

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

MARCOS MONTEIRO MACHADO

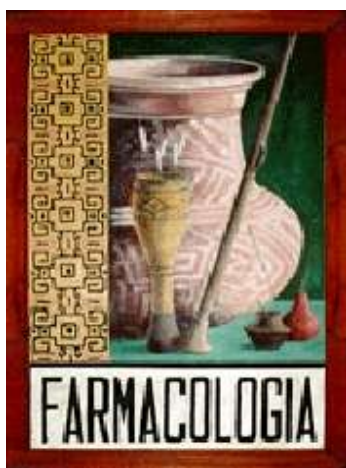
A FUCOSE SULFATADA É ESSENCIAL PARA A
CONDROITINA FUCOSILADA INIBIR A CITOTOXICIDADE
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E SUAS TOXINAS

RIO DE JANEIRO

2015

MARCOS MONTEIRO MACHADO

**A FUCOSE SULFATADA É ESSENCIAL PARA A
CONDROITINA FUCOSILADA INIBIR A CITOTOXICIDADE
DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* E SUAS TOXINAS**



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

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

**RIO DE JANEIRO
OUTUBRO / 2015**

Machado, Marcos Monteiro.

A fucose sulfatada é essencial para o sulfato de condroitina fucosilada (fucCS) inibir a miotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas toxinas / Marcos Monteiro Machado. – Rio de Janeiro: UFRJ / ICB, 2015.

xii, 97f.: il.; 31 cm.

Orientador: Paulo de Assis Melo

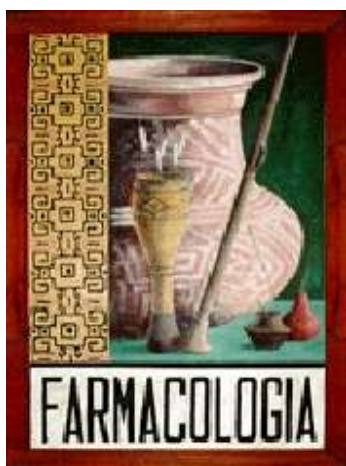
Tese (doutorado) – UFRJ / ICB / Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 68-84.

1. *Bothrops jararacussu*. 2. Sulfato de condroitina fucosilada (fucCS) 3. BthTX-I 4. BthTX-II 5. Miotoxicidade. I. Melo, Paulo de Assis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. A fucose sulfatada é essencial para a condroitina fucosilada (fucCS) inibir a citotoxicidade do veneno de *bothrops jararacussu* e suas toxinas.

MARCOS MONTEIRO MACHADO

**A FUCOSE SULFATADA É ESSENCIAL PARA A CONDROITINA
FUCOSILADA INIBIR A CITOTOXICIDADE DO VENENO DE *Bothrops
jararacussu* E SUAS TOXINAS**



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

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Aprovada por:

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo (Orientador)

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Prof^a. Dr^a. Russolina Benedeta Zingali

Prof^a. Dr^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas (Revisor)

**RIO DE JANEIRO
OUTUBRO / 2015**

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO...

... ao meu professor, orientador e mestre Paulo de Assis Melo pela orientação dedicada e constante incentivo ao aprendizado e ao crescimento pessoal. Além da amizade, do carinho e dos ótimos momentos e discussões ocorridas. A minha eterna gratidão e admiração.

... à minha mãe Leonor pelo incentivo educacional constante, criação adequada e formação sólida, pelo suporte familiar e amor incondicional.

... à meu pai Estevão (*in memoriam*) pelo carinho, ensinamentos e amoroso convívio.

... ao meus irmãos João e Ana pelo apoio e incentivo durante todo esse período.

... ao Prof. Roberto Fonseca (ICB) e ao Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão (IBqM) pelo isolamento do sulfato de condroitina fucosilada e derivados, e por auxílio nos experimentos de afinidade do fucCS ao veneno.

... aos meus colegas de laboratório, e grandes amigos: Sabrina Calil-Elias, Jeison Saturnino Oliveira, Etyene Castro Dip, Marcelo Amorim Tomaz, Fabrício Ferreira de Albuquerque Fernandes, Camila Ziccardi El-kik, Hilmar Dias Ricardo, Bruno Lemos Cons, Glauco Alexandre Gaban, Paula Alvarenga Borges, Vinícius Vieira Martins, Marcelo Abrahão Strauch, Jair Netto, Matheus Tavares Henriques, Fernanda Lece Siqueira, Douglas Conceição Santos, Fernando Chagas Patrão Neto, Jhonatha Mota Teixeira Cruz, José Roberto da Silva Rocha Júnior, Tatiana da Silva Gonçalves, Pedro Monassa de Souza, Laryssa Dias, Rafaela Camilo.

... ao técnico Natanael Rabelo Gonzaga, pela ajuda e convívio.

... aos funcionários Vinicius Meneguitte, Roberto Ignácio e Dayane Lopes.

... ao professor Luis Eduardo Menezes Quintas pela revisão cuidadosa e comentários precisos.

... aos professores Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão, Prof^a. Dr^a. Russolina Benedeta Zingali e Prof^a. Dr^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo por estarem presentes em minha banca examinadora.

... aos Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão e ao Prof. Newton Gonçalves de Castro por serem o suplente externo e interno, respectivamente, dessa tese.

... aos amigos do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal.

... aos professores Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal.

**“Há um olhar que sabe discernir o certo
do errado e o errado do certo.
Há um olhar que enxerga quando a obediência
significa desrespeito e a desobediência
representa respeito.
Há um olhar que reconhece os curtos caminhos
longos e os longos caminhos curtos.
Há um olhar que desnuda, que não hesita
em afirmar que existem fidelidades perversas
e traições de grande lealdade.
Este olhar é o da alma.”**

Nilton Bonder

RESUMO

MACHADO, Marcos Monteiro. A fucose sulfatada é essencial para a condroitina fucosilada inibir a citotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas toxinas. Rio de Janeiro, 2015. Tese de Doutorado (Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O acidente ofídico é doença negligenciada, e possui significativo impacto no Brasil. Dentre seus efeitos biológicos, o dano muscular é preocupante, pois a soroterapia apresenta baixa eficácia reduzir esse efeito, que causa grande morbidade aos acidentados. A serpente *Bothrops jararacussu* é uma das principais serpentes venenosas da região sudeste no Brasil, e apresenta um potente efeito miotóxico. O objetivo do estudo é avaliar a habilidade do sulfato de condroitina fucosilada (fucCS) e seus derivados, o sulfato de condroitina defucosilada (defucCS) e o sulfato de condroitina carbóxi-reduzida (fucCS-CR) em inibir atividades tóxicas do veneno bruto de *B. jararacussu* e suas toxinas isoladas, as bothropstoxinas (BthTX-I e BthTX-II). A atividade miotóxica *in vitro* induzida pelo veneno bruto (25 µg/mL), pela BthTX-I sozinha (10 µg/mL) e pelas toxinas juntas foram antagonizadas pelo fucCS e pelo fucCS-CR (50 µg/mL), o que não ocorreu com o defucCS. Observou-se um mesmo padrão de inibição pelo fucCS (1 e 10 mg/kg) em outros protocolos experimentais como o aumento dos níveis plasmáticos de creatinoquinase (CK), a redução do conteúdo de CK muscular e o aumento da mieloperoxidase (MPO) no músculo induzida pelo veneno isolado e pelas toxinas. O fucCS (10 mg/kg) ainda foi capaz de prevenir parcialmente a redução do número total de leucócitos no sangue induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* e o edema induzido pelo veneno e pelas toxinas. Além disso, o efeito pró-coagulante do veneno foi antagonizado por concentrações crescentes do fucCS (0,01-0,08 µg/µL),

embora esse polianionte tenha sido incapaz de impedir o sangramento na cauda e a hemorragia na pele, esta última induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*. As atividades fosfolipásica, hialuronidásica, proteolítica e colagenásica do veneno de *B. jararacussu* foram inibidas *in vitro* pelo fucCS (10-300 µg/mL), com maior eficácia nas duas primeiras. A microscopia de luz do músculo extensor dos dedos (EDL) mostrou uma mioproteção pelo fucCS (1 e 10 mg/kg), onde áreas necróticas, edema e células inflamatórias foram reduzidas quando comparadas ao veneno sozinho. No experimento de cromatografia por afinidade, o fucCS interagiu com componentes do veneno bruto, possivelmente as bothropstoxinas. Por fim, fucCS também inibiu a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II. Esses resultados sugerem que o fucCS pode ser capaz de interagir com ambas as toxinas. De forma conjunta, os dados mostram que o fucCS foi capaz de inibir a miotoxicidade e a inflamação induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* e suas toxinas fosfolipásicas. Dessa forma, o fucCS possui potencial para ser usado como adjuvante no tratamento de mordedura por serpentes no futuro.

Palavra-Chave: *Bothrops jararacussu*, sulfato de condroitina fucosilada (fucCS), BthTX-I, BthTX-II, miotoxicidade

Rio de Janeiro
Outubro / 2015

ABSTRACT

MACHADO, Marcos Monteiro. A fucose sulfatada é essencial para a condroitina fucosilada inibir a citotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas toxinas. Rio de Janeiro, 2015. Tese de Doutorado (Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Snakebite is neglected disease, and has possui significant impact on Brazil. Among biological effects, muscle damage is worrying because sorotherapy has low efficacy to antagonize this effect, which induces high morbidity to injured people. The *Bothrops jararacussu* snake is one of the main venomous snake in southeast region of Brazil, and particularly presents strong myotoxic effect. The aim of this study is to assess the ability of fucosylated chondroitin sulfate (fucCS), and its derivatives, defucosylated chondroitin sulfate (defucCS) and carboxy-reduced fucosylated chondroitin sulfate (fucCS-CR) to inhibit toxic activities of *B. jararacussu* crude venom and its isolated toxins, named bothropstoxins (BthTX-I and BthTX-II). The *in vitro* myotoxic activity induced by crude venom (25 µg/mL), by BthTX-I (10 µg/mL) alone and by toxins together were abolished by fucCS and fucCS-CR (50 µg/mL), while the same did not happen with the defucCS. We observed the same pattern of response to other experimental protocols with fucCS (1 and 10 mg/kg) like in the inhibition of the increase in plasma creatine kinase (CK) levels, skeletal muscle CK content and myeloperoxidase (MPO) activity induced by crude venom and isolated toxins. FucCS (10 mg/kg) partially prevented the reduction of total leukocytes in blood when pre-incubated with crude venom and edema induced by crude venom and its toxins. Furthermore, the venom procoagulant effect was completely antagonized by increasing concentrations of fucCS (0.01-0.08 µg/µL), although this polyanion could stop neither the tail bleeding nor the skin hemorrhage induced by

Bothrops jararaca venom. The *B. jararacussu* phospholipase, hyaluronidase, proteolytic and collagenase activities were inhibited *in vitro* by fucCS (10-300 µg/mL), the two former activities. Light microscopy of extensor digitorum longus muscle (EDL) muscle showed myoprotection by fucCS (1 e 10 mg/kg), once necrotic areas, edema and inflammatory cells were all decreased as compared to venom injection alone. In affinity chromatography experiment, fucCS interacted with crude venom components, possibly the bothropstoxins. Lastly, fucCS also inhibited BthTX-II phospholipase activity. These results suggest that fucCS was able to interact with both toxins. Altogether, data show that fucCS was able to inhibit myotoxicity and inflammation induced by *B. jararacussu* venom and its phospholipase toxins. Thus, fucCS has the potential to be used as an adjunct in the treatment of snakebites in the future.

Key words: *Bothrops jararacussu*, fucosylated chondroitin sulfate (fucCS), BthTX-I, BthTX-II, myotoxicity

Rio de Janeiro
October / 2015

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
BthTX-I	Bothropstoxina I
BthTX-II	Bothropstoxina II
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CK	Creatinoquinase
defucCS	Sulfato de condroitina defucosilada
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
fucCS	Sulfato de condroitina fucosilada
fucCS-CR	Sulfato de condroitina fucosilada carbóxi-reduzida
GPIb	Glicoproteína Ib
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GPVI	Glicoproteína VI
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Ácido hialurônico
kDa	QuiloDaltons
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon gama
LAOs	L-Aminoácido oxidases
MMPs	Metaloproteases de matriz
p.m.	Perimuscular
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PKC	Proteína quinase do tipo C
P-Lis	Polilisina
PSS	Solução salina fisiológica
sFLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretória
ST	Solução Trabalho
SVMP	Metaloproteases de veneno de serpentes
SVSP	Serinoproteases de veneno de serpentes
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos	1
1.2. Composição e atividades da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>	4
1.2.1. Fosfolipases e miotoxicidade	5
1.2.2. Hialuronidasas	10
1.2.3. Componentes do veneno envolvidos na hemostasia	12
1.2.3.1. Metaloproteases	12
1.2.3.2. Serino-proteases “thrombin-like”	14
1.2.3.3. Fosfolipases A ₂	16
1.2.3.4. Outros componentes que afetam a hemostasia	17
1.3. Inflamação no empeçonhamento	18
1.4. Substâncias antagonistas	21
1.5. Sulfato de Condroitina Fucosilada (fucCS) e derivados	22
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. MATERIAIS	28
3.1.1. Animais	28
3.1.2. Reagentes	28
3.2. METODOLOGIA	29
3.2.1. Atividade fosfolipásica	29
3.2.2. Atividade proteolítica	30
3.2.3. Atividade hialuronidásica	30
3.2.4. Atividade colagenásica	31
3.2.5. Miotoxicidade <i>in vitro</i>	32
3.2.6. Atividade pró-coagulante	33
3.2.7. Miotoxicidade <i>in vivo</i>	33
3.2.7.1. Avaliação da atividade de CK no plasma	33
3.2.7.2. Análise do conteúdo de creatinoquinase no músculo	34

3.2.8. Avaliação da atividade hemorrágica na cauda	35
3.2.9. Avaliação da atividade hemorrágica na pele	35
3.2.10. Atividade edematogênica	36
3.2.11. Leucometria total	36
3.2.12. Análise do conteúdo de MPO no músculo	37
3.2.13. Coluna de afinidade e Eletroforese	38
3.2.14. Histologia	39
3.3. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Atividades enzimáticas <i>in vitro</i>	40
4.2. Miotoxicidade <i>in vitro</i>	46
4.3. Avaliação da atividade de CK no plasma, conteúdo de CK e atividade mieloperoxidásica no músculo EDL	50
4.4. Atividade Edematogênica.....	52
4.5. Leucometria total.....	54
4.6. Hemostasia	55
4.7. Coluna de Afinidade e Eletroforese.....	57
4.8. Histologia	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8. ANEXO	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Empeçonhamento por serpentes é um problema de saúde pública em países tropicais, uma vez que o mesmo acarreta graves consequências que podem variar desde amputação de membros à morte. Os acidentes ofídicos possuem incidência e mortalidade maiores que doenças consideradas mais graves como febre hemorrágica causada pela dengue, cólera, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomoses e febre amarela (Williams e cols., 2010). No mundo, as regiões tropicais são as que possuem maior incidência de casos e maior número de óbitos relacionados aos mesmos, sendo as regiões do sul e sudeste asiático as que mais afetadas, quando comparadas à África, América Latina e América Central (fig. 1). No Brasil, o número de acidentes peçonhentos com serpentes no período de 2003-

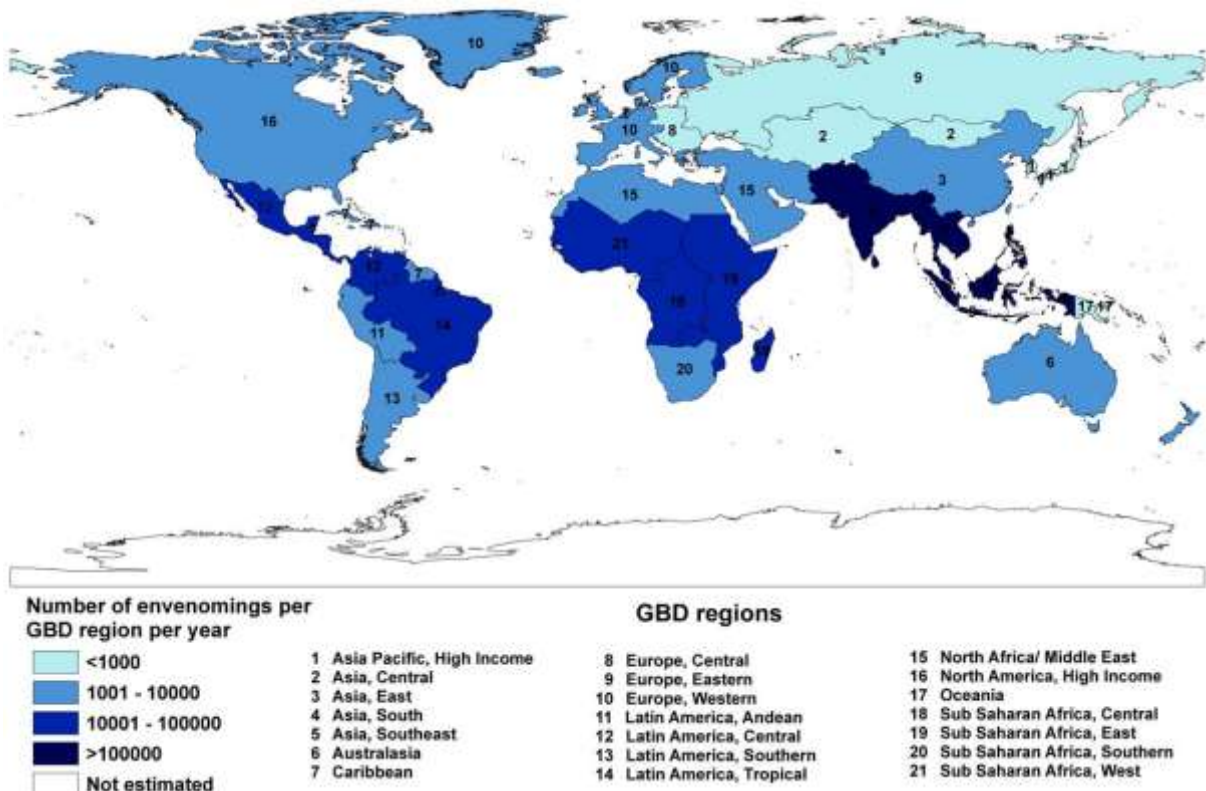


Figura 1 Estimativa regional de envenenamentos por serpentes (Retirado de Kasturiratne e cols., 2008).

2013 correspondeu a cerca de 30 mil casos anuais, sendo o gênero *Bothrops* responsável por 90% dos casos de serpentes identificadas, seguido pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* com 7,7%, 1,4% e 0,4% das ocorrências, respectivamente (Brasil, 2015). No Estado do Rio de Janeiro, localizado na região sudeste brasileira, alguns municípios localizados nas regiões Noroeste Fluminense e a Região Serrana apresentaram alta incidência de acidentes ofídicos. Dentre esses municípios encontram-se grandes produtores de feijão e horticultura, como o município de Varre-Sai e Bom Jardim (fig. 2) (Bochner & Struchiner, 2004). Estudos mostram uma correlação entre altas taxas de mortalidade por acidentes ofídicos e baixo Índice de Desenvolvimento Humano, alto percentual de trabalhadores na agricultura, baixo Produto Interno Bruto e baixo investimento em saúde, o que demonstra que a pobreza está fortemente correlacionada com consequências do ofidismo (Harrison e cols., 2009). Devido a essa maior exposição, os trabalhadores rurais de países pobres são o principal grupo de prevalência de casos de empecoamento (Pinho & Pereira, 2001).

Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, a espécie *Bothrops jararacussu* destaca-se pela sua distribuição ampla na região sudeste e por seu potencial citotóxico. Essa serpente caracteriza-se por possuir e presas retráteis bem desenvolvidas que podem inocular grande quantidade de veneno no local da mordedura (fig. 3) (Milani Jr. e cols., 1997).

Embora exista uma alternativa terapêutica que apresente uma excelente relação custo-efetividade, que é a soroterapia específica, a mesma ainda apresenta ineficácia em sua capacidade de impedir os danos teciduais no local da mordedura pela serpente (Melo & Suarez-Kurtz, 1988; Brown & Landon, 2010). A situação ainda é agravada devido a demora no atendimento do acidentado, o que acarreta dificult-

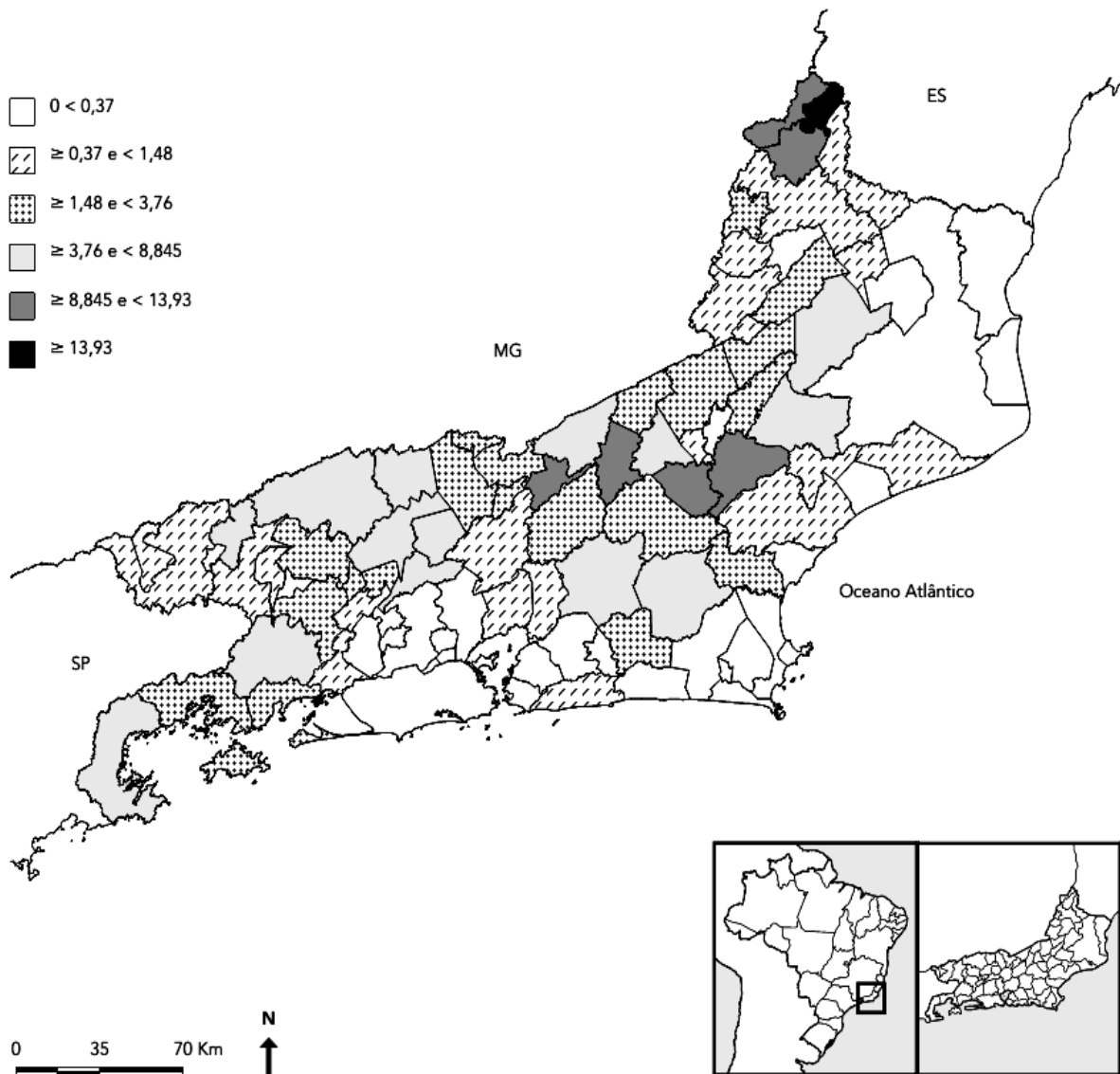


Figura 2 Coeficiente de incidência de acidentes por serpentes no Estado do Rio de Janeiro no período de 1990 a 1996. (Retirado de Bochner & Struchiner., 2004).

dades no tratamento do empeçonhamento, que contribuem com lesões no tecido muscular que acabam incapacitando esses indivíduos (Gutiérrez e cols., 2006; Chippaux, 2008; Warrell, 2010). A soroterapia é pouco eficaz no antagonismo da mionecrose causada pelos componentes do veneno, e não existem ainda alternativas terapêuticas e clínicas que melhorem esses efeitos (Mebis, 1986; dos Santos e cols., 1992; Cardoso e cols., 1993; Zamunér e cols., 2004; da Silva e cols. 2007; Gutiérrez e cols., 2009). Estudos recentes mostram que polianiontes como a

heparina, suramina, o fucoidan (isolado de fontes marinhas) extratos de plantas como a *Eclipta prostrata*, *Casearia sylvestris* e *Combretum leprosum* são eficazes na neutralização de miotoxinas *in vitro* e *in vivo*. (Mors et al., 1989; Melo e cols., 1993; Melo e cols.,1994; Lomonte e cols., 1994; Borges e cols., 2000; Calil-Elias e cols., 2002a; Arruda e cols., 2002; Murakami e cols., 2005; Azofeifa e cols., 2008; Fernandes e cols., 2014).

Dessa forma, os acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública, uma vez que os problemas sociais causados pelo mesmo incapacitam pessoas em sua faixa etária produtiva, e devido à sua incidência, que chega a mais de 13 casos por 100 mil no país (Brasil, 2015).



Figura 3 Serpente da espécie *Bothrops jararacussu*.

1.2. Composição e atividades da peçonha de *Bothrops jararacussu*

Os venenos das serpentes crotalídeas possuem substâncias que, quando inoculadas no tecido podem causar efeitos locais como edema, inflamação, mionecrose, e efeitos sistêmicos como distúrbios hemodinâmicos, cardiotoxicidade, lesão renal e mioglobínúria, e hipotensão (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Melo & Ownby, 1999; Gutiérrez & Ownby, 2003; Koh e cols., 2006; Montecucco e cols., 2008). Esses venenos são compostos por uma grande diversidade de substâncias

como fosfolipases A_2 , metaloproteases, serino-proteases, miotoxinas, pequenos peptídeos, cardiotoxinas, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, lectinas do tipo-C, íons metálicos, aminas biogênicas, carboidratos, aminoácidos, lipídeos e nucleosídeos (Mebs & Ownby, 1990; Sanchez e cols., 1992; Tu, 1996; Markland, 1998; Aird, 2002; Koh et al., 2006; Correa-neto e cols., 2010; Kang et al., 2011). Estudos de imunoma e transcriptoma demonstram que o veneno de *Bothrops jararacussu* possui fosfolipases A_2 , metaloproteases, lectinas do tipo-C, proteínas indutoras de apoptose vascular, serino-proteases, L-aminoácido oxidases, proteína semelhante à ablomina, proteínas precursoras de veneno rico em cisteína (CRISP), fator de crescimento neural (NGF) (Kashima e cols., 2004; Corrêa-neto e cols., 2010). Dentre estas, as fosfolipases A_2 que possuem diversos efeitos biológicos, principalmente na indução de resposta tecidual local como edema e miotoxicidade (Gutiérrez & Ownby, 2003).

1.2.1. Fosfolipases e miotoxicidade

As fosfolipases (FLA_2) compõem a principal família de substâncias químicas responsáveis pelas atividades biológicas de venenos de diversos animais peçonhentos desde anfíbios até insetos (Burke & Dennis, 2009). As FLA_2 induzem a hidrólise específica das ligações ésteres *sn*-2 dos fosfolipídeos, promovendo a liberação do ácido araquidônico, importante precursor de eicosanóides que participam do processo inflamatório. As FLA_2 são enzimas que possuem uma estrutura que varia entre 119 e 134 aminoácidos, baixa massa molecular, variando entre 13 e 15 kDa, necessitam de cálcio para atividade biológica, e apresentam entre 6 e 8 pontes dissulfeto, para conferir estabilidade à sua estrutura. As fosfolipases secretadas por glândulas de animais peçonhentos possuem estrutura tridimensional

semelhante à de fosfolipases A₂ secretórias (sFLA₂) de mamíferos. Elas possuem um “loop” chamado de “loop” pancreático com resíduos importantes para a formação de uma rede catalítica como as regiões His48, Asp49, Tyr52 e Asp99. Esses aminoácidos são importantes na capacidade de ligação da molécula de água à FLA₂ (His 48), dos íons cálcio (Asp 49) e polarização dos grupos fosfato e *sn*-2 carbonila da molécula de fosfolípido durante a hidrólise. A alteração bioquímica desses resíduos, seja por moléculas ou mutações, é capaz de alterar diversos efeitos biológicos como a perda das atividades enzimática, edematogênica, miotóxica, citotóxica, bactericida e anticoagulante (Arni & Ward, 1996; Soares & Giglio, 2003; Burke & Dennis, 2009; Montecucco e cols., 2008). Além disso, alquilação dos resíduos His48 diminuem sua miotoxicidade, mas não a sua antigenicidade (Guimarães et al., 2014).

As FLA₂, provenientes de diversos animais, podem induzir neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade, edema; promover a desestabilização de membranas artificiais; possuir efeito anticoagulante, anti-agregante plaquetário, hemolítico, convulsivante, hipotensivo; e possuir atividade bactericida, anti-HIV, anti-malária e antiparasitária (Soares & Giglio, 2003). Não só apenas as fosfolipases enzimaticamente ativas são capazes de promover essas atividade, haja visto que as enzimaticamente inativas são capazes de ativar processos fisiológicos como proliferação e migração celular (Valentim & Lambeau, 2000a). Dentre as toxinas presentes no veneno de *B. jararacussu* destacam-se duas miotoxinas fosfolipásicas denominadas bothropstoxina-I (BthTX-I) e bothropstoxina-II (BthTX-II). A BthTX-I possui o aminoácido lisina na posição 49 de sua sequência estrutural, enquanto que a BthTX-II possui um aspartato nessa posição. Dessa forma, essa última é capaz hidrolisar fosfolípidos das membranas celulares (Gutiérrez & Ownby, 2003), uma

propriedade conferida pelo aspartato. Já a BthTX-I, enzimaticamente inativa, é capaz de se ligar ao sarcolema, sem promover a hidrólise de fosfolípidos. No entanto, ela pode causar lesão celular, possivelmente por uma interação de cargas, já que essas FLA₂ possuem caráter catiónico, em contraste ao caráter aniônico da membrana plasmática (Ownby e cols., 1999; Valentim & Lambeau, 2000b, Murakami e cols., 2005). Além disso, outras diferenças entre ambas as toxinas incluem a presença de três triptofanos na BthTX-I e dois na BthTX-II, 9 tirosinas na BthTX-I e 10 na BthTX-II, 2 fenilalaninas na BthTX-I e 4 na BthTX-II, 2 histidinas na BthTX-I e 1 na BthTX-II (fig.4).

BthTX-I	MRTLWIMAVL	LVGVEGSLFE	LGKMILQETG	KNPAKSYGAY
BthTX-II	MRTLWIMAVL	LVGVEGDLWQ	FGQMILKETG	KLFPFYTTY
BthTX-I	GCNCGVLGRG	KPKDATDRCC	YVHKCCYKKL	TGCDPKKDRY
BthTX-II	GCYCGWGGQG	QPKDATDRCC	FVHDCCYGKL	TNCKPKTDRY
BthTX-I	SYSWKDKTIV	CGENNPCLKE	LCECDKAVAI	CLRENLTGTYN
BthTX-II	SYSRENGVII	CGEGTPEKQ	ICECDKAAAV	CFRENLRITYK
BthTX-I	KKYRYHLKPF	CKKADPC		
BthTX-II	KRYMAYPDVL	CKKPAEKC		

Figura 4 Sequência de aminoácidos das BthTX-I e BthTX-II.

As FLA₂ podem promover diferentes alterações de acordo com o tecido, independente das mesmas serem capazes ou não de promoverem a hidrólise de fosfolípidos, e essas alterações dependem do tipo de tecido exposto às FLA₂ (Kini & Evans, 1989; Lomonte e cols., 2003). No caso da miotoxicidade, por exemplo, ocorre com a ruptura da membrana plasmática, que promove um aumento da concentração do cálcio intracelular e potencialização dos efeitos das toxinas, além de estimular enzimas celulares a promoverem a apoptose. Após a lesão muscular, ocorrem edema e reação inflamatória com conseqüente recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e leucócitos para o local da lesão (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez & Ownby, 2003). As toxinas no veneno de *B. jararacussu*

são formadoras de poro na membrana e causam despolarização e degradação da membrana plasmática de células musculares esqueléticas (Harris, 2003; Melo & Ownby, 1996, Tomaz e cols., 2008). Esses efeitos ocorrem tanto com a BthTX-I, que promove a formação de poros por interação de cargas, quanto com a BthTX-II que hidrolisa os fosfolipídeos de membrana, que culmina com a mesma formação de poros.

No entanto, a miotoxicidade pode ocorrer não apenas ação direta das enzimas fosfolipásicas, mas também pelo comprometimento da microcirculação local, que ocorre tanto pela formação do edema quanto pela ação de toxinas hemorrágicas (Mebs & Ownby, 1990; Sanchez e cols., 1992; Tu, 1996; Gutiérrez & Ownby, 2003). Além disso, as toxinas FLA₂ isoladas da serpente *Bothrops jararacussu* provocam um aumento primário da concentração intracelular de cálcio, este proveniente das vesículas do retículo sarcoplasmático, seguido por um aumento secundário causado pelo influxo do cálcio extracelular (Cintra-Francischinelli e cols., 2009; Schaffazick e cols., 2010). Independentemente das capacidades das miotoxinas, a citotoxicidade dos venenos crotalídeos parece depender de aceptores celulares ainda não identificados, que aumentam a afinidade da ligação das toxinas ao tecido por interações divalentes (Montecucco e cols., 2008; Cintra-Francischinelli e cols., 2009).

Diversos antagonistas naturais e sintéticos têm sido descritos com a capacidade de inibir os efeitos miotóxicos das FLA₂ de serpentes crotalídeas. Dentre eles, destacam-se polianiontes como heparina e suramina; produtos marinhos como o fucoidan; extratos de plantas; substâncias isoladas como a wedelolactona; e substâncias envolvidas na inativação de resíduos-chave da FLA₂ como o brometo de p-bromofenacil (acetilação da His48) e o sulfonato de nitrobenzeno (trinitrofenilação

do Tyr52) (Melo e cols., 1993; Melo & Ownby, 1999; Arruda de cols., 2002; Azofeifa e cols., 2008). A heparina, um polissacarídeo endógeno, possui comprovada atividade antiofídica contra veneno do gênero *Bothrops* (Melo et al., 1993, Rostelato-Ferreira et al., 2010). Uma isoflavona isolada da *Dipteryx alata* (“baruzeiro”) demonstrou ser capaz de inibir paralisia neuromuscular induzida pelo veneno de *B. jararacussu* e a miotoxicidade induzida tanto pelo veneno bruto quanto pela BthTX-I, assim como o extrato bruto de *Combretum leprosum* (“mofumbo”) (Fernandes e cols., 2014; Ferraz e cols., 2014).

As miotoxinas fosfolipásicas possivelmente também participam da miotoxicidade por outros efeitos pleiotrópicos, como a inibição da Ca^{2+} -ATPase reticular pela BthTX-II e alteração na expressão de SERCA1 pelo veneno bruto de *B. jararacussu* em músculo esquelético (Schaffazick et al., 2010; Ayres et al., 2015). A BthTX-I também é capaz de promover o bloqueio neuromuscular *in vitro*, embora essa atividade não tenha significância clínica, uma vez que empeçonhamento por serpentes do gênero *Bothrops* não induzem neurotoxicidade *in vivo* (Gallacci & Cavalcante, 2010). Também foi descrita a capacidade da BthTX-I em estimular a secreção de insulina pela células β -pancreáticas (Fagundes e cols., 2011). Além disso, essas toxinas e o veneno bruto de *B. jararacussu* são capazes de promover dano ao tecido muscular cardíaco (Sifuentes e cols, 2008; Rodrigues e cols., 2014).

Outro grupo de substâncias envolvidas com a miotoxicidade são as metaloproteases, que promovem isquemia e dano muscular, como consequência de hemorragias e dano na microcirculação. Dentre fatores que contribuem para essa hipótese está a observação da mionecrose, lesão observada na histologia após exposição à ação de desintegrinas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, que ocorre somente *in vivo*, o que sugere que ocorra um dano secundário à hemorragia,

e não uma ação miotóxica direta pela metaloprotease sobre o tecido muscular. As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMP) além de danificarem a microcirculação podem impedir a regeneração do tecido muscular, por promoverem a destruição da lâmina basal, interrupção do fluxo sanguíneo adequado, o que impede a ativação de células satélites, fundamentais para a regeneração (Gutiérrez & Rucavado, 2000).

1.2.2. Hialuronidases

As hialuronidases são enzimas capazes de degradar o ácido hialurônico e estão presentes em peçonhas de diversos seres vivos como serpentes, vespas, lagartos, abelhas, fungos, bactérias, bacteriófagos, parasitas, sanguessugas, crustáceos, nematódeos, peixes, coelhos, camundongos, macacos e humanos (Frost e cols., 1996; Kemparaju & Girish, 2006). Essas enzimas muitas das vezes, por estarem presentes em pequenas quantidades, são negligenciadas quanto à capacidade de promoverem significativas alterações biológicas (Kreil, 1995). Elas podem ser divididas em três grupos: as hialuronoglicosaminidases; as hialoglicosidases e as hialuronidases bacterianas, que atuam em diferentes sítios para degradarem o ácido hialurônico. Esses diferentes grupos de hialuronidases promovem diferentes clivagens com a formação de tetra e hexassacarídeos como produto final. As hialuronidases de veneno de serpentes pertencem ao grupo das β -eliminases que clivam as ligações β 1-4 glicosídicas do ácido hialurônico, formando dissacarídeos insaturados (Girish e cols., 2009).

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo ácido, linear, sendo composto de unidade repetitivas de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina unidos por ligações β 1-3 e β 1-4, possui um caráter superficial negativo, massa molecular de até

6000 KDa, ausência de sulfato e não está ligado de forma covalente a nenhuma proteína ancoradora. Ele é o principal constituinte da substância fundamental amorfa presente na matriz extracelular, e apresenta um aspecto viscoso e impede a penetração de partículas estranhas no interior dos tecidos. Ele atua como um “cola” que segura proteínas e monômeros de agrecanos através de sua estrutura linear para fornecer um suporte mecânico à matriz extracelular. Além disso, o HA confere uma alta viscosidade às soluções e está envolvido em processos biológicos como fertilização, desenvolvimento embrionário, migração e diferenciação celular, tratamento de feridas, inflamação e crescimento e metástase de células tumorais (Kreil, 1995; Frost e cols., 1996; Kemparaju & Girish, 2006; Girish & Kemparaju, 2007; Girish e cols., 2009). O HA ainda tem um papel importante na prevenção do colapso circulatório que pode ser causado por queimaduras, sepse e choque, principalmente o causado por bactérias gram-negativas, além de importante papel na promoção da tumorigênese (Mio & Stern, 2002). Essa proteção ocorre devido ao HA ser um expansor de espaço extracelular, pois se liga a grandes quantidades de sais, íons metálicos e água (Mio & Stern, 2002; Kemparaju & Girish, 2006).

O veneno de *B. jararaca* possui uma SVMP, a Jararafibrase-I capaz de promover a difusão de toxinas sistêmicas, devido à sua capacidade de degradar o ácido hialurônico, mesmo quando inibida por anticorpos que previnem a coagulopatia induzida pelo veneno (Kemparaju & Girish, 2006). Foram descritos diversos inibidores de hialuronidase de venenos de serpentes e cobras como proteínas, glicosaminoglicanos, polissacarídeos, ácidos graxos, alcalóides, flavanóides e terpenóides, polifenóis e substâncias antioxidantes, lanostanóides e saponinas, fármacos antiinflamatórios, antialérgicos e antibióticos (Girish e cols., 2009), embora nenhum para a serpente *B. jararacussu*.

Além disso, os produtos da degradação do HA que possuem alta massa molecular podem causar um efeito antiinflamatório, o que contribuiria para a resposta do indivíduo a um empecoamento, enquanto que os fragmentos de baixa massa molecular possuem um efeito inflamatório. (Kemparaju & Girish, 2006).

1.2.3. Componentes do veneno envolvidos na hemostasia

1.2.3.1. Metaloproteases

Metaloproteases são enzimas que possuem multidomínios dependentes de Zn^{2+} e são capazes de promoverem a proteólise de diversas proteínas estruturais ou funcionais. As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMP) se assemelham às metaloproteases de matriz (MMPs) e são classificadas de PI a PIII, incluindo subtipos, de acordo com a constituição de seus domínios. O primeiro grupo (PIa) é composto apenas pelo domínio metaloprotease com o sítio de ligação do zinco; o segundo grupo PII, composto pelas subdivisões PIIa, PIIb, PIIc, PII d e PIIe, possui domínios adicionais não-catalíticos como desintegrinas; o terceiro grupo é composto de domínios tipo desintegrinas e domínios ricos em cisteína, nas subdivisões PIIIa, PIIIb e PIIIc. Além disso, o último grupo possui a subdivisão PIII d que é composto de todos componentes de outros subgrupos PIII mais dois domínios tipo lectinas conectados por ligações dissulfeto ao domínio rico em cisteína (Fox & Serrano, 2008).

Uma característica muito comum das metaloproteases é possuírem algum efeito sobre o sistema hemostático. Algumas SVMP são capazes de causar hemorragia *in vivo*, principalmente as pertencentes ao grupo PIII. Já as metaloproteases da família PI, comumente promovem um efeito pró-coagulantes

(Bjnarsson & Fox, 1994; Baldo e cols., 2001; Fox & Serrano, 2009). O veneno de *B. jararaca* possui diversas metaloproteases que induzem hemorragia e distúrbios da hemostasia, inibem a agregação plaquetária, se ligam ao colágeno, causam apoptose de células endoteliais, além de ativar fibroblastos, liberar angiostatina, citocinas e quimiocinas, e recrutar leucócitos. A principal delas é a jararagina, uma metaloprotease da classe PIII. Essa metaloprotease é considerada responsável pela degradação de proteínas de matriz, que causa o enfraquecimento da ligação de células endoteliais, e, conseqüentemente, lesam o endotélio e causam *angiorrexis*, um mecanismo no qual ocorre perda de oferta de sangue e oxigênio a determinado tecido (Jia e cols., 1996; Kamiguti, 2005; Moura-da-Silva e cols., 2007). A jararagina também é capaz de causar apoptose em células endoteliais, através da clivagem de caderinas e cateninas, que prejudicam a adesão das junções comunicantes e causam a ruptura da actina do citoesqueleto (Moura-da-Silva e cols., 2007).

Outras SVMPs do veneno de *B. jararaca* conhecidas como jararafibrase II, III e IV podem promover a hemoaglutinação na faixa nanomolar, efeito este antagonizado por quelantes de cálcio (Maruyama e cols., 2002). O veneno de *B. jararacussu* possui metaloprotease da classe PIII, chamada de BjussuMP-I (Mazzi e cols., 2004; Mazzi e cols., 2007), que possui atividade hemorrágica, atividade fibrinolítica com preferência de degradação da cadeia A α do fibrinogênio em relação à cadeia B β , e capacidade de inibir a agregação plaquetária causada pelo ADP ou colágeno (Mazzi et al. 2007). Já a BjussuMP-II, também isolada do veneno de *B. jararacussu*, é capaz de causar a proteólise do fibrinogênio, colágeno, fibrina, caseína e gelatina. Assim como a BjussuMP-I, a BjussuMP-II é incapaz de causar miotoxicidade, hemorragia e letalidade (Marcussi e cols., 2007).

Metaloproteases de outros venenos do gênero *Bothrops* também são capazes de promoverem hemorragia *in vivo* através da destruição parcial da lâmina basal (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Outras metaloproteases podem atuar na lâmina basal através da degradação de proteínas como colágeno, laminina, fibronectina e elastina (White, 2005).

Demonstrou-se que diversas substâncias como o clodronato e a doxicilina são capazes de antagonizar os efeitos hemorrágicos, coagulante e desfibrinogenante de metaloproteases (Rucavado e cols., 2008). E, clinicamente, algumas SVMP podem ser utilizadas como tratamento e prevenção da trombose e doenças cardiovasculares, ou como ferramentas de diagnóstico de distúrbios hemostáticos (Koh e cols., 2006; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

1.2.3.2. Serino-proteases “thrombin-like”

As serino-proteases de veneno de serpentes (SVSP) são enzimas definidas por um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo de serina altamente reativo, que desempenha um papel essencial na formação de um complexo transitório de acil-enzimas. As SVSP podem possuir atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica. Ela possuem grande capacidade de interferir em componentes da cascata de coagulação, fibrinolítico e do sistema de calicreínas-cininas do sistema hemostático. No entanto, a clivagem do fibrinogênio ocorre com seletividade maior pelo fibrinopeptídeo A ou B, na maioria dos casos, ou igualmente para ambos, promovendo a coagulação (Serrano & Mauron, 2005). As SVSP atuam de forma semelhante à trombina, embora com significativas diferenças estruturais e não tenha seletividade entre os fibrinopeptídeos, como a mesma. As SVSP isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* não são capazes de ativar o fator XIII, induzir a

agregação plaquetária e ativar o fator V, induzindo a coagulação (Kini e cols., 2002; Serrano & Mauron, 2005). Contudo, essa incapacidade de ativação do fator XIII associada à liberação de apenas um fibrinopeptídeo, acarreta na formação de um tampão de fibrina frouxo, que logo é disperso. Um exemplo é a batroxobina, isolada do veneno de *B. atrox*, que possui capacidade de produzir majoritariamente o fibrinopeptídeo A e não forma rede de fibrina estável (Kini e cols., 2001; Serrano & Mauron, 2005).

Já foram isoladas diversas SVSP do veneno de *B. jararacussu*. Zaganelli e cols. (1996) isolaram a FC-Bj, de massa molecular de cerca de 56 KDa, atividade coagulante do fibrinogênio, capaz de degradar tanto cadeias A α quanto B β do fibrinopeptídeo. Além disso, ela possui atividade amidolítica e atividade tipo caliceína, demonstrada pela contração de íleo e hipotensão seguida de bradicardia. Alguns inibidores de proteases são capazes de inibir seus efeitos, PMSF e benzamidina, e outros incapazes, como a heparina. Uma outra serino-protease isolada foi descrita por Andrião-Escarso e cols. (1997), sendo esta de massa molecular entre 30 e 37 KDa e possui seletividade para degradação de fibrinopeptídeo A α . Além disso, possui atividade esterásica e coagulante. Já Bortoleto e cols. (2002) descreveu uma outra SVSP chamada Jararacussina-I, que possui uma massa molecular de cerca de 28 KDa, capaz de clivar as cadeias de fibrinopeptídeos A α e B β com temperatura e pH ótimos de 37 °C e 7.4-8.0, respectivamente. Possui também atividade esterásica.

A BjussuSP-I, isolada e caracterizada por Pérez e cols. (2007), é incapaz de causar miotoxicidade, recrutamento de leucócitos, hemorragia, alterações morfológicas, aumentar a hemorragia intravascular ou causar a formação de trombos. No entanto, ela possui um importante efeito na desfibrin(ogen)ação e

causam um discreto edema. Por sua vez, Sant'Ana e cols. (2008) demonstraram a atividade pró-coagulante e tipo calicreína dessa enzima, e ausência de atividade sobre plaquetas. Além disso, foi possível constatar a presença de dois sítios de N-glicosilação, que aumentam em 50% a capacidade de formação da rede de fibrina por essa SVSP. Essa N-glicosilação, de acordo com Silva-Júnior e cols. (2007), também é importante na atuação SVSP BJ-48, que possui uma preferência na degradação da cadeia B β , que acarreta na formação de rede de fibrinas fracas.

Dessa forma, o consumo de fibrinogênio e fibrina pelas SVSP acarretam um efeito hemorrágico posterior, uma vez que ocorre a depleção desses elementos e, conseqüentemente, a incapacidade de formação de etapas cruciais para a formação da rede de fibrina e do plugue plaquetário (Markland Jr., 1998).

1.2.3.3. Fosfolipases A₂

As FLA₂ podem promover a hidrólise de fosfolípidos pró-coagulantes essenciais para a ativação tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. Algumas fosfolipases possuem alta afinidade por fosfolípidos aniônicos, como a fosfatidilserina, que participa da atividade pró-coagulante, e podem assim induzir hemorragia pela hidrólise dos mesmos. Assim, os distúrbios hemodinâmicos dessas enzimas poderiam ocorrer devido à competição de FLA₂ por fatores de coagulação para se ligarem a esses fosfolípidos (Mounier e cols., 2001). Já foi descrita uma região básica chamada de 'região anticoagulante', que compreende os resíduos 55-80 das FLA₂, e que o efeito anticoagulante dessas FLA₂ é inibido pela acetilação de resíduos de lisina. Dessa forma, sugere-se que as cargas positivas das lisinas seriam importantes para o efeito anticoagulante, não relacionando esse efeito à sua atividade enzimática, devido à região da toxina em

que se encontram esses aminoácidos. Além disso, outras FLA₂ podem inibir a coagulação por se ligarem diretamente ao fator Xa, um mecanismo independente de fosfolípídeos (Mounier e cols., 2001). Andrião-Escarso e cols. (2000) descreveu que a BthTX-II, uma fosfolipase enzimaticamente ativa do veneno de *B. jararacussu*, é capaz de induzir hemorragia, efeito esse totalmente inibido pelo tratamento como o brometo de *p*-bromofenacil.

Kini (2005) demonstra a importância de fatores importantes para atividade anticoagulante de fosfolipases, como: (a) a preservação do resíduo ativo His48, (b) a presença de fosfolípídeos hidrolisáveis, (c) a presença do Ca²⁺, e (d) atividade catalítica e não somente a capacidade de se ligar a fosfolípídeos. No entanto, outros fatores como: (a) a falta de correlação entre atividade catalítica e potência anticoagulante, (b) relação entre hidrólise de fosfolípídeos plasmáticos e efeito anticoagulante, (c) reversão do efeito anticoagulante por anticorpos após exposição à FLA₂, e (d) modificações químicas; reforçam a hipótese do efeito anticoagulante ser independente da atividade catalítica. Dessa forma, existem evidências que ambos os mecanismos contribuam para a atividade anticoagulante.

1.2.3.4. Outros componentes que afetam a hemostasia

As lectinas do tipo C afetam as plaquetas por se ligarem ao fator de von Willebrand (VWF) ou receptores como GPIb, a2b1 e GPVI. Dessa forma, esse grupo de enzimas pode causar a aglutinação de células sanguíneas, estimular células presentes em tecidos periféricos e se ligar a enzimas coaguladoras. Um exemplo, é a botrocetina, isolada do veneno de *B. jararaca*, que forma um complexo trimolecular com o VWF e GPIb para ativar as plaquetas. Além disso, a interação de lectinas do tipo C com a GPIb pode causar tanto a inibição da ativação das plaquetas quanto a

aglutinação das mesmas (Lu e cols. 2005). A jararafibrase III, uma SVMP que contém lectina do tipo C de baixo peso molecular (20 KDa) pode contribuir para o efeito hemorrágico do veneno de *B. jararaca* por promover hemoaglutinação (Maruyama e cols., 2002).

L-Aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas homodiméricas que catalisam a desaminação oxidativa de um substrato L-aminoácido para um α -cetoácido com amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este último produto capaz de inibir a agregação plaquetária, pois impediria a interação entre a integrina GPIIb/IIIa de plaquetas ativadas e fibrinogênio, de acordo com alguns autores. Outros, no entanto, defendem que o peróxido de hidrogênio pode possuir efeito pró-coagulante, embora por mecanismo ainda desconhecido (Lu e cols., 2005). As LAAOs estão presentes em serpentes viperídeas, crotalídeas e elapídeas, e possuem outros efeitos como a indução de apoptose, atividades bactericida, antiparasitárias e antivirais, e atividades hemorrágica e edematogênica (Zuliani e cols., 2009; Correa-neto e cols., 2010.).

Desintegrinas possuem entre 40 e 80 aminoácidos e contém uma seqüência de RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp) na parte carbóxi-terminal da molécula e inibem a agregação plaquetária via GPIIb/IIIa causada por ADP, trombina, colágeno e ácido araquidônico. Além disso, podem interagir com integrinas das subfamílias b1 e b3, incluindo o receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa, os receptores de vitronectina e fibronectina, e influenciarem na hemostasia (Lu e cols., 2005).

1.3. Inflamação no empeçonhamento

O efeito pró-inflamatório causado pelo veneno de *B. jararacussu* é um importante fator que pode exacerbar o dano tecidual local. As toxinas são capazes

de liberar agentes pró-inflamatórios endógenos como TNF- α , IL-1, IL-6 e INF- γ , além da ativação de leucócitos, sendo que glicocorticóides como a dexametasona podem antagonizar efeitos como a ativação e migração de leucócitos (Moura-da-Silva e cols., 2007; Patrão-Neto e cols., 2013). Já foram descritos componentes de serpentes do gênero *Bothrops* como uma metaloprotease isolada do veneno de *B. asper*, a BaP1, que é capaz de ativar, além dos fatores já citados, o sistema complemento gerando o fator C5a, uma quimiocina que auxilia no recrutamento de leucócitos; e também promove uma hipernocicepção de articulações por mecanismos de aumento concentrações de TNF- α e de PGE₂ (Fernandes e cols., 2007) . Além disso, a jararagina, presente no veneno de *B. jararaca*, também é uma potente toxina inflamatória e aumenta os níveis de leucócitos na área injetada, principalmente de neutrófilos, além de recrutar macrófagos. Isso ocorre pois ela possui a capacidade de mimetizar a atividade de metaloproteases de matriz em digerir a membrana basal dos vasos sanguíneos, causando o extravasamento de leucócitos; e também pela ativação direta de macrófagos com consequente liberação de mediadores inflamatórios (Moura-da-Silva e cols., 2007). Além disso, a jararagina também é capaz de induzir hiperalgesia mecânica por aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ e NF κ B (Ferraz e cols., 2015).

Um dos principais componentes capaz de promover resposta inflamatória é a fosfolipase, que induz mionecrose, que é seguida por uma abundante invasão de infiltrado inflamatório. Nesse processo os leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, são os primeiros a chegar à área lesada, de 3 a 6 horas após a inoculação do veneno, seguida por macrófagos horas mais tarde (Gutiérrez & Ownby, 2003). Teixeira e cols. (2003) demonstraram que a depleção de neutrófilos não diminui a extensão do dano agudo ao músculo induzido pela miotoxina I (Lys49)

do veneno de *B. asper*, o que demonstra que a participação dessas células não são essenciais para o dano tecidual muscular, já que elas chegam ao local da lesão horas após a injeção do veneno. No entanto, neutrófilos e macrófagos possuem um papel fundamental na remoção do tecido necrótico, uma etapa essencial para uma regeneração adequada do músculo, o que foi demonstrado pela incapacidade de regeneração muscular de camundongos neutropênicos após injeção do veneno (Teixeira e cols., 2003). No entanto, a dexametasona é capaz de reduzir o dano tecidual muscular, mesmo sendo incapaz de antagonizar *in vitro* a miotoxicidade induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (Patrão-Neto e cols., 2013). As FLA₂ do veneno *B. jararacussu* (BthTX-I e BthTX-II) são capazes de induzir edema, efeito este que é inibido pelo brometo de *p*-bromofenacil e pela heparina (Landucci e cols., 1998). O veneno bruto de *B. jararacussu* é capaz de promover uma resposta inflamatória dependente de prostanóides e neutrófilos. Evidenciou-se um aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 β e COX-2 durante a resposta edematogênica (Wanderley et al., 2014). Estudos recentes mostraram que receptores Toll-like do tipo 4 (TLR4) exercem um papel protetor na prevenção de um dano muscular induzido pelo veneno de *B. jararacussu* (Paiva-Oliveira et al, 2012).

A Bothropstoxina-I, isolada do veneno de *B. jararacussu*, é capaz de induzir a migração leucocitária *in vitro*, um processo inibido por inibidores de proteína quinase C (PKC) e pela toxina pertussis. Isso sugere que as FLA₂ do veneno de serpentes causam migração leucocitária através da ativação de FLA₂ endógenas, proteínas ligadoras de GTP, e PKC, e não somente através de fatores liberados após o dano tecidual. Assim, aumento de polimorfonucleares no tecido afetado pelo veneno de serpentes pode ter participação de FLA₂ citosólicas dessas células que promovem aumento da degranulação e motilidade celular (Du e cols., 2006). Sundell (2003)

demonstra que ocorre uma interação de fosfolipídeos aniônicos expostos em polimorfonucleares ativadas com as FLA₂ do veneno, sendo estas endocitadas e contribuem para a produção de quimioatraentes responsáveis pelo acúmulo de polimorfonucleares no local da mordedura.

Outros componentes presentes no veneno de serpentes podem interferir na resposta inflamatória como a clivagem de P-selectinas por metaloproteases, a interação entre plaquetas e neutrófilos. A jararagina é capaz de promover o acúmulo de leucócitos na área lesionada, um mecanismo parcialmente dependente de atividade catalítica e da presença de macrófagos. Recentemente, foram descritas outras substâncias como lectinas que são capazes de promoverem a migração e ativação de leucócitos humanos, induzindo a resposta imune inata do hospedeiro. (Elifio-Esposito et al., 2011).

1.4. Substâncias antagonistas

Diversas substâncias foram descritas como antagonistas de componentes de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Dentre estas destacam-se produtos naturais e polianiontes. O primeiro grupo compreende plantas como *Casearia Sylvestris*, *Humirianthera ampla*, *Combretum leprosum*, *Eclipta prostrata*, *Harpalyce brasiliiana*, *Mikania glomerata* e *Pentaclethra macroloba* (Mors e cols., 1989; Mors e cols., 2000; Soares e cols., 2005; Strauch e cols., 2013; Fernandes e cols., 2014). Dentre os polianiontes, tem especial destaque a heparina e a suramina, ambas com efeitos inibidores sobre o veneno bruto de *B. jararacussu* e suas toxinas fosfolipásicas.

Melo e cols. (1993) e Arruda e cols. (2002) demonstraram que a heparina e a suramina, respectivamente, são capazes de antagonizar diretamente efeitos

miotóxicos do veneno de *B. jararacussu*. Isso é extremamente relevante, uma vez que Da Silva e cols. (2007) demonstraram que o soro antibotrópico produzido por laboratórios públicos brasileiros são incapazes de antagonizar efetivamente a miotoxicidade induzida por esse veneno bruto na concentração neutralizante recomendada.

Além disso, o fucoidan, um polissacarídeo isolado de fontes marinhas com um caráter polianionte, foi capaz de reduzir a miotoxicidade in vivo induzida pelo veneno bruto de *B. asper* (Azofeifa e cols, 2008). Embora exista uma extensa bibliografia de substâncias capazes de antagonizar atividades diversas do veneno da serpente *B. jararacussu*, nenhum desses tornou-se um adjuvante à soroterapia.

1.5. Sulfato de Condroitina Fucosilada (fucCS) e seus derivados

O sulfato de condroitina fucosilada (fucCS), um polissacarídeo isolado da parede do corpo do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, possui uma estrutura química semelhante ao sulfato de condroitina de mamíferos. Assim, eles possuem um esqueleto principal que se alterna entre os resíduos de ácido β -D-glucurônico e N-acetilgalactosamina. No entanto, ele pode possuir substituições de sulfato ou de cadeias de α -L-fucopiranoses monossulfatadas ou dissulfatadas na posição 3 do ácido β -D-glucurônico (Vieira e cols., 1991; Mourão e cols., 1996; Mourão & Pereira., 1999; Borsig e cols., 2007), resíduos estes de fucopiranoses que protegem o fucCS da degradação por condroitinases. No entanto, após hidrólise ácida parcial com ácido sulfúrico, que remove os resíduos de fucose sulfatados, obtém-se um derivado defucosilado (defucCS), que possui propriedades químicas e fisiológicas distintas do fucCS e que pode sofrer degradação parcial pelas condroitinases. O fucCS pode sofrer outros tratamentos que originam uma molécula semelhante à original, mas

que sofreu uma carbóxi-redução na carboxila ligada ao carbono 5 do ácido β -D-glucurônico, o que origina o derivado carbóxi-reduzido (fucCS-CR) (fig. 5) (Vieira e cols., 1991).

Por possuir semelhança química com outros glicosaminoglicanos com ações fisiológicas como a heparina, dermatan sulfato e sulfato de condroitina, investigou-se e constatou-se que o fucCS possui potencial terapêutico no tratamento da aterosclerose, hemodiálise, fibrose, infecções virais e hiperglicemia (Mourão, 2004; Pomin, 2014). Parte desse potencial, como o uso em hemodiálise, como anticoagulante e antitrombótico, se justifica pelo fato desse polissacarídeo possuir potente ação anticoagulante, efeito esse causado por sua habilidade de potencializar a inibição da trombina tanto pela heparina cofator 2 quanto pela antitrombina (Mourão e cols., 2001). No entanto, essa propriedade anticoagulante é perdida após o processo de dessulfatação e desfucosilação, demonstrando que esses resíduos sulfatados são importantes para esse efeito. Além disso, a redução do grupamento carboxila (fucCS-CR) não interfere na propriedade potencializadora da antitrombina do fucCS (Mourão e cols., 1996), o que corrobora a importância dos resíduos de fucose sulfatada nesse efeito. Mourão e cols. (1998) demonstraram que o fucCS também possui um efeito antitrombótico, que é dependente da concentração plasmática do polímero, e o esse efeito é mantido na carbóxi-redução ou perdido com a remoção dos resíduos de fucose, assim como na avaliação da atividade anticoagulante. Além disso, o tempo de sangramento é aumentado em duas vezes com uma dose entre 1 e 5 mg/kg de fucCS (Mourão e cols., 1998. Mourão, 2015). O fucCS também demonstrou capacidade de inibir a interação de L- e P-selectinas com sialil-Lewis^X e sialil-Lewis^a, essenciais para a migração celular, o que acarreta uma forte redução no recrutamento de neutrófilos durante o processo inflamatório e

bloqueio de metástases de células tumorais (Borsig e cols., 2007). O fucCS ainda é capaz de modular o crescimento vascular do músculo liso, de otimizar o processo de proliferação celular, de induzir a angiogênese *in vitro*, e de promover a reorganização da actina no citoesqueleto (Tapon-Breaudière e cols., 2000; Tapon-Breaudière e cols., 2002). Uma vantagem do fucCS quando comparado a outros glicosaminoglicanos utilizados terapeuticamente é que o mesmo pode ser administrado por via oral, já que ele é resistente à digestão por enzimas que clivam os glicosaminoglicanos (Fonseca & Mourão, 2006). O fucCS pode causar hipotensão quando administrado até 5 mg/kg por via intravenosa, o que pode limitar o seu uso clinicamente, embora não se saiba se o seu uso oral interfere com os parâmetros hemodinâmicos (Fonseca e cols., 2010).

O defucCS é um derivado que perde as propriedades que o fucCS possui na hemostasia, sendo o resíduo de fucose sulfatada essencial para essas propriedades, uma vez que a defucosilação e a desulfatação aboliram a propriedade antitrombótica do fucCS, propriedade essa mantida após a carbóxi-redução. Tanto fucCS-CR quanto fucCS possuem valores de tempo parcial de tromboplastina ativada (aPTT) semelhantes, embora o fucCS-CR tenha uma média de tempo de sangramento um pouco menor que o fucCS (Mourão et al., 1996, 1998), *in vivo*. A defucosilação promove a perda da maioria das atividades do fucCS já descritas, e a sulfatação também parece ter um papel importante na manutenção de alguns desses efeitos (Pomin, 2015).

Dessa forma, devido ao potencial do fucCS para ser utilizado como antiveneno, como descrito anteriormente (Machado, 2010), é necessário que se investigue o mecanismo de ação de sua inibição das atividades enzimáticas e o

antagonismo dos efeitos tóxicos do veneno de *B. jararacussu* e o potencial de seus derivados frente à exposição ao veneno bruto e suas toxinas isoladas.

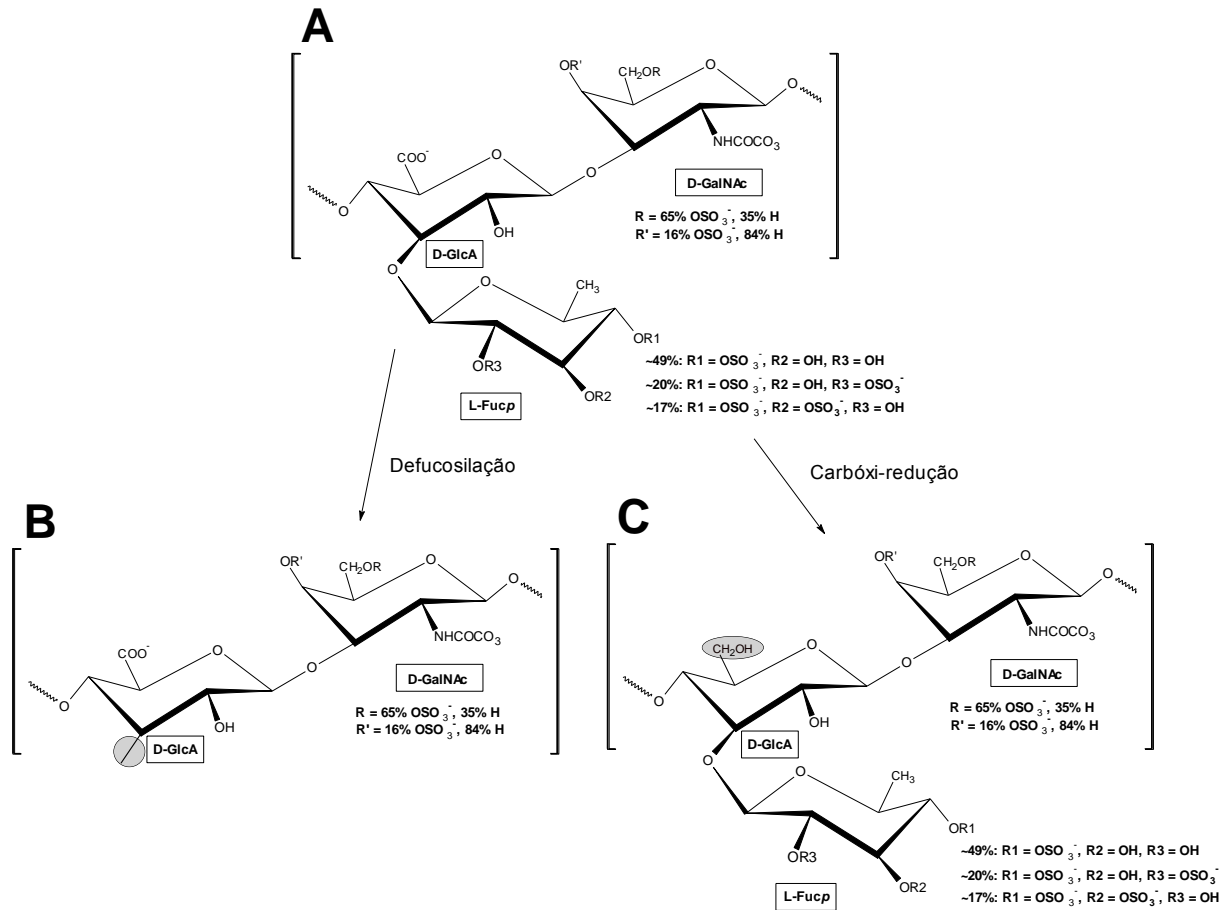


Figura 5 Estruturas químicas do fucCS, do defucCS e do fucCS-CR.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a atividade antiofídica do sulfato de condroitina fucosilada (fucCS) em experimentos *in vitro* e *in vivo* usando o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e suas toxinas isoladas, BthTX-I e BthTX-II, e determinar a relação de sua estrutura química com sua atividade.

2.2. Objetivos Específicos

1) Determinar a habilidade do Sulfato de Condroitina Fucosilada (FucCS), do Sulfato de Condroitina Fucosilada carbóxi-reduzido (fucCS-CR) e do Sulfato de Condroitina Defucosilado (defucCS) em antagonizar a atividade citotóxica e enzimática do veneno de *B. jararacussu* (BJU) em modelos experimentais, a saber:

in vitro:

- a) as atividades fosfolipásica, proteolítica, hialuronidásica e colagenásica;
- b) a atividade miotóxica usando o músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos;
- c) a atividade pró-coagulante do veneno no sangue de camundongos;

in vivo:

- d) as atividades miotóxica, hemorrágica, edematogênica, contagem de células sanguíneas e MPO no músculo EDL;
- e) Avaliar o músculo EDL em microscopia de luz após exposição ao veneno.

2) Investigar a capacidade do fucCS em antagonizar a citotoxicidade e inibir atividades enzimáticas das BthTX-I e BthTX-II em modelos experimentais, a saber: a

atividade fosfolipásica da BthTX-II e a atividade miotóxica usando o músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos (*in vitro*); e a miotoxicidade, edema e atividade mieloperoxidásica (*in vivo*).

3) Avaliar a interação do fucCS com os componentes do veneno de BJU em uma coluna de afinidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*) adultos, de ambos os sexos e pesando cerca de 25 ± 5 g. O animais foram mantidos à temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo de 12 horas de claro-escuro e receberam água e ração “*ad libitum*”. A manipulação e procedimentos com os animais obedeceram aos princípios da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo a aprovação dos mesmos registrada pelo protocolo DFBCICB 026.

3.1.2. Reagentes

Os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca* foram adquirido de criador particular de serpentes. O fucCS, o defucCS e o fucCS-CR foram gentilmente cedidos pelo Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão do Instituto de Bioquímica Médica (IBQmed/UFRJ). A BthTX-I e a BthTX-II foram cedidas pela Prof. Adélia Cristina Oliveira Cintra da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Para análise da creatinoquinase (CK) foi utilizado o kit da marca Bioclin®. O azocolágeno, a azocaseína, o Tris, o cetremide, o taurocolato de sódio e a albumina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Já o ácido hialurônico utilizado foi adquirido da Fluka® (St. Louis, EUA) e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada através da adaptação do método turbidimétrico de Marinetti (1965). Utilizou-se como substrato uma suspensão de gema de ovo de galinha, rica em fosfatidilcolina. Para o preparo da solução estoque (SE), a gema de ovo fresca foi separada da clara, coada e diluída em solução de NaCl 150 mM até o volume de 100 mL. A partir da SE, foi preparada uma solução trabalho (ST), a partir da diluição de 10% (v/v) da SE com NaCl 150 mM. A ST foi diluída ou concentrada pela adição de NaCl 150 mM ou SE, respectivamente, de forma que uma amostra de 200 µL da ST e 800 µL de NaCl 150 mM ao ser avaliada a absorvância a 925 nm obtivesse uma leitura na faixa de absorvância entre 0,700 – 0,750. A reação ocorreu em placas de ELISA de 96 poços, tendo como volume final de solução 200 µL e foram lidas em espectrofotômetro a 925 nm após a adição das soluções a cada 5 minutos durante 30 minutos. Para cada poço adicionou-se 4 µL de CaCl₂ 1M, 5 µL taurocolato de sódio 0,4%, 5 µL tampão Tris-HCl (pH 7,5; 0,2 M), 60 µL da ST e solução salina suficiente para o volume final de 200 µL. O volume correspondente ao veneno e fucCS foi de 20 µL, retirado do volume da solução salina. A adição do veneno (10 µg/mL), da BthTX-I (2,5-10 µg/mL), BthTX-II (2,5-10 µg/mL), da polilisina (2,5-10 µg/mL), do fucCS (1-30 µg/mL), do defucCS (1-30 µg/mL) e do fucCS-CR (1-30 µg/mL) ocorreram antes da adição das soluções, e adicionou-se 180 µL da solução teste. Os resultados foram expressos como porcentagem da variação da absorvância entre os minutos registrados em relação ao controle.

3.2.2. Atividade proteolítica

O estudo da atividade proteolítica foi realizado pelo método descrito por Garcia e cols. (1978). O método consiste na digestão de azocaseína e leitura do grupamento azo liberado para a solução, que gera coloração alaranjada. Foi preparada uma solução de azocaseína 0,4% diluída em solução 1:1 de salina 0,9% e NaOH 0,05 M. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 100 µL da solução de azocaseína a 0,4% (concentração final 0,2%), 50 µL de tampão Tris-HCl 0.2 M, pH 7,5, 4 µL CaCl₂ 1 M (concentração final de 20 mM) e água destilada qsp para 200 µL. O volume correspondente ao veneno (10 µg/mL), ao fucCS (1-300 µg/mL), ao defucCS (1-300 µg/mL) e ao fucCS-CR (1-300 µg/mL) foi subtraído do volume de água destilada. A reação ocorreu durante 90 minutos à temperatura de 37 °C e foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 15%. Cada tubo de ensaio foi centrifugado a 5000 rpm, a 20 °C durante 5 minutos. Após esse processo, alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram retiradas e, então, adicionadas a 75 µL de NaOH 2M e medida a absorbância em placas de ELISA no espectrofotômetro a 420 nm. Foi considerada como zero de atividade a leitura correspondente à alíquota sem o veneno e os resultados foram apresentados em percentual de atividade do controle do veneno versus concentração de fucCS.

3.2.3. Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi avaliada através do método de di Ferrante e cols. (1956). Foi utilizado como substrato o ácido hialurônico bovino (Fluka®, St. Louis, EUA) para avaliar a degradação do mesmo através da diminuição da turbidez da solução. O ácido hialurônico foi reconstituído com tampão acetato-ácido acético 0,2 M + NaCl 0,15 M pH 6,0. Foram adicionados ao poços da placa de ELISA 100

$\mu\text{g/mL}$ de ácido hialurônico e completado com o tampão para um volume final de reação de 100 μL . O veneno (50 $\mu\text{g/mL}$), o fucCS (1-10 $\mu\text{g/mL}$), o defucCS (1-10 $\mu\text{g/mL}$) e o fucCS-CR (1-10 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados antes do ácido hialurônico, sendo seus volumes descontados do tampão. A solução permaneceu por 60 minutos a 37 °C. Ao término, foram adicionados 200 μL de cetremide 2,5% e aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente, para realizar a leitura em espectrofotômetro a 400 nm. O tampão acetato-ácido acético foi utilizado como tubo branco e os resultados expressos em função da atividade hialuronidásica do veneno em relação a atividade na presença de diferentes concentrações de fucCS e seus derivados.

3.2.4. Atividade colagenásica

A avaliação da atividade colagenásica do veneno de *B. jararacussu* foi realizada pelo método colorimétrico adaptado de Chavira Jr. e cols. (1984). Preparou-se uma solução 0,3% de azocolágeno (Azocoll®, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,5. Esse substrato confere coloração lilás à solução após degradação e liberação do grupamento azo. Adicionou-se a cada tubo de ensaio 200 μL dessa solução (concentração final de 0,2%), 6 μL de uma solução de CaCl_2 a 1M (concentração final de 20 mM) e a solução tampão quantidade suficiente para 300 μL . Nos grupos que foram adicionados o veneno (50 $\mu\text{g/mL}$), o fucCS (1-200 $\mu\text{g/mL}$), o defucCS (1-200 $\mu\text{g/mL}$) e o fucCS-CR (1-200 $\mu\text{g/mL}$) os volumes foram subtraídos do tampão. A solução foi mantida a 37 °C por 90 minutos e agitada levemente a cada 10 minutos. Ao término desse período, os tubos foram centrifugados, coletados 150 μL do sobrenadante e a absorbância final da solução foi lida em espectrofotômetro a 520 nm em placas de ELISA. Os

resultados foram expressos em função da atividade colagenásica do veneno na presença de diferentes concentrações de fucCS e seus derivados.

3.2.5. Miotoxicidade *in vitro*

Foram utilizadas preparações de músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos para avaliação da lesão muscular. Os músculos foram cuidadosamente dissecados, de tendão a tendão, com auxílio de microscópio estereoscópico e, posteriormente, montados em cubas acopladas a um sistema de perfusão com capacidade de 2 mL, constantemente aerada com mistura carbogênica (5% CO₂ + 95% O₂) e banhados em meio nutritor com a seguinte composição em mM: NaCl (135,0); KCl (5,0); MgCl₂ (1,0); NaH₂PO₄ (1,0), NaHCO₃ (15,0) e dextrose (11,1), a temperatura ambiente (25°C). Os músculos foram perfundidos por 30 minutos em perfusão contínua durante tempo suficiente para estabilizar a taxa basal de liberação de CK e aqueles que tiveram fibras lesadas foram desprezados (Melo & Suarez-Kurtz, 1988). Após essa etapa, preparou-se soluções para perfusão contendo solução nutritora e o veneno bruto de *B. jararacussu* (25 µg/mL), toxinas (10 µg/mL) ou associado ao fucCS (10-50 µg/mL), defucCS (50 µg/mL) ou fucCS-CR (50 µg/mL) por 15 minutos à temperatura ambiente. A cada 30 minutos a solução nutritora com diferentes tratamentos e as amostras coletadas foram estocadas a temperatura de 4°C para análise da atividade de CK (Suarez-Kurtz & Eastwood, 1981), e novas soluções perfundidas. Ao final de cada experimento, os músculos foram pesados para correção da taxa de liberação de CK em relação a massa de músculo. Para a determinação da atividade de CK foi utilizado o kit, sendo o resultado expresso em unidades de enzima liberada para o meio nutritor por grama de músculo por hora (U. g⁻¹. h⁻¹), onde cada unidade de CK

representa a quantidade de enzima que catalisa a fosforilação de 1 μM de creatina por minuto a 25°C.

3.2.6. Atividade pró-coagulante

Para análise do efeito de fucCS na atividade pró-coagulante do veneno de *B. jararacussu*, foi realizada a contagem do tempo de coagulação *in vitro*, através do método de Lee & White (1913) modificado. Para tal procedimento, o sangue de camundongos foi coletado pelo saco conjuntival em capilares de micro-hematócrito não-heparinizados. Esses capilares foram previamente preenchidos com um volume de 15 μL de PSS, veneno (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sozinho ou incubado com concentrações crescentes de fucCS (0,01-0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e, posteriormente, os capilares foram completados com sangue até o volume máximo dos mesmos (70 μL) e o tempo de coagulação determinado. Os resultados foram expressos em percentagem considerando-se como 100% de atividade do veneno a diminuição do tempo grupo controle menos os valores do grupo veneno.

3.2.7. Miotoxicidade *in vivo*

3.2.7.1. Avaliação da atividade de CK no plasma

Para avaliação da lesão muscular *in vivo* foi utilizada a análise da atividade de creatinoquinase (CK) no plasma. Os camundongos foram injetados com dose de 1 mg/kg de veneno bruto de *B. jararacussu* (1 mg/kg) ou das toxinas (1 mg/kg), associadas ao fucCS (1 e 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) ou fucCS-CR (1 mg/kg) na região posterior da pata posterior. Após 2 horas da injeção, os animais foram anestesiados e o sangue coletado do saco conjuntival, por intermédio de capilares

de microhematócrito heparinizados e centrifugado por 5 minutos a 11000 rpm em centrífuga de microhematócrito. A atividade de CK no plasma foi determinada pelo método cinético em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm, sendo a atividade enzimática expressa em U/L. Cada unidade de CK representa a quantidade de enzima que catalisa a fosforilação de 1 μ M de creatina por minuto a 25°C. (Melo & Suarez-Kurtz, 1988).

3.2.7.2. Análise do conteúdo de CK no músculo

Para a análise do conteúdo de CK no músculo EDL, os camundongos receberam uma injeção perimuscular do veneno (1 mg/kg) ou toxinas (1 mg/kg), associadas ao fucCS (1 e 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) ou fucCS-CR (1 mg/kg) e após 24 horas eles foram anestesiados e sacrificados com éter etílico. Os músculos EDL do membro posterior direito de cada animal foram dissecados e isolados sem os tendões, secos em papel de filtro absorvente e pesados. Em seguida clivados em pequenos fragmentos e colocados em um tubo de ensaio com 500 μ L de solução contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (5 g em 1L de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0) para homogenização (IKA – ULTRA – TURRAX, T 25 basic, 20.500 rpm), sendo conservado no gelo. Após a homogenização, retirou-se 250 μ L da solução e adicionou-se a 100 μ L de albumina 2% e 150 μ L de salina 0,9%. Utilizou-se 5 μ L dessa solução para análise do conteúdo total de CK em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Os valores foram expressos em unidades por grama de tecido muscular (U/g). (Melo e cols., 1994)

3.2.8. Avaliação do sangramento na cauda

Para avaliação da atividade de fucCS frente ao aumento do tempo de sangramento da cauda causado pelo veneno de *B. jararacussu* (0,1-0,3 mg/kg) sozinho ou associado ao fucCS (1 mg/kg), utilizou-se camundongos suíços pesando cerca de 30 g. Estes foram anestesiados com pentobarbital (i.m.) e xilazina (i.p.) nas doses de 50 mg/kg e 2,5 mg/kg, respectivamente, e tiveram 1 cm distal da cauda cortado, sendo esta imersa em um tubo de ensaio com o volume de 4 mL de água destilada. Durante uma hora o tempo de sangramento da cauda dos animais foi analisado e após esse período cada tubo de ensaio foi colocado no vórtex por cerca de 10 segundos. Em seguida, foram coletados 100 µL da solução do tubo de ensaio e diluídos com 900 µL de água destilada, realizada a leitura no espectrofotômetro a 540 nm, e os resultados expressos em valores de absorbância (Dejana e cols. 1979).

3.2.9. Avaliação do sangramento na pele

Para avaliação da atividade hemorrágica dos camundongos foi utilizado o método descrito por Melo e cols. (1994). Os camundongos tiveram sua região ventral depilada e foram injetados, por via intradérmica, com 100 µL das soluções de solução salina fisiológica (PSS), de veneno de *B. jararaca* (1 mg/kg) associada ou não ao fucCS (1-10 mg/kg). Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados sob anestesia com éter etílico. As peles foram retiradas, estiradas e estocadas por 72 horas à temperatura ambiente (25°C). Depois de secas, as peles foram raspadas e recortadas em quadrados de 3,0cm de lado ao redor do ponto central da hemorragia. A intensidade da lesão hemorrágica foi determinada pela quantificação da densidade óptica, empregando luz policromática em equipamento

desenvolvido em nosso laboratório. As leituras dos valores obtidos nos tratamentos foram expressas unidades arbitrárias (Melo e cols., 1994).

3.2.10. Atividade edematogênica

Para avaliar a atividade edematogênica do veneno de *B. jararacussu* utilizou-se paquímetros para medir as distâncias ântero-posterior e latero-lateral no membro posterior do camundongo. O grau do edema observado nos animais foi realizado multiplicando os valores obtidos destas medidas e expresso em mm². Os camundongos foram divididos em grupos com 4 animais e receberam uma injeção intramuscular no músculo posterior da pata, da dose de 1 mg/kg para o veneno de BJU, BthTX-I e BthTX-II, sozinhos ou associados ao fucCS (1 e 10 mg/kg) em 60 µL de volume final. Em todos os animais as coxas foram medidas com o paquímetro nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção (Melo e cols., 2010).

3.2.11. Leucometrial total

O sangue utilizado para avaliação de células inflamatórias foi coletado do saco conjuntival dos camundongos expostos ao veneno de *B. jararacussu* e tratados com fucCS (1 e 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) e fucCS-CR (1 mg/kg) através de capilares de microhematócritos preenchidos com citrato de sódio para uma concentração final de 3,8%. Para a contagem da leucometria total foram diluído 20 µL do sangue anticoagulado em 380 µL de Líquido de Türck (2 ml de ácido acético glacial em 1L de água destilada, com algumas gotas de violeta Genciana). Esta solução promove hemólise pelo ácido acético e a coloração leve dos leucócitos pela violeta genciana, permitindo a visualização destes ao microscópio óptico. Foram adicionados 10 µL da diluição à câmara de Neubauer para a contagem dos

leucócitos, que ocorreu nos quatro quadrados maiores das arestas da câmara, sendo o número obtido multiplicado por cinquenta, que é o fator de diluição. O resultado expresso pelo número de células por mm^3 de sangue de acordo com Inwood e cols. (1983). O resultado final foi expresso em variação em porcentagem do número de células após a adição dos diversos protocolos experimentais.

3.2.12. Análise do conteúdo de MPO no músculo

Para a análise do conteúdo de CK no músculo EDL, os camundongos receberam uma injeção perimuscular do veneno (1 mg/kg) ou toxinas (1 mg/kg) associadas ao fucCS (1 e 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) ou fucCS-CR (1 mg/kg) e após 24 horas eles foram anestesiados e sacrificados com éter etílico. Os músculos EDL do membro posterior direito de cada animal foram dissecados e isolados sem os tendões, secos em papel de filtro absorvente e pesados. Em seguida clivados em pequenos fragmentos e colocados em um tubo de ensaio com 500 μL de solução HTAB para homogenização (IKA – ULTRA – TURRAX, T 25 basic, 20.500 rpm), sendo conservado no gelo. Após a homogenização, utilizou-se 100 μL do homogeneizado, que foi adicionado a 900 μL de uma solução contendo o-diasinodina 1 mM e água oxigenada 0,001%. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a cada 30 segundos durante 3 minutos a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidades de MPO, considerando que 1 U MPO é equivalente a quebra de 1 μM de H_2O_2 , que permite a mudança de $1,13 \times 10^{-2}$ na absorbância ($\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$) (Posadas e cols., 2004)

3.2.13 Coluna de afinidade e Eletroforese

A coluna de afinidade foi construída através do acoplamento do fucCS a uma coluna de resina de Sepharose ativada com CNBr, de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). A eficácia da ligação do fucCS à resina foi avaliada pela medição das propriedades metocromáticas da resina. Uma coluna controle foi feita pelo tratamento da resina sem a adição do polissacarídeo sulfatado. Em seguida, o veneno de *B. jararacussu* (100 mg) foi aplicado a coluna previamente equilibrada com Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) e conectada a um sistema de HPLC. A coluna foi lavada com 10 mL do tampão e realizada uma eluição a 0,5 mL/minuto usando um gradiente linear de NaCl (de 0 a 2 M). As frações foram coletadas e monitoradas em uma absorbância de 280 nm, e a concentração de NaCl determinada por condutividade. As colunas de afinidade foram cuidadosamente testadas com diferentes concentrações do veneno de BJU para assegurar condições não saturantes, o que propicia uma boa capacidade de ligação das proteínas do veneno ao fucCS (Fonseca et al., 2010). A massa molecular das frações isoladas foram estimadas em gel de eletroforese de poliacrilamida. Cerca de 10 mg de cada fração foi aplicada a um gel de poliacrilamida a 14% em barbital sódico (0,02M, pH 8,6), e a corrida realizada por 60 minutos a 100 V. Posteriormente, o gel foi corado com uma solução de azul de Coomassie 1% em ácido acético e lavada por 4 horas em uma solução de ácido acético 1%. A massa molecular foi determinada ao se comparar a mobilidade com a de compostos padronizados (Fonseca et al., 2010).

3.2.14. Histologia

Foram realizadas injeções perimuscular do veneno de BJU (1 mg/kg) e após 24 horas os animais foram anestesiados e eutanasiados em altas doses de éter etílico. Os músculos EDL foram dissecados, seccionados, e fixados com uma solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4). Em seguida, os músculos foram lavados três vezes no mesmo tampão e fixado por 1 hora em uma solução de tetróxido de ósmio 1%. Posteriormente, o tecido foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (30-100%), e embebidos em uma resina de Polybed 812. Utilizou-se um ultramicrótomo RMC para realizar secções de 500 nm para avaliação em microscopia de luz, sendo essas secções coradas com azul de toluidina 1% (Melo and Ownby, 1999; Calil-Elias et al., 2002b). Por fim, analisou-se em microscopia de luz os diferentes músculos expostos ao PSS, veneno de BJU e os tratados com doses de 1 e 10 mg/kg de fucCS.

3.3. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão, e para análise de vários grupos em procedimentos temporais foi utilizada o ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnet. Para análise de duas variáveis foi utilizado o teste de “two-way analysis of variance”, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram utilizados para indicar diferença significativa entre as médias. As regressões não-lineares de quarto parâmetros ($y = \min + [\max - \min / 1 + (x/EC_{50})^{\text{coeficiente de Hill}}]$) foram utilizadas para o delineamento das curvas e determinação de IC_{50} no programa Sigmaplot versão 8.02.

4. RESULTADOS

4.1. Atividades enzimáticas *in vitro*

O veneno bruto de *B. jararacussu* demonstrou possuir atividade fosfolipásica dependente da concentração após 30 minutos de contato com fosfolipídeos da gema de ovo de galinha, conforme descrito anteriormente (Machado, 2010). Dessa forma, utilizou-se a concentração de 10 µg/mL do veneno de BJU e o expôs a diferentes concentrações de fucCS, defucCS, fucCS-CR (1-30 µg/mL). O fucCS ($IC_{50} = 13,5$ µg/mL) e o fucCS-CR ($IC_{50} = 10,5$ µg/mL) foram capazes de inibir esta atividade de maneira dependente da concentração quando misturados ao veneno, enquanto que o defucCS foi incapaz (fig. 6A). A concentração máxima testada na presença do veneno foi capaz de inibir entre 85 e 90% da atividade fosfolipásica. Não foi possível avaliar concentrações maiores de fucCS, pois altas concentrações influenciam no método turbidimétrico..

A avaliação da atividade hialuronidásica do veneno de BJU demonstrou que essa atividade foi inibida pelo fucCS e pelo fucCS-CR. Ambas as substâncias foram capazes de inibir esta atividade de maneira dependente da concentração, quando associadas ao veneno (fig. 6B). O fucCS antagonizou a atividade hialuronidásica do veneno com IC_{50} de 4,5 µg/mL, e o fucCS-CR com IC_{50} de 3,6 µg/mL. Ambas as substâncias inibiram 100% da atividade hialuronidásica, enquanto que o defucCS, não alterou significativamente essa atividade induzida pelo veneno.

O veneno de BJU apresenta atividade colagenásica discreta e necessita de concentrações maiores (50 µg/mL) em relação as utilizadas para avaliação das atividades fosfolipásica e hialuronidásica. Observou-se que ocorreu uma inibição dependente da concentração, no entanto, esse antagonismo ocorreu apenas de forma parcial (fig. 6C). O percentual máximo de inibição foi de 60% do efeito, na

maior concentração testada de fucCS e 53% na de fucCS-CR. Novamente, o defucCS não inibiu essa atividade enzimática.

Por fim, o veneno bruto de BJU também demonstrou possuir uma atividade proteolítica dependente da concentração após exposição do mesmo ao substrato azocaseína, sendo a concentração de 10 µg/mL escolhida para ser antagonizada (Machado, 2010). O fucCS e o fucCS-CR tiveram menor potência inibitória em relação às outras atividade, inibindo no máximo 40% da atividade proteolítica na maior concentração testada. O defuccS não inibiu essa atividade de maneira significativa (fig. 6D).

Avaliou-se também a atividade fosfolipásica da BthTX-II e sua inibição pelo fucCS e derivados. A concentração de 10 µg/mL da BthTX-II produziu um efeito fosfolipásico proeminente, que, assim como o veneno bruto, foi inibido tanto pelo fucCS ($IC_{50} = 3,46 \mu\text{g/mL}$) quanto pelo fucCS-CR ($IC_{50} = 8,15 \mu\text{g/mL}$). O defucCS não inibiu significativamente a atividade fosfolipásica da toxina (fig. 7).

Por fim, avaliou-se se a BthTX-I é capaz de potencializar a hidrólise de fosfolipídeos promovida pela BthTX-II, *in vitro*. Demonstrou-se que a BthTX-I foi enzimaticamente inativa, conforme o esperado. No entanto, ao se associar as duas toxinas observou-se que a BthTX-I potencializou a hidrólise de fosfolipídeos da BthTX-II de maneira concentração dependente (fig. 8), sendo o efeito dessa associação também antagonizado pelo fucCS (fig. 10). Ao se expor a BthTX-II associada à polilisina em uma solução de gema de ovo, observou-se efeito semelhante ao resultado da exposição associada à BthTX-I. A polilisina, enzimaticamente inativa, potencializou o efeito da BthTX-II sobre os fosfolipídeos presentes na solução de gema de ovo (fig. 9).

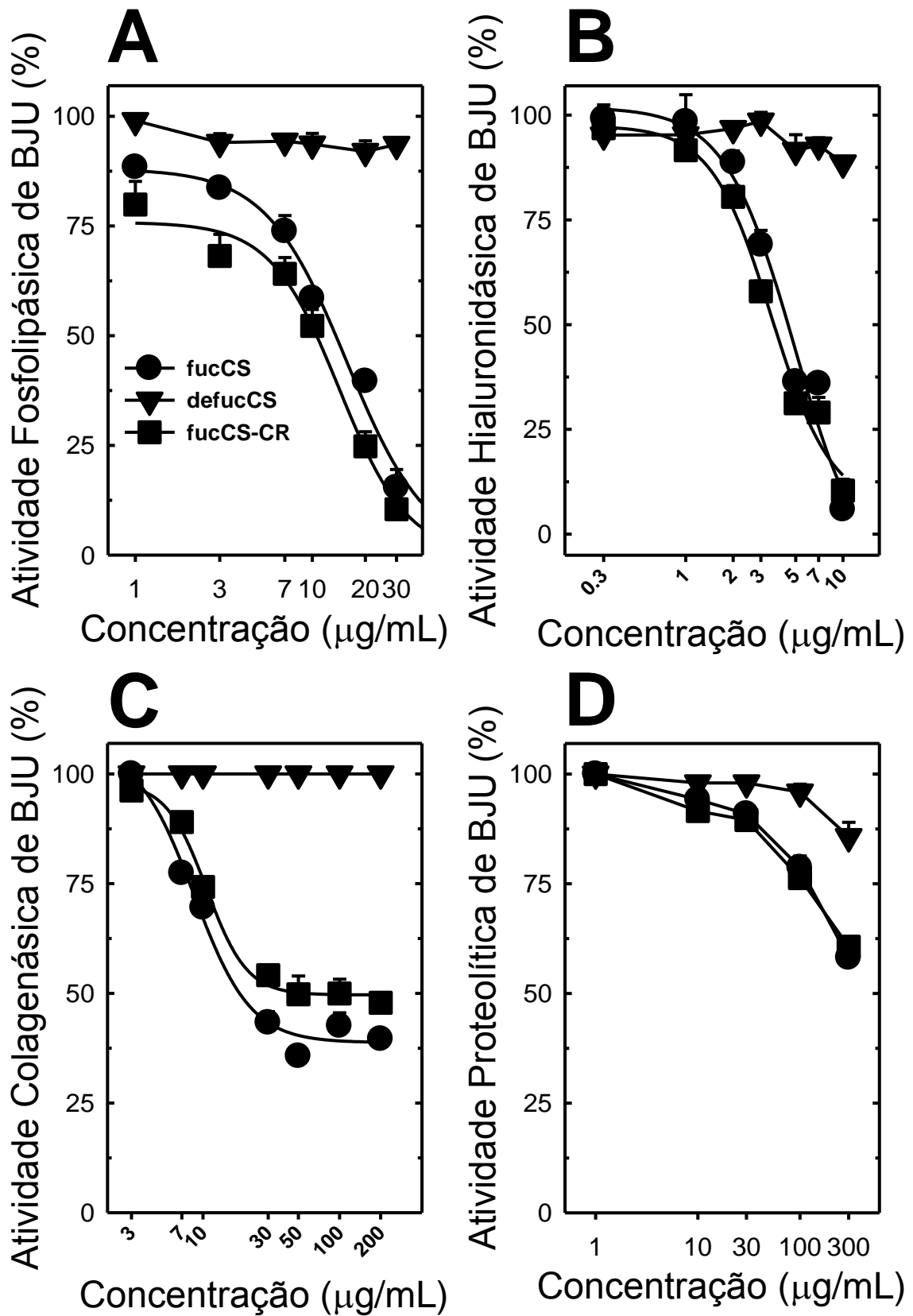


Figura 6 Atividades enzimáticas do veneno de BJV e sua inibição pelo fucCS e seus derivados. Os painéis **A**, **B**, **C** e **D** mostram, respectivamente, o efeito do fucCS, defucCS e fucCS-CR sobre as atividade fosfolipásica, hialuronidásica, colagenásica e proteolítica do veneno de BJV. (n=5-10)

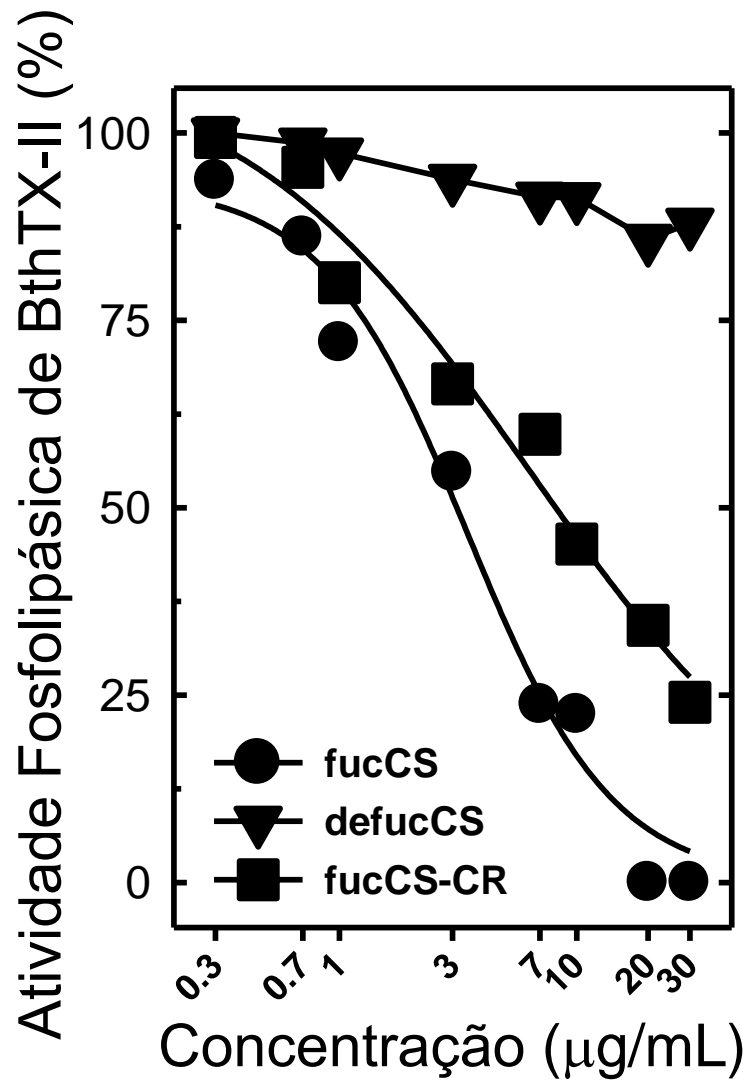


Figura 7 Atividade fosfolipásica da BthTX-II e seus antagonismo por fucCS e derivados. Observa-se que fucCS e fucCS-CR foram capazes de inibir a atividade fosfolipásica induzida por BthTX-II de maneira concentração dependente, e que o defucCS não inibiu significativamente essa atividade (n=5-10).

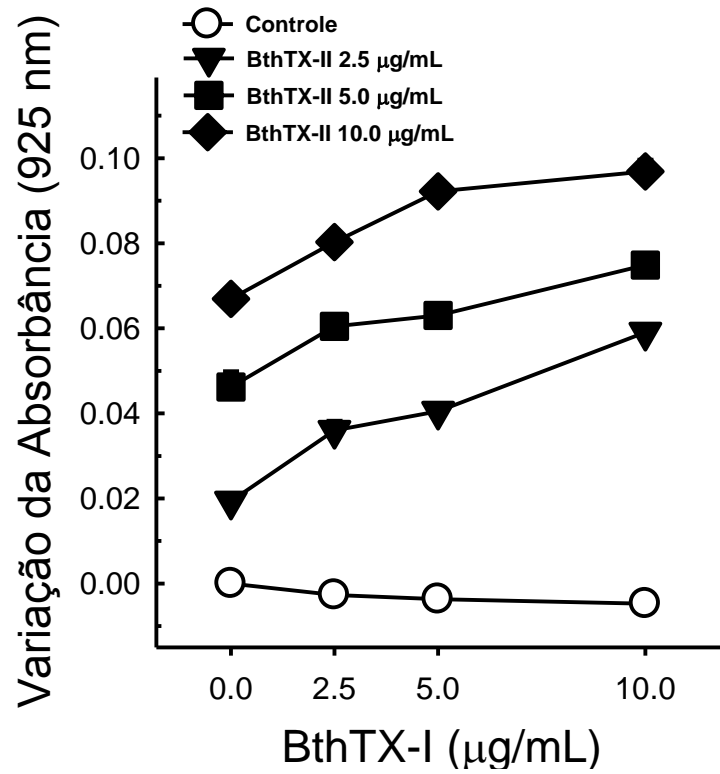


Figura 8 Atividade fosfolipásica da BthTX-II e na presença de BthTX-I. Observa-se que a BthTX-I foi capaz de potencializar a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II (n=4).

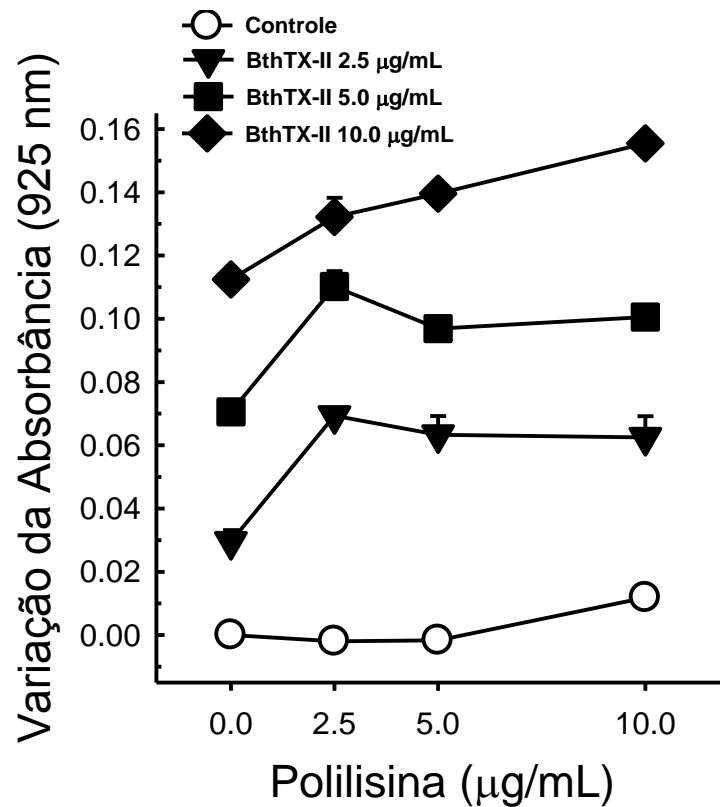


Figura 9 Atividade fosfolipásica da BthTX-II e na presença de polilisina. Observa-se que a polilisina foi capaz de potencializar a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II (n=4).

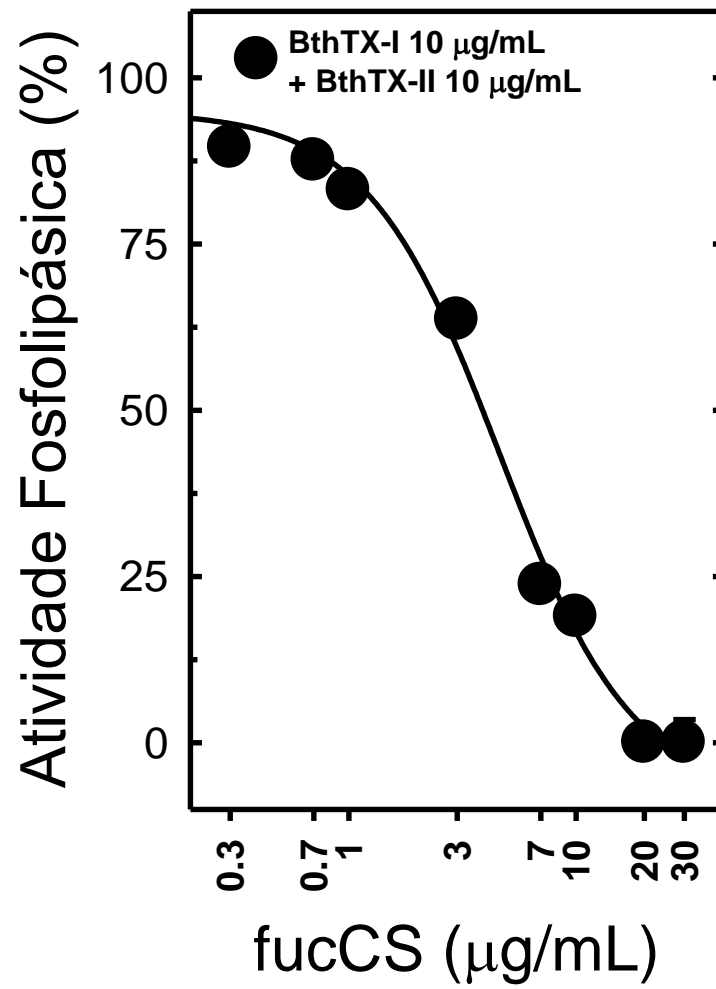


Figura 10 Atividade fosfolipásica da BthTX-II e na presença de BthTX-I. Observa-se que a BthTX-I foi capaz de potencializar a atividade fosfolipásica induzida pela BthTX-II (n=4).

4.2. Miotoxicidade *in vitro*

Após a exposição de músculos EDL isolados de camundongos ao veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, observou-se aumento da taxa de liberação de CK na solução nutritora. Os valores basais de CK aumentaram significativamente após 90 minutos de perfusão do músculo com 25 µg/mL do veneno bruto de BJU (fig. 11A). Quando se expôs o músculo EDL a uma solução contendo o veneno (25 µg/mL) associado a concentrações crescentes de fucCS (10-50 µg/mL), previamente misturados, foi possível avaliar que o aumento da taxa de liberação de CK foi inibida em todos os tempos analisados, sendo os níveis de CK até dez vezes menores que o do veneno na concentração de 50 µg/mL de fucCS (fig. 11A). Esta foi capaz de inibir 89% do efeito do veneno 90 minutos após a perfusão da solução (fig. 11A). Quando em contato com o defucCS, o veneno bruto manteve sua capacidade de promover o aumento dos níveis de CK no meio nutritor de maneira semelhante quando sozinho na solução (fig. 11B). Ao ser exposto com o veneno associado ao fucCS-CR, o músculo EDL liberou pequena quantidade de CK na solução nutritora, de maneira semelhante quando exposto ao fucCS (fig. 11C). Avaliou-se a reversibilidade do efeito miotóxico do veneno, através da alternância de solução contendo ou o veneno sozinho ou associado ao fucCS. Observou-se que a alternância reverteu o efeito miotóxico do veneno quando o fucCS com o veneno é perfundido depois do veneno sozinho, assim como minimizou o aumento da liberação de CK quando o veneno sozinho foi perfundido após a associação do veneno ao fucCS (fig. 11D). Em outro protocolo experimental, avaliou-se o efeito miotóxico da L-polilisina, uma molécula de caráter catiônico. Após a perfusão da solução com a mesma concentração utilizada com o veneno (25 µg/mL), a análise da liberação de CK indicou a ocorrência de dano tecidual muscular. Ao misturar a

solução de L-polilisina às mesmas concentrações do fucCS (10, 30 e 50 µg/mL) e avaliar os níveis de CK liberado pelo EDL notou-se que o fucCS foi capaz de inibir o efeito miotóxico da L-polilisina nas duas maiores concentrações (fig. 11E). Para se excluir a possibilidade do efeito de fucCS em reduzir os níveis de CK estar ocorrendo devido à interação direta com a enzima creatinoquinase, foi realizado um experimento com o Triton X-100 (0,1%). O Triton X-100 é um detergente capaz de dissolver as membranas celulares, causando lesão e, conseqüentemente, a elevação dos níveis de CK. Quando exposto o músculo ao Triton X-100 observou-se uma acentuada lesão e esta não foi impedida quando adicionado o fucCS (50 µg/mL) ao triton X-100 (fig. 11F). Dessa forma, descarta-se a ação do fucCS sobre CK, já que o fucCS é incapaz de impedir a ação miotóxica do detergente sobre o músculo EDL.

Realizou-se um protocolo semelhante, utilizando-se as toxinas isoladas do veneno de BJU, a BthTX-I e a BthTX-II. Observou-se que na concentração de 10 µg/mL a BthTX-I promoveu um pequeno aumento na taxa de liberação de CK na solução nutritora após 90 minutos de perfusão em relação ao basal (fig. 12A). A concentração de 10 µg/mL de fucCS foi capaz de impedir o aumento dos níveis de CK quando associado à BthTX-I antes da perfusão do músculo EDL. No entanto, a mesma concentração de BthTX-II não foi capaz de aumentar significativamente a taxa de liberação de CK após os 90 minutos de (fig. 12B). Quando associou-se a BthTX-II como o fucCS também observou-se uma alteração não significativa da taxa de liberação de CK para o meio nutritor. Por fim, realizou-se um protocolo no qual associou-se ambas as toxinas nessas mesmas concentrações e realizou-se o experimento. Observou-se que a associação potencializou a capacidade das toxinas

de induzirem a liberação de CK. Mais uma vez, 10 $\mu\text{g/mL}$ de fucCS foi capaz de inibir em grande extensão esse aumento (fig. 12C).

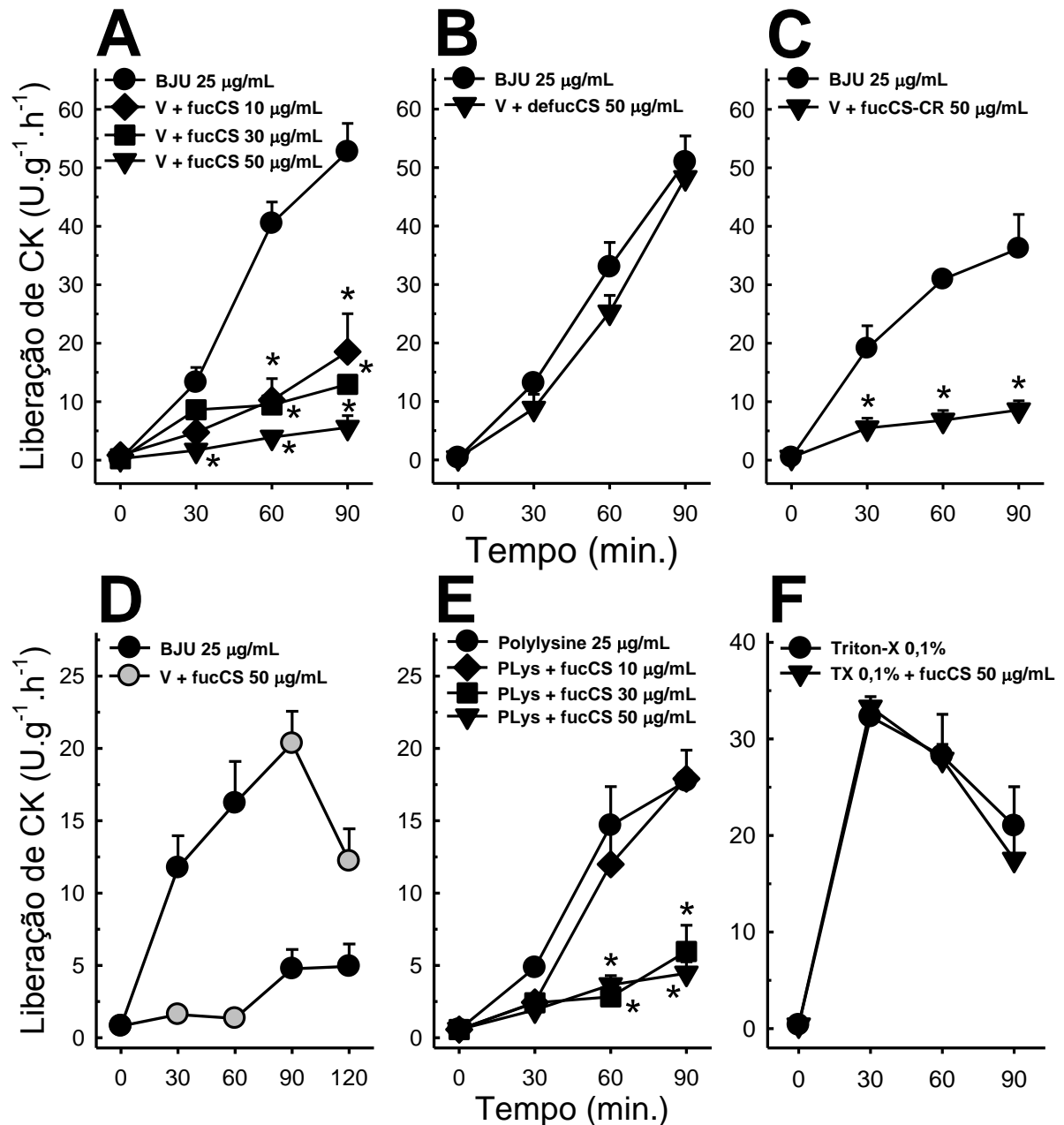


Figura 11 Efeito miotóxico do veneno de *B. jararacussu* (BJU), polilisina e triton X-100 no músculo EDL e sua exposição ao fucCS e derivados. No painel A observa-se o efeito do veneno de *B. jararacussu* (V) na taxa de liberação de CK do músculo EDL após 90 minutos de exposição quando desafiado a concentrações crescentes de fucCS (10-50 $\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$ vs BJU ($n=4-6$); No painel B observa-se o efeito do defucCS (50 $\mu\text{g/mL}$) misturado ao veneno (V) (25 $\mu\text{g/mL}$) e no painel C o efeