL de trombina e CaCl₂ 100 mM (em tampão de Tyrode).

Em cubas pré-aquecidas em coagulômetro (STart 4, Diagnostica Stago) foram adicionados 100 μL de fibrinogênio ou plasma (diluído 1:4 em tampão de Tyrode) e 12,5 μL de tampão de Tyrode ou das soluções de rutinas e ácido succínico e incubados por 15 min a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 12,5 μL da solução de trombina-cálcio e o tempo de coagulação foi determinado (até no máximo 300 s).

2.1.5.4. Formação de complexos com o fibrinogênio

A capacidade das rutina e ácido succínico formarem complexos com o fibrinogênio foi investigada avaliando a turbidez da solução de fibrinogênio bovino (140). Para o ensaio foram preparadas soluções de fibrinogênio bovino (6,4 mg/mL) em PBS (pH 7,4), soluções de rutina e rutina succinil (3,6 mg/mL em PBS contendo DMSO 5%) e solução de ácido succínico (0,696 mg/mL em PBS contendo DMSO 5%). Em microplaca de quartzo foram pipetados em cada poço 50 μL de solução de fibrinogênio e 50 μL de PBS ou soluções de rutina, rutina succinil ou ácido succínico. A leitura de absorbância foi realizada a 405 nm em equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices).

2.1.5.5.Espectro de fluorescência do fibrinogênio e albumina

A ação das rutinas e ácido succínico também foi verificada em relação à estrutura do fibrinogênio bovino (Sigma, cód. F8630) e albumina de soro bovino (BSA, Sigma, cód. A3059) (140). Para esse ensaio foram utilizados: solução de fibrinogênio (6,4 mg/mL em tampão de Tyrode), solução de BSA (6,4 mg/mL em tampão de Tyrode), soluções de rutina ou rutina succinil (3,6; 1,8; 0,9; 0,45; 0,225 mg/mL em tampão de Tyrode contendo DMSO 5%), soluções ácido succínico (0,696; 0,348; 0,174; 0,087; 0,0435 mg/mL em tampão de Tyrode contendo DMSO 5%). A uma placa de 96 poços preta foram adicionados 12,5 μL da solução de fibrinogênio ou BSA + 12,5 μL de tampão de Tyrode

ou das soluções de rutinas ou ácido succínico + 75 μL de tampão de Tyrode e incubados por 15 min a 37°C. Após esse período, foi realizada a leitura de espectro de fluorescência (Ex. 280 nm, Em. 360-510 nm) em leitor de placas SpectraMax M2.

2.1.6. <u>Ação da rutina e rutina succinil nas atividades do veneno de B.</u> jararaca *in vitro*

As principais atividades do BjV foram testadas *in vitro*, assim como a possível ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em inibir diretamente os componentes do BjV. Também foi avaliada a ação das rutinas e ácido succínico especificamente em relação às atividades da jararagina, uma importante SVMP presente no BjV (77).

2.1.6.1. Espectro de fluorescência do BjV e jararagina

Foram preparadas soluções de BjV a 0,4 mg/mL em tampão Tris-HCl [Tris 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl2 1mM, pH 8,0], soluções de rutina a 1,44; 0,72; 0,36; 0,18; 0,09 mg/mL e soluções de ácido succínico a 0,28; 0,14; 0,07; 0,35 e 0,17 mg/mL em tampão Tris-HCl contendo DMSO 1%. As amostras foram preparadas adicionando partes iguais de: tampão Tris-HCl + tampão Tris-HCl contendo DMSO 1% (branco de amostra), tampão Tris-HCl + cada solução de rutinas ou ácido succínico (branco das amostras), BjV + tampão Tris-HCl contendo DMSO 1% (controle positivo), BjV + cada solução das rutinas ou ácido succínico e pré-incubadas a 37°C por 30 min. Como controles de inibição, o BjV foi diluído em tampão de Tyrode contendo DMSO 1% e AEBSF 8 mM (inibidor de SVSP) e/ou o-phe 13 mM (1,10-fenantrolina, Sigma, EUA, código 131377), visto que a o-phe é um inibidor de SVMP (63) e pré-incubado a 37°C por 1 h. As mesmas soluções foram preparadas substituindo o BjV pela jararagina para a análise de fluorescência dessa toxina.

Para o ensaio, 100 μL das soluções foram adicionados em cada poço (em triplicata) em microplacas pretas de 96 poços (Costar, EUA) e foi realizada a leitura de espectro de fluorescência (Ex. 280 nm, Em. 360-510 nm) em leitor de placas SpectraMax M2.

2.1.6.2. Atividade de L-aminoácido oxidases (LAAO)

As LAAO podem gerar H₂O₂ ao desaminar aminoácidos em sistemas biológicos. Nesse ensaio, as LAAO desaminam a L-leucina e geram H₂O₂, o que é detectável por sondas sensitivas como o OPD (diidrocloreto de *o*-fenilenediamina, Sigma, EUA, código P9187) (132, 141, 142). Para a realização do ensaio, o BjV foi diluído em tampão bórax [bórax 50 mM, pH= 8,5, sendo que o pH deve ser ajustado com HCl 1M a 37°C] na concentração de 0,5 mg/mL. Já a rutina e rutina succinil foram diluídas a 18; 9; 4,5; 2,25 e 1,125 mg/mL em tampão bórax contendo DMSO 1%. Partes iguais das seguintes soluções foram pré-incubadas por 30 minutos à 37°C: tampão bórax + tampão bórax contendo DMSO 1% (branco de reação); tampão bórax + cada solução de rutina ou rutina succinil (brancos das rutinas); BjV + tampão bórax contendo DMSO 1%; BjV + cada solução de rutina ou rutina succinil.

Para a curva padrão, foi realizada uma diluição seriada de H₂O₂ nas concentrações: 51,2; 25,6; 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8 mM em tampão bórax. Em microplacas de 96 poços foram pipetados em triplicata 10 μL/ poço de amostra (BjV + tampão bórax ou BjV + rutinas), brancos de reação (tampão bórax, tampão bórax + rutinas) ou das soluções da curva padrão. A seguir, foram adicionados 90 μL/ poço de solução de uso [solução de OPD 2 mM (em tampão bórax), solução de peroxidase 0,81 U/mL (peroxidase, Sigma, EUA, código P6782, em tampão bórax), solução de L-leucina 5 mM (em H₂O)]. Após incubar a placa por 60 minutos a 37°C, foram adicionados 50 μL de H₂SO₄ 2M e a leitura de absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular

Devices). Os resultados foram analisados com base na curva padrão utilizando o software CurveExpert (versão 1.4). A média dos resultados da amostra BjV+tampão bórax foi considerada como 100% de atividade de LAAO e os resultados das amostras foram expressos proporcionalmente como porcentagem de atividade de LAAO.

2.1.6.3. Atividade de hialuronidase

A atividade de hialuronidase do BjV foi analisada por ensaio de turbidez, no qual o ácido hialurônico é precipitado pelo brometo de cetilmetilamônio (CTAB), resultando em alta turbidez, que é diminuída pela ação das hialuronidases do veneno ao degradarem o ácido hialurônico (142, 143). No momento do uso, o BjV foi diluído em tampão acetato [acetato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 6,0, sendo que o pH deve ser ajustado com ácido acético concentrado] na concentração de 2,5 mg/mL. A rutina e rutina succinil foram diluídas a 90; 45; 22,5; 11,25 e 5,625 mg/mL em tampão acetato contendo DMSO 5%. Como amostras, partes iguais das seguintes soluções foram pré-incubadas por 30 minutos à 37°C: tampão acetato + tampão acetato contendo DMSO 5% (branco); tampão acetato + cada solução de rutina ou rutina succinil (brancos das rutinas); BjV + tampão acetato contendo DMSO 5%; BjV + cada solução de rutina ou rutina succinil.

Em cada poço da microplaca foram adicionados 10 μL das amostras (tampão acetato, BjV + tampão acetato ou BjV + rutinas) e 40 μL de solução de ácido hialurônico (Sigma, cód. H1876, EUA) 0,5 mg/mL diluído em tampão acetado e aquecido a 37°C. A incubação ocorreu a 37°C por 15 minutos. Já para os brancos da reação foram adicionados 10 μL de tampão acetato ou de soluções de rutina e rutina succinil + 40 μL de tampão acetato. Após a adição em cada poço de 150 μL de solução de CTAB (Sigma, EUA, código H5882) 2,5%, diluída em NaOH 0,5 M, foi realizada a leitura de turbidez a 650 nm em leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices). A média dos resultados da

amostra tampão acetado foi considerada como 100% de ácido hialurônico. Foi considerada como 100% de atividade de hialuronidase a diferença da média dos valores da amostra tampão acetato e da amostra BjV + tampão acetato. Os resultados das demais amostras foram expressos proporcionalmente como porcentagem de atividade de hialuronidase.

2.1.6.4. Atividade de serinaproteases de veneno de serpentes (SVSP)

Para esse ensaio, foi utilizado o substrato sintético DL-BAPNA ("Nα-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride", Sigma, EUA, código B4875), que ao sofrer hidrólise por enzimas proteolíticas como as SVSP, libera o cromóforo *p*-nitroanilina que é detectável colorimetricamente (144). Para isso, as diluições do BjV e rutina e as préincubações foram realizadas como descrito anteriormente para o ensaio de atividade de LAAO, utilizando solução de Tris (Tris-HCl 0,05 M, CaCl₂ 20 mM, pH= 8,2). Como controle positivo de inibição, o BjV (0,5 mg/mL) foi incubado com AEBSF ("4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride", Sigma, EUA, código A8456) 8 mM, um inibidor de serinaproteases, por 1 h a 37°C. Foram pipetados em placa de 96 poços (em triplicata) 30 μL de cada amostra/branco e 140 μL da mistura reativa (1 parte de BAPNA 100 mM em DMSO + 99 partes de solução de Tris). A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C e foram adicionados 50 μL de ácido acético 30% para parar a reação. A leitura de absorbância foi feita a 405 nm em equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices) e os resultados foram analisados e expressos como descrito anteriormente.

2.1.6.5. Atividade de metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMP)

A atividade das SVMP foi testada quanto à capacidade de ativar fatores da coagulação, como fator X e protrombina, assim como sua atividade catalítica e atividade

proteolítica, utilizando diferentes substratos, como colágeno, gelatina, caseína e fibrinogênio. As ações da rutina, rutina succinil e ácido succínico também foram avaliadas em relação a essas atividades.

2.1.6.5.1. Atividade colagenolítica

Para analisar a atividade colagenolítica das SVMP foi realizado um ensaio quantitativo, utilizando como substrato o colágeno tipo IV azocoll (Sigma, EUA) (66, 142). O BjV foi diluído em tampão de Tyrode na concentração de 1,0 mg/mL, e a rutina e a rutina succinil foram diluídas em tampão de Tyrode contendo DMSO 10% nas concentrações de 136,0; 18,0; 9,0; 4,5; 2,25 mg/mL. As amostras foram preparadas adicionando volumes iguais das soluções: tampão de Tyrode + tampão de Tyrode contendo DMSO 10% (branco da reação), tampão de Tyrode + cada solução das rutinas (brancos das rutinas), BjV + tampão de Tyrode contendo DMSO 10% (controle positivo), BjV + cada solução das rutinas. O controle de inibição de SVMP foi preparado com o uso de o-phe (1,10-fenantrolina, Sigma, EUA, código 131377), visto que a o-phe é um inibidor de SVMP (66), e para isso foram adicionados volumes iguais de BjV + tampão de Tyrode e o-phe 26 mM. As amostras foram pré-incubadas a 37°C por 30 minutos e a amostra de BjV + o-phe foi pré-incubadas a 37°C por 1 hora. Após as incubações, 100 μL das amostras foram diluídas adicionando 455 μL de tampão de Tyrode.

O ensaio foi realizado incubando 400 μL de cada amostra com 100 μL de solução de azocoll (5 mg/mL, em tampão de Tyrode) por uma hora a 37°C, com homogeneização em vórtex a cada 5 minutos. A reação foi finalizada colocando as soluções no gelo e então, foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 g. Foram retirados 175 μL de sobrenadante de cada solução e pipetados em cada poço de microplaca de 96 poços para a leitura de absorbância a 540 nm, em triplicata. A média dos resultados da amostra BjV

+ tampão de Tyrode foi considerada como 100% de atividade colagenolítica e os resultados das amostras foram expressos proporcionalmente como porcentagem de atividade colagenolítica de SVMP.

2.1.6.5.2. Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinolítica foi analisada como descrito previamente (142, 145), com base na avaliação da degradação das cadeias do fibrinogênio pelo BjV. Para isso, o BjV foi diluído em tampão de Tyrode na concentração de 1,0 mg/mL, a rutina e rutina succinil foram diluídas a 36,0; 18,0; 9,0; 4,5 e 2,25 mg/mL em tampão de Tyrode contendo DMSO 2% e o ácido succínico foi diluído a 6,96; 3,48; 1,74, 0,87 e 0,435 mg/mL em tampão de Tyrode contendo DMSO 2%. As amostras foram preparadas adicionando partes iguais de: tampão de Tyrode + tampão de Tyrode contendo DMSO 2% (controle negativo), BjV + tampão de Tyrode contendo DMSO 2% (controle positivo), BjV + cada solução das rutinas ou ácido succínico. Como controles de inibição, o BjV foi diluído em tampão de Tyrode contendo DMSO 1% e Na₂EDTA 13 mM, AEBSF 8 mM ou o-phe 13 mM e pré-incubado a 37°C por 1 h.

Após a pré-incubação, 200 μL de fibrinogênio bovino (Sigma, EUA, código F8630; 2 mg/mL de proteína coagulável em tampão de Tyrode) foram adicionados em microtubos mantidos em banho-seco a 37°C. Em cada alíquota de fibrinogênio foram adicionados 8 μL de amostra (um tubo por amostra), rapidamente homogeneizados e incubados a 37°C por 15 min. Alíquotas de 104 μL cada solução de fibrinogênio + amostra foram retiradas nos tempos 0 e 15 min, adicionadas a 104 μL de tampão de amostra reduzido (Tris 0,125 M, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, 2-mercaptoetanol 2-%), homogeneizados e armazenados a -20°C até as posteriores análises.

As amostras reduzidas (146) foram submetidas à eletroforese em géis de SDS-Page 10% (10 µL de amostra/poço) e a corrida de eletroforese foi realizada a 15 mA até a saída das amostras do gel de aplicação de amostra e a 20-30 mA até o término da corrida. É preciso salientar que as amostras controle negativo (fibrinogênio + tampão) e controle positivo (fibrinogênio + BjV) foram adicionadas em todos os géis analisados. Após o término da corrida de eletroforese, os géis foram submetidos à coloração de prata (147) e escaneados com resolução de 600 dpi em equipamento ImageScanner III (GE Healthcare, EUA). As análises densitométricas foram realizadas no software ImageJ (Fiji) e a diferença nos valores da densitometria entre a amostra do controle negativo (fibrinogênio íntegro) e do controle positivo (fibrinogênio degradado pelo BjV) foi considerada como 100% de atividade fibrinolítica. Os resultados das amostras foram expressos proporcionalmente como porcentagem de atividade fibrinolítica.

A atividade fibrinolítica também foi avaliada em relação à ação da jararagina do mesmo modo como descrito acima, com a substituição do BjV por jararagina (0,4 mg/mL).

2.1.6.5.3. Atividades gelatinolítica e caseinolítica

A inibição das atividades gelatinolítica e caseinolítica pelas rutinas e ácido succínico foram avaliadas semelhantemente à técnica da atividade fibrinolítica, exceto que com as seguintes modificações: foram utilizados solução de gelatina (de pele de suíno, Sigma, EUA) a 4 mg/mL e géis de SDS-Page 10% ou solução de caseína (Sigma, EUA) a 4 mg/mL e géis de SDS-Page 15%.

A ação das rutinas e ácido succínico também foi avaliada com a análise de inibição da atividade da colagenase de *Clostridium histolyticum* (Sigma, EUA, cód. C5138). Os procedimentos foram realizados como descrito acima, utilizando a colagenase a 1 mg/mL.

2.1.6.5.4. Atividade de ativador de protrombina

O BjV contém componentes pró-coagulantes, capazes de ativar fatores da coagulação, como a protrombina (142, 148). Nesse ensaio, o BjV ativa a protrombina, que por sua vez hidrolisam os substratos sintéticos, S-2765 (N-a-benzyloxycarbonyl-D-argininyl-L-glycyl-L-argininie-pNA.2 HCl) e S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2 HCl), respectivamente, liberando *p*-nitroanilina (142, 149). Os substratos foram obtidos da Chromogenix (EUA), e a protrombina humana foram obtida da Sigma (EUA, código F5132).

O BjV foi diluído em tampão Tris (Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, BSA 0,1%, pH 8,0) na concentração de 1,0 mg/mL e a rutina e a rutina succinil foram diluídas a 36,0; 18,0; 9,0; 4,5; 2,25 mg/mL em tampão Tris contendo DMSO 10%. Posteriormente as amostras foram preparadas adicionando partes iguais das soluções: tampão Tris + tampão Tris contendo DMSO 1% (branco de reação); tampão Tris + cada solução de rutina ou rutina succinil (brancos das rutinas); BjV + tampão Tris contendo DMSO 10%; BjV + cada solução de rutina ou rutina succinil. A seguir, as amostras foram pré-incubadas por 30 minutos a 37°C em banho-seco.

O ensaio foi iniciado pipetando por poço (em triplicata) 5 μ L das amostras e 85 μ L de protrombina (0,5 μ M em tampão Tris). A microplaca foi incubada a 37°C por 20 minutos, seguido da adição de 100 μ L/poço da solução do substrato sintético 0,1 mM (S-2238, diluído em tampão Tris e pré-aquecidos a 37°C). A leitura da microplaca foi realizada imediatamente em equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices), modo de cinética enzimática a 405 nm por 10 minutos, com leituras a cada 15 segundos. A velocidade inicial da reação foi calculada (utilizando os valores do tempo de 60 segundos), seguida do cálculo de μ mol de p-nitroalanina liberada/min/mg de veneno, tendo como base o coeficiente de extinção da p-nitroalanina: $\varepsilon_{405\,mm}^{1mM} = 9,65/cm$. Esses

valores foram utilizados para analisar a porcentagem correspondente de atividade de ativador de protrombina, considerando que a amostra BjV + tampão foi designada como 100% de atividade enzimática.

2.1.6.6.Atividade coagulante em fibrinogênio bovino e plasma de camundongo

O BjV possui componentes, como SVMP que agem como ativadores de fator X ou protrombina e SVSP que possuem ação tipo-trombina. A atividade dessas toxinas *in vitro* induz a coagulação de plasmas animais e humanos, assim como a coagulação de fibrinogênio (66, 142, 145). Desse modo, a atividade coagulante do BjV foi avaliada em fibrinogênio bovino e plasma de camundongos, utilizando uma modificação da técnica de dose mínima coagulante (63).

Para a preparação do *pool* de plasma de camundongo foi coletado sangue de camundongos em citrato de sódio (9 partes de sangue e 1 parte de citrato de sódio 3,2%) e após a centrifugação a 2500 g, 15 min a 4°C, o plasma foi coletado. O plasma foi mantido em banho de gelo durante a realização do ensaio. O fibrinogênio bovino (Sigma, EUA, código F8630) foi diluído na concentração de 4 mg/mL em tampão de Tyrode (2 mg/mL de proteína coagulável), aquecido em banho-maria a 37°C por no mínimo 30 min antes do início do ensaio e mantido também em banho-maria a 37°C durante o experimento.

As soluções de BjV e das rutinas foram preparadas como descrito para a atividade de SVSP, utilizando salina 0,9% para as diluições e o ácido succínico na mesma concentração molar que as rutinas. Visto que tanto SVMP quanto SVSP possuem atividade coagulante, foram preparados dois controles de inibição ao pré-incubar o BjV

com Na₂EDTA ou o-phe (concentração final 13 mM) ou AEBSF (concentração 8 mM) por 1 h a 37°C.

Após as pré-incubações das soluções, 100 μL da solução de fibrinogênio ou de plasma foram pipetados em tubos de coagulômetro e aquecidos por 2 min a 37°C. Após a adição de 25 μL de cada amostra, foi determinado o tempo de coagulação, até o tempo de 300 s em coagulômetro (Start 4, Diagnostica Stago). O experimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos como tempo de coagulação (em segundos).

2.1.6.7.Dose mínima coagulante

A fim de confirmar a participação das SVMP e SVSP na atividade coagulante do BjV, assim como especificamente a participação dos ativadores de fator X e protrombina do BjV, o ensaio de dose mínima coagulante foi utilizado (63). A preparação dos *pools* de plasma de camundongos foi realizada como descrito acima. O BjV (1,0 mg/mL em salina) foi adicionado à somente salina, etanol (veículo do o-phe) ou o-phe (concentração final: 13 mM) ou AEBSF (concentração final: 8 mM), pré-incubado a 37°C por 1 h e então foi realizada uma diluição seriada na razão de 2 (0,5; 0,25; 0,125 mg/mL).

As soluções de inibidores de fator X e protrombina foram preparadas com uso de rivaroxabana 40 mg/mL em DMSO (Xarelto, Bayer, Brasil) e dabigatrana 8 mg/mL em DMSO (Pradaxa, Boehinger, Brasil), respectivamente. Foi determinado o uso no plasma das concentrações finais 200 μg/mL de rivaroxabana e 40 μg/mL de dabigatrana (150, 151), sendo que a cada 99 μL de plasma foram adicionados: 1 μL de DMSO ou 0,5 μL de DMSO + 0,5 μL de rivaroxabana ou 0,5 μL de DMSO + 0,5 μL de dabigatrana ou 0,5 μL de rivaroxabana + 0,5 μL de dabigatrana. Para verificar a eficácia dos inibidores no plasma, foi empregado o método de tempo de protrombina, como descrito abaixo com uso dos plasmas com ou sem inibidores.

Para o ensaio de dose mínima coagulante foram adicionados 100 μL de plasma (com ou sem inibidores de FX e protrombina) em tubos de coagulômetro e aquecidos por 2 min a 37°C. Após a adição de 25 μL de cada diluição das soluções de BjV (BjV, BjV+etanol, BjV + o-phe e BjV + AEBSF), foi determinado o tempo de coagulação do plasma (máximo de 300 s) em coagulômetro (STart 4, Diagnostica Stago). O experimento foi realizado em duplicata e o valor da DMC foi determinado baseado na concentração de veneno capaz de coagular o plasma em 60 s a 37°C, utilizando o software CurveExpert (versão 1.4). A atividade coagulante relativa do BjV foi calculada pela divisão do valor da DMC do BjV pelo valor de DMC do BjV com inibidores.

2.1.7. Envenenamento in vivo

Os envenenamentos *in vivo* foram iniciados com a avaliação dos efeitos moderados e graves do envenenamento por BjV e da possível neutralização pela rutina e rutina succinil. Para isso, utilizou-se duas doses de veneno: uma dose de 3,2 mg/kg p.v. i.p. (2 DL₅₀, envenenamento moderado), e outra de 4,8 mg/kg p.v. i.p. (3 DL₅₀, envenenamento grave) (142). Já a rutina e a rutina succinil foram utilizadas em doses 9 vezes maiores que as doses de veneno (28,8 ou 43,2 mg/kg p.v. i.p.), como utilizado previamente (66). Também foi avaliada a importância das ações de SVMP e SVSP nesses modelos utilizando a o-phe (13 mM) para inibição de SVMP do BjV e AEBSF (8 mM) para inibição de SVSP. A fim de melhor compreender os mecanismos de ação da rutina succinil, os efeitos do ácido succínico (9,6 mg/kg p.v. i.p.) em relação ao BjV também foram avaliados *in vivo*. Visto que a rutina é uma conhecida inibidora de PDI (109), foi avaliada a influência da inibição de tiol isomerases no envenenamento com uso de bacitracina A (Sigma, EUA, cód. 31626) na dose de 80 mg/kg p.v. i.p. (152).

2.1.7.1. Soluções de veneno de B. jararaca e rutinas

O BjV foi diluído no momento do uso em salina estéril na concentração de 0,8 mg/mL (envenenamento moderado) ou de 1,6 mg/mL (envenenamento grave). A rutina foi diluída na concentração de 7,2 mg/mL (envenenamento moderado) ou de 14,4 mg/mL (envenenamento grave) em um volume de propileno glicol e um volume de salina estéril (66, 153). A rutina succinil foi diluída somente em salina estéril nas mesmas concentrações que a rutina. O ácido succínico foi diluído na concentração de 2,8 mg/mL em salina estéril (envenenamento grave). A bacitracina A foi diluída em salina estéril a 20,0 mg/mL (envenenamento moderado) ou 26,6 mg/mL (envenenamento grave).

As soluções a serem injetadas nos animais foram preparadas adicionando: (1) 1 volume de salina + 1 volume de salina (controle negativo); (2) 1 volume de BjV + 1 volume de salina (controle positivo); (3) 1 volume de BjV + 1 volume de rutina, (4) 1 volume de BjV + 1 volume de rutina succinil; (4) 1 volume de BjV + 1 volume de ácido succínico; (5) 1 volume de BjV + 1 volume de salina contendo o-phe 26 mM; (6) 1 volume de BjV + 1 volume de salina contendo o-phe 26 mM; (7) 1 volume de BjV + 1 volume de salina contendo o-phe 26 mM e AEBSF 16 mM; (8) 1 volume de BjV + 1 volume de bacitracina.

As soluções foram pré-incubadas por 30 min a 37°C (controles, BjV + rutinas, BjV + ácido succínico e BjV+bacitracina) ou pré-incubadas por 1 h a 37°C (BjV + o-phe, BjV + AEBSF e BjV + o-phe + AEBSF) em banho-seco e mantidas em gelo durante o uso.

2.1.7.2. Grupos e procedimentos experimentais

Os camundongos foram alocados em quatro diferentes grupos experimentais (n=6 animais/grupo). Os grupos e procedimentos experimentais para as duas concentrações de veneno estão demonstrados a seguir na Figura 4. Os animais receberam por via

intraperitoneal 8,0 mL/kg p.v. (envenenamento moderado) e 6,0 mL/kg p.v. (envenenamento grave) das soluções descritas anteriormente.

2.1.7.3. Análise de sobrevivência

A sobrevivência dos animais foi analisada no envenenamento grave, com dose de 3DL₅₀ (142). Ao decorrer de 48 h após a injeção das soluções o número de animais sobreviventes foi determinada nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24 e 48 h.

2.1.7.4. Coleta de sangue e órgãos

A coleta de órgãos dos camundongos que morreram durante o período de 48 h após as injeções foi realizada logo após a confirmação da morte do animal. Quanto aos animais que sobreviveram por 48 h, no momento da coleta foram anestesiados pela administração de isoflurano (indução e manutenção a 2,5%) por via inalatória. Após a coleta, os animais foram submetidos a uma superdose de anestésico e para certificarmo-nos da eutanásia dos animais, o deslocamento cervical foi realizado.

O sangue foi coletado por punção da veia cava caudal dos camundongos anestesiados com seringas plásticas. Para o hemograma e esfregações sanguíneos foi utilizada uma alíquota de sangue de 100 μL em tubo plástico contendo 1,0 μL de Na₂-EDTA 269 mM e 1,0 μL de soro antibotrópico (SAB, doado pelo Instituto Butantan, lote 1305077). Para obtenção de plasma citratado, uma alíquota de sangue (9 volumes) foi adicionada a tubo plástico contendo 1 volume de citrato de sódio 3,2% e SAB (na proporção de 1:100 do volume total), e posteriormente, essas alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 2500 g a 4°C e o plasma armazenado a -80°C até posteriores análises. Para as análises histológicas foram coletados órgãos (fígado, rim, pulmão, coração, pâncreas, baço,

intestino, diafragma e fragmentos da parede intestinal) e imersos em solução de Bouin até posteriores processamentos do material histológico.

Procedimentos experimentais

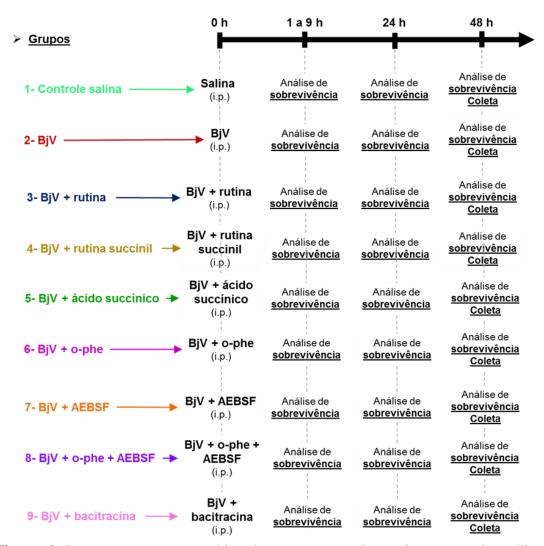


Figura 4: Representação esquemática dos grupos experimentais, tempos de análises e coleta de amostras dos envenenamentos moderado e grave.

2.1.7.5.Hemograma

A contagem total das células sanguíneas dos animais sobreviventes a 48 h foi realizada com as amostras de sangue coletado com Na₂-EDTA com uso de contador

hematológico automático BC-2800 Vet (Mindray, China). As amostras de sangue também foram utilizadas para a realização de esfregaços sanguíneos.

2.1.7.6.Dosagem de fibrinogênio plasmático

A dosagem de fibrinogênio nas amostras de plasma citratado foi realizada por técnica colorimétrica (132, 154). Em tubos Falcon foram adicionados 0,50 g de vidro moído (correspondente a 0,5 mL), 5 mL de NaCl 0,85%, 25 µL de EACA 10%, 50 µL de plasma e 34,5 μL de trombina a 720 NIH-U. Os tubos foram homogeneizados, mantidos em banho-maria a 37°C por 15 minutos para a formação de coágulos, centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e a seguir o coágulo foi espremido e o sobrenadante será descartado. Após adicionar 5 mL de salina, a centrifugação e o descarte de sobrenadante foram realizados por mais duas vezes. Foi acrescentado 1,0 mL de NaOH 10%, os tubos foram cobertos com papel alumínio e aquecidos em banho-maria fervente por 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foram acrescentado 7,0 mL de água destilada, 3,0 mL de Na₂CO₃ 20% e 1,0 mL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu (Sigma, EUA). O branco foi preparado adicionando 1,0 mL de NaOH 10%, 7,0 mL de água destilada, 3,0 mL de Na₂CO₃ 20% e 1,0 mL de reagente fenólico Folin-Ciocalteu a um tubo. Os tubos foram homogeneizados e após 30 minutos, a leitura da absorbância das amostras foi realizada a 650 nm em espectrofotômetro (Utrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer). O resultado da leitura foi analisado com base na curva padrão de tirosina (0,125 a 0,0125 mg), utilizando o software CurveExpert (versão 1.4), e esse valor foi multiplicado pelo fator de correção do volume de plasma (50 µL de plasma: fator de correção 23400) para se obter a concentração de fibrinogênio plasmático (mg/dL).

2.1.8. Análise estatística

A distribuição normal e homocedasticidade dos resultados foram analisadas no programa estatístico STATATM versão 10. Sempre que necessário, os dados foram transformados por algoritmos desse programa para obter distribuição normal e homocedasticidade. Para análise estatística posterior dos resultados foram utilizados os softwares SPSS (versão 22), SigmaPlot (versão 12.0) ou R (versão 4.00). Para observar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos, foram empregados para os dados com distribuição normal e homocedasticidade o teste análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni para comparação de médias. Para os dados não paramétricos, foi empregado o teste Kruskal-Wallis e para a comparação de médias foi realizado o teste *post-hoc* de Dunn. Para a análise de curvas de sobrevivência foi utilizado o teste Log-Rank. Foram considerados significativos os resultados com p< 0,05 e os dados foram expressos como média ± erro padrão médio (e.p.m.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O veneno de *Bothrops jararaca* é composto por uma complexa mistura de componentes, e dentre esses componentes, destacam-se famílias de proteínas do veneno como metaloproteinases, serinaproteases, L-aminoácido oxidases e hialuronidases (49-53). Essas proteínas apresentam atividades *in vitro* e também possuem atividades *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em pacientes envenenados, induzindo distúrbios hemostáticos, sangramentos e reações inflamatórias (45, 54-57). Desse modo, as possíveis ações inibitórias da rutina e seu derivado hidrossolúvel, rutina succinil, foram testadas em relação a atividades *in vitro* de famílias de proteínas do veneno, assim como foi testada a capacidade das rutinas inibirem a ação tóxica do veneno *in vivo*, em modelos de envenenamentos experimentais moderado e grave.

3.1.Síntese e caracterização da rutina succinil

A rutina succinil sintetizada apresentou coloração amarela e aspecto de pó, como a rutina. Foi observado que a rutina succinil possui característica higroscópica e seu armazenamento por períodos maiores que um mês deve ser realizado em dessecador.

Ao ser solubilizada em água, a rutina succinil apresentou um aumento de solubilidade de aproximadamente 115 vezes quando comparada à rutina (14,4 g/L e 0,125 g/L, respectivamente). Esse aumento de solubilidade em água da rutina succinil está de acordo com o observado em estudo anterior, com aumento de cerca de aproximadamente 80 vezes (111).

Em relação ao espectro de absorbância, foi possível observar que tanto a rutina succinil quanto a rutina apresentaram dois picos de absorbância (Figura 5a), nos comprimentos de onda 260 nm e 360 nm. Esse resultado é condizente com a estrutura

química dos flavonoides pela absorção dos anéis aromáticos A e B (Figura 5b) (155, 156), demonstrando que a rutina succinil não teve alterações na sua estrutura química básica, mantendo-se um flavonoide, como a rutina. Ao serem diluídas, a rutina apresentou uma coloração amarela mais intensa que a rutina succinil, o que pode ser observado pela diferença das absorbâncias das rutinas em diferentes comprimentos de ondas (Figura 4a).

Nos testes de espectro de absorbância de possíveis contaminantes na amostra de rutina succinil, a amostra contendo somente metanol, utilizado como solvente no ensaio, apresentou somente um pico em 200 nm, diferentemente da solução de piridina que apresentou um pico em 230 nm e das soluções de ácido e anidrido succínico com pico em 220 nm (Figura 6). Já em relação às soluções de rutina e rutina succinil foi possível observar somente os dois picos de absorção característicos da sua estrutura flavonoide (260 nm e 360 nm). Desse modo, o método de obtenção e purificação da rutina succinil demonstrou ser eficaz e livre de contaminações significativas por piridina e anidrido succínico.

A rutina e a rutina succinil demonstraram perfis diferentes quando analisadas por HPLC (Figura 7). Como já demonstrado em estudo anterior (157), a rutina apresentou somente um pico majoritário quando analisada pelo HPLC em aproximadamente 13 minutos, enquanto que a rutina succinil apresentou diversos picos, o que se deve às substituições dos grupos hidroxila nos glicosídeos da rutina succinil por succinatos e indica a efetividade do processo utilizado para modificar quimicamente a rutina e deixála succinilada. Foi considerada como rutina succinil o produto da junção de todos os picos aferidos no ensaio de HLPC.

A amostra de rutina succinil demonstrou ter uma boa purificação, já que não foram observados picos significativos condizentes com possíveis contaminantes: o ácido succínico apresentou um pico em aproximadamente 6 minutos; o anidrido succínico

apresentou um pico em 12 minutos; para a piridina foi possível observar um pico em 5 minutos; para o éter, picos majoritários em 23 e 33 minutos.

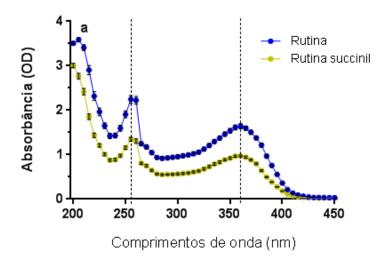


Figura 5: perfis de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda pela rutina e rutina succinil, analisados por espectrofotometria de absorção UV-visível (a) e estrutura molecular da rutina, com a indicação dos anéis aromáticos A, B e C (b).

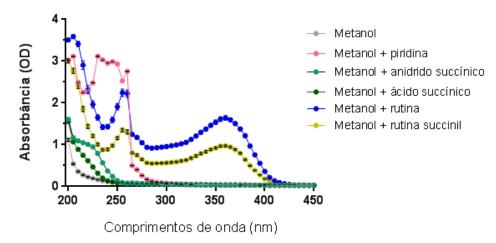


Figura 6: perfis de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda por soluções de rutina, rutina succinil, metanol, piridina, anidrido succínico e ácido succínico, analisados por espectrofotometria de absorção UV-visível.

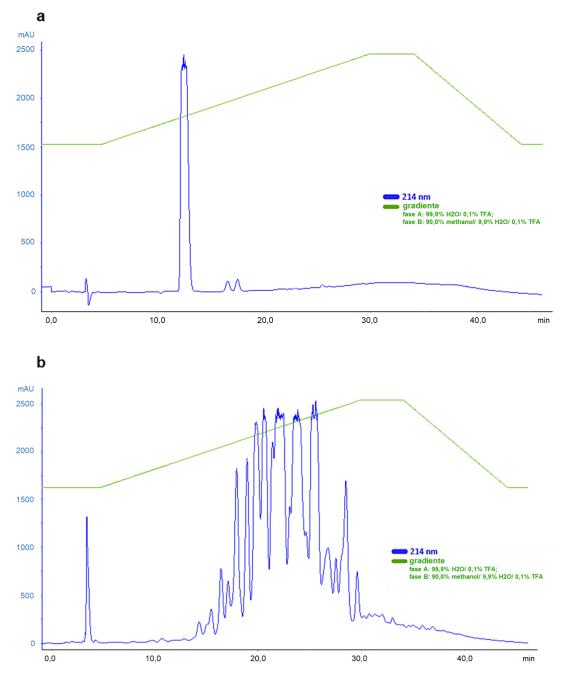


Figura 7: perfis de eluição da **(a)** rutina e **(b)** rutina succinil analisados por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC) com uso de coluna C18.

A rutina foi analisada por LC-MSE e eluída em 6,48 min, mostrando um íon precursor esperado de m/z 611,18+ e fragmentos principais de 303,06+ e 465,12+ (Figuras 8a,b). A rutina possui seis possíveis locais de succinilação nos seus grupos hidroxilas livres no rutinosídeo (Figuras 9a,b).

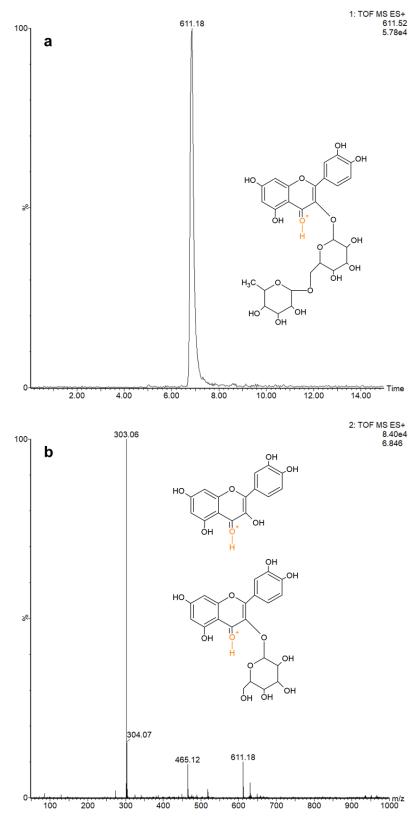


Figura 8: (a) LC-MSE cromatograma da rutina (10 ng, RT 6,84). (b) CID-MS/MS espectro da rutina: fragmentos de íons principais observados a m/z 303,06+ e 465.12+. Íon precursor remanescente a 611.18+ devido a análise DIA.

Figura 9: Proposta de rotas de fragmentação da (a) rutina e (b) rutina succinil por ESI-CID-MS/MS.

Os cromatogramas iônicos da rutina succinil demonstraram que diferentes foram de succinilação coexistem, compondo uma mistura complexa com 1 a 6 substituições (Figura 10a). Seis possíveis formas existem para uma succinilação da rutina e 15, 20, 15 e 6 formas existem para 2, 3, 4 e 5 succinilações. De fato, as rutinas succinil com 2-5 substituições apresentam formas isoméricas nos cromatogramas dos íons precursores (Figura 10b). Cada substituição adiciona 100,016 Da à rutina e dessa forma, os íons precursores da rutina succinil para 1-6 substituições são observados a 711,2; 811,2; 911,2;

1011,2; 1111,2 e 1211,2, respectivamente. Somente a rutina original e a forma com 6 succinilações demonstram formas únicas e somente um pico no cromatograma (Figura 10a). Desse modo, um total de 63 formas de rutina succinil coexistem na mistura, além de parte da rutina original sem substituições. Porcentagens baixas de rutina e rutina succinil com 5 e 6 substituições foram encontradas na amostra (3,9%, 4,8% e 0,6%, respectivamente). Níveis médios foram observados para as rutinas succinil com 1 e 4 substituições (17,3% e 15,3%) e a maior porcentagem da amostra é composta por rutinas succinil com 2 e 3 succinilações (30,7 e 27,6% da amostra).

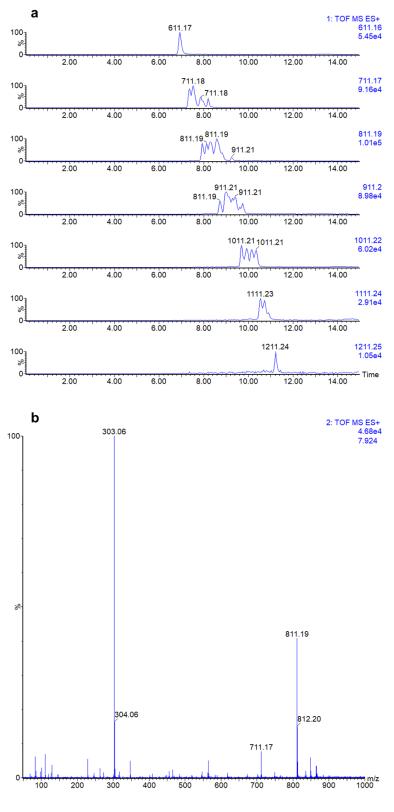


Figura 10: (a) LC-MSE cromatogramas da rutina succinil (500 ng) com múltiplas succinilações (1-6). (b) Espectro CID-MS/MS representativo da rutina succinil com duas ou três succinilações, a RT 7,924. Íons precursores remanescentes (a m/z 711,17+ e m/z 811,19+) devido a análise DIA.

Visto que a rutina apresenta uma ampla gama de atividades, mostrou-se relevante verificar se a rutina succinil também apresenta as mesmas atividades características da rutina, como a antioxidante (108), quelante de íons metálicos (104-108) e a inibidora da PDI (109), por exemplo. Tanto a rutina quanto a rutina succinil apresentaram atividade antioxidante de forma concentração-dependente (Figura 11a), porém, a rutina succinil demonstrou uma ação antioxidante mais baixa que a rutina. É necessário ressaltar que os níveis de capacidade antioxidante dentre os flavonoides diferem entre si, sendo diferentes até mesmo entre as moléculas com estrutura de quercetina, da qual a rutina e a rutina succinil fazem parte. Ademais, os resultados estão de acordo com a atividade antioxidante da rutina succinil reportada previamente, em que foi observado que a diferença entre as atividades antioxidantes pode ser devida a uma falta de estabilização de carboxilatos por hidroxilas na rutina succinil (111, 157).

No entanto, ao analisar a interação das rutinas e ácido succínico com cálcio, magnésio e zinco (Figura 11), somente foram observadas diferenças mais expressivas do ácido succínico em relação ao cálcio, de forma concentração-dependente. De fato, estudos já demonstraram que o ácido succínico é capaz de interagir com íons metálicos, formando complexos e agir como um agente quelante (158, 159).

Ao analisar o ensaio de atividade da PDI (Figura 12a), foi observado que as rutinas apresentam ações inibitórias similares. Os resultados demonstraram que as amostras de PDI incubadas com a rutina ou a rutina succinil apresentaram diminuição das unidades relativas de fluorescência (RFU) ao longo do tempo analisado. Também foi observado que a Vmax da reação com a PDI (0,043±0,0003 unidades/segundo) diminuiu quando incubada com a rutina (0,030±0,0041 unidades/segundo) ou com a rutina succinil (0,033±0,0007 unidades/segundo). Desse modo, os resultados indicam que tanto a rutina quanto a rutina succinil possuem capacidade inibitória em relação à PDI.

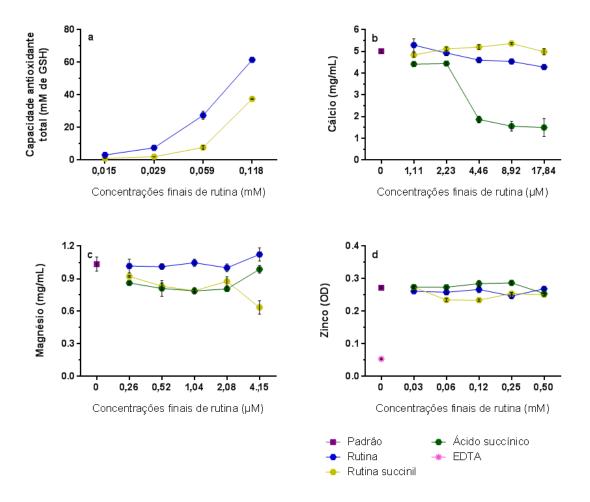


Figura 11: (a) capacidade antioxidante total de soluções de rutina e rutina succinil em diferentes concentrações. Dados expressos como equivalentes à GSH (em mM), representativos de ensaios realizados em duplicata; dosagens de (b) cálcio, (c) magnésio e (d) zinco com pré-incubação com rutina, rutina succinil, ácido succínico e Na₂EDTA em diferentes concentrações. Dados expressos como concentração de cálcio ou magnésio (mg/mL) ou como unidades de densidade óptica (OD), representativos de ensaios realizados em duplicata.

Ademais, as rutinas demonstraram interferir não somente com a atividade da PDI, porém também com sua estrutura, o que pode ser observado pela diminuição da intensidade de fluorescência dos resíduos de Trp (Figura 12b). Sabe-se que a PDI é susceptível a mudanças de estrutura e função dependendo do meio em que se encontra e os substratos com os quais interage (160). A PDI possui 5 resíduos de Trp em sua estrutura e já foi demonstrado que a GSSG – um conhecido substrato que interage com a PDI (137)

– induz a diminuição da fluorescência dos resíduos de Trp da PDI (136), como observado no presente trabalho. Congruentemente com os resultados apresentados, a rutina liga-se ao bolsão hidrofóbico da PDI no domínio b', o que induz uma mudança conformacional para uma estrutura mais compactada da PDI, que impede a ligação de substratos e inibe sua atividade (161). Já foi demonstrado que a ação inibitória de quercetina em relação à PDI é dependente da presença de glicosídeos na posição 3' do anel C (162) e de fato foi observado que somente a rutina e rutina succinil foram capazes de interferir com a estrutura da PDI e não o ácido succínico.

É preciso ressaltar que foi já demonstrado que a PDI extracelular é necessária para a formação de trombo em modelo animal *in vivo*, e que a rutina é capaz de ligar-se reversivelmente à PDI, inibindo sua atividade, tanto *in vitro* como *in vivo*. Visto que a administração de rutina e análogos (tanto por via oral quanto intravenosa) impede a formação de trombos, seja em relação ao acúmulo de plaquetas, seja quanto à deposição de fibrina, os inibidores de PDI foram considerados como uma nova classe de agentes antitrombóticos, gerando mais interesse na pesquisa desses compostos (109).

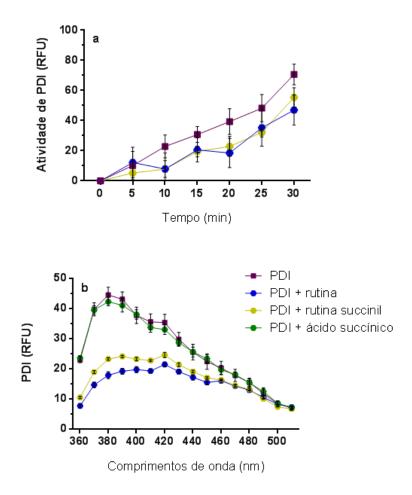


Figura 12: (a) atividade de redução da sonda Di-eosina-GSSG pela PDI (150 nM) ou PDI pré-incubada com rutina ou rutina succinil (60 μM). Dados expressos como unidades relativas de fluorescência (RFU), representativos de ensaios realizados em triplicata; (b) perfis de fluorescência em diferentes comprimentos de onda da PDI ou PDI pré-incubada com soluções de rutina, rutina succinil ou ácido succínico, analisados por espectro de fluorescência. Dados expressos como unidades relativas de fluorescência (RFU), representativos de ensaios realizados em triplicata.

Desse modo, foi possível observar que a rutina succinil possui a estrutura química de um flavonoide (111) e apresenta atividades características da rutina, como ação antioxidante e inibidora da PDI.

3.2. A rutina succinil altera parâmetros hemostáticos in vitro

Além de sua ação como inibidora da PDI, alguns estudos já demonstraram a influência da rutina em outros componentes da hemostasia *in vitro* (120, 163). Para averiguar a ação

direta da rutina e rutina succinil em relação à coagulação, foram utilizados ensaios de hemostasia *in vitro* e ensaios com proteínas abundantes no sangue, como fibrinogênio e albumina. Visto que a rutina succinil foi sintetizada utilizando o processo de succinilação, a ação específica do ácido succínico também foi avaliado para melhor compreender as atividades da rutina succinil.

Para isso, foram analisadas as vias extrínseca e comum da cascata de coagulação pelo teste de tempo de protrombina (Figura 13a) e vias intrínseca e comum pelo teste TTPA (Figura 13b). Foi observado que a rutina succinil prolonga modestamente o tempo de protrombina (máximo de 3,6 s em relação ao controle) e o TTPA (máximo de 3,9 s em relação ao controle), o que indicou que a rutina succinil poderia ter ação em algum componente da via comum da coagulação. Desse modo, foi avaliado o tempo de trombina tanto em plasma de camundongo (Figura 13c) quanto em fibrinogênio bovino (Figura 13d). A rutina succinil prolongou o tempo de trombina tanto em plasma de camundongo (maior que 300 s com uso da concentração mais alta de rutina succinil) quanto em fibrinogênio bovino (aumento máximo de 93,7 s em relação ao controle). Já o ácido succínico somente prolongou o tempo de trombina em fibrinogênio (aumento máximo de 81 s em relação ao controle). Diferentemente, a rutina encurtou o tempo de trombina em fibrinogênio, com diminuição de 6,45 s em relação ao controle.

Ao considerar a influência das rutinas e ácido succínico em relação ao tempo de trombina em fibrinogênio foram investigadas mais profundamente as possíveis interações entres esses componentes. Ao analisar a possível formação de complexos com o fibrinogênio (Figura 14), somente a incubação com a rutina succinil na concentração mais alta foi capaz de induz um aumento da turbidez do fibrinogênio, o que indica uma possível formação de complexo por atração eletroestática (140).

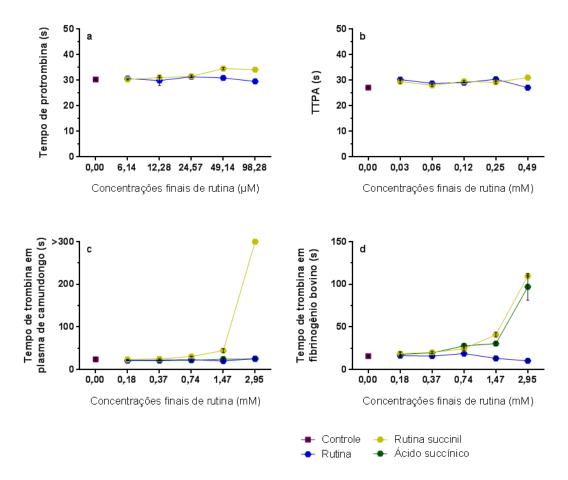


Figura 13: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações no (a) tempo de protrombina em plasma de camundongos; (b) tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) em plasma de camundongos; (c) tempo de trombina em plasma de camundongos; (d) tempo de trombina em fibrinogênio bovino. Dados representativos de ensaios realizados em triplicata.

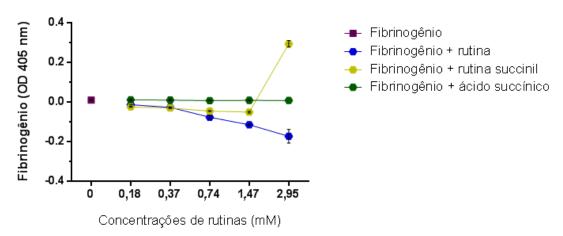


Figura 14: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações na formação de complexos com o fibrinogênio bovino. Dados expressos como unidades de densidade óptica, representativos de ensaios realizados em triplicata.

No entanto, ao analisar a fluorescência dos resíduos de Trp do fibrinogênio (Figura 15a,b) e da BSA (Figura 15c,d), foram observados padrões similares, com a diminuição da fluorescência com a incubação com as rutinas de forma concentração-dependente e sem alteração pela incubação com o ácido succínico. Esse resultado indica que a ação do ácido succínico no tempo de trombina não aparenta estar relacionado ao fibrinogênio, no entanto, pode ter relação com sua ação como quelante de cálcio, como o demonstrado pelos resultados descritos acima.

É preciso considerar que a ação da rutina em relação à albuminas séricas já foi demonstrada anteriormente, com a diminuição da fluorescência das albuminas sendo atribuída à ligação da rutina às mesmas de forma espontânea por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals fracas, alterando a conformação das albuminas (164). Já à respeito do fibrinogênio, a diminuição da fluorescência dos resíduos de Trp – que se localizam na maior parte na porção hidrofóbica do fibrinogênio – também está associada a mudanças conformacionais da proteína (140).

Os resultados confirmam a interação tanto da rutina quanto rutina succinil com a BSA, sendo um dado relevante já que as albuminas séricas são proteínas importantes para o transporte e biodisponibilição de componentes exógenos ao organismo, assim como a interação com o fibrinogênio, um componente fundamental da coagulação. No entanto, somente a rutina succinil alterou outros parâmetros hemostáticos, o que indica que sua ação em relação à coagulação é diferente da rutina.

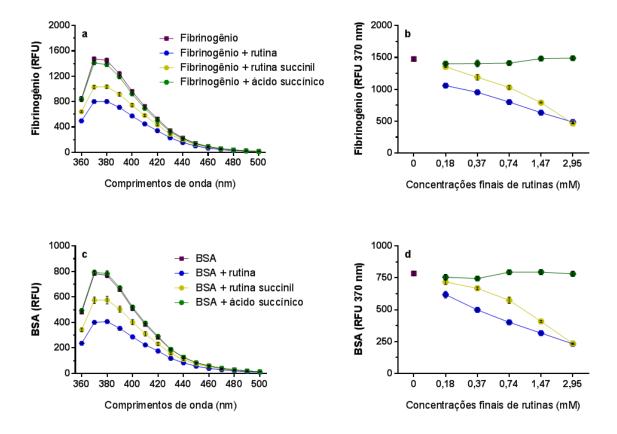


Figura 15: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações nos perfis de fluorescência em diferentes comprimentos de onda (**a,b**) do fibrinogênio bovino; (**c,d**) da BSA, analisados por espectro de fluorescência. Dados expressos como unidades relativas de fluorescência (RFU), representativos de ensaios realizados em triplicata.

Como o enfoque de nosso estudo é o uso da rutina para o tratamento do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, e visto que anteriormente a rutina não demonstrou ação inibitória direta em relação a algumas atividades características do BjV (66), foi analisada a ação da rutina e rutina succinil nas principais atividades do BjV *in vitro*.

3.3.A rutina succinil inibe atividades do veneno de B. jararaca in vitro

A avaliação das principais atividades do BjV foi fundamental para compreender as ações diretas da rutina e da rutina succinil em relação ao veneno. Essa avaliação foi

iniciada com a análise do espectro de fluorescência de resíduos de Trp presente no BjV (Figura 16a) e na SVMP isolada jararagina (Figura 16b), uma toxina importante no envenenamento *in vivo* (165).

Como observado em relação às outras proteínas, a rutina e rutina succinil induziram a diminuição da fluorescência do BjV e jararagina, diferentemente do ácido succínico que somente induziu alterações na jararagina.

Já foi demonstrado que a redução de fluorescência de Trp em venenos de serpente pode indicar uma mudança conformacional (166) e que a quercetina é capaz de ligar-se a componentes do veneno de serpentes *Bothrops* e induzir essa alteração (167).

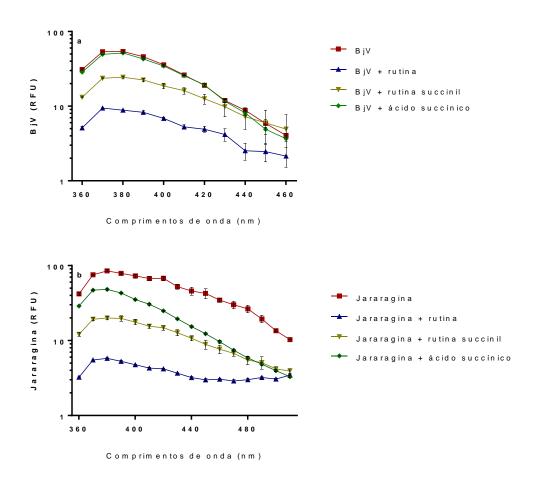


Figura 16: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações e da o-phe e AEBSF nos perfis de fluorescência em diferentes comprimentos de onda (a) do BjV; (b) da jararagina, analisados por espectro de fluorescência. Dados expressos como unidades relativas de fluorescência (RFU), representativos de ensaios realizados em triplicata.

Para verificar se as possíveis alterações conformacionais do BjV também modificam suas ações, foram testadas importantes atividades específicas do veneno e da jararagina.

A rutina e rutina succinil inibiram somente 15,4-30,1% e 6,7-22,3% da atividade de LAAO (Figura 17a), respectivamente. Mesmo havendo uma pequena diferença de inibição entre as rutinas, o mesmo padrão foi observado, de forma concentração dependente, o que pode ocorrer por uma ação indireta das rutinas, já que as LAAO geram H₂O₂ e as rutinas são capazes de agir como antioxidantes *in vitro*.

Já em relação à atividade de hialuronidase (Figura 17b), as três concentrações mais altas da rutina foram minimamente inibitórias (0,4 - 9,7% de inibição). Diferentemente, a rutina succinil apresentou alta atividade inibitória nas três concentrações mais altas (11,7; 45,8 e 97,7%). As hialuronidases do veneno são relacionadas com a degradação de componentes da matriz extracelular, principalmente o ácido hialurônico, podendo contribuir para o dano local do envenenamento e auxiliando na propagação do veneno no organismo. De fato, flavonoides como a rutina são conhecidos inibidores de hialuronidases – como as encontradas nos venenos de serpentes – (168), o que está de acordo com os resultados observados da inibição da atividade de hialuronidase pela rutina succinil. A maior eficiência da rutina succinil em relação à rutina pode ser devida tanto às diferenças químicas desses flavonoides quanto à melhor solubilidade da rutina succinil.

Considerando que as LAAO e hialuronidases compõem partes minoritárias do BjV, também foram analisadas atividades de famílias de proteínas majoritárias do BjV, como as SVSP e SVMP. Como esperado para o controle positivo, o AEBSF, um inibidor de SVSP, inibiu 99,4% da atividade de SVSP, confirmando a especificidade do ensaio. A pré-incubação do BjV com a rutina succinil não alterou a atividade de SVSP (Figura 17c), no entanto foram observadas modestas inibições (0,9-23,3%) com a pré-incubação com a rutina.

Os resultados relativos à rutina estão de acordo com o observado anteriormente com o uso de concentrações de rutina 9 vezes maiores que de BjV (66). O aumento da inibição da atividade de SVSP com concentrações maiores de rutina pode estar relacionado com a capacidade de flavonoides agirem como inibidores reversíveis de serinaproteases, como a trombina e enzimas tipo-trombina. Já foi demonstrado que a rutina é capaz de ligar-se à trombina e inibir sua atividade amidolítica de forma concentração-dependente (169), como o observado no presente estudo.

As SVMP compõe a família de proteínas mais abundante no veneno de *B. jararaca* e possuem diversas atividades *in vitro* e *in vivo* (170). Dentre as ações *in vitro*, inicialmente foi analisada a atividade colagenolítica de SVMP do BjV (Figura 17d). Como já demonstrado anteriormente (66), a rutina não inibiu essa ação do BjV, diferentemente da o-phe que inibiu 100% da atividade colagenolítica do BjV. Foram observadas inibições das SVMP pela rutina succinil e ácido succínico de forma concentração dependente. A rutina succinil apresentou 100% de inibição nas duas concentrações mais altas, seguida de inibição de 62, 27 e 0% nas demais concentrações. Já o ácido succínico inibiu 100% da atividade colagenolítica do BjV na concentração mais alta e inibição de 35% na concentração seguinte. Para confirmar a ação inibitória das rutinas e ácido succínico, outras atividades de SVMP foram avaliadas.

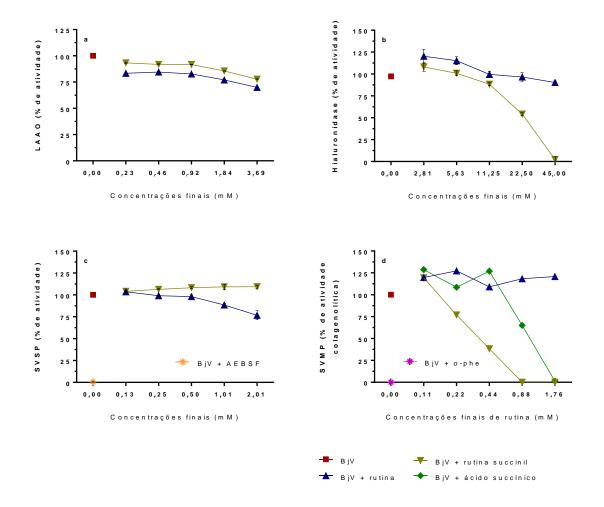


Figura 17: ação da rutina e rutina succinil em diferentes concentrações em relação às atividades enzimáticas de famílias de proteínas do BjV *in vitro* (a) LAAO, (b) hialuronidase, (c) SVSP, (d) SVMP. Dados expressos como porcentagem de atividade enzimática, representativos de ensaios realizados em duplicata/triplicata.

Ao analisar a atividade proteolítica do BjV frente a outros substratos, como gelatina, caseína e fibrinogênio bovino foi observado que o BjV foi capaz de degradar os substratos analisados (Figuras 18-20, *poços* 2), o que pode ser observado pela diminuição de bandas das proteínas, como bandas de 75 kDa a 250 kDa para a gelatina, banda próxima a 25 kDa para caseína (relativa à α-caseína) e banda próxima a 60 kDa para o fibrinogênio (relativa à cadeia α do fibrinogênio). Devido à proteólise, foi possível observar um aumento de bandas com pesos moleculares menores que as bandas de interesse, demonstrando assim os produtos da degradação dos substratos. Como esperado, a

inibição das SVMP pelo Na₂EDTA ou o-phe foi eficaz na diminuição das atividades proteolíticas do BjV (Figura 18-20a,e), apresentando inibição mínima de 93,4% da atividade gelatinolítica, inibição total da atividade caseinolítica e 42,2% de inibição da atividade fibrinogenolítica. Já a inibição de SVSP pelo uso de AEBSF (Figura 18-20a,e) atenuou minimamente a proteólise dos substratos (0 a 19,8% de diminuição).

A rutina afetou de forma modesta as atividades gelatinolítica (Figura 18a,b, *poços* 3-7), caseinolítica (Figura 19a,b, *poços* 3-7) e fibrinogenolítica (Figuras 20a,b, *poços* 3-7) do veneno, apresentando inibição de 0 a 7,4%, 0 a 19,8 e 0 a 13,3%, respectivamente. No entanto, a rutina succinil foi capaz de inibir de forma concentração-dependente a atividade proteolítica do BjV (Figuras 18a,c, 19a,c, 20a,c, *poços* 3-7), sendo que as três concentrações mais altas de rutina succinil apresentaram melhores resultados de inibição, com variação de 45,5 a 88,7% para atividade gelatinolítica (Figuras 18a,c, *poços* 3-7), 45,9 a 100% para atividade caseinolítica (Figuras 19a,c, *poços* 3-7) e 32,6 a 46,8% para atividade fibrinogenolítica (Figuras 20a,c, *poços* 3-7). Assim como a rutina succinil, o ácido succínico inibiu a atividade proteolítica de maneira concentração dependente, com maiores efeitos nas três concentrações mais altas, apresentando inibição de 8,7 a 61,6% para atividade gelatinolítica (Figuras 18a,d, *poços* 3-7), 38,6 a 79,1% para atividade caseinolítica (Figuras 19a,d, *poços* 3-7) e 23,7 a 61,2% para atividade fibrinogenolítica (Figuras 20a,d, *poços* 3-7).

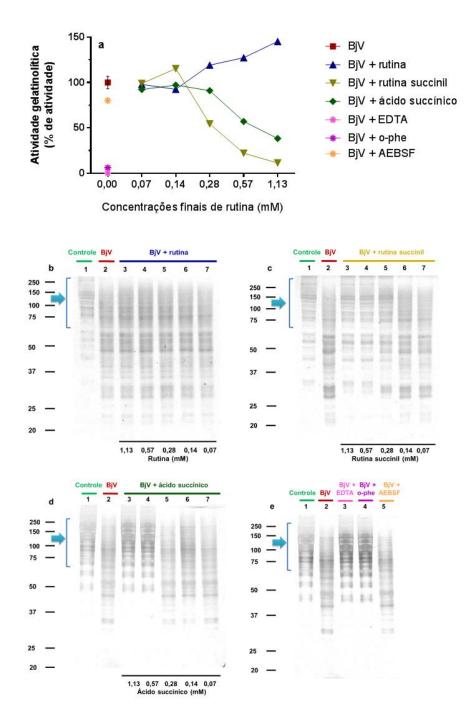


Figura 18: (a-d) ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações em relação à atividade gelatinolítica do BjV *in vitro*. (a) dados expressos como porcentagem de atividade gelatinolítica induzida pelo BjV sozinho. (b-e) A degradação da gelatina pelo BjV foi avaliada em géis de SDS-Page (10%). A gelatina foi incubada na ausência de BjV (poços 1) ou com soluções de BjV 1,0 mg/mL (poços 2); (b, BjV + rutina), poços 3-7, concentrações de rutina 1,13 a 0,07 mM; (c, BjV + rutina succinil), poços 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM; (d, BjV + ácido succínico), poços 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM, (e) BjV+EDTA (poço 3), BjV+o-phe (poço 4) e BjV+AEBSF (poço 5). As setas são referentes às bandas de interesse de 75 kDa a 250 kDa, relativas à gelatina.

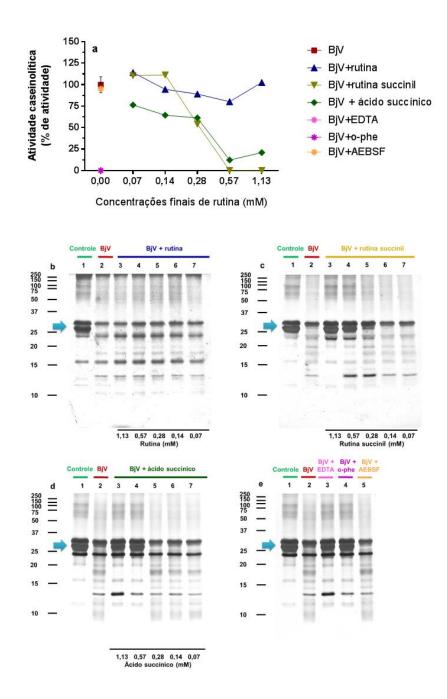


Figura 19: (a-d) ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações em relação à atividade caseinolítica do BjV *in vitro*. (a) dados expressos como porcentagem de atividade caseinolítica induzida pelo BjV sozinho. (b-e) A degradação da gelatina pelo BjV foi avaliada em géis de SDS-Page (15%). A gelatina foi incubada na ausência de BjV (*poços* 1) ou com soluções de BjV 1,0 mg/mL (*poços* 2); (b, BjV + rutina), *poços* 3-7, concentrações de rutina 1,13 a 0,07 mM; (c, BjV + rutina succinil), *poços* 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM; (d, BjV + ácido succínico), *poços* 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM, (e) BjV+EDTA (*poço* 3), BjV+o-phe (*poço* 4) e BjV+AEBSF (*poço* 5). As setas são referentes às bandas de interesse próximas a 25 kDa, relativas à α-caseína.

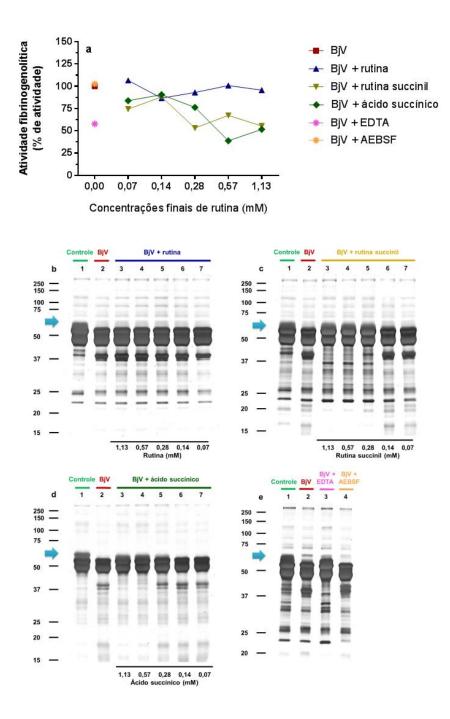


Figura 20: (a-d) ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações em relação à atividade fibrinogenolítica do BjV *in vitro*. (a) dados expressos como porcentagem de atividade fibrinogenolítica induzida pelo BjV sozinho. (b-e) A degradação da gelatina pelo BjV foi avaliada em géis de SDS-Page (10%). A gelatina foi incubada na ausência de BjV (poços 1) ou com soluções de BjV 1,0 mg/mL (poços 2); (b, BjV + rutina), poços 3-7, concentrações de rutina 1,13 a 0,07 mM; (c, BjV + rutina succinil), poços 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM; (d, BjV + ácido succínico), poços 3-7, concentrações de rutina succinil 1,13 a 0,07 mM, (e) BjV+EDTA (poço 3) e BjV+AEBSF (poço 4). As setas são referentes às bandas de interesse próximas a 60 kDa, relativas à cadeia α do fibrinogênio).

A rutina succinil e ácido succínico também demonstraram ação inibitória em relação à proteólise de fibrinogênio pela jararagina e de gelatina pela colagenase de *Clostridium histolyticum*, o que pode indicar que sua atividade se estende a agentes de diversas fonte e toxinas isoladas.

É importante ressaltar que a ação inibitória da rutina succinil e ácido succínico foi visualizada tanto pela diminuição da degradação das bandas de interesse das proteínas, quanto pela diminuição dos produtos de degradação das mesmas.

Esses resultados indicam que a rutina succinil e ácido succínico são capazes de inibir diretamente importantes atividades das SVMP do veneno e que a ação inibitória da rutina succinil em relação às atividades proteolíticas do BjV pode estar diretamente relacionada aos succinatos em sua estrutura. Ademais, a degradação de componentes proteicos é uma ação importante das SVMP, especialmente quando relacionada à hidrólise de componentes da membrana basal de vasos sanguíneos capilares, passo fundamental para o desenvolvimento da hemorragia induzida pelo veneno *in vivo* (171, 172).

Sabe que além da atividade proteolítica, as SVMP apresentam outras ações *in vitro*, como atividade coagulante pela ativação de fatores da coagulação, como protrombina e fator X (57, 173). No presente estudo foi observado que a rutina interfere minimamente nessas atividades de SVMP (Figura 21), apresentando o máximo de 9% de inibição. Já a pré-incubação do veneno com rutina succinil e ácido succínico inibiram de maneira concentração-dependente a atividade de ativador de protrombina. As três concentrações mais altas de rutina succinil e as duas concentrações mais altas de ácido succínico foram capazes de inibir em média 98-99% dessa atividade de SVMP.

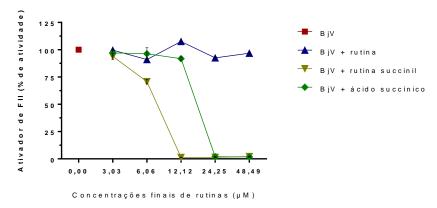


Figura 21: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações em relação à atividade de ativador de protrombina do BjV *in vitro*. Dados expressos como porcentagem de atividade, representativos de ensaios realizados em triplicata.

Vistas as diferentes inibições diretas da rutina, rutina succinil e ácido succínico em relação ao veneno, foi avaliada mais uma importante ação do BjV, a atividade coagulante em fibrinogênio bovino (Figura 22a) e em plasma de camundongos (Figura 22b). A rutina inibiu minimamente a atividade coagulante do BjV no fibrinogênio bovino (máximo de 5,1% de inibição) e o ácido succínico inibiu modestamente a atividade coagulante (máximo de 21%). No entanto, a rutina succinil demonstrou atividade inibitória concentração-dependente, de 11,3 a 56,3% de inibição, sendo que a maior concentração de rutina succinil foi capaz de inibir completamente a coagulação do fibrinogênio (acima de 300 s). A inibição de SVMP pelo o-phe não alterou significativamente a atividade coagulante do BjV no fibrinogênio, já a inibição de SVSP pelo AEBSF inibiu totalmente essa atividade.

Sabe-se que SVSP agem como enzimas trombina-símile e são capazes de induzir a coagulação tanto *in vitro* quanto *in vivo* (57, 63, 142, 145), e já foram apontadas como importantes toxinas para o desenvolvimento da coagulopatia por consumo induzida pelo envenenamento (174, 175). Ademais, já foi demonstrado que os flavonoides, como as quercetinas e derivados glicosilados, como a rutina e análogos, são capazes de inibir serinaproteases, como a trombina humana e possivelmente, enzimas trombina-símile

(169, 176, 177). Visto que a inibição de serinaproteases ocorre pela ligação dos flavonoides e que as diferentes estruturas químicas dos flavonoides podem influenciar essa ligação (169), é possível que a succinilação da rutina possa favorecer a inibição de trombina-símiles do BjV.

Assim como observado em relação ao fibrinogênio, a atividade coagulante do veneno em plasma não foi alterada pela rutina (máximo de inibição de 2,1%) e modestamente alterada pelo ácido succínico (máximo de 17,26%). Já a rutina succinil apresentou inibição total quando usada nas duas concentrações mais altas, seguido por inibições parciais de 71,3% e 30,0% nas concentrações de 2,95 e 1,47 mM.

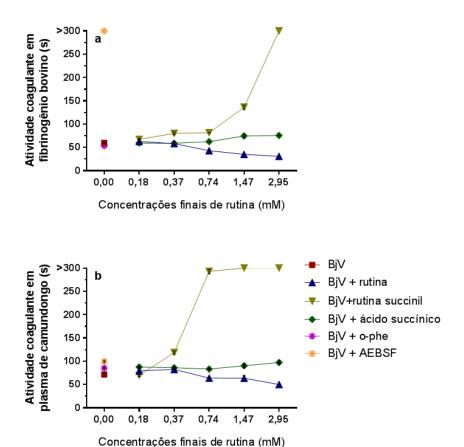


Figura 22: ação da rutina, rutina succinil e ácido succínico em diferentes concentrações em relação atividade coagulante *in vitro* do BjV (a) em fibrinogênio bovino e (b) em plasma de camundongos. Dados expressos como atividade coagulante em segundos para a coagulação do fibrinogênio e plasma após a adição do BjV (0,25 mg/mL), representativos de ensaios realizados em triplicata.

Foi observado que ao utilizar a concentração de BjV equivalente a uma dose mínima coagulante (0,25 mg/mL) (66), as inibições de SVMP pelo o-phe ou inibições de SVSP pelo AEBSF alteraram somente de forma parcial a atividade coagulante do BjV no plasma, com 16,6% e 9,4% de inibição, respectivamente. Desse modo, o ensaio de DMC foi realizado (Tabela 1) a fim de compreender mais especificamente a participação das SVMP e SVSP em relação à atividade coagulante do BjV em plasma de camundongos. Os resultados do ensaio de DMC demonstram que tanto as inibições de SVMP quanto de SVSP aumentam a dose mínima do veneno necessária para coagular o plasma, portanto, as duas famílias de proteínas são responsáveis pela atividade coagulante do veneno, como já demonstrado em estudos anteriores (63, 66, 145). Ademais, é possível observar que a inibição conjunta de fator X (pela rivaroxabana) e protrombina (pela dabigatrana) apresentou atividade relativa similar à inibição de SVMP pela o-phe, o que confirma que a atividade pró-coagulante das SVMP do BjV é devida à ação de ativadores de FX e protrombina presentes no veneno (142, 148).

Tabela 1: dose mínima coagulante e atividade coagulante relativa do veneno de Bothrops jararaca em plasma de camundongo

Column1	DMC (µg/mL)	Atividade coagulante relativa (%)
BjV	301.17	100.00
BjV+AEBSF	471.73	63.84
BjV+rivaroxabana	362.53	83.07
BjV+dabigatrana	373.00	80.74
BjV+rivaroxabana+dabigatrana	424.01	71.03
BjV+etanol	244.56	100.00
BjV+o-phe	348.84	70.11

Desse modo, os resultados indicam que as inibições de SVMP e SVSP separadamente somente inibem parcialmente a atividade pró-coagulante do BjV em plasma de camundongo e que a rutina succinil é capaz de inibir completamente a atividade coagulante do veneno no plasma. Esses resultados vão de acordo com as alterações diretas na coagulação induzidas pela rutina succinil observadas no presente trabalho, evidenciando uma ação anticoagulante da rutina succinil.

A rutina somente inibiu minimamente as atividades de SVMP, diferentemente da rutina succinil e ácido succínico que inibiram diretamente importantes atividades *in vitro* de SVMP do BjV.

Visto o potencial *in vivo* da rutina em relação às alterações deletérias induzidas pelo envenenamento (66) e as ações inibitórias das atividades do veneno *in vitro* pela rutina succinil, foram realizados experimentos *in vivo* a fim de averiguar a ação das rutinas em diferentes modelos experimentais de envenenamento. No entanto, é necessário enfatizar que apesar da rutina e rutina succinil apresentaram diversos potenciais inibitórios em relação ao BjV de forma concentração-dependente *in vitro*, é preciso considerar que para os experimentos *in vivo* foram utilizadas concentrações das rutinas 9 vezes maiores que as de BjV. Desse modo, a pré-incubação do veneno com a rutina não promove alterações diretas às toxinas do BjV e a pré-incubação com a rutina succinil inibe parcialmente a atividade coagulante do BjV, assim como atividades associadas às SVMP, como colagenolítica, gelatinolítica, caseinolítica, fibrinogenolítica e de ativador de protrombina.

3.4. A rutina e a rutina succinil neutralizam as atividades tóxicas do BjV in vivo

O modelo experimental de envenenamento pela via intraperitoneal permite a avaliação da toxicidade sistêmica do envenenamento, assim como a averiguação de sua

neutralização *in vivo*. A utilização de um modelo de envenenamento moderado (2 DL₅₀) teve como objetivo possibilitar a avaliação dos parâmetros hemostáticos de todos os animais. Já o modelo de envenenamento grave (3 DL₅₀) permitiu a averiguação da influência das ações sistêmicas do veneno na sobrevivência dos animais, além das alterações hemostáticas. Tanto a rutina quanto a rutina succinil foram avaliadas em relação ao seu potencial de neutralização dos efeitos do BjV nos dois modelos de envenenamento.

3.4.1. Envenenamento moderado

A utilização de uma dose-desafio de 2 DL₅₀ de BjV não induziu mortalidade, permitindo que fosse possível observar os efeitos do envenenamento em todos os animais após 48 h da administração do veneno

Os animais envenenados não demonstraram alterações na contagem de leucócitos circulantes (Figura 23a) comparado ao controle salina (p= 0,130), porém os grupos BjV + rutina succinil e BjV + o-phe apresentaram diminuição de leucócitos quando comparado ao grupo BjV (p< 0,050). O BjV induziu alterações hematológicas características do envenenamento botrópico, como a queda de valores eritrocitários tanto no grupo BjV quanto no grupo BjV + rutina, com diminuição de 44 - 58% da contagem de eritrócitos (Figura 23b), hemoglobina (Figura 23c) e hematócrito (Figura 23d) comparado ao controle salina (p< 0,001 para BjV + rutina) em 48 h. Já os grupos BjV + rutina succinil e BjV + o-phe reverteram as ações deletérias do veneno e apresentaram resultados similares ao controle (p= 1,000) e diferentes do grupo BjV (p< 0,001).

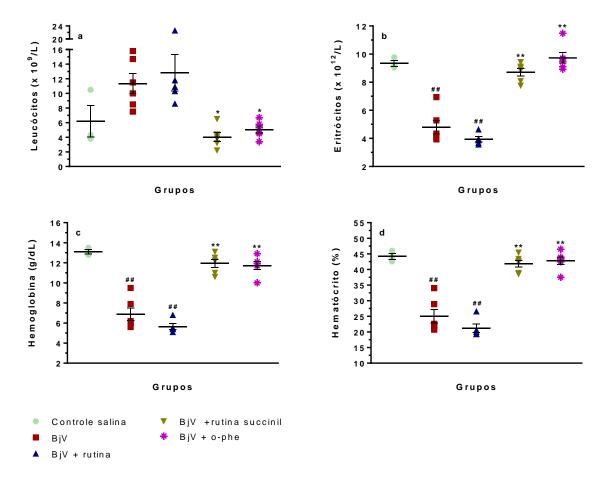


Figura 23: contagem de leucócitos (**a**), eritrócitos (**b**), hemoglobina (**c**), hematócrito (**d**) em camundongos 48 h após a administração de salina, BjV, BjV + rutina, BjV + rutina succinil ou BjV + o-phe (dose-desafio: 2 DL₅₀). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-6/grupo).

O envenenamento também foi capaz de induzir outros distúrbios hemostáticos importantes *in vivo*, como a plaquetopenia e a hipofibrinogenemia. Ao serem comparados ao controle salina, os grupos BjV, BjV + rutina e BjV + o-phe apresentaram diminuição de 53-86% da contagem plaquetária (p< 0,001, Figura 24a) e aumento de 16-33% do volume plaquetário médio (VPM, p< 0,05 para os grupos BjV + rutina e BjV + o-phe, Figura 24b).

Os grupos BjV e BjV + o-phe demonstraram a queda mais acentuada dos níveis de fibrinogênio plasmático (Figura 24c) comparados ao controle salina (diminuição de 51-

56%, p< 0.050). Já o grupo BjV + rutina apresentou diminuição de 29-33%, não diferindo do controle salina (p= 0,201).

Assim como observado para os valores eritrocitários, o grupo BjV + rutina succinil foi capaz de reverter as alterações na contagem plaquetária, volume médio plaquetário e fibrinogênio e não apresentou diferenças significativas em relação ao controle salina (p= 1,000). No entanto, o grupo BjV + rutina succinil demonstrou diferenças quando comparado ao grupo BjV na contagem plaquetária (p< 0,050) e fibrinogênio (p< 0,001).

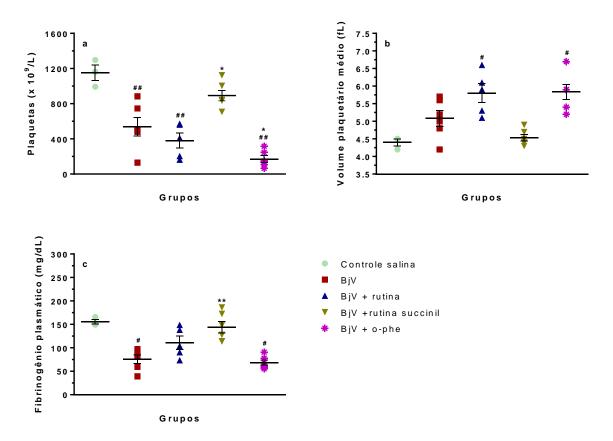


Figura 24: contagem de plaquetas (a), volume plaquetário médio (b), fibrinogênio plasmático (c) em camundongos 48 h após a administração de salina, BjV, BjV + rutina, BjV + rutina succinil ou BjV + o-phe (dose-desafio: $2DL_{50}$). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-6/grupo).

Além das alterações hematológicas e sistêmicas induzidas pelo envenenamento, também foi possível observar nos grupos BjV e BjV + rutina o desenvolvimento de hemorragia na parede abdominal de todos os animais. Já a rutina succinil e a o-phe foram capazes de inibir completamente esse efeito e desse modo, os animais dos grupos BjV + rutina succinil e BjV + o-phe não apresentaram hemorragia

3.4.2. Envenenamento grave

O envenenamento grave foi analisado com uso de modelo experimental utilizando uma dose-desafio letal de 3 DL₅₀, que possibilita a análise de sobrevivência dos animais durante 48 h, assim como o potencial de neutralização da atividade letal do veneno pelo soro antibotrópico ou outros compostos, como a rutina e rutina succinil. Durante 48 h após a administração das soluções, todos os animais dos grupos controle salina, BjV + rutina, BjV + rutina succinil, BjV + ácido succínico e BjV + o-phe sobreviveram. No entanto, em relação aos animais injetados com BjV, 3 animais morreram após 4 h (50% de sobrevivência) e 1 animal morreu após 24 h (33,3% de sobrevivência). Já os animais do grupo BjV + bacitracina apresentaram somente 16,7% de sobrevivência, sendo que 1 animal morreu após 1 h, 2 animais morreram após 2 h, 1 animal morreu após 3h e 1 animal morreu após 5 h. As curvas de sobrevivência (Figura 25) apresentaram diferença estatística significativa entre si (p< 0,001).

Os resultados indicam que a rutina e rutina succinil, assim como o ácido succínico e a o-phe (pela inibição de SVMP) foram capazes de inibir a atividade tóxica do veneno, preservando a sobrevivência dos animais no modelo de envenenamento sistêmico grave. Ademais, a inibição de tiol isomerases pela bacitracina reduziu a sobrevivência dos animais, indicando um papel protetor dessas enzimas no organismo no envenenamento grave.

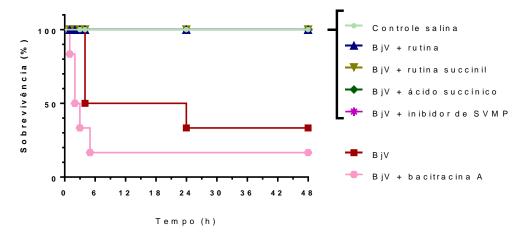


Figura 25: curvas de sobrevivência de camundongos durante 48 h após a administração de salina, BjV, BjV + rutina, BjV + rutina succinil, BjV + ácido succínico, BjV + o-phe e BjV + bacitracina (dose-desafio: 3 DL₅₀). Foi utilizado o teste de log-rank e as curvas de sobrevivência apresentaram diferença significativa (p= 0,005). Dados expressos como porcentagem de sobrevivência. (n= 3-6/grupo).

Após 48 h da administração do veneno, os parâmetros hematológicos dos animais sobreviventes foram analisados. A contagem de leucócitos (Figura 26a) não demonstrou alteração entre os grupos comparados ao controle salina (p> 0,129), no entanto os parâmetros eritrocitários (Figura 26b-d) mostraram um padrão similar ao observado no envenenamento moderado (2 DL₅₀). O grupos BjV e BjV + rutina apresentaram diminuição de 49-61% da contagem de eritrócitos (Figura 26b), 45-59% de hemoglobina (Figura 26b) e 47-60% de hematócrito (Figura 26c) quando comparados ao controle salina (p< 0,001). A incubação da rutina succinil ou ácido succínico com o BjV causou uma reversão completa das alterações eritrocitárias, de modo que os grupos BjV + rutina succinil e BjV + ácido succínico não apresentaram diferenças em relação ao controle salina (p= 1,000), mas sim em relação ao grupo BjV (p< 0,001 para o grupo BjV + rutina succinil e p< 0,050 para o grupo BjV + ácido succínico). Diferentemente do observado no envenenamento moderado, o grupo BjV + o-phe apresentou diminuição de 43-45% desses valores (p< 0,001 comparado ao controle salina), como também observado para os animais do grupo BjV + bacitracina (31-37% de reducão). Ademais, ao realizar a análise

de eritrócitos em esfregaços sanguíneos foi observado que os eritrócitos dos animais envenenados apresentam alterações morfológicas, como anisocitose, policromasia e presença de esquizócitos, dacriócitos e acantócitos. Esses resultados indicam que a inibição de SVMP, assim como a ação da rutina e inibição de tiol isomerases não são capazes de impedir a queda de eritrócitos induzida pelo envenenamento sistêmico grave. No entanto, a rutina succinil preveniu essa queda, assim como o ácido succínico, podendo indicar a efetividade de ação direta dos succinatos da rutina succinil nos componentes do BjV que induzem esse efeito.

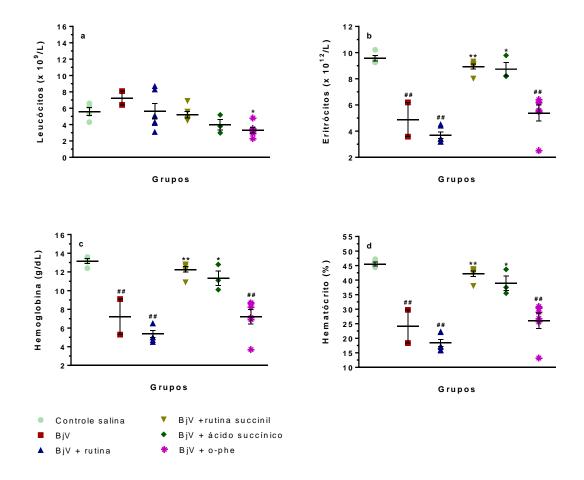


Figura 26: contagem de leucócitos (a), eritrócitos (b), hemoglobina (c), hematócrito (d) em camundongos 48 h após a administração de salina, BjV, BjV + rutina, BjV + rutina succinil, BjV + ácido succínico ou BjV + o-phe (dose-desafio: 3 DL₅₀). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-6/grupo).

O modelo de envenenamento grave induziu uma plaquetopenia acentuada em todos os grupos que receberam BjV, sendo que quando comparado ao controle salina, houve queda moderada de 42% na contagem plaquetária no grupo BjV + rutina succinil (p< 0,001, Figura 27a), seguida por uma diminuição intensa de 74-75% nos grupos BjV e BjV + rutina (p< 0,001) e a diminuição mais expressiva de 90-92% nos grupos BjV + ácido succínico e BjV + o-phe (p< 0,001). Esses resultados foram acompanhados de um aumento de 26-50% do volume plaquetário médio nos grupos BjV + rutina (p< 0,050, Figura 27b), BjV + ácido succínico e BjV + o-phe (p< 0,001).

Já os níveis plasmáticos de fibrinogênio nos grupos envenenados apresentaram uma queda 38-60% em relação ao controle salina (p< 0,050 para grupo BjV e p< 0,001 para os outros grupos, Figura 27c). Ademais, é possível observar que a hipofibrinogenemia do grupo BjV + rutina foi similar nos envenenamentos moderado e grave, ao contrário do grupo BjV + rutina succinil que apresentou hipofibrinogenemia mais leve no envenenamento moderado.

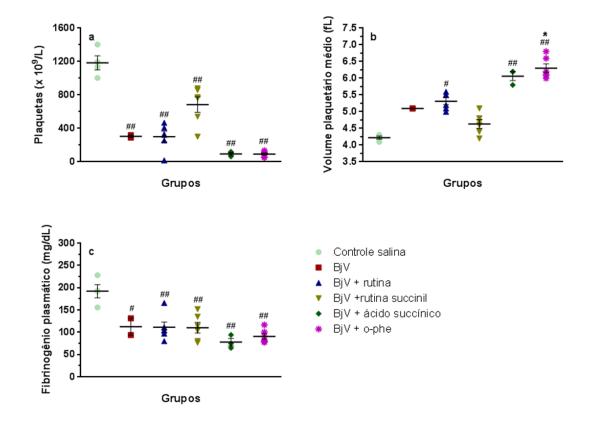


Figura 27: contagem de plaquetas (a), volume plaquetário médio (b), fibrinogênio plasmático (c) em camundongos 48 h após a administração de salina, BjV, BjV + rutina, BjV + rutina succinil, BjV + ácido succínico e BjV + o-phe (dose-desafio: 3 DL₅₀). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-6/grupo).

Assim como no envenenamento moderado, foi observado que o envenenamento grave possui ação hemorrágica na parede abdominal e no diafragma dos animais (Tabela 2). Somente os animais dos grupos controle salina, BjV + rutina succinil, BjV + ácido succínico e BjV + o-phe não apresentaram hemorragia nos locais analisados e de forma interessante, os animais do grupo BjV + rutina também não apresentaram diafragmas hemorrágicos.

Tabela 2: Hemorragia abdominal e no diafragma de camundongos em modelo grave de envenenamento

Grupo	Hemorragia abdominal	Hemorragia - diafragma
Controle salina	Ausente	Ausente
BjV	Presente	Presente
BjV + rutina	Presente	Ausente
BjV + rutina succinil	Ausente	Ausente
BjV + ácido succínico	Ausente	Ausente
BjV + o-phe	Ausente	Ausente
BjV + bacitracina	Presente	Presente

Desse modo, os resultados dos experimentos dos envenenamentos *in vivo* moderado e grave demonstraram que o BjV é capaz de induzir alterações hematológicas e hemostáticas sistêmicas, podendo ocasionar a morte dos animais. A inibição de SVMP (pela-o-phe) e o uso de ácido succínico impediram a ação hemorrágica e letal do veneno, no entanto não mostraram induzir diferenças expressivas em outros parâmetros. Já rutina foi capaz de induzir uma melhora parcial dos níveis de fibrinogênio, enquanto que a rutina succinil induziu melhora em parâmetros hematológicos, hemostáticos e impediu completamente a ação hemorrágica do veneno. Esses resultados evidenciam que a ação da rutina succinil no envenenamento não se limita a ação de seus succinatos e de sua atividade inibitória de SVMP. Ademais, a rutina e rutina succinil aumentaram a sobrevivência dos animais envenenados, mostrando seu potencial de neutralização das ações tóxicas do veneno, impedindo a letalidade do envenenamento.

A classificação de envenenamentos por serpentes *Bothrops* – leve, moderado e grave – é uma ferramenta importante para o tratamento dos pacientes envenenados e para a administração do soro antibotrópico (61). O envenenamento por *B. jararaca* induz alterações sistêmicas, como plaquetopenia, diminuição de eritrócitos e

hipofibrinogenemia tanto em modelos animais (63, 66) quanto pacientes picados (59, 178), como observado no presente estudo. Assim, a análise dos distúrbios hemostáticos, como a incoagulabilidade sanguínea — marcada pela diminuição de fibrinogênio plasmático — e alterações hematológicas são parâmetros relevantes para a avaliação do envenenamento sistêmico (178).

A diminuição em parâmetros eritrocitários no envenenamento botrópico já foi relacionada com a ocorrência de sangramentos locais e sistêmicos ou com o quadro de anemia microangiopática em modelos animais (65, 66) e em pacientes (178). Congruentemente, nossos resultados demonstraram que essa diminuição foi observada em animais que apresentaram alterações morfológicas de eritrócitos, que já foram relacionadas com a ocorrência de hemólise intravascular no envenenamento (65) e também em animais com hemorragia abdominal, indicando a relação de sangramentos e queda de parâmetros eritrocitários.

A plaquetopenia no envenenamento por *B. jararaca* ainda não possui mecanismos completamente elucidados, porém sua causa principal não está relacionada com a ação de SVMP, SVSP e lesão hemorrágica local (63). No entanto, em pacientes é possível observar que envenenamentos graves induzem uma plaquetopenia mais acentuada (178), como também demonstrado em nossos resultados. Já a incoagulabilidade sanguínea já foi atribuída à ação de SVMP e SVSP (66, 142, 145) e quando associada ao quadro de plaquetopenia, pode aumentar a propensão ao desenvolvimento de sangramentos sistêmicos.

Estudos já demonstraram a relevância da ação das SVMP em modelos de envenenamentos sistêmicos por *Bothrops asper* e que o uso de inibidores de SVMP induzem uma inibição significativa da atividade coagulante do veneno *in vitro* e das ações desfibrinogenante e hemorrágica *in vivo* (179). No entanto, foi observado que o uso desses

inibidores somente reduz parcialmente o aumento de permeabilidade vascular e a mortalidade de animais induzidas pelo envenenamento (179, 180). Em relação aos venenos de serpentes da família Viperidae, a letalidade do envenenamento já foi relacionada com a trombose intravascular fulminante por venenos pró-coagulantes e ao extravasamento de sangue levando a colapso cardiovascular por venenos hemorrágicos (181). Estudos sugerem que a letalidade dos venenos botrópicos tem natureza multifatorial (182) e que a mortalidade induzida pelo veneno pode ser devida não somente à ação das SVMP, porém também ao aumento de inflamação e permeabilidade vascular (180). Nossos resultados demonstram que a inibição de SVMP do veneno de *B. jararaca* (pela rutina succinil, ácido succínico e o-phe) foi eficaz para impedir a hemorragia e a letalidade induzidas pelo veneno. No entanto, as ações da rutina succinil demonstraram ser mais amplas e não devidas somente a sua capacidade inibitória das SVMP.

Já foi demonstrado que o uso de compostos ou extratos de plantas — incluindo flavonoides — inibe total ou parcialmente a ação hemorrágica ou letal do BjV (183-186), no entanto ainda não estão elucidados os componentes responsáveis por essa ação inibitória e seus mecanismos. Visto que a rutina e rutina succinil inibiram completamente a ação letal do BjV e modularam os distúrbios hemostáticos induzidos pelo BjV, é possível que essa ação inibitória seja devida à uma ação direta no organismo, ao impedirem as consequências danosas do envenenamento. Visto que a inibição de tiol isomerases não foi eficaz na proteção contra o envenenamento, é possível que outras ações das rutinas estejam envolvidas, além da sua atividade como inibidoras da PDI, como a atividade anti-inflamatória, antioxidante e moduladora do tônus vascular e da permeabilidade vascular (107-109, 120-126).

O presente estudo demonstra que a rutina e rutina succinil apresentam diferentes ações diretas em relação às proteínas do BjV. A pré-incubação da rutina com o veneno

não demonstrou ações inibitórias significativas em relação às atividades do veneno *in vitro*, no entanto, a pré-incubação do veneno com a rutina succinil inibiu as atividades coagulante e proteolítica do veneno. Já no envenenamento *in vivo*, a rutina succinil inibiu parcialmente as alterações nos parâmetros hemostáticos induzidas pelo veneno e inibiu completamente a ação hemorrágica do veneno. Desse modo, é possível observar que a rutina succinil é capaz de inibir diretamente atividades do BjV relacionadas às SVMP *in vitro* e *in vivo*. Ademais, o uso de rutina ou rutina succinil demonstrou ação importante *in vivo* por proteger os animais das atividades tóxicas do veneno, aumentando sua sobrevivência. No entanto, é preciso considerar que o envenenamento por *B. jararaca* induz alterações locais e sistêmicas e, desse modo, fez-se também importante a investigação das potenciais ações das rutinas em outros modelos experimentais que induzem a ativação da coagulação e inflamação, como a endotoxemia, e assim entender os modos de ação das rutinas.

4. CAPÍTULO 2: NOVOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO DA HEMOSTASIA-INFLAMAÇÃO NO ENVENANAMENTO PELA SERPENTE Bothrops jararaca

Após a verificação do potencial neutralizante das rutinas em relação ao BjV, foram avaliados parâmetros da hemostasia e inflamação no envenenamento por via subcutânea. O envenenamento experimental por via subcutânea com uso de dose sub-letal de veneno de B. jararaca mimetiza o observado em pacientes humanos, sendo observados tanto efeitos locais quanto sistêmicos, dentre eles plaquetopenia, hipofibrinogenemia e lesão local hemorrágica (66, 98). Visto que a cinética dos efeitos fisiopatológicos do envenenamento altera-se ao longo do tempo, mostrou-se importante a análise de tempos representativos da fase aguda do envenenamento para possibilitar a análise em um tempo em que houvesse o pico de ativação da coagulação (3 h) e um tempo no qual tanto as alterações hemostáticas quanto inflamatórias pudessem ser analisadas (6 h) (66, 74). Para compreender a participação do TF no envenenamento, a atividade de TF foi analisada em 3 h e as consequências de sua inibição na circulação sanguínea (pelo uso do anticorpo anti-TF 1H1) foram analisadas em 6 h. Para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação do veneno de B. jararaca, foram utilizados modelos de inibição das duas famílias de proteínas majoritárias do BjV, sendo elas as SVMP e as SVSP. Já os mecanismos de ação das rutinas foram explorados utilizando modelos de pré-incubação com o veneno e injeção local, ou modelos que mimetizam o uso das mesmas como tratamentos, com administração por via intravenosa.

A fim de compreender melhor os mecanismos do envenenamento, foi utilizado o modelo de endotoxemia, que é um modelo experimental que envolve alterações tanto na coagulação quanto inflamação que se relacionam com o TF. Essas alterações podem ser observadas em diversos níveis e, desse modo, foram analisados parâmetros hematológicos, hemostáticos plasmáticos e inflamatórios. A expressão gênica hepática também foi avaliada visto que o fígado é um órgão fundamental para a produção de proteínas que possuem participações importantes na hemostasia e inflamação, assim como seus fatores de transcrição. Ademais, visto que tanto o envenenamento quanto a sepse carecem de melhorias em sua terapêutica, foram avaliadas as ações da rutina e rutina succinil quando administradas como tratamentos após o envenenamento ou endotoxemia.

4.1.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. **Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (30-35 g) obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais com esses animais foram aprovados pelos Comitês de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo n°. 4491070319, aprovado em 20 de março de 2019) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo n°. 1334/2019, aprovado em 26 de junho de 2019).

4.1.2. Veneno de B. jararaca

Foi utilizado um *pool* de veneno liofilizado de indivíduos adultos de *B. jararaca* obtido do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (autorização: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SisGen AF375C2), mantido na temperatura de -20°C.

4.1.3. <u>LPS</u>

Para o modelo de endotoxemia, foi utilizado LPS de *Escherichia coli* (0111:B4, Sigma).

4.1.4. Rutina e rutina succinil

A rutina foi obtida da Sigma (EUA, código R5143) e a rutina succinil foi sintetizada como descrito acima no capítulo 1.

4.1.5. Envenenamento e endotoxemia in vivo

4.1.5.1. Soluções de veneno de *B. jararaca*, LPS, rutinas e inibidores

O BjV foi diluído em salina estéril no momento do uso na concentração de 0,4 mg/mL. O veneno foi injetado nos animais na dose de 1,6 mg/kg p.v., que se mostrou capaz de causar plaquetopenia e hipofibrinogenemia em camundongos (66) semelhantes àquelas descritas para ratos (34, 115) e seres humanos (116). A rutina foi diluída em um volume de propilenoglicol + um volume de salina estéril (117) e a rutina succinil foi diluída somente em salina, ambas na concentração de 3,6 mg/mL. A dose empregada das rutinas foi de 14,4 mg/kg p.v., baseada em resultados anteriores que demonstraram a efetividade da rutina em modular parâmetros hemostáticos (66).

As soluções de BjV + rutina e BjV + rutina succinil foram preparadas adicionando um volume de BjV (0,4 mg/mL) + um volume de rutina ou rutina succinil (3,6 mg/mL), resultando em concentrações finais de BjV 0,2 mg/mL e rutina 1,8 mg/mL. Todas as soluções utilizadas para a injeção nos animais foram pré-incubadas por 30 min a 37°C.

Para a verificação da participação das SVMP e SVSP no envenenamento, o BjV (concentração final de 0,2 mg/mL) foi pré-incubado com o-phe, um inibidor de SVMP (concentração final 13 mM) ou AEBSF, um inibidor de SVSP (concentração final 8 mM) ou com a combinação dos dois inibidores o-phe + AEBSF nas mesmas concentrações descritas anteriormente. As incubações foram conduzidas por 1 h a 37°C (63).

A participação do TF no envenenamento foi validada com o uso de anticorpo monoclonal específico que inibe o TF. Para isso, foi utilizado o anticorpo anti-TF 1H1 (produzido em rato) (187), doado pelo Dr. Nigel Mackman, e como controle foi utilizado anticorpo IgG de rato não imunizado. Foi utilizada a dose de 20 mg/kg p.v. por via

intraperitoneal, já que essa concentração de anticorpo 1H1 é suficiente para inibir a formação do complexo TF-FVIIa *in vivo* (188, 189).

Visto que a endotoxemia é um modelo experimental que induz distúrbios de inflamação e hemostasia mediados por TF, mostrou-se importante a verificação das ações das rutinas nesse contexto. Para isso o LPS foi diluído em NaCl 0,9% estéril na concentração de 1,875 mg/mL e foi utilizada a dose de 7,5 mg/kg p.v., baseado em estudos anteriores (7, 35).

4.1.5.2. Grupos e procedimentos experimentais

Os camundongos (30-35 g) foram aleatoriamente alocados nos grupos experimentais descritos a seguir (n=3-9 animais/grupo). Os grupos e procedimentos experimentais estão demonstrados nas Figuras 28-32. Os animais receberam por via subcutânea (s.c.) na região dorsal ou por via intravenosa (i.v.):

- 1- Controle salina (controle negativo): 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de salina e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 2- Controle rutina: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de rutina e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 3- Controle rutina succinil: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de rutina succinil e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 4- BjV (controle positivo): 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 5- IgG→BjV: 14,0 mL/kg p.v., via i.p., de anticorpo controle IgG de rato e após 30 min, 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de BjV;

- 6- 1H1→BjV: 14,0 mL/kg p.v., via i.p., de anticorpo anti-TF 1H1 e após 30 min, 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de BjV;
- 7- BjV + rutina: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + rutina (concomitante);
- 8- BjV + rutina succinil: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + rutina succinil (concomitante);
- 9- BjV→rutina: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina;
- 10-BjV→rutina succinil: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina succinil;
- 11-BjV + o-phe: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + o-phe (concomitante);
- 12-BjV + AEBSF: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + AEBSF (concomitante);
- 13-BjV + o-phe+AEBSF: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + o-phe + AEBSF (concomitante).
- 14-LPS (controle positivo): 4,0 mL/kg p.v., via i.p., de solução de LPS e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 15- LPS→rutina: 4,0 mL/kg p.v., via i.p., de solução de LPS e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina;
- 16-LPS→rutina succinil: 4,0 mL/kg p.v., via i.p., de solução de LPS e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina succinil;

No momento de coleta de amostras (3 h ou 6 h, tempos condizentes com a fase aguda do envenenamento), os animais foram anestesiados e a eutanásia confirmada como descrito acima para o envenenamento *in vivo* (capítulo 1).

Procedimentos experimentais - participação do TF no envenenamento

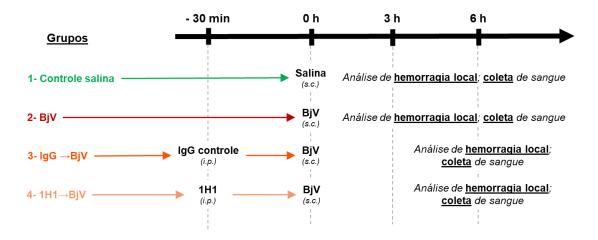


Figura 28: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina, veneno, anticorpo IgG controle ou anticorpo inibidor de TF 1H1, tempo de análise e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais - controles

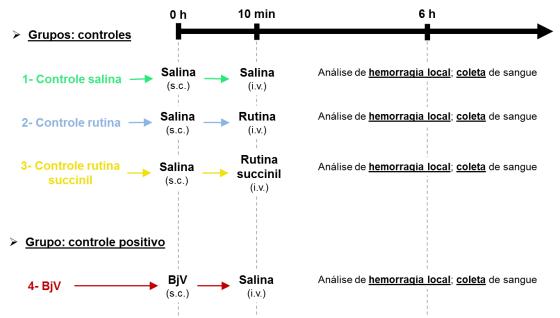


Figura 29: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina, rutina, rutina succinil ou veneno, tempo de análise e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais - inibidores

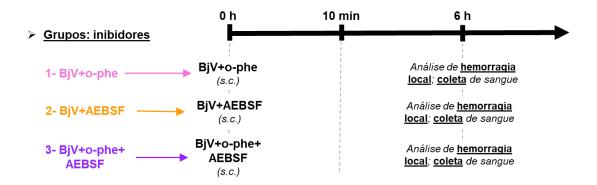


Figura 30: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com veneno e inibidores das metaloproteinases e serinaproteases do veneno, tempo de análise e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais - rutinas

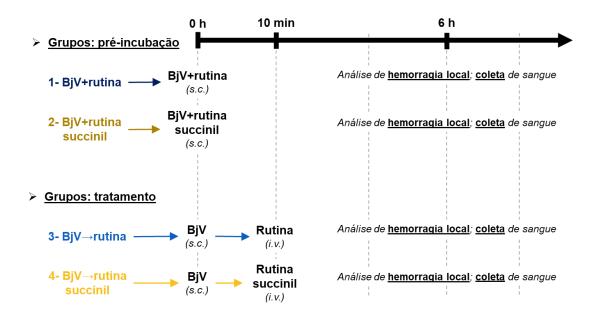


Figura 31: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com rutina, rutina succinil ou veneno, tempo de análise e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais - endotoxemia

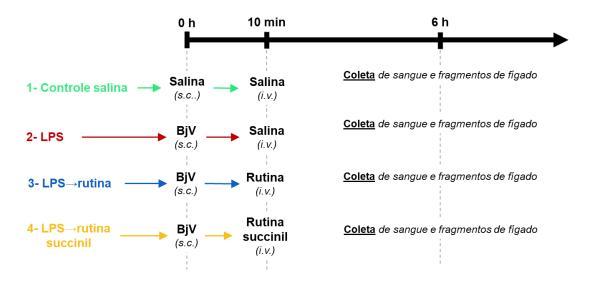


Figura 32: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com rutina, rutina succinil ou LPS, tempo de análise e coleta de amostras.

4.1.5.3.Coleta de sangue e tecidos

Após 3 ou 6 h da administração das soluções controles, com veneno ou LPS, foi realizada a coleta de sangue e tecidos dos animais. O sangue foi coletado como descrito anteriormente para o envenenamento no capítulo 1. Para a análise de expressão gênica, fragmentos de fígado foram coletados em 0,5 mL de solução de RNAlater (99).

4.1.5.4.Hemograma

As análises hematológicas e esfregaços sanguíneos foram realizadas como descrito no capítulo 1.

4.1.5.5. Atividade de TF em vesículas extracelulares (EV)

Para a análise da atividade de TF em EVs, amostras de plasma foram descongeladas e aquecidas por 15 min em banho-maria a 37°C antes do início do ensaio. Após aquecidas,

foi adicionado 1 mL de tampão HBSA-Ca(-) [(NaCl 137 mM, KCl 5,38 mM, glicose 5,55 mM, Hepes 10 mM, BSA 0,1%, pH 7,4] em cada amostra (100 μL de plasma). Após centrifugação de 20000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado, o pellet foi dissolvido em 1 mL de tampão HBSA-Ca(-) e centrifugado novamente nas mesmas condições. As EVs foram ressuspendidas em 100 μL de HBSA-Ca(-).

Para a realização do ensaio, 40 µL de EVs foram adicionados em cada poço de microplaca (em duplicata), seguidos por 10 µL de anticorpos (1H1 ou IgG controle, 400 μg/mL) e incubados por 15 min a T.A. A curva padrão de TF relipidado (Elabscience, E-EL-M1163) foi preparada nas concentrações de 0,3125 a 20 pg/mL em tampão HBSA-Ca(-). Foram adicionados 50 µL de mistura de reação [4 mL de HBSA-Ca(+) (HBSA+ CaCl₂ 10 mM) + 800 µL de fator X (FX 900 nM em HBSA-Ca(+), Haematologic Technologies, EUA) + 120 μL de fator FVIIa (FVIIa 1,2 μM em HBSA-Ca(+), Invitrogen, EUA)] e incubados por 2 h em estufa a 37°C. A reação foi parada com uso de 25 μL de tampão HBSA-EDTA/poço e incubada por 5 min a T.A.. A seguir, 25 μL de solução de S-2765 (4 mM em H₂O, N-a-benzyloxycarbonyl-D-argininyl-L-glycyl-Largininie-pNA.2 HCl, Chromogenix) foram adicionados e após 30 min, a leitura da placa foi realizada a 405 nm. A análise dos resultados foi realizada com base na curva padrão e os resultados das amostras incubadas com IgG controle foram consideradas como geração total de FXa, e ao resultado dessas amostras foi subtraído o resultado das amostras incubadas com 1H1 para obtenção do valor específico de atividade de TF em EVs.

4.1.5.6.Dosagem de fibrinogênio plasmático

A dosagem de fibrinogênio foi realizada como descrito anteriormente para o envenenamento do capítulo 1.

4.1.5.7.Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT)

A dosagem do complexo TAT por método de ELISA sanduíche é um parâmetro quantitativo usado para avaliar a ativação da coagulação. Para esse ensaio foram utilizadas alíquotas dos plasmas citratados (diluídos 1:10), analisadas em duplicata com uso do kit comercial TAT Complexes Mouse ELISA Kit (Abcam, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A leitura da microplaca foi realizada em leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) e a concentração de complexos de TAT nas amostras foi quantificada por meio do software CurveExpert (versão 1.4), tendo como base a curva padrão. Os resultados foram expressos como ng/mL de complexos de TAT.

4.1.5.8.Dosagem de IL-6 plasmática

A dosagem dos níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória IL-6 também foi avaliada com a técnica de ELISA sanduíche. O ensaio foi realizado em duplicata com uso de amostras de plasma citratado (diluído 1:5), microplacas de 96 poços MaxiSorp (Nunc®) e o kit IL-6 Mouse Uncoated ELISA Kit (Invitrogen, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para as leituras de absorbância foi empregado o equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices) e para as análises da concentração de IL-6, foi usado o software CurveExpert (versão 1.4). Os resultados foram expressos como pg/mL de IL-6.

4.1.5.9. Análise de hemorragia local

A hemorragia local induzida pelo envenenamento foi analisada na pele dorso dos animais (local da injeção s.c. do veneno). Para isso, foram capturadas imagens

subcutâneas da pele dos camundongos com uso do equipamento ImageScanner III (GE Healthcare, EUA), com qualidade de 600 dpi e formato TIFF. As imagens foram analisadas no software Inkscape (versão 1.0) como descrito anteriormente (66, 190) tanto em relação à intensidade da hemorragia quanto à área hemorrágica. Desse modo, as áreas hemorrágicas foram demarcadas e mensuradas com base em um mesmo padrão de medida adicionado em cada imagem. Já a intensidade da hemorragia foi calculada com base nos valores do sistema de cores RGB. Os dados da hemorragia local foram expressos como valores da área hemorrágica (mm²) e como unidades hemorrágicas arbitrárias (HaU), calculadas com base nos valores de área e intensidade da hemorragia.

4.1.5.10. Expressão gênica

A fim de aprofundar a análise comparativa entre os distúrbios hemostáticos e inflamatórios do envenenamento e endotoxemia, a expressão gênica hepática dos genes de interesse F2, Fga, Proc, Plg, Stat3 e Nfkb1foi analisada, assim como o gene referência Rplp0. Esses genes foram previamente analisados no envenenamento botrópico (99) tanto pelo seu importante envolvimento na hemostasia quanto pelo envolvimento na resposta de fase aguda.

Para isso, fragmentos de órgãos congelados em solução de RNAlater foram descongelados, adicionados a 1 mL de Trizol (Life Technologies, EUA) e homogeneizados utilizando equipamento FastPrep 24 (Mpbio). O RNA foi extraído e purificado utilizando o Trizol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A seguir foi realizada a quantificação de RNA (Qubit RNA BR Assay Kit, Invitrogen, EUA), seguindo a instruções do fabricante. As amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa (kit iSriptTMcDNASynthesis, BioRad, EUA) e posteriormente o cDNA foi utilizado para a realização de PCR tempo

real quantitativo (com sonda SYBR-Green) para analisar a expressão gênica (método 2⁻ ΔΔC_T (191, 192)). Os primers específicos foram obtidos do banco de dados PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/).

4.1.6. Análise estatística

A distribuição normal e homocedasticidade dos resultados foram analisadas no programa estatístico STATATM versão 10. Sempre que necessário, os dados foram transformados por algoritmos desse programa para obter distribuição normal e homocedasticidade. Para análise estatística posterior dos resultados foram utilizados os softwares SPSS (versão 22), SigmaPlot (versão 12.0) ou R (versão 4.00). Para observar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos, foram empregados para os dados com distribuição normal e homocedasticidade os testes análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni para comparação de médias. Para os dados não paramétricos, foi empregado o teste Kruskal-Wallis e para a comparação de médias foi realizado o teste *post-hoc* de Dunn. Foram considerados significativos os resultados com p< 0,05 e os dados foram expressos como média ± erro padrão médio (e.p.m.).

4.2.RESULTADOS

4.2.1. O envenenamento induz rápida resposta inflamatória, ativação da coagulação e hemorragia local

No tempo de 3 h após o envenenamento, não foram observadas alterações significativas de leucócitos (Figura 33a), monócitos (Figura 33c) e eritrócitos (Figura 33e). No entanto, foi observada diminuição na contagem de linfócitos circulantes (p< 0.001, Figura 33b) e aumento de neutrófilos (p< 0.050, Figura 33d).

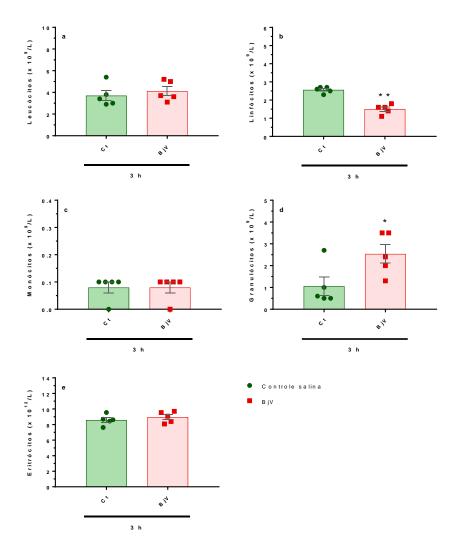


Figura 33: contagens de **(a)** leucócitos, **(b)** linfócitos, **(c)** monócitos, **(d)** granulócitos e **(e)** eritrócitos em camundongos 3 h após a administração de salina ou BjV. Foi utilizado o teste t de Student, * p< 0.05 e ** p< 0.001 quando comparado ao grupo controle salina. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 5/grupo).

O envenenamento também induziu alterações características do envenenamento botrópico, como diminuição de plaquetas (p< 0.001, Figura 34a), aumento do volume plaquetário médio (VPM, p< 0.001, Figura 34b) e diminuição dos níveis de fibrinogênio plasmático (p< 0.050, Figura 34d). Concomitantemente a essas alterações hemostáticas, foi observado aumento nos níveis de TAT, um marcador da ativação da coagulação (p< 0.050, Figura 34c).

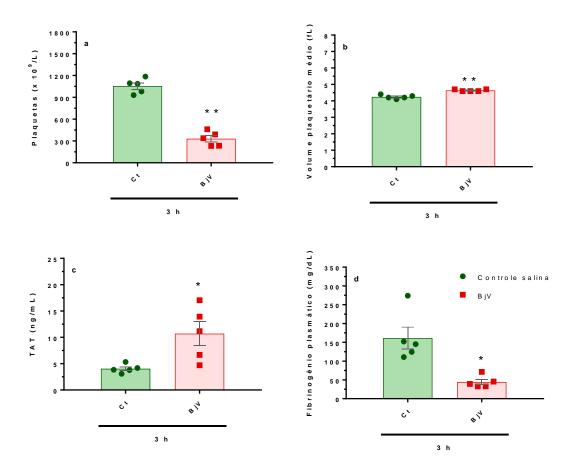


Figura 34: (a) contagem de plaquetas, (b) volume plaquetário médio, (c) níveis do complexo TAT e (d) fibrinogênio plasmático em camundongos 3 h após a administração de salina ou BjV. Foi utilizado o teste t de Student, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 5/grupo).

Assim como o aumento de TAT, os resultados demonstraram um aumento da atividade pró-coagulante em vesículas extracelulares (EVs) tanto total (p< 0.050, Figura 35c), quanto independente de TF (p< 0.050, Figura 35b). A atividade pró-coagulante

dependente de TF em EVs demonstrou uma tendência de aumento, no entanto não foi significativa (p= 0.1058, Figura 35a). Congruentemente, os níveis de TAT se correlacionaram com a atividade pró-coagulante total em EVs (r= 0.964, p< 0.001) e a atividade de TF em EVs (r= 0.865, p= 0.001). Esse resultado indica que a rápida ativação da coagulação no envenenamento não é mediada ativação do TF.

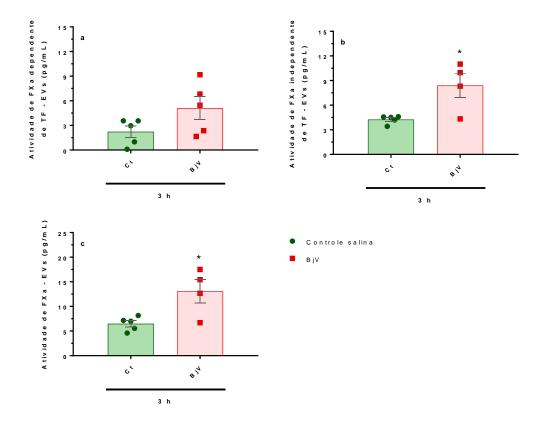


Figura 35: (a) atividade de TF em EVs, (b) atividade de FXa independente de TF em EVs, (c) atividade de FXa total em EVs em camundongos 3 h após a administração de salina ou BjV. Foi utilizado o teste t de Student, * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle salina. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 5/grupo).

Rapidamente após a administração do BjV foi possível observar o desenvolvimento de hemorragia no local da injeção, tanto em relação à área hemorrágica quanto sua intensidade (p<0.050, Figura 36a e p< 0.001, Figura 36b). Ademais, os resultados de hemorragia mostraram correlação com parâmetros hemostáticos, como plaquetas (r= -0.86, p= 0.002), fibrinogênio plasmático (r= -0.84, p= 0.003) e TAT (r= 0.92, p= 0.0005).

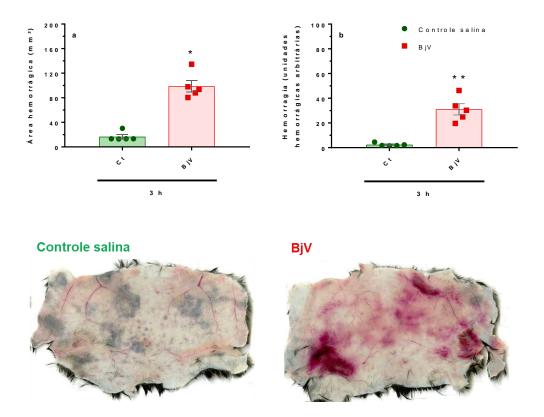


Figura 36: (a) área hemorrágica local e (b) hemorragia local e imagens representativas da hemorragia em cada grupo experimental em camundongos 3 h após a administração de salina ou BjV. Foi utilizado o teste Mann-Whitney, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 5/grupo).

Visto que o envenenamento induz rápidas alterações no organismo, tanto locais quanto sistêmicas, e que o veneno é capaz de induzir a ativação da coagulação, mas não depende exclusivamente da atividade de TF, mostrou-se importante a verificação da participação do TF no modelo de envenenamento em 6 h, que possibilita a análise de parâmetros hemostáticos e inflamatórios. Para isso, o TF circulante foi inibido pelo uso do anticorpo anti-TF 1H1.

4.2.2. <u>A inibição de TF agrava os distúrbios hemostáticos e a hemorragia</u> induzidos pelo envenenamento

Após 6 h da administração de BjV, os animais apresentam alterações relacionadas com a resposta inflamatória que segue o envenenamento, como neutrofilia (p< 0.050, Figura 37d) e aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 (p< 0.001, Figura 37e). os resultados demonstram que a inibição do TF não induziu modificações no estado pró-inflamatório induzido pelo BjV.

Assim como observado em 3 h, 6 h após o envenenamento, os animais apresentaram plaquetopenia (p< 0.050, Figura 38d) e hipofibrinogenemia (p< 0.001, Figura 38f). No entanto, o grupo que recebeu o anticorpo 1H1 (inibidor de TF) apresentou plaquetopenia mais acentuada (p<0.001) do que os outros animais envenenados. Ademais, somente nesse grupo foram observados diminuição dos parâmetros eritrocitários (p< 0.050, Figura 38a-c) e aumento dos níveis de TAT (p< 0.050, Figura 38e), sendo que esses parâmetros não apresentaram alterações quando comparados animais controle e animais envenenados.

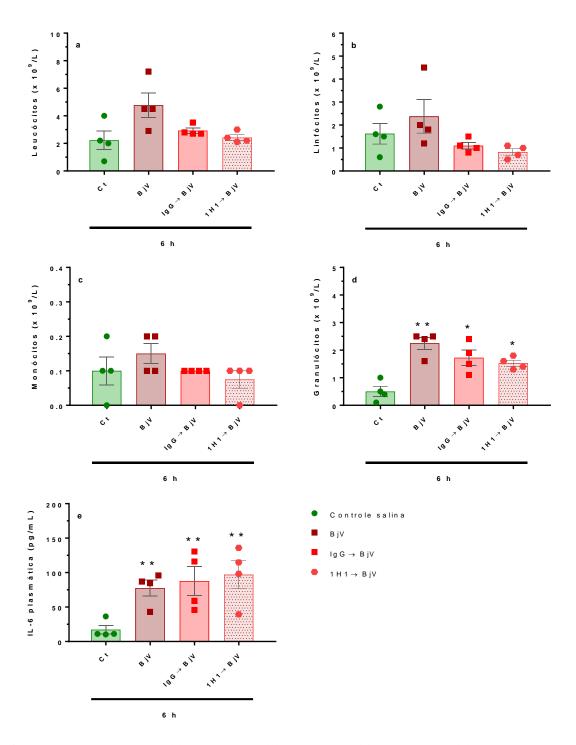


Figura 37: contagens de (a) leucócitos, (b) linfócitos, (c) monócitos, (d) granulócitos e (e) níveis de IL-6 plasmática em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, IgG controle ou anticorpo 1H1. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4/grupo).

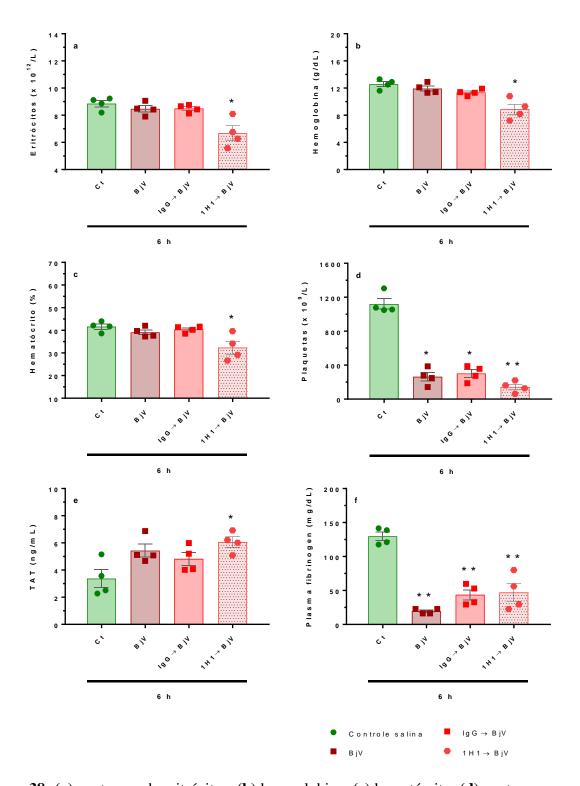


Figura 38: (a) contagem de eritrócitos, (b) hemoglobina, (c) hematócrito, (d) contagem de plaquetas, (e) níveis de TAT e (f) fibrinogênio plasmático em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, IgG controle ou anticorpo 1H1. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salinaquando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4/grupo).

Além dos distúrbios hemostáticos, a inibição do TF também induziu o desenvolvimento de hemorragia local mais exacerbada. Todos os animais envenenados apresentaram hemorragia local (p< 0.001 comparado ao controle salina, Figura 39), no entanto os animais do grupo 1H1→BjV apresentaram maior intensidade da hemorragia (p< 0.050 comparado ao grupo BjV, Figura 39b).

A hemorragia apresentou correlação com a contagem de eritrócitos (r= -0,859, p< 0,001) e também com a contagem plaquetária (r= -0,850, p< 0,001), o que indica que a intensificação da hemorragia pode ser a responsável pelo extravasamento de eritrócitos e plaquetas da circulação para o local da lesão. Ademais, visto que os distúrbios hemostáticos se associam à hemorragia, como observado em 3 h, a ativação prolongada da coagulação pela inibição de TF poderia agravar ainda mais a hemostasia e, consequentemente, a lesão hemorrágica.

Desse modo, os resultados em 3 h demonstraram que a ativação da coagulação e distúrbios hemostáticos no envenenamento não são dependentes da atividade de TF. Os resultados da inibição de TF no envenenamento em 6 h corroboram com essa hipótese já que as alterações hemostáticas e inflamatórias não dependem da ação do TF e ademais, foi demonstrado que o TF não possui uma participação prejudicial e sim benéfica nesse modelo experimental, como um fator hemostático importante.

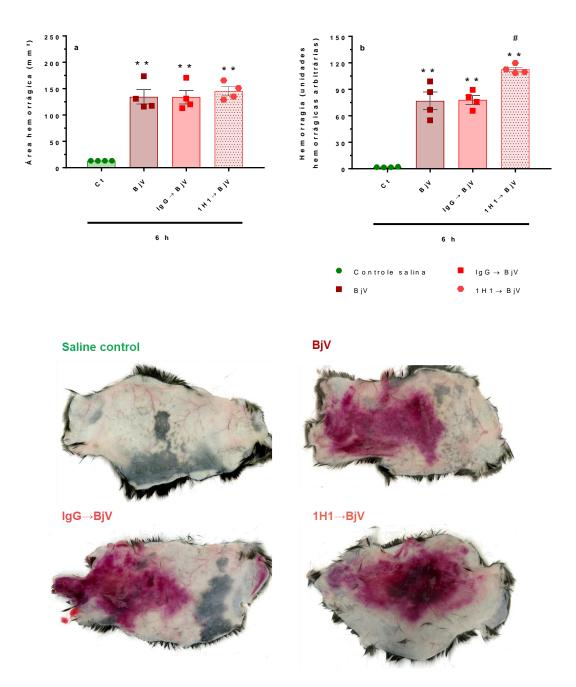


Figura 39: (a) área hemorrágica, (b) intensidade de hemorragia local e imagens representativas da hemorragia em cada grupo experimental em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, IgG controle ou anticorpo 1H1. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4/grupo).

4.2.3. A inibição de SVSP impede a coagulopatia por consumo e a inibição de SVMP previne a inflamação e lesão local hemorrágica

Visto que os distúrbios locais e sistêmicos do envenenamento não dependem da mediação do TF, mostrou-se relevante a análise dos componentes do BjV diretamente relacionados a essas alterações. Para isso foram analisadas as participações das duas famílias de proteínas majoritárias no envenenamento – SVMP e SVSP – utilizando os compostos o-phe e RS (pré-incubada) para inibição de SVMP e AEBSF para inibição de SVSP.

No tempo de 6 h após o envenenamento não foram observadas nos animais envenenados alterações significativas de contagem de linfócitos (Figura 40b), monócitos (Figura 40c), granulócitos (Figura 40d) e eritrócitos (Figura 40e), no entanto, a contagem de leucócitos totais mostrou-se aumentada nos grupos BjV e BjV+o-phe (p< 0,050) e é possível observar uma tendência similar de aumento em relação aos granulócitos.

A plaquetopenia foi observada em todos os animais envenenados, com redução da contagem plaquetária (Figura 40f) mais intensa nos grupos BjV+o-phe e BjV+o-phe+AEBSF comparados ao controle salina (85-90%, p< 0,001), e redução moderada de 64-75% nos demais grupos envenenados (p< 0,001 para BjV e p< 0,050 para os outros grupos em relação ao controle). Congruentemente, somente os grupos BjV+o-phe e BjV+o-phe+AEBSF demonstraram aumento do VPM (p< 0,050, Figura 40g), que está relacionado com a liberação de plaquetas jovens na circulação devido a plaquetopenia intensa.

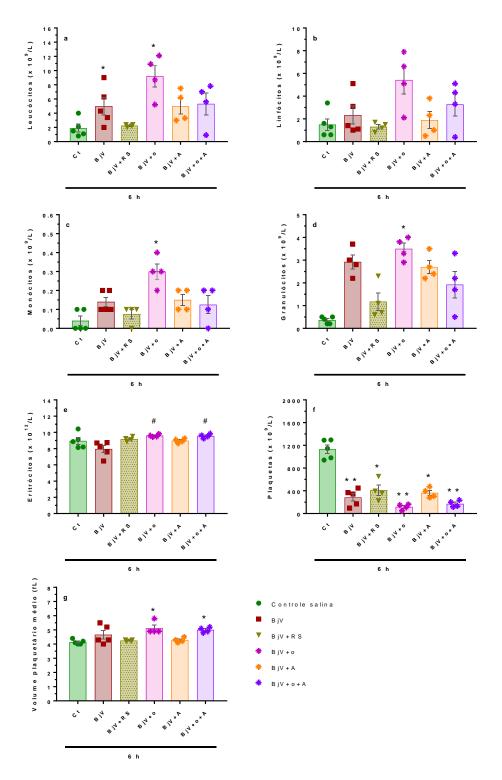


Figura 40: contagens de **(a)** leucócitos, **(b)** linfócitos, **(c)** monócitos, **(d)** granulócitos, **(e)** eritrócitos, **(f)** plaquetas e **(g)** volume plaquetário médio em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF ou BjV+o-phe+AEBSF. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni e o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (VPM), * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-5/grupo).

Assim como a plaquetopenia, a hipofibrinogenemia também é característica do envenenamento botrópico e foi observada nos animais envenenados, que apresentaram 64-66% de redução nos níveis de fibrinogênio comparados ao controle salina (p< 0,001, Figura 41a). Já os animais do grupo BjV+AEBSF apresentaram somente 29% de redução (p< 0,050 comparado ao controle salina ou BjV). No entanto, a inibição de SVSP pelo tratamento com AEBSF impediu a queda dos níveis de fibrinogênio e os grupos BjV+AEBSF e BjV+o-phe+AEBSF apresentaram diminuições de 29 e 3%, respectivamente (p= 0,1054 e p> 1,000 comparado ao controle salina, p< 0,050 e p< 0,001 comparado ao BjV).

Diferentemente do observado em 3 h, após 6 h de envenenamento não são observadas alterações significativas nos níveis de TAT (p= 0,4089, Figura 41b), no entanto é possível observar uma tendência de aumento maior no grupo BjV.

Além das alterações hemostáticas, também foi possível observar que o envenenamento induziu um aumento de 248% dos níveis plasmáticos de IL-6 nos grupos BjV e BjV+AEBSF (p<0,050, Figura 41c). Já os grupos em que houve inibição de SVMP pela o-phe ou rutina succinil não apresentaram aumento significativo de IL-6, se assemelhando ao controle salina (p=0,3243 para BjV+o-phe e p= 1,000 para BjV+RS e BjV+o-phe+AEBSF).

Visto que além das ações sistêmicas do envenenamento, o BjV induz sérias alterações locais, foi avaliada a participação das famílias de proteínas do BjV frente à lesão local hemorrágica induzida pelo veneno.

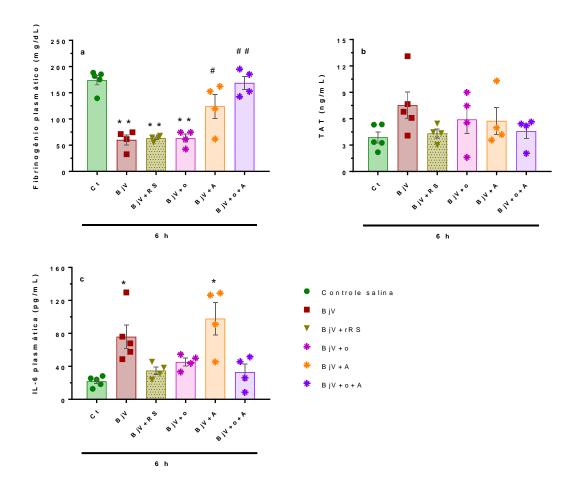


Figura 41: níveis de **(a)** fibrinogênio plasmático, **(b)** TAT e **(c)** IL-6 plasmática em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF ou BjV+o-phe+AEBSF. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-5/grupo).

A hemorragia (Figura 42) induzida pelo envenenamento foi analisada somente pela sua área total (Figura 42a) ou considerando tanto a área hemorrágica quanto a intensidade da hemorragia (Figura 42b).

Como esperado, o envenenamento induziu o desenvolvimento de hemorragia local e aumento da área hemorrágica (comparado ao controle salina, p< 0,001). Assim como observado nos experimentos *in vivo* do Capítulo 1, a inibição de SVMP (pela préincubação do BjV com o-phe ou rutina succinil) impediu completamente a ação hemorrágica do veneno em camundongos (p= 1,000 comparado ao controle salina).

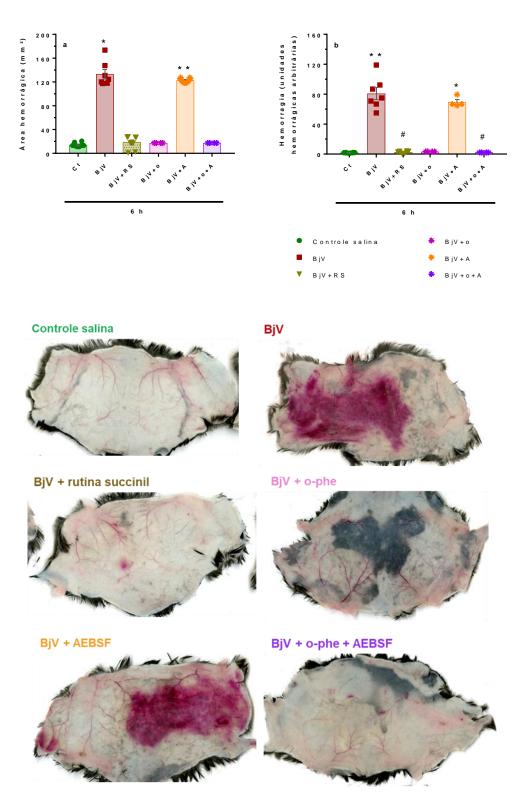


Figura 42: (a) área hemorrágica, (b) intensidade de hemorragia local e imagens representativas da hemorragia de cada grupo experimental em camundongos 6 h após a administração de salina, BjV, BjV+rutina succinil, BjV+o-phe, BjV+AEBSF ou BjV+o-phe+AEBSF. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-9/grupo).

Desse modo, foi possível observar que as SVMP são importantes na indução da resposta inflamatória e desenvolvimento da lesão hemorrágica local, e que as SVSP são responsáveis pela coagulopatia de consumo do envenenamento nos camundongos. Já a pré-incubação da rutina succinil com o BjV demonstrou mais uma vez inibir as ações sistêmicas e locais das SVMP, como também observado no Capítulo 1.

4.2.4. A rutina e rutina succinil diminuem os distúrbios hemostáticos, inflamatórios e hemorrágicos induzidos pelo BjV na fase aguda do envenenamento

A rutina e rutina succinil demonstraram potencial para neutralizar as atividades sistêmicas tóxicas do BjV *in vivo*, como explanado no Capítulo 1, no entanto, para evidenciar seus potenciais como agentes terapêuticos, foi utilizado o modelo experimental de administração das rutinas por via intravenosa após o envenenamento. Como demonstrado anteriormente (66) e também no Capítulo 1, não foi observada ação inibitória direta da rutina em relação às proteínas do BjV, no entanto ela se mostrou eficaz em relação aos distúrbios induzidos pelo envenenamento. Desse modo, o grupo experimental BjV+rutina foi utilizado para averiguar a possível influência da administração da rutina no local de injeção do veneno em relação às alterações sistêmicas e locais do envenenamento.

Ao analisar os parâmetros hematológicos foi possível observar aumento na contagem de granulócitos (p< 0,001, Figura 43d) e diminuição da contagem plaquetária (p< 0,001, Figura 43e) em todos os grupos envenenados comparados ao controle salina. Já o grupo controle rutina apresentou aumento das contagens de leucócitos totais, linfócitos e granulócitos (p< 0,050, Figuras 43a,b,d).

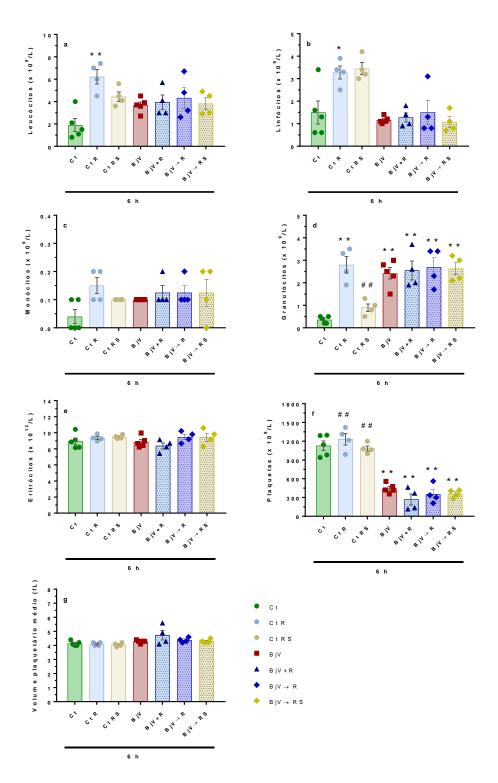


Figura 43: contagens de **(a)** leucócitos, **(b)** linfócitos, **(c)** monócitos, **(d)** granulócitos, **(e)** eritrócitos, **(f)** plaquetas e **(g)** volume plaquetário médio em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni e o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (plaquetas), * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-5/grupo).

Diferentemente dos parâmetros hematológicos, a rutina (pré-incubação, BjV+R) impediu moderadamente a queda nos níveis de fibrinogênio (p= 0,5992 comparado ao controle salina, Figura 44a). Já a rutina succinil como tratamento (BjV→RS) normalizou os níveis de fibrinogênio plasmático, não diferindo do controle salina, apresentando redução de somente 28%, (p= 1,000). Assim como observado anteriormente, os níveis de TAT (Figura 44b) não se alteraram em 6 h, porém há uma tendência de aumento de 68-69% nos grupos BjV e BjV→rutina e de somente 37-42% nos grupos BjV+rutina e BjV→RS, que também apresentaram melhoria no consumo do fibrinogênio. Esses resultados indicam uma possível associação entre a ativação da coagulação (níveis de TAT) e os níveis de fibrinogênio plasmático.

Ao avaliar a citocina pró-inflamatória IL-6 (Figura 44c) foi verificado que o tratamento com a rutina e rutina succinil foi eficaz para reduzir os níveis de IL-6 (p= 1,000 e p= 0,8415 comparado ao controle salina, respectivamente), diferentemente dos outros grupos envenenados que apresentaram aumento de IL-6 (p< 0,050).

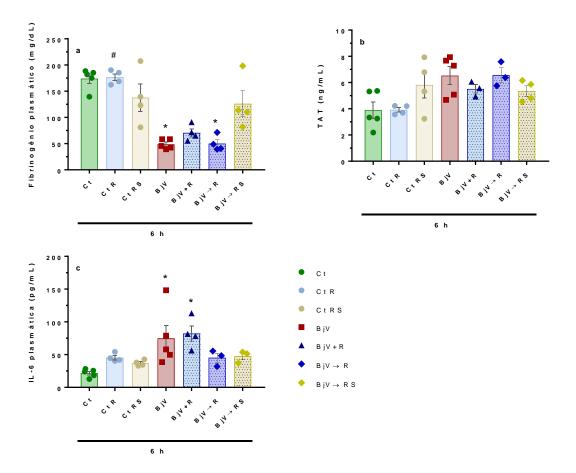


Figura 44: níveis de **(a)** fibrinogênio plasmático, **(b)** TAT e **(c)** IL-6 plasmática em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (plaquetas), * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-5/grupo).

Visto que a rutina e a rutina succinil apresentaram diferentes resultados em relação aos efeitos sistêmicos do BjV, foram verificadas suas possíveis ações em relação aos efeitos locais do envenenamento.

Os animais que receberam rutina (BjV+rutina e BjV \rightarrow rutina) ou rutina succinil (BjV \rightarrow rutina succinil) apresentaram diminuição da lesão hemorrágica de 22-38% comparados aos animais BjV (comparado ao grupo BjV, p< 0,001 para BjV + rutina e p< 0,050 para BjV \rightarrow rutina e BjV \rightarrow rutina succinil, Figura 45).

As rutinas agiram beneficamente tanto em parâmetros hemostáticos quanto inflamatórios alterados pelo envenenamento. No entanto, a rutina apresenta diferenças quando injetada por via subcutânea ou via intravenosa. A rutina succinil mostrou-se promissora em relação às alterações sistêmicas do envenenamento, já que foi capaz de normalizar os níveis de fibrinogênio plasmático e reduzir os níveis de IL-6 no plasma. É importante ressaltar que a rutina (independentemente da via de inoculação) e a rutina succinil reduziram a grave ação hemorrágica do veneno na fase aguda do envenenamento, mostrando sua rápida ação em combater as atividades do BjV.

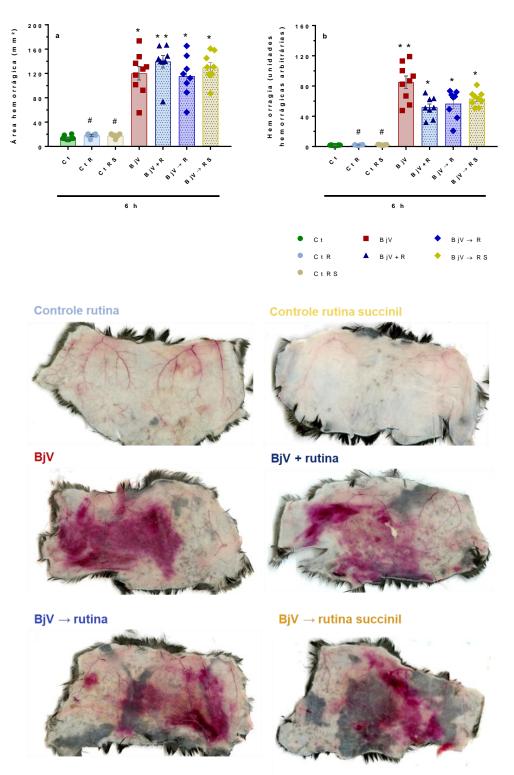


Figura 45: (a) área hemorrágica, (b) intensidade de hemorragia local e imagens representativas da hemorragia de cada grupo experimental em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou BjV+rutina. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (plaquetas), * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 7-9/grupo).

4.2.5. A endotoxemia induz a ativação de TF, resposta inflamatória e expressão gênica de proteínas de fase aguda

Após 6 h da administração das substâncias, os animais injetados somente com LPS apresentaram diminuição da contagem de leucócitos (p< 0,050, Figura 46a), linfócitos (p< 0,050, Figura 46b) e monócitos (p< 0,050, Figura 46c), diferentemente dos animais que receberam LPS e foram tratados com as rutinas, que não apresentaram diferenças nas contagens leucocitárias em relação aos animais controles, apesar de apresentarem tendência de diminuição desses parâmetros. Já em relação à contagem de granulócitos, os grupos LPS não demonstraram diferenças em relação aos controles (p= 1,000, Figura 46d). Como observado anteriormente no modelo de envenenamento, a administração de rutina induziu uma tendência de aumento nos granulócitos circulantes (p< 0,050 comparado ao grupo LPS).

A endotoxemia induziu um exacerbado aumento dos níveis de IL-6 plasmática nos animais (p< 0,050, Figura 46e) que foi minimizado pelo tratamento com a rutina e rutina succinil (p= 0,1119 e p= 0,1501 comparados ao controle salina, respectivamente). Esses resultados indicam que as rutinas são capazes de agir como moléculas anti-inflamatórias mesmo em condições mais acentuadas de inflamação. Os níveis de fibrinogênio também foram analisados considerando que o fibrinogênio é tanto uma proteína fundamental para a coagulação quanto uma proteína de fase aguda e tanto o grupo LPS quanto o grupo LPS—rutina demonstraram aumento de fibrinogênio plasmático (p< 0,050 comparados ao controle salina, Figura 46f).

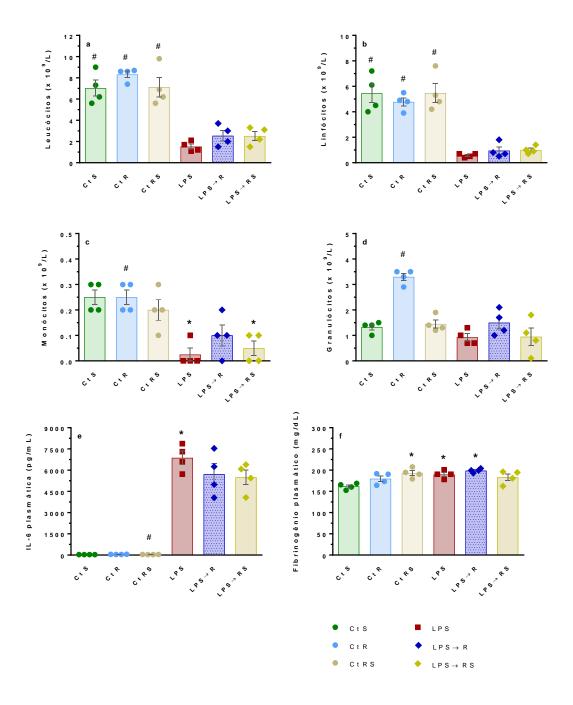


Figura 46: contagens de **(a)** leucócitos, **(b)** linfócitos, **(c)** monócitos, **(d)** granulócitos e níveis de **(e)** IL-6 plasmática e **(f)** fibrinogênio plasmático em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil ou LPS. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e IL-6) e o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni e (fibringênio), * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo LPS. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4/grupo).

Em relação aos parâmetros hemostáticos, não houve diferenças na contagem de eritrócitos (p= 1,000, Figura 47a), diferentemente da contagem plaquetária que apresentou diminuição de 40-53% em todos os grupos LPS comparado aos controles (p< 0,001, Figura 47b). A ativação da coagulação na endotoxemia é marcada pelo aumento da atividade pró-coagulante em EVs e atividade de TF em EVs, como observado nos resultados (p< 0,050, Figuras 47c,d).

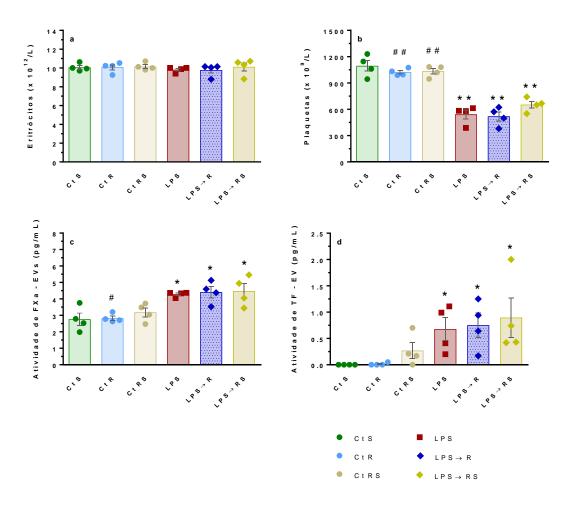


Figura 47: contagens de (**a**) eritrócitos e (**b**) plaquetas, e níveis de (**c**) atividade de FXa em EVs e (**d**) atividade de TF em EVs em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil ou LPS. Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo LPS. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 4/grupo).

As alterações induzidas pelo LPS também foram observadas no nível gênico, como também descrito previamente em relação ao envenenamento (99). A endotoxemia foi capaz de induzir o aumento em *Fga* e diminuição de *Proc* (p< 0,050, Figuras 48b,c), porém sem alterar outros genes como *F2* e *Plg* (p=0,0666 e p=0,4359, Figuras 48a,d). Ademais, *Stat3* e *Nfkb1* – fatores de transcrição com grande relevância no controle gênico de proteínas de fase aguda e componentes da hemostasia – foram induzidos pelo LPS (p< 0,050, Figura 48e,f) e demonstraram estar correlacionados (r= 0,902, p< 0,001). Os fatores de transcrição *Stat3* e *Nfkb1* também mostraram alta correlação com *Fga* e *F2* (r= 0,790, p< 0,001 em relação a *Stat3* e r=776, p< 0,001 em relação a *Nfkb1*) e correlação moderada com *Plg* (r= -0,666, p< 0,001 e -0,625, p= 0,002). Os outros genes também demonstraram correlação entre si: *F2* e *Fga* (r= 1,000, p< 0,001), *Proc* e *F2*, *Fga* (r= -0,633, p= 0,002), *Plg* e *F2*, *Fga* (r= -0,825, p< 0,001) e *Plg* e *Proc* (r=0,825, p< 0,001). Esses resultados demonstram que assim como observado no envenenamento, a endotoxemia induz alterações na expressão gênica voltadas a um estado pró-coagulante e responsivo a um estado pró-inflamatório, que não são modificadas pelas rutinas.

Desse modo, os resultados indicam que assim como o envenenamento, a endotoxemia induz alterações hemostáticas, inflamatórias e na síntese hepática. No entanto, diferentemente do envenenamento, as rutinas não induzem melhoras nos parâmetros hemostáticos, indicando que o mecanismo de ação das rutinas não está relacionado com TF. Ademais, as rutinas são eficazes para reduzir parâmetros de inflamação, como alterações na contagem de leucócitos circulantes e níveis de IL-6 plasmática, mostrando ação anti-inflamatória como no envenenamento.

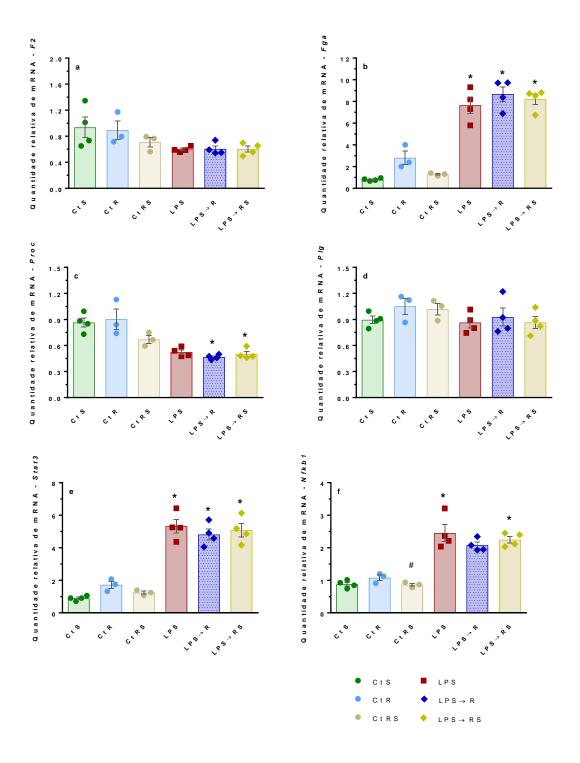


Figura 48: quantidade relativa de mRNA (fígado) dos genes (a) F2, (b) Fga, (c) Proc, (d) Plg, (e) Stat3 e (f) Nfkb1 em camundongos 6 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil ou LPS. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste post-hoc Dunn e o teste de ANOVA de uma-via, * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo LPS. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 4/grupo).

4.3.DISCUSSÃO

Como evidenciado pelos resultados apresentados, a fisiopatologia do envenenamento botrópico é complexa e inclui alterações locais e sistêmicas, hematológicas, hemostáticas e inflamatórias. Compreender melhor os mecanismos dessas alterações é fundamental para a melhoria do tratamento de pacientes picados, assim como para a análise do potencial de agentes terapêuticos complementares à soroterapia.

A sinergia de atividades biológicas distintas do veneno de B. jararaca induz alterações fisiopatológicas complexas, o que pode ser evidenciado pela potencialização da atividade hemorrágica do veneno pelos distúrbios hemostáticos. As vias naturais de inoculação do veneno – subcutânea e intramuscular – fazem com que o veneno atinja a corrente sanguínea de maneira lenta e gradual, induzindo uma ativação constante da coagulação, evidenciada pelo aumento dos níveis de TAT nos nossos resultados e já observado em pacientes (64). A ativação contínua da coagulação induz o consumo de fatores da coagulação, como protrombina, os fatores V, VIII, X e principalmente, o fibrinogênio plasmático e leva ao prolongamento do tempo de coagulação ou até mesmo a incoagulabilidade sanguínea (57-60, 66), como foi possível observar no presente estudo e em estudo anterior do nosso grupo (66) pelo prolongamento do tempo de sangramento de cauda e diminuição do fibrinogênio plasmático. A coagulopatia por consumo no envenenamento botrópico já foi atribuída à ação de SVMP pela ação dos ativadores de fator X e protrombina, assim como à ação de SVSP trombina-símiles (66, 142, 145, 172). A coagulação do plasma de camundongos é influenciada parcialmente pela inibição de SVMP ou SVSP, como demonstrado no capítulo 1 e em estudo anterior (66). No entanto, a coagulopatia por consumo em camundongos envenenados é prevenida somente com a inibição de SVSP, indicando a importante das enzimas trombina-símiles nesse modelo, sendo responsáveis pela hidrólise direta do fibrinogênio em fibrina, que posteriormente é degradada pela característica hiperfibrinólise induzida pelo BjV (63).

As SVMP do *B. jararaca* demonstram possuir um papel importante na indução da inflamação. De fato, o envenenamento por *B. jararaca* possui componentes pró-inflamatórios que induzem uma resposta inflamatória aguda, marcada por leucocitose e aumento de mediadores inflamatórios endógenos (62, 69, 70, 74-79), o que está de acordo com os presentes resultados. Ademais, já foi demonstrado que em pacientes envenenados há correlação entre níveis de citocinas pró-inflamatórias e os níveis de fibrinogênio plasmático (193). Já a sepse é marcada pela resposta inflamatória exacerbada à infecção, como observado nos resultados do modelo de endotoxemia, em que há aumento de IL-6 e diminuição dos leucócitos circulantes, o que está de acordo com estudo anteriores que demonstram o estímulo de citocinas pró-inflamatórias e a ativação e marginalização intravascular de leucócitos induzida por bactérias ou LPS (194, 195).

A utilização da rutina succinil no modelo de pré-incubação com o veneno e consequente inibição de atividades das SVMP pode ser uma ferramenta importante para compreender melhor essa família de proteínas do veneno, incluindo mecanismos de ação e inibição e a influência das diversas toxinas da família SVMP no envenenamento. Já o uso da rutina (pré-incubação e tratamento) e rutina succinil (tratamento) possibilitou observar que esses bioflavonóides apresentam ações em processos fisiológicos endógenos, auxiliando na recuperação dos distúrbios hemostáticos induzidos pelo envenenamento. O modelo de endotoxemia apresentou uma resposta inflamatória sistêmica mais exacerbada que o modelo de envenenamento. Tanto a rutina quanto a rutina succinil foram capazes de reduzir os parâmetros inflamatórios quando administradas como tratamentos, no entanto, a ação das rutinas mostrou-se limitada, o que poderia ser atribuído à intensidade do estado pró-inflamatório induzido pelo LPS.

Considerando a complexidade dos distúrbios do envenenamento e endotoxemia, a rutina e rutina succinil seriam capazes de agir em diversos aspectos, já que a rutina possui uma ampla gama de atividades, como ações anti-inflamatória, anti-trombótica, anti-hemorrágica, antioxidante, inibidora de trombina e PDI, moduladora do tônus vascular, vasoprotetora, entre outras (107-109, 120-126). Sendo assim, é importante considerar que o potencial das rutinas de influenciarem tanto a hemostasia quanto a inflamação pode ser uma estratégia terapêutica importante considerando a interação desses sistemas.

É preciso considerar que a administração das rutinas por via intravenosa induz uma biodisponibilidade imediata de 100% (196), o que já foi apontado como uma possível alternativa terapêutica à administração oral (197). Ademais, tanto a rutina quanto a quercetina (que não apresenta glicosídeos) apresentam picos de concentração no plasma logo após a injeção por via intravenosa, no entanto após 1 h da injeção há uma queda expressiva dos níveis de quercetina no plasma. Diferentemente, a concentração da rutina no plasma possui uma diminuição menos intensa e mais lenta, e desse modo, após 6 h da administração, a rutina apresenta níveis mensuráveis no plasma de animais (198). Também já foi demonstrado que após a administração de flavonóides por via intravenosa, houve aumento da concentração de flavonóides em tecidos de ratos (como o fígado) em até 1 h após os tratamentos (199). Desse modo, é preciso considerar que no presente estudo somente foi utilizada uma dose de rutinas em injeção única nos animais e que estudos futuros serão importantes para avaliar o possível benefício de tratamentos com utilização de mais tempos de administração das rutinas.

Assim como observado no envenenamento por *B. jararaca*, a sepse e endotoxemia induzem a ativação da coagulação (com aumento de TAT e atividade de TF em EVs), coagulopatia por consumo e resposta inflamatória (com aumento de IL-6 plasmática). Assim como o envenenamento ofídico, o tratamento da sepse também apresenta desafios,

sendo importantes estudos de novas estratégias terapêuticas. Ademais, na sepse e endotoxemia as alterações da coagulação-inflamação estão diretamente relacionadas com a ativação do TF, que pode desencadear um quadro de coagulação intravascular disseminada, aumentando a complexidade do tratamento da sepse (31-35, 37, 38). Em relação ao envenenamento, já foi demonstrado que o veneno de *B. jararaca* é capaz de induzir a ativação do TF *in vitro* ou *in vivo* (63, 66, 76, 89-92), e os resultados confirmam que o envenenamento induz a ativação do TF. No entanto, diferentemente do observado na sepse, as alterações hemostáticas e inflamatórias no envenenamento não são dependentes do fator tissular e sim das diferenças ações das toxinas do BjV. Congruentemente, as rutinas não foram capazes de alterar a atividade de TF na endotoxemia, mas influenciaram os níveis de fibrinogênio e intensidade da hemorragia local no envenenamento. De fato, o TF demonstra ter uma participação benéfica no envenenamento, agindo como um agente pró-hemostático, como já observado anteriormente (200) em que a deficiência de TF induz aumento da hemorragia, como demonstrado no presente estudo.

Assim como observado previamente no envenenamento (99), a endotoxemia também induz a expressão hepática de importantes genes que agem tanto no sistema inflamatório quanto hemostático. Estudos já demonstraram que a expressão gênica de proteínas de fase aguda é associada à ação de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez estimulam as vias dos fatores de transcrição STAT3 e NF-κB, responsáveis pelo controle da síntese de diversos genes pelos hepatócitos (201). Como observado no envenenamento (99), a regulação gênica do gene *Nfkb1* se mostra relacionada com a síntese de importantes genes de fase aguda e componentes da hemostasia. No entanto, a associação desses genes com a expressão de *Stat3* somente foi observada na endotoxemia, como já apontado previamente em estudos (202, 203) que demonstraram que o STAT3 (*Stat3*) é essencial

para a resposta do fígado ao estímulo de IL-6 e LPS via ativação dos genes de fase aguda. Desse modo, é possível inferir que apesar de serem provocados por diferentes agentes, a endotoxemia e envenenamento por *B. jararaca* apresentam ativação da coagulação, resposta inflamatória e resposta de fase aguda, no entanto isso ocorre em graus de intensidade e mecanismos de ação diferentes.

Além das alterações sistêmicas induzidas pelo BjV, as alterações locais, como a atividade hemorrágica são características do veneno botrópico e estão relacionadas à ação das SVMP ao hidrolisarem os componentes da membrana basal de vasos capilares, gerando o enfraquecimento da estabilidade mecânica dos capilares, que pela ação das forças hemodinâmicas, se rompem, induzindo o extravasamento de sangue (172). Isso está de acordo com os resultados apresentados visto que a inibição de SVMP impede o desenvolvimento da hemorragia. Estudos já apontaram a ação anti-hemorrágica da rutina no envenenamento botrópico (66, 130, 131), no entanto é necessário enfatizar que as rutinas demonstram potencial terapêutico em relação à lesão local mesmo quanto administradas como tratamento por via intravenosa, o que pode estar relacionado com a ação da rutina e análogos como protetores de fragilidade capilar (108, 204). No entanto mostraram-se necessários mais estudos para compreender os mecanismos de ação da rutina e rutina succinil nos efeitos locais do envenenamento, assim como seus usos concomitantes ao soro-antibotrópico como potencial agente complementar. Desse modo, foram iniciados estudos na fase crônica do envenenamento para averiguar o potencial da rutina e da rutina succinil como tratamentos auxiliares no envenenamento botrópico.

5. CAPÍTULO 3: OS BIOFLAVONÓIDES RUTINA E RUTINA SUCCINIL SÃO EFICAZES NO TRATAMENTO DE ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL POR Bothrops jararaca

Visto que é importante o estudo dos efeitos fisiopatológicos do veneno e também da resposta do organismo a esses eventos e sua capacidade de recuperação, mostrou-se importante a análise da fase crônica do envenenamento (24 e 48 h) (66, 98, 178). Ademais, a eficácia de tratamentos com soros antiofídicos é testada com experimentos que utilizam a pré-incubação do soro com o veneno. No entanto é mister ressaltar a importância de avaliar novos compostos terapêuticos também em modelos experimentais em que os compostos são administrados somente após o veneno como tratamentos sozinhos ou complementares ao soro antiofídico (205). Desse modo, as ações da rutina e rutina succinil foram testadas em relação ao potencial como tratamentos únicos quanto tratamentos complementares à soroterapia.

5.1.MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. Animais

O uso de animais foi realizado e aprovado como descrito no Capítulo 2.

5.1.2. <u>Veneno de *B. jararaca*</u>

Foi utilizado um *pool* de veneno liofilizado de indivíduos adultos de *B. jararaca* obtido do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (autorização: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SisGen AF375C2), mantido na temperatura de -20°C.

5.1.3. Rutina e rutina succinil

A rutina foi obtida da Sigma (EUA, código R5143) e a rutina succinil foi sintetizada como descrito acima no capítulo 1.

5.1.4. Envenenamento in vivo

5.1.4.1. Soluções de veneno de *B. jararaca* e rutinas

As soluções de BjV, rutina e rutina succinil foram preparadas como descrito no capítulo 2, sendo que as rutinas também foram preparadas nas concentrações de 7,2 mg/mL. Em relação ao tratamento com SAB, a administração do SAB foi realizada 1 hora após o envenenamento e utilizou-se a dose de 0,32 mL/kg p.v. por via intravenosa (i.v.). A dose foi escolhida baseando-se no fato de que um mililitro do SAB é capaz de neutralizar 5 mg do veneno de *B. jararaca* e a via intravenosa é via indicada para administração do SAB em pacientes picados (96, 97).

5.1.4.2.Grupos e procedimentos experimentais

Os camundongos (30-35 g) foram aleatoriamente alocados nos grupos experimentais descritos a seguir (n=3-8 animais/grupo/tempo de análise). Os grupos e procedimentos experimentais estão demonstrados nas Figuras 49-51. Os animais receberam por via subcutânea (s.c.) na região dorsal ou por via intravenosa (i.v.):

- 1- Controle salina (controle negativo): 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de salina e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 2- Controle rutina: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de rutina e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 3- Controle rutina succinil: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de rutina succinil e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 4- BjV (controle positivo): 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina;
- 5- BjV + rutina: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV pré-incubado com rutina;
- 6- BjV + rutina succinil: 8,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV + rutina succinil;
- 7- BjV → rutina: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina;
- 8- BjV → rutina succinil: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV e após 10 min, 4,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina succinil;
- 9- BjV → salina → SAB: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV, após 10 min, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina e após 1 h da injeção de BjV, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de SAB;

- 10-BjV → salina → SAB: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV, após 10 min, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de salina e após 1 h da injeção de BjV, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de SAB;
- 11-BjV → rutina → SAB: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV, após 10 min, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina (7,2 mg/mL) e após 1 h da injeção de BjV, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de SAB;
- 12-BjV → rutina succinil → SAB: 4,0 mL/kg p.v., via s.c., de solução de BjV, após 10 min, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de rutina succinil (7,2 mg/mL) e após 1 h da injeção de BjV, 2,0 mL/kg p.v., via i.v., de SAB.

No momento de coleta de amostras (24 ou 48 h, tempos condizentes com a fase crônica do envenenamento), os animais foram anestesiados e a eutanásia confirmada como descrito acima para o envenenamento *in vivo* (capítulo 1).

Procedimentos experimentais - controles

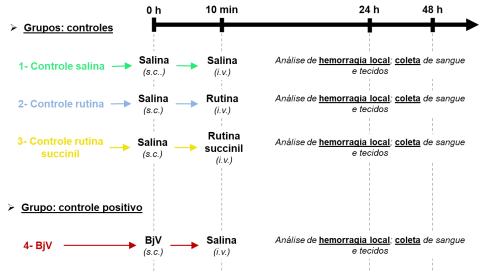


Figura 49: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina, veneno, rutina ou rutina succinil, tempos de análises e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais - rutinas

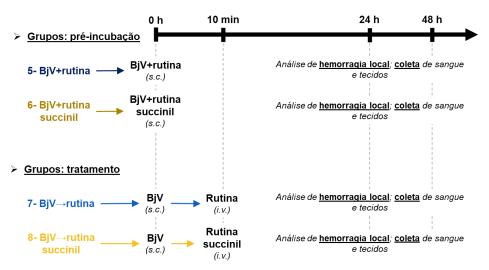


Figura 50: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina, veneno, rutina ou rutina succinil, tempos de análises e coleta de amostras.

Procedimentos experimentais – rutinas e SAB

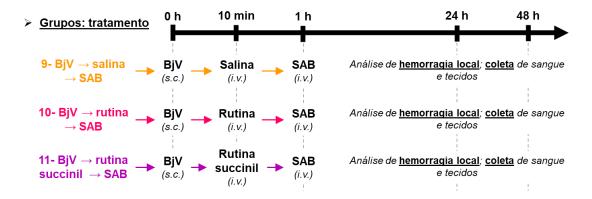


Figura 51: Representação esquemática dos grupos experimentais injetados com salina, veneno, rutina, rutina succinil ou SAB, tempos de análises e coleta de amostras.

5.1.4.3. Coleta de sangue e órgãos

Após 24 ou 48 h da administração das soluções controles ou com veneno, foi realizada a coleta de sangue e tecidos dos animais. O sangue foi coletado como descrito anteriormente para o envenenamento no capítulo 1.

Os tecidos foram coletados somente dos animais 24 h e imediatamente imersos RNAlater para análises gênicas. Fragmentos de pele (ao redor do local de inoculação das soluções, dimensão: 0,5-0,75 cm²) (63) e fígado (50 mg) foram imersos em 500 µL de RNAlater (Invitrogen, EUA), imediatamente congelados utilizando gelo-seco e armazenados a -80°C até as posteriores análises.

5.1.4.4.Hemograma

As análises hematológicas e esfregaços sanguíneos foram realizadas como descrito no capítulo 1.

5.1.4.5.Dosagem de fibrinogênio plasmático

A dosagem de fibrinogênio foi realizada como descrito anteriormente para o envenenamento do capítulo 1.

5.1.4.6.Dosagem de capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante das amostras de plasma foi avaliada por ensaio colorimétrico (124). Para isso, foram preparadas a mistura reativa 1 e a mistura reativa 2 e mantidos em banho-seco a 37°C. Alíquotas de plasma (5 μL, diluição 1:20) foram adicionadas em cada poço da placa, seguidas por 95 μL de água destilada e 150 μL da mistura reativa 1. Os brancos de amostras consistiram de 5 μL de cada plasma, 95 μL de água destilada e 150 μL da mistura reativa 2. Para o branco reativo 1 foram adicionados 100 μL de salina e 150 μL da mistura reativa 2, já para o branco reativo 2 foram adicionados 100 μL de salina e 150 μL da mistura reativa 2. Como padrão para a curva, foi preparada uma solução de L-glutationa reduzida (GSH, Sigma G4251) 1mM, pH 7,0, aliquotada e mantida a -20°C até a hora do uso para evitar perda de atividade. Essa solução

estoque de GSH foi diluída em água destilada para a obtenção das concentrações da curva padrão de GSH: 12,5; 25; 50; 100; 150 e 300 μM; como branco da curva foi utilizada água destilada. Posteriormente, 100 μL de cada concentração foram adicionados e 150 μL da mistura reativa 1. O ensaio foi realizado em duplicatas e a cinética da absorbância foi monitorada a 450 nm a cada minuto durante 30 minutos.

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

5.1.4.7. Análise de hemorragia local

A análise de hemorragia local foi realizada como descrito anteriormente para o envenenamento do capítulo 2.

5.1.4.8.Expressão gênica

A expressão gênica foi realizada como descrito anteriormente para o envenenamento do capítulo 2, sendo que para amostras de fígado foram analisados os genes Fga, Stat3 e Rplp0 e para as amostras de pele foram analisados os genes Hmox1 (codifica a proteína heme oxigenasse 1) e Rplp0.

5.1.5. Análise estatística

A distribuição normal e homocedasticidade dos resultados foram analisadas no programa estatístico STATATM versão 10. Sempre que necessário, os dados foram

transformados por algoritmos desse programa para obter distribuição normal e homocedasticidade. Para análise estatística posterior dos resultados foram utilizados os softwares SPSS (versão 22), SigmaPlot (versão 12.0) ou R (versão 4.00). Para observar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos, foram empregados para os dados com distribuição normal e homocedasticidade os testes análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni para comparação de médias. Para os dados não-paramétricos, foi empregado o teste Kruskal-Wallis e para a comparação de médias foi realizado o teste *post-hoc* de Dunn. Foram considerados significativos os resultados com p< 0,05 e os dados foram expressos como média ± erro padrão médio (e.p.m.).

5.2.RESULTADOS

5.2.1. Os tratamentos com as rutinas e/ou SAB normalizam os parâmetros hemostáticos e de estado redox

A contagem de leucócitos circulantes não apresentou alterações significativas em 24 h, exceto pelo aumento de leucócitos no grupo BjV (p< 0,050 comparado ao controle salina, Figura 52), que foi diminuído pela administração de rutina succinil e SAB (grupo BjV→rutina succinil→SAB, p< 0,001 comparado ao BjV). Esse resultado demonstra uma resposta inflamatória prolongada induzida pelas SVMP do BjV e combatida pelo tratamento com as rutinas e/ou SAB.

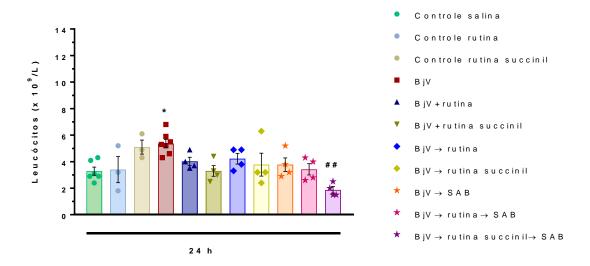


Figura 52: contagem de leucócitos totais em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-7/grupo).

Já para os valores eritrocitários, - contagem de eritrócitos (Figura 53a), hemoglobina (Figura 53b) e hematócrito (Figura 53c) - podem ser observadas diminuições de 20-30% nesses parâmetros em 24 h nos animais envenenados quando comparados ao controle (p< 0,050), exceto pelos animais que receberam SAB ou rutina succinil seguida por SAB que não apresentaram diferenças na contagem de eritrócitos (p= 0,0801 e p= 0,1021, respectivamente). Já os animais administrados com BjV pré-incubado com a rutina succinil apresentaram parâmetros eritrocitários similares ao controle salina (p= 1,000) e diferentes do grupo BjV em 24 h (p< 0,050). Resultados similares também foram observados nos modelos de envenenamento sistêmico moderado e grave (Capítulo 1), o que indica que a pré-incubação do veneno com a rutina succinil é capaz de inibir a queda de eritrócitos em diferentes modelos de envenenamento.

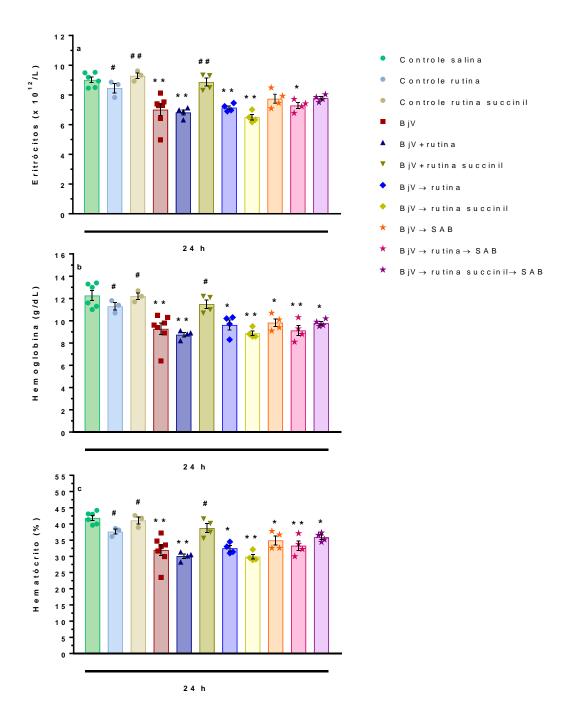


Figura 53: (a) contagem de eritrócitos, (b) hemoglobina e (c) hematócrito em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3-7/grupo).

O envenenamento induziu a diminuição da contagem plaquetária (Figura 54a) de 62-73% em 24 h nos animais envenenados (BjV) e nos envenenados tratados com as rutinas (p< 0,050). Em 24 h, a rutina succinil pré-incubada com o BjV induziu uma melhora na contagem plaquetária (p= 0,1635 comparado ao controle). Como esperado, o tratamento com o SAB foi eficaz na recuperação da plaquetopenia, mostrando resultados similares ao controle (p= 1,000).

Após 24 h, os animais envenenados continuaram apresentando diminuição de 58-72% nos níveis de fibrinogênio plasmático (Figura 54b) tanto no grupo BjV quanto no grupo BjV+rutina succinil (p< 0,050). Já o tratamento dos animais envenenados com SAB e/ou com as rutinas foi eficaz em normalizar os níveis de fibrinogênio plasmático (p= 0,8924 para BjV→rutina succinil e p= 1,000 para os demais grupos comparados ao controle).

Similarmente, o BjV reduziu a capacidade antioxidante total no plasma – um parâmetro do estado redox – em 24 h (p< 0,050, Figura 54c). Somente a administração da rutina ou do SAB foi capaz de aumentar os níveis de antioxidantes, no entanto, os animais tratados com as rutinas e SAB apresentaram uma capacidade antioxidante mais elevada (p< 0,050 comparado ao controle salina e p< 0,001 comparado ao BjV).

Os resultados demonstram que a soroterapia é eficaz em relação aos distúrbios sistêmicos provocados pelo envenenamento e induz a recuperação da plaquetopenia, hipofibrinogenemia e desbalanço redox já em 24 h. Já o tratamento somente com a rutina foi capaz de induzir a recuperação dos níveis de fibrinogênio e capacidade antioxidante total. Congruentemente, os resultados de fibrinogênio e capacidade antioxidante mostraram-se correlacionadas (r= 0,840, p< 0,001).

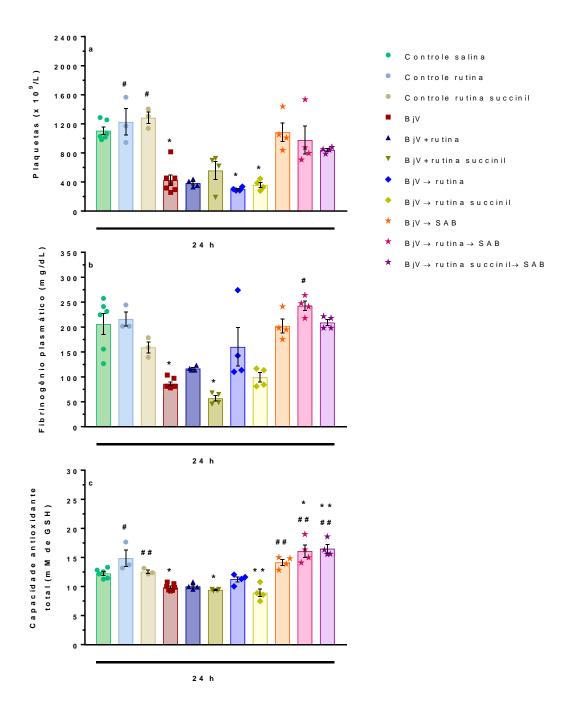


Figura 54: (a) contagem de plaquetas, (b) fibrinogênio plasmático e (c) capacidade antioxidante total em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (plaquetas e fibrinogênio) e o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni (capacidade antioxidante), * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 3-7/grupo).

5.2.2. <u>As rutinas são eficazes no tratamento da lesão hemorrágica no envenenamento</u>

As rutinas demonstram auxiliar na recuperação da hemostasia por agirem tanto em parâmetros hematológicos quanto em parâmetros da coagulação afetados pela ação sistêmica do envenenamento. Visto que o BjV apresenta uma característica ação hemorrágica e a importância do tratamento dos sangramentos e lesões locais em pacientes picados, foi avaliado o potencial das rutinas e SAB frente à lesão local hemorrágica induzida pelo veneno.

O envenenamento induziu o desenvolvimento de lesão local hemorrágica (p< 0,050 comparado ao controle salina), determinada pela área hemorrágica (Figura 55a) e pela análise da intensidade e área hemorrágicas (unidades arbitrárias hemorrágicas, HaU, Figura 55b). A análise desses dois diferentes parâmetros é importante para a averiguação dos diferentes aspectos da hemorragia (Figura 55-56), assim como a eficácia de seus possíveis tratamentos.

Todos os animais envenenados apresentaram hemorragia exceto pelo grupo BjV+rutina succinil, como já observado nos outros modelos experimentais descritos no presente trabalho. O tratamento com o SAB ou com as rutinas induziu a redução de 15-21% da hemorragia em 24 h, exceto pelo grupo BjV→rutina succinil→SAB que reduziu somente 5% e o grupo BjV+rutina que apresentou a maior redução de 31%. Já em relação à área hemorrágica, os animais envenenados e envenenados tratados somente com rutina demonstraram aumento da área hemorrágica (p<0,050), que foi reduzida em 22-23% com o tratamento com as rutinas e posteriormente o SAB.

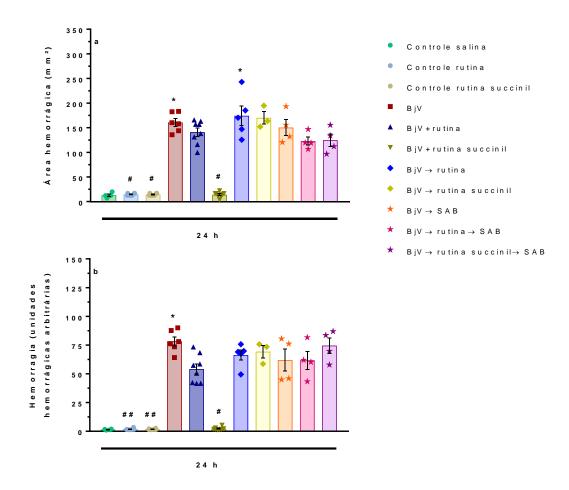


Figura 55: (a) área hemorrágica e (b) hemorragia local (unidades hemorrágicas = intensidade e área da hemorragia) em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 3-7/grupo).

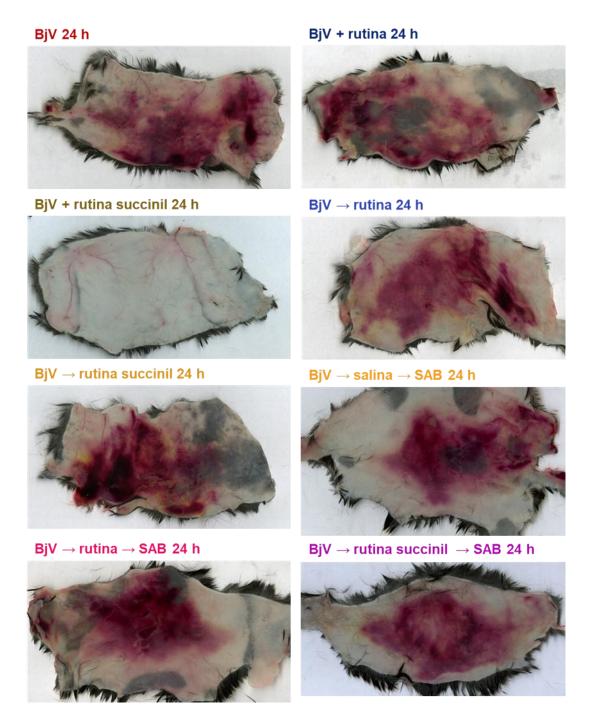


Figura 56: imagens representativas da hemorragia em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico).

5.2.3. A rutina induz a expressão gênica de fibrinogênio e heme-oxigenase

Visto que a rutina foi capaz de estimular o aumento de fibrinogênio plasmático, mostrou-se importante verificar se esse aumento estava associado à indução em nível transcricional. O envenenamento induziu um aumento discreto de 22-25% na expressão de *Stat3* (Figura 57b) e *Fga* (Figura 57a) no fígado, no entanto os animais tratados com SAB não apresentaram diferenças nesses parâmetros. Já a rutina foi capaz de induzir um aumento de 42-74% na expressão de *Stat3* e 83-110% na expressão de *Fga*. Já em relação às alterações locais, ao analisar a expressão de *Hmox1* − gene que codifica a proteína heme-oxigenase 1 − no local de injeção do BjV foi observado que os animais envenenados apresentaram aumento de *Hmox1* (Figura 57c), sendo que a maior intensidade foi observada nos grupos tratados com rutina succinil e com SAB, especialmente o grupo BjV→rutina→SAB (p< 0,050 comparado ao controle salina ou BjV). Os grupos de animais envenenados que apresentaram maiores níveis de *Hmox1* também apresentaram menores áreas hemorrágicas, demonstrando uma possível associação entre esses parâmetros.

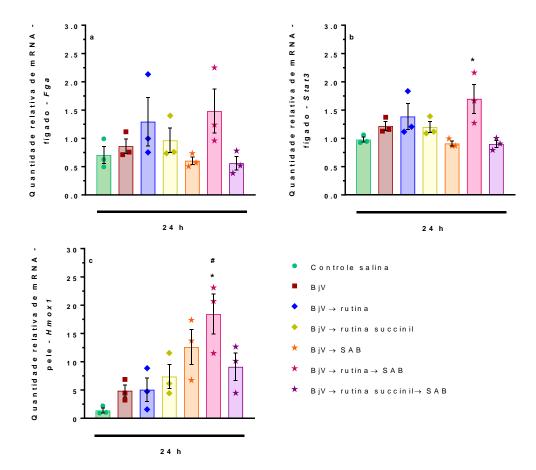


Figura 57: quantidade relativa de RNA dos genes (a) Fga (fígado), (b) Stat3 (fígado) e (c) Hmox1 (pele) em camundongos 24 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste post-hoc Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n= 3/grupo).

5.2.4. <u>As rutinas estimulam a recuperação dos distúrbios locais e</u> sistêmicos induzidos pelo envenenamento em 48 h

A fim de avaliar se o tratamento com as rutinas é capaz de manter e acelerar a recuperação dos distúrbios hemostáticos locais e sistêmicos do envenenamento foi analisado o tempo de 48 h após o envenenamento.

Após 48 h da injeção do BjV a contagem de leucócitos dos animais envenenados foi similar a dos controles (p= 1,000, Figura 58), diferentemente do observado em 24 h.

Assim como em 24 h, os valores eritrocitários dos animais envenenados mantiveram-se reduzidos em relação ao controle salina (p< 0,050, Figura 59).

A administração da soroterapia normalizou a contagem plaquetária já em 24 h, seguindo o mesmo padrão em 48 h, mostrando resultados similares ao controle (p= 1,000, Figura 60a). Já a administração das rutinas (pré-incubação ou tratamento) induziu a recuperação na contagem plaquetária em 48 h e os animais não apresentaram diferenças do controle salina (p= 0,5835 para BjV→rutina succinil e p= 1,000 para os outros grupos).

Mesmo não apresentando diferenças significativas com o controle, em 48 h o fibrinogênio plasmático (Figura 60b) ainda apresentou diminuição de 21-29% nos grupos BjV, BjV+rutina succinil e BjV→rutina succinil, diferentemente dos grupos que receberam rutina (BjV+rutina e BjV→rutina) que apresentaram somente 3-6% de diminuição. Os animais que receberam SAB não apresentaram diminuição de fibrinogênio e demonstraram níveis maiores que o grupo BjV (p< 0,050). Desse modo, é possível observar que a recuperação do fibrinogênio plasmático seguiu o mesmo padrão nos dois tempos crônicos de envenenamento avaliados.

Após 48 h do envenenamento, os níveis de capacidade antioxidante se mostraram estabilizados, não havendo diferença entre animais envenenados e animais controle (p= 1,000, Figura 60c) e sendo que o grupo BjV→rutina succinil→SAB apresentou níveis ainda maiores, diferindo do grupo BjV (p< 0,050). Assim como observado em 24 h, em 48 h a capacidade antioxidante mostrou correlação significativa com os níveis de fibrinogênio plasmático (r= 0,736, p< 0,001).

Os animais envenenados apresentaram redução da área e intensidade da hemorragia (Figuras 61-62) em 48 h comparados a 24 h, no entanto ainda diferiram do controle salina (p< 0,050 para área e p< 0,001 para hemorragia total). A soroterapia não foi eficaz para reduzir a hemorragia em 48 h (p< 0,050 comparado ao controle salina), demonstrando

que a inibição direta do BjV não é suficiente para recuperar a lesão hemorrágica. No entanto, a administração de rutina e rutina succinil reduziram a hemorragia em 28-42% comparado ao grupo BjV, não diferindo dos animais controle.

Esses resultados indicam que o tratamento com o SAB acelera o processo de recuperação de parâmetros hemostáticos, como contagem plaquetária e fibrinogênio plasmático, porém a administração das rutinas também se mostrou eficaz mesmo quando administradas sem o SAB. Ademais, o soro antibotrópico realmente possui uma limitação quanto ao tratamento dos efeitos locais do envenenamento e que tanto a rutina quanto a rutina succinil são capazes de agir como componentes anti-hemorrágicos, auxiliando no processo de recuperação do organismo. Foi possível observar que a rutina é eficaz independentemente de sua via de administração, mas aparenta ter uma ação mais rápida quando injetada no mesmo local do veneno e as rutinas tem eficácia tanto quando administrada sozinha como tratamento quanto quando usada como agente auxiliar à soroterapia.

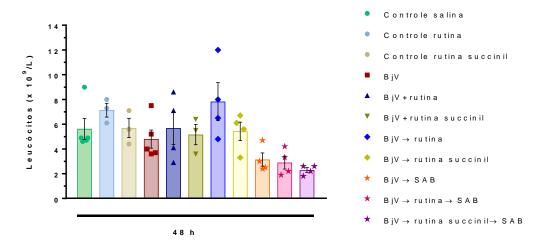


Figura 58: contagem de leucócitos em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 3-5/grupo).

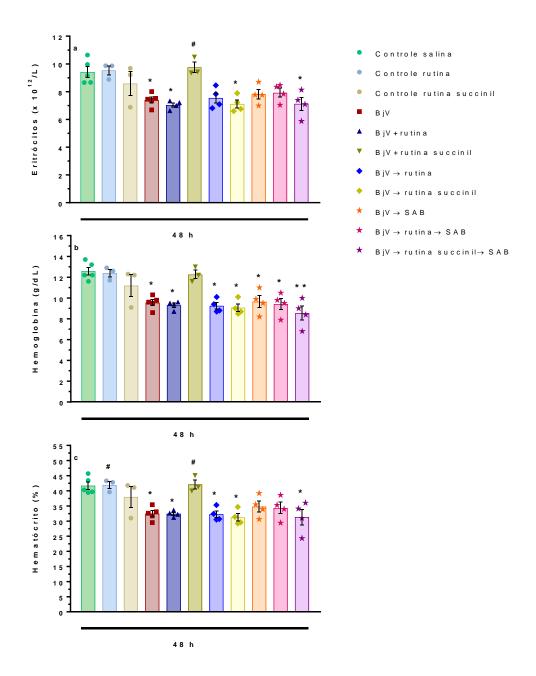


Figura 59: (a) contagem de eritrócitos, (b) hemoglobina e (c) hematócrito em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 3-5/grupo).

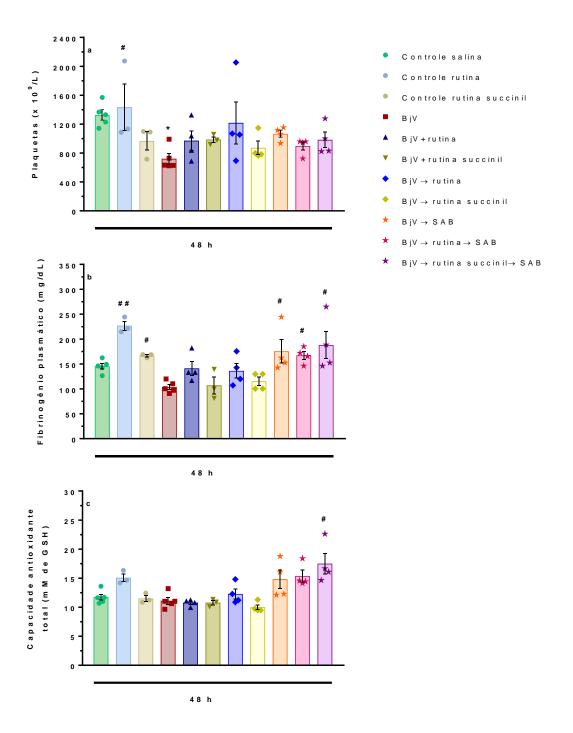


Figura 60: (a) contagem de plaquetas, (b) fibrinogênio plasmático e (c) capacidade antioxidante total em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste de ANOVA de uma-via, seguido por teste *post-hoc* Bonferroni (plaquetas e fibrinogênio) e o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn (capacidade antioxidante), * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 3-5/grupo).

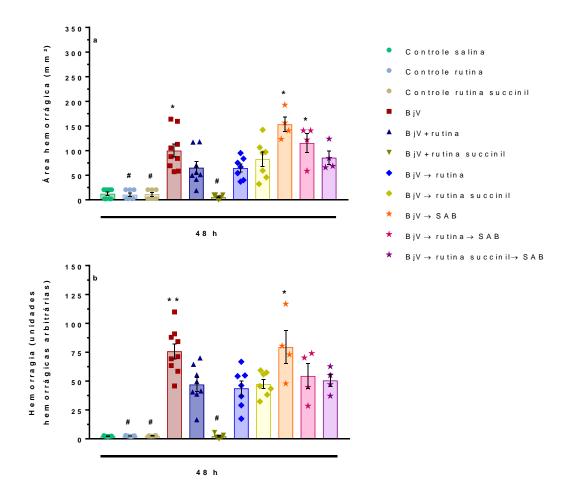


Figura 61: (a) área hemorrágica e (b) hemorragia local (unidades hemorrágicas = intensidade e área da hemorragia) em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico). Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste *post-hoc* Dunn, * p< 0,05 e ** p< 0,001 quando comparado ao grupo controle salina; # p< 0,05 e ## p< 0,001 quando comparado ao grupo BjV. Dados expressos como média ± e.p.m. (n= 4-9/grupo).

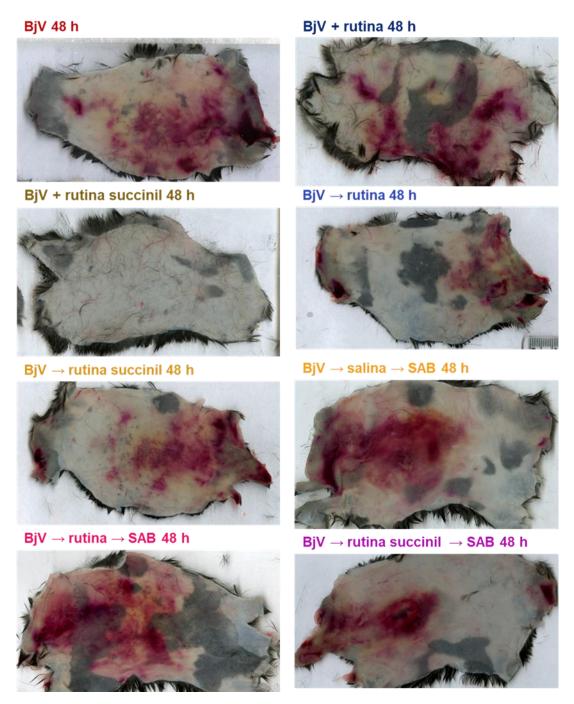


Figura 62: imagens representativas da hemorragia em camundongos 48 h após a administração de salina, rutina, rutina succinil, BjV ou SAB (soro antibotrópico).

5.3.DISCUSSÃO

O reconhecimento do envenenamento ofídico como uma prioridade dentre as doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde acarretou a organização de um plano estratégico global com o objetivo de melhorar a prevenção, tratamento e recuperação de vítimas envenenadas. Dentre as diversas etapas elencadas podem ser citadas as melhorias do tratamento das vítimas, tanto por melhorar a qualidade e disponibilização de antivenenos quanto pela busca de novos agentes terapêuticos (206).

O soro antiofídico derivado de imunoglobulinas animais é o tratamento oficial para picadas de serpentes (45), como o soro antibotrópico que é o único medicamento aprovado para o tratamento de envenenamento por serpentes *Bothrops*. A soroterapia é eficaz para neutralizar as toxinas presentes no veneno e assim, os pacientes picados por *B. jararaca* apresentam uma rápida recuperação (6 – 18h) dos parâmetros hemostáticos após a administração do soro anti-botrópico (98), como observado nos resultados desse estudo. Sabe-se que a hipofibrinogenemia no envenenamento por *B. jararaca* não possui correlação com a plaquetopenia, no entanto, pacientes que apresentam plaquetopenia e hipofibrinogenemia simultaneamente são mais propensos ao desenvolvimento de sagramentos sistêmicos (57, 58, 63, 64). No entanto, já foi demonstrado que mesmo pacientes picados com contagem plaquetária e níveis de fibrinogênio normais também podem desenvolver sangramentos sistêmicos (64).

A plaquetopenia induzida pelo BjV não é causada pela ação de SVMP, SVSP e lesão local hemorrágica (63), como demonstrado no capítulo 2 e seus mecanismos estão sendo atualmente estudados pelo nosso grupo. Ademais, já foi demonstrado que em situações pró-inflamatórias, as plaquetas tem papel fundamental na preservação da integridade da microcirculação em diversos órgãos, como pele e pulmão, preservando sua função fisiológica (207). Desse modo, a recuperação dos parâmetros hemostáticos pela

administração das rutinas pode ser uma estratégia importante para melhorar a recuperação após o envenenamento, até mesmo em situações com indisponibilidade de soroterapia.

Além de desafios de armazenamento e disponibilização do soro antiofídico, sabe-se que a soroterapia apresenta limitações quanto a efeitos secundários e locais do envenenamento (82, 97, 98, 101) e como foi demonstrado, é preciso considerar a complexa interação das alterações fisiopatológicas induzidas pelo envenenamento. Os efeitos locais do envenenamento botrópico representam um desafio no tratamento de pacientes picados, já que seu rápido desenvolvimento leva a não serem completamente combatidos pelo soro antibotrópico. Essa ação também já foi avaliada com uso de modelos experimentais, que permitiram compreender que a ineficácia do antiveneno no dano local está relacionada com a inabilidade do soro antiofídico atingir e se distribuir pelos tecidos danificados, assim como sua incapacidade em de neutralizar mediadores endógenos responsáveis pelas alterações locais (61, 82, 85, 97, 98, 101).

A complexidade do tratamento de envenenamentos é agravada pelo tempo entre a picada e o início da soroterapia (61, 82, 85, 97, 98, 101), no entanto com base em nossos resultados, a rutina e rutina succinil se mostram compostos eficazes para serem utilizadas como tratamentos auxiliares antes da soroterapia, permitindo a assistência terapêutica a pacientes de forma mais rápida.

Diversos estudos já demonstraram o uso de extratos de plantas ou compostos naturais isolados no envenenamento em relação aos distúrbios hemostáticos e locais, como a hemorragia. As ações desses compostos já foram relacionadas com a sua capacidade de inibir componentes do veneno, de quelar íons metálicos e agir como antioxidante (66, 130, 131) (183-186). É preciso considerar que esses estudos ressaltam limitações desse uso, como a eficácia dos compostos quando administrados como tratamentos de forma sistêmica. Com base nos resultados do presente estudo, a indução do gene do fibrinogênio

e *Stat3* pela rutina pode estar associado ao aumento dos níveis de fibrinogênio plasmático, visto que esses genes estão relacionados com a síntese hepática do fibrinogênio e que já foi demonstrada a síntese coordenada das cadeias de fibrinogênio no envenenamento (99, 100). É preciso considerar que a correlação entre os níveis de fibrinogênio e a capacidade antioxidantes total já foi descrita anteriormente no envenenamento (66), como também observado nos dados de 24 e 48 h e pode estar associada à capacidade de antioxidantes protegerem o fibrinogênio de danos oxidativos (208, 209). Já em relação às alterações locais, a heme oxigenase 1 (codificada pelo gene *Hmox1*) é uma enzima com ações antioxidantes e anti-inflamatórias, possuindo papel importante na resolução da inflamação e reparo tecidual (210, 211). Com base nos resultados, é possível inferir que o aumento na síntese local de *Hmox1* poderia ser beneficial para conter a reação pró-inflamatória induzida pelo veneno e auxiliar na recuperação da lesão hemorrágica. No entanto, os mecanismos de ação das rutinas no envenenamento podem estar relacionados com a sinergia de suas atividades visto que a rutina age como um composto anti-inflamatório, antioxidante, protetor de vasos sanguíneos, pró-hemostático, entre outras.

Visto que são biomoléculas pequenas, de baixa toxicidade, com amplo espectro de ações, baixo custo e mostram-se eficazes contra os efeitos deletérios do veneno, as rutinas demonstram grande potencial como agentes complementares à soroterapia no envenenamento botrópico.

5. CONCLUSÃO

- A rutina succinil apresenta maior solubilidade em água que a rutina, mantendo as atividades características da rutina, como antioxidante e inibidora da PDI. No entanto a rutina succinil é capaz de agir como anticoagulante *in vitro* e inibir diretamente a ação de metaloproteinases quando pré-incubada com o BjV.
- 2. A endotoxemia e envenenamento apresentam similaridade, como ativação da coagulação, plaquetopenia, resposta inflamatória e resposta de fase aguda, no entanto diferentemente da endotoxemia, essas alterações no envenenamento não são mediadas pelo TF. Ademais, as rutinas agiram como antioxidantes nos dois modelos, porém de modo limitado na endotoxemia.
- 3. Em camundongos, as serinaproteases são responsáveis pela coagulopatia de consumo induzida pelo envenenamento e já as metaloproteinases são responsáveis pela resposta inflamatória e indução da hemorragia local.

A rutina e rutina succinil possuem mecanismos de ação diferentes no envenenamento, no entanto as rutinas são capazes de acelerar a recuperação de parâmetros hemostáticos e da hemorragia induzida pelo BjV tanto quando administradas sozinhas quanto coadjuvantes à soroterapia. Desse modo, as rutinas demonstram grande eficácia em combater os efeitos deletérios do envenenamento e estimular a recuperação do organismo. Estudos futuros serão importantes para determinar o potencial das rutinas em outros modelos animais e aplicação para tratamentos de pacientes picados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Foley JH, Conway EM. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. Circ Res. 2016;118(9):1392-408.
- Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. Crit Care Med. 2010;38(2 Suppl):S26-34.
- 3. Petäjä J. Inflammation and coagulation. An overview. Thrombosis research. 2011;127:S34-S7.
- 4. Grover SP, Mackman N. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(4):709-25.
- 5. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. Anesth Analg. 2009;108(5):1447-52.
- 6. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. Thromb Haemost. 2014;111(4):590-7.
- 7. Pawlinski R, Mackman N. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. Thromb Res. 2010;125 Suppl 1:S70-3.
- 8. Pawlinski R, Wang JG, Owens AP, 3rd, Williams J, Antoniak S, Tencati M, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. Blood. 2010;116(5):806-14.
- 9. Mackman N. Tissue-specific hemostasis in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(11):2273-81.
- 10. Butenas S. Tissue factor structure and function. Scientifica. 2012;2012:964862.

- 11. Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. J Thromb Haemost. 2013;11 Suppl 1:277-84.
- 12. Williams J, Mackman N. Tissue factor in health and disease. Frontiers in Bioscience. 2012;E4:358-72.
- 13. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. Trends Cardiovasc Med. 2016;26(4):297-303.
- 14. Owens AP, 3rd, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. Thromb Haemost. 2010;104(3):432-9.
- 15. Nawroth PP. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med. 1986;163(3):740-5.
- 16. Levi M, Cate H. Disseminated intravascular coagulation. N Engl J Med. 1999;341(8):586-92.
- 17. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. Oxidative medicine and cellular longevity. 2015;2015:590987.
- 18. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Soc. 1998;75(2):199-212.
- 19. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia Of Life Sciences: Nature Publishing Group; 2001. p. 1-9.
- 20. Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. Antioxid Redox Signal. 2008;10(6):1101-13.
- 21. Chen X, Andresen B, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha induced endothelial dysfunction. Curr Hypertens Rev. 2008;4(4):245–55.

- 22. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochimica et biophysica acta. 2014;1843(11):2563-82.
- 23. Sevastos J, Kennedy S, Davis D, Sam M, Peake P, Charlesworth J, et al. Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. Blood. 2007;109:577-83.
- 24. Adams M, Thom J, Hankey G, Baker R, Gilmore G, Staton J, et al. The tissue factor pathway in ischemic stroke. Blood Coagul Fibrinolysis. 2006;17:527–32.
- 25. Chong A, Pohlman T, Hampton C, Shimamoto A, Mackman N, Verrier E. Tissue factor and thrombin mediate myocardial ischemia-reperfusion injury. Ann Thorac Surg. 2003;75:S649–55.
- 26. Ushigome H, Sano H, Okamoto M, Kadotani Y, Nakamura K, Akioka K, et al. The role of tissue factor in renal ischemic reperfusion injury of the rat. J Surg Res. 2002;102(2):102-9.
- 27. World Health Organization. Sepsis: World Health Organization; [Available from: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis.
- 28. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 2014;5(1):4-11.
- 29. Hack C. Tissue factor pathway of coagulation in sepsis. Crit Care Med. 2000;28:S25–S30).
- 30. Xue M, Sun Z, Shao M, Yin J, Deng Z, Zhang J, et al. Diagnostic and prognostic utility of tissue factor for severe sepsis and sepsis-induced acute lung injury. J Transl Med. 2015;13:172.
- 31. Grover SP, Bergmeier W, Mackman N. Platelet signaling pathways and new inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(4):e28-e35.

- 32. Pawlinski R, Mackman N. Tissue factor, coagulation proteases, and protease-activated receptors in endotoxemia and sepsis. Critical Care Medicine. 2004;32(Supplement):S293-S7.
- 33. Franco R, Jonge E, Dekkers P, Timmerman J, Spek C, van Deventer S, et al. The *in vivo* kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. Blood. 2000;96:554-9.
- 34. Wang JG, Manly D, Kirchhofer D, Pawlinski R, Mackman N. Levels of microparticle tissue factor activity correlate with coagulation activation in endotoxemic mice. J Thromb Haemost. 2009;7(7):1092-8.
- 35. Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, et al. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. Blood. 2004;103(4):1342-7.
- 36. Pawlinski R, Pedersen B, Erlich J, Mackman N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. Thromb Haemost. 2004;92(3):444-50.
- 37. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, et al. LPS induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NFkB, STAT3 or AP1 activation. Mol Med Rep. 2018;17(4):5484-91.
- 38. Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. J Immunol. 2008;180(6):4218-26.
- 39. Kamimura M, Viedt C, Dalpke A, Rosenfeld ME, Mackman N, Cohen DM, et al. Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated

- macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. Circulation research. 2005;97(4):305-13.
- 40. Pawlinski R, Pedersen B, Kehrle B, Aird W, Frank R, Guha M, et al. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. Blood. 2003;101:3940-7.
- 41. Scarlatescu E, Tomescu D, Arama SS. Anticoagulant therapy in sepsis. The importance of timing. J Crit Care Med 2017;3(2):63-9.
- 42. Thachil J, Iba T. The application of anticoagulant therapy to sepsis. J Intensive Care. 2017;5:32.
- 43. Victor V, Rocha M, Esplugues J, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. Curr Pharm Des. 2005;11:3141-58.
- 44. World Health Organization. Snakebite envenoming: World Health Organization; [Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/.
- 45. Gutierrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17063.
- 46. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação [Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def.
- 47. Melgarejo AR. *Serpentes Peçonhentas do Brasil*. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editors. *Animais Peçonhentos no Brasil* Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 33-61.
- 48. World Health Organization. Venomous snakes distribution and species risk categories: World Health Organization; [Available from: http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/default.htm.
- 49. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. 2006;63(24):3030-41.

- 50. Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon. 2011;57(5):627-45.
- 51. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. Biochim Biophys Acta. 2012;1824(1):164-76.
- 52. Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, DaMatta RA, Alves EW. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. Toxicon. 2010;56(6):944-55.
- 53. Izidoro LF, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. Biomed Res Int. 2014;2014:196754.
- 54. Gutierrez JM. Understanding and confronting snakebite envenoming: the harvest of cooperation. Toxicon. 2016;109:51-62.
- 55. 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(6):e727.
- 56. Kini RM, Koh CY. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. Toxins. 2016;8(10).
- 57. Sano-Martins IS, Santoro ML. *Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil*. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editors. *Animais Peçonhentos no Brasil* Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 289-309.

- 58. Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. Braz J Med Biol Res. 1986;19(2):199-204.
- 59. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Thromb Haemost. 1990;63(3):449-53.
- 60. Santoro ML, Sano-Martins IS, Chamone DA. *In vivo* platelet activation induced by *Bothrops jararaca* venom in rabbits. Platelets. 1994;5(3):162-70.
- 61. França FOS, Málaque CMS. *Acidente Botrópico*. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editors. *Animais Peçonhentos no Brasil* Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 72-86.
- 62. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA, et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, Bothrops jararaca, in Brazil. Toxicon. 2008;51(8):1440-8.
- 63. Yamashita KM, Alves AF, Barbaro KC, Santoro ML. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5):e2814.
- 64. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. Toxicon. 1991;29(8):961-72.
- 65. Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. Exp Biol Med 2015;240(11):1528-36.

- 66. Sachetto ATA, Rosa JG, Santoro ML. Rutin (quercetin-3-rutinoside) modulates the hemostatic disturbances and redox imbalance induced by *Bothrops jararaca* snake venom in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006774.
- 67. Málaque CMS, Duayer IF, Santoro ML. Acute kidney injury induced by thrombotic microangiopathy in two cases of *Bothrops* envenomation. Clin Toxicol. 2018:1-4.
- 68. Bucaretchi F, Pimenta MMB, Borrasca-Fernandes CF, Prado CC, Capitani EM, Hyslop S. Thrombotic microangiopathy following *Bothrops jararaca* snakebite: case report. Clin Toxicol. 2018:1-6.
- 69. Sano-Martins IS, Santoro ML, Morena P, Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Antonio LC, et al. Hematological changes induced by Bothrops jararaca venom in dogs. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 1995;28(3):303-12.
- 70. Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. Toxicon. 1997;35(2):185-93.
- 71. Gutiérrez J, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie. 2000;82:841–50.
- 72. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. Toxicon. 2010;55(2-3):227-34.
- 73. Gonçalves L, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. Mediators Inflamm. 2000;9:101-07.
- 74. Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide. Toxicon. 2000;38:1253-66.

- 75. Ferraz CR, Calixto-Campos C, Manchope MF, Casagrande R, Clissa PB, Baldo C, et al. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF-a, IL-1b and NFkB in mice. Toxicon. 2015;103:119-28.
- 76. Schattner M, Fritzen M, Ventura Jde S, de Albuquerque Modesto JC, Pozner RG, Moura-da-Silva AM, et al. The snake venom metalloproteases berythractivase and jararhagin activate endothelial cells. Biol Chem. 2005;386(4):369-74.
- 77. Moura-da-Silva AM, Baldo C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. Toxicon. 2012;60(3):280-9.
- 78. Avila-Agüero M, París M, Hu S, Peterson P, Gutiérrez J, Lomonte B, et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. Pediatr Emerg Care. 2001;17(6):425-9.
- 79. Barravieira B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson L, Meira D. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. J Venom Anim Toxins. 1995;1(1):1-10.
- 80. Moura-da-Silva A, Lain G, Pahe M, Dennison J, Politi V, Crampton J, et al. Processing of pro-tumor necrosis factor-α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. Eur J Immunol. 1996;26:2000-5.
- 81. Strapazzon JO. *Análise do dano oxidativo e monitoramentodo status antioxidante de pacientes de acidente botrópico* [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
- 82. Strapazzon JO, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Bastos J, Zimermann IR, et al. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. J Appl Biomed. 2014;13(2):161-7.
- 83. Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WH, Vorraro F, De Franco M, Ibanez OM, et al. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice

- genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. Toxicon. 2008;52(5):619-27.
- 84. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. eLS. 2015:1-9.
- 85. Gutierrez JM, Rucavado A, Chaves F, Diaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 2009;54(7):958-75.
- 86. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2010;50(1):323-54.
- 87. Grochot-Przeczek A, Lach R, Mis J, Skrzypek K, Gozdecka M, Sroczynska P, et al. Heme Oxygenase-1 Accelerates Cutaneous Wound Healing in Mice. PLoS ONE. 2009;4(6):e5803.
- 88. Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutierrez JM, de Fatima Pereira Teixeira C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. Toxicon. 2005;46(7):806-13.
- 89. Sartim MA, Cezarette GN, Jacob-Ferreira AL, Frantz FG, Faccioli LH, Sampaio SV. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. Int J Biol Macromol. 2017;103:1077-86.
- 90. Sartim MA, Costa TR, Laure HJ, Espindola MS, Frantz FG, Sorgi CA, et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor upregulation in leukocytes. Arch Toxicol. 2016;90(5):1261-78.
- 91. Peichoto ME, Santoro ML. Patagonfibrase modifies protein expression of tissue factor and protein disulfide isomerase in rat skin. Toxicon. 2016;119:330-5.

- 92. Pereira AL, Fritzen M, Faria F, Motta G, Chudzinski-Tavassi AM. Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by berythractivase and jararhagin (SVMPs). Toxicon. 2006;47(7):788-96.
- 93. Trebien H, Calixto J. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. Agents and Actions. 1989;26(3/4):292-300.
- 94. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. Toxicon. 2010;55(2-3):227-34.
- 95. Hillgruber C, Poppelmann B, Weishaupt C, Steingraber AK, Wessel F, Berdel WE, et al. Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. J Exp Med. 2015;212(8):1255-66.
- 96. Cardoso D, Yamaguchim I, Moura-da-Silva AM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editors. Animais Peçonhentos no Brasil Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1 ed. São Paulo: Savier; 2003. p. 367-79.
- 97. Jorge M, Cardoso J, Castro S, Ribeiro L, França F, Almeida M, et al. A randomized 'blinded' comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89:111-4.
- 98. Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86(5):315-25.
- 99. Sachetto A, Jensen J, Santoro M, editors. Gene expression of coagulation factors after experimental snake envenomation in mice. 64th Annual Scientific and

- Standardization Committee Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; 2018; Dublin: Res Pract Thromb Haemost.
- 100. Crabtree G, Kant J. Coordinate accumulation of the mRNAs for the α , β and γ chains of rat fibrinogen following defibrination. J Biol Chem. 1982;257(13):7277-9.
- 101. Battellino C, Piazza R, da Silva AMM, Cury Y, Farsky SHP. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon. 2003;41(5):583-93.
- 102. Seba RA. Efeitos vasculares do veneno de "*Bothrops atrox*" sua inibição pela rutina e um antihistaminico. Revista Fluminense de Medicina. 1949;14:179-88.
- 103. MacLean A, Brambel C. Dicumarol and rutin in retinal vascular disorders. Am J Ophthalmol. 1947;30(9):1093-108.
- 104. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MdLP. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. Alim Nutr. 2004;15(3):285-92.
- 105. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 2000;63(7):1035-42.
- 106. Kandaswami C, Middleton EJR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. Adv Exp Med Biol. 1994;366:351-76.
- 107. Afanas'ev IB. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1989;38:1763-9.
- 108. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. Saudi Pharm J. 2017;25(2):149-64.
- 109. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. J Clin Invest. 2012;122(6):2104-13.

- 110. Gullón B, Lú-Chau TA, Moreira MT, Lema JM, Eibes G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. Trends Food Sci Technol. 2017;67:220-35.
- 111. Pedriali C, Fernandes A, Bernusso L, Polakiewicz B. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. Quim Nova. 2008;31(8):2147-51.
- 112. Krewson C, Couch J. Preparation of water-soluble metal complexes of rutin and related flavonols. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc. 1952;41(2:1):83-6.
- 113. Alluis B, Pérol N, El hajji H, Dangles O. Water-soluble flavonol (=3-Hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: chemical synthesis, colouring, and antioxidant properties. Helvetica Chimica Acta. 2000;83:428-43.
- 114. Flaumenhaft R, Furie B, Zwicker JI. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(1):16-23.
- 115. Stopa J, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker J, editors. Human clinical trials evaluating protein disulfide isomerase as an antithrombotic target: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies of oral quercetin and isoquercetin. XXIV Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis; 2013.
- 116. Di Lorenzo G. Isoquercetin as an adjunct therapy in patients with kidney cancer receiving first-line sunitinib: a phase I/II trial (QUASAR). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02446795. 2018 [Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02446795. Zwicker J. Cancer associated thrombosis and isoquercetin. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02195232 2018 [Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02195232.
- 118. Kooshyar MM, Mozafari PM, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Karoos P, Mohasel MR, et al. A randomized placebo- controlled double blind clinical trial of

- quercetin in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis. J Clin Diagn Res. 2017;11(3):ZC46-ZC50.
- 119. Heinz SA, Henson DA, Austin MD, Jin F, Nieman DC. Quercetin supplementation and upper respiratory tract infection: a randomized community clinical trial. Pharmacol Res. 2010;62(3):237-42.
- 120. Choi JH, Kim DW, Park SE, Lee HJ, Kim KM, Kim KJ, et al. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. J Biosci Bioeng. 2015;120(2):181-6.
- 121. Stopa JD, Neuberg D, Puligandla M, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker JI. Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation. JCI Insight. 2017;2(1):e89373.
- 122. Schulman S, Bendapudi P, Sharda A, Chen V, Bellido-Martin L, Jasuja R, et al. Extracellular thiol isomerases and their role in thrombus formation. Antioxid Redox Signal. 2016;24(1):1-15.
- 123. Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. Expert Opin Investig Drugs. 2013;22(8):1063-79.
- 124. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016;5:1-15.
- 125. Kauss T, Moynet D, Rambert J, Al-Kharrat A, Brajot S, Thiolat D, et al. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R19.
- 126. Kirchner T, Hermann E, Moller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, et al. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps. Mediators Inflamm. 2013;2013:710239.

- 127. Soromou LW, Sylla MK, Keyra M, Sidime Y. Protective effect of a traditional medicine, rutin, against lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2018;8(1).
- 128. Gul A, Kunwar B, Mazhar M, Faizi S, Ahmed D, Shah MR, et al. Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF-κB and iNOS activation. Int Immunopharmacol. 2018;59:310-7.
- 129. Lee W, Ku SK, Bae JS. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. Food Chem Toxicol. 2012;50(9):3048-55.
- 130. Nishijima CM, Rodrigues CM, Silva MA, Lopes-Ferreira M, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. Molecules. 2009;14(3):1072-80.
- 131. Castro O, Gutiérrez J, Barrios M, Castra I, Romera M, Umaña E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Rev Biol Trop. 1999;47(3):605-16.
- 132. Sachetto ATA. Alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento por *Bothrops jararaca*: modulação pelo antioxidante natural rutina (quercetina-3-rutinosídeo). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2018.
- 133. Silva JC, Gorenstein M, Li VG-Z, Vissers JPC, Geromanos SJ. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: A Virtue of Parallel ms Acquisition. Molecular & Cellular Proteomics. 2006;5(1):144-56.
- 134. Abreu TF, Sumitomo BN, Nishiyama MY, Oliveira UC, Souza GH, Kitano ES, et al. Peptidomics of Acanthoscurria gomesiana spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. J Proteomics. 2017;151:232-42.
- 135. Pedroso AP, Souza AP, Dornellas AP, Oyama LM, Nascimento CM, Santos GM, et al. Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats:

- Integrated Analysis of Proteomic and Metabolomic Data. J Proteome Res. 2017;16(4):1515-25.
- 136. Ado K, Takeda N, Kikuchi M, Taniguchi Y. The pressure effect on the structure and functions of protein disulfide isomerase. Biochimica et biophysica acta. 2006;1764(3):586-92.
- 137. Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. Free Radic Biol Med. 2007;43(1):62-70.
- 138. Montano SJ, Lu J, Gustafsson TN, Holmgren A. Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. Anal Biochem. 2014;449:139-46.
- 139. Oliveira PVS, Garcia-Rosa S, Sachetto ATA, Moretti AIS, Debbas V, De Bessa TC, et al. Protein disulfide isomerase plasma levels in healthy humans reveal proteomic signatures involved in contrasting endothelial phenotypes. Redox biology. 2019;22:101142.
- 140. Zhang W, Zhong D, Liu Q, Zhang Y, Li N, Wang Q, et al. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. J Biomater Sci Polym Ed. 2013;24(13):1549-63.
- 141. Kishimoto M, Takahashi T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. Anal Biochem. 2001;298(1):136-9.
- 142. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon. 2010;56(8):1443-58.

- 143. Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, Mcmichael AJ, White NJ, Bunnagi D. The hyaluronidase activities of some southeast asian snake venoms. Toxicon. 1988;26(7):6Z9-637.
- 144. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys. 1961;95:271-8.
- 145. Santoro ML, Sano-Martins IS. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. Toxicon. 1993;31(6):733-42.
- 146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
- 147. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 1987;8:93-9.
- 148. Sachetto ATA, Mackman N. Modulation of the mammalian coagulation system by venoms and other proteins from snakes, arthropods, nematodes and insects. Thromb Res. 2019;178:145-54.
- 149. Yamada D, Morita T. Purification and characterization of a Ca2+-dependent prothrombin activator, multactivase, from the venom of *Echis multisquamatus*. J Biochem. 1997;122:991-7.
- 150. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. J Thromb Haemost. 2011;9(1):133-9.
- 151. Fenyvesi T, Jorg I, Weiss C, Harenberg J. Effects of lepirudin, argatroban and melagatran and additional influence of phenprocoumon on ecarin clotting time. Thrombosis research. 2003;111(1-2):89-94.

- 152. Cho J, Furie BC, Coughlin SR, Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. J Clin Invest. 2008;118(3):1123-31.
- 153. Piskula MK, Terao J. Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. J Agric Food Chem. 1998;46:4313–7.
- 154. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J Lab Clin Med. 1951;37(2):316-20.
- 155. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Scientific World Journal. 2013;2013:162750.
- 156. Bondarev SL, Knyukshto VN. Fluorescence and phosphorescence of rutin. Journal of Luminescence. 2013;142:236-40.
- 157. Pedriali CA. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
- 158. Pathan J, Janrao DM, Agarwal BR, Farooqui M. Studies on metal ligand stability constant of allopurinol and succinic acid with some metal ions in aqueos media. International Journal of Chemical Studies. 2014;1(5):36-41.
- 159. Domingo JL, Goméz M, Llobet J, Corbella J. Comparative effects of several chelating agents on the toxicity, distribution and excretion of aluminium. Human Toxicol. 1988;7:259-62.
- 160. Bekendam RH, Bendapudi PK, Lin L, Nag PP, Pu J, Kennedy DR, et al. A substrate-driven allosteric switch that enhances PDI catalytic activity. Nat Commun. 2016;7:12579.

- 161. Lin L, Gopal S, Sharda A, Passam F, Bowley SR, Stopa J, et al. Quercetin-3-rutinoside inhibits protein disulfide isomerase by binding to its b'x domain. J Biol Chem. 2015;290(39):23543-52.
- 162. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. Circ Res. 2014;114(7):1162-73.
- 163. Kuntic V, Filipovic I, Vujic Z. Effects of rutin and hesperidin and their Al(III) and Cu(II) complexes on *in vitro* plasma coagulation assays. Molecules. 2011;16(2):1378-88.
- 164. Sengupta P, Sardar PS, Roy P, Dasgupta S, Bose A. Investigation on the interaction of Rutin with serum albumins: Insights from spectroscopic and molecular docking techniques. Journal of photochemistry and photobiology B, Biology. 2018:183:101-10.
- 165. Sugiki M, Maruyama M, Yoshida E, Mihara H, Kamiguti AS, Theakston DG. Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. Toxicon. 1995;33(12):1605-17.
- 166. Alla MH, Enas AS, Asia M, Nesren MM, Ibrahim AM, Salah MB, et al. Differentiation between snake and bee venoms using fluorescence spectroscopy and computational approach. COJ Rev & Res. 2018;1(2):1-8.
- 167. Kumar R, Caruso IP, Ullah A, Lopes Cornelio M, Andres Fossey M, Pereira de Souza F, et al. Exploring the binding mechanism of flavonoid quercetin to phospholipase A2: fluorescence spectroscopy and computational approach. European Journal of Experimental Biology. 2017;07(05).
- 168. Bala E, Hazarika R, Singh P, Yasir M, Shrivastava R. A biological overview of hyaluronidase: a venom enzyme and its inhibition with plants materials. Materials Today: Proceedings. 2018;5(2):6406-12.

- 169. Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Eleuteri AM, Fioretti E, Angeletti M. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. Biochimie. 2006;88(9):1297-306.
- 170. Markland FS, Jr., Swenson S. Snake venom metalloproteinases. Toxicon. 2013;62:3-18.
- 171. Gutierrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C, Fox JW. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (symps): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. Toxins. 2016;8(10).
- 172. Gutierrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. Toxins. 2016;8(4):93.
- 173. Serrano SMT, Oliveira AK, Menezes MC, Zelanis A. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. Toxin Reviews. 2014;33(4):169-84.
- 174. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MAR. Thrombin-like and factor x-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb Haemost 1979;41(02):314-28.
- 175. Stocker K, Fischer H, Meier J. Thrombin-like snake venom proteinases. Toxicon. 1982;20(1):265-73.
- 176. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Bonfili L, Cecarini V, Eleuteri AM, Angeletti M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. Chem Biol Drug Des. 2009;74(1):1-15.
- 177. Xue G, Gong L, Yuan C, Xu M, Wang X, Jiang L, et al. A structural mechanism of flavonoids in inhibiting serine proteases. Food Funct. 2017;8(7):2437-43.

- 178. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon. 2008;51(8):1440-8.
- 179. 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(4):417-24.
- 180. Chacon F, Oviedo A, Escalante T, Solano G, Rucavado A, Gutierrez JM. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate *in vitro* assay. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology. 2015;93:41-50.
- 181. Gutierrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, Vargas M, et al. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. Toxins. 2017;9(5).
- 182. Maria W, Cambuy M, Costa J, Velarde D, Chávez-Olórtegui C. Neutralizing potency of horse antibothropic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. Toxicon. 1998;36(10):1433-9.
- 183. da Silva GA, Domingos TF, Fonseca RR, Sanchez EF, Teixeira VL, Fuly AL. The red seaweed *Plocamium brasiliense* shows anti-snake venom toxic effects. The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 2015;21:2.
- 184. de Souza JF, de Oliveira EC, da Silva ACR, da Silva VP, Coelho Kaplan MA, Figueiredo MR, et al. Potential use of extract of the plant *Schwartiza brasiliensis* (choisy) bedell ex gir.-Caãas against the toxic effects of the venom of *Bothrops jararaca* or *B. jararacussu*. Biomed Pharmacother. 2020;125:109951.

- 185. Domingos TF, Vallim MA, Cavalcanti DN, Sanchez EF, Teixeira VL, Fuly AL. Effect of diterpenes isolated of the marine alga *Canistrocarpus cervicornis* against some toxic effects of the venom of the *Bothrops jararaca* snake. Molecules. 2015;20(3):3515-26.
- 186. Ferreira LG, da Silva ACR, Noseda MD, Fuly AL, de Carvalho MM, Fujii MT, et al. Chemical structure and snake antivenom properties of sulfated agarans obtained from *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). Carbohydr Polym. 2019;218:136-44.
- 187. Kirchhofer D, Moran P, Bullens S, Peale F, Bunting S. A monoclonal antibody that inhibits mouse tissue factor function. J Thromb Haemostasis. 2005;3:1098–9.
- 188. Chantrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang JG, Parise LV, Kirchhofer D, et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. Blood. 2012;120(3):636-46.
- 189. Sparkenbaugh EM, Chantrathammachart P, Wang S, Jonas W, Kirchhofer D, Gailani D, et al. Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice. Haematologica. 2015;100(3):308-14.
- 190. Jenkins TP, Sanchez A, Segura A, Vargas M, Herrera M, Stewart TK, et al. An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. Toxicon. 2017;139:87-93.
- 191. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
- 192. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols. 2008;3(6):1101-8.

- 193. Wellmann IAM, Ibiapina HNS, Sachett JAG, Sartim MA, Silva IM, Oliveira SS, et al. Correlating fibrinogen consumption and profiles of inflammatory molecules in human envenomation's by *Bothrops atrox* in the brazilian amazon. Front Immunol. 2020;11:1874.
- 194. Thomson CA, Mccoll A, Graham GJ, Cavanagh J. Sustained exposure to systemic endotoxin triggers chemokine induction in the brain followed by a rapid influx of leukocytes. Journal of Neuroinflammation. 2020;17(1).
- 195. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends in Immunology. 2010;31(8):318-24.
- 196. Xue H, Li Y, Zhang W, Lu D, Chen Y, Yin J, et al. Pharmacokinetic study of isoquercitrin in rat plasma after intravenous administration at three different doses. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;49(3):435-41.
- 197. Da Silva FMA, Da Silva KPA, De Oliveira LPM, Costa EV, Koolen HH, Pinheiro MLB, et al. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2020;115.
- 198. Zhu S, Yan H, Niu K, Zhang S. Simultaneous Determination of Seven Components from Hawthorn Leaves Flavonoids in Rat Plasma by LC-MS/MS. Journal of Chromatographic Science. 2015;53(6):909-14.
- 199. Zhang S, Xie Y, Wang J, Geng Y, Zhou Y, Sun C, et al. Simultaneous determination of six bioactive components of total flavonoids of Scorzonera austriaca in rat tissues by LC-MS/MS: application to a tissue distribution study. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2018;28(2):156-64.

- 200. Bastarache JA, Sebag SC, Clune JK, Grove BS, Lawson WE, Janz DR, et al. Low levels of tissue factor lead to alveolar haemorrhage, potentiating murine acute lung injury and oxidative stress. Thorax. 2012;67(12):1032-9.
- 201. Goldstein I, Paakinaho V, Baek S, Sung M-H, Hager GL. Synergistic gene expression during the acute phase response is characterized by transcription factor assisted loading. Nature Communications. 2017;8(1).
- 202. Zhao J, Yu H, Liu Y, Gibson SA, Yan Z, Xu X, et al. Protective effect of suppressing STAT3 activity in LPS-induced acute lung injury. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2016;311(5):L868-L80.
- 203. Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as Revealed by Inducible Gene Activation in the Liver. Molecular and Cellular Biology. 2001;21(5):1621-32.
- 204. Yang X, Shao J, Wu XM, Pan FF, Yang SA, Pan XH, et al. Troxerutin Stimulates Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cell and Facilitates Bone Fracture Healing. Front Pharmacol. 2021;12:723145.
- 205. Knudsen C, Casewell NR, Lomonte B, Gutierrez JM, Vaiyapuri S, Laustsen AH. Novel snakebite therapeutics must be tested in appropriate rescue models to robustly assess their preclinical efficacy. Toxins. 2020;12(9).
- 206. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(2):e0007059.
- 207. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. Blood. 2008;111(10):4958-64.

- 208. Becatti M, Mannucci A, Argento FR, Gitto S, Vizzutti F, Marra F, et al. Super-Resolution Microscopy Reveals an Altered Fibrin Network in Cirrhosis: The Key Role of Oxidative Stress in Fibrinogen Structural Modifications. Antioxidants. 2020;9(8):737. 209. Lymbouris M. Effects of various oxidants and antioxidants on fibrin polymerisation'. *Reinvention: an International Journal of Undergraduate Research*. 2013;6(1).
- 210. Szabo IL, Kenyeres A, Szegedi A, Szollosi AG. Heme Oxygenase and the Skin in Health and Disease. Curr Pharm Des. 2018;24(20):2303-10.
- 211. Kämpfer H, Kolb N, Manderscheid M, Wetzler C, Pfeilschifter J, Frank S. Macrophage-Derived Heme-Oxygenase-1: Expression, Regulation, and Possible Functions in Skin Repair. Molecular Medicine. 2001;7(7):488-98.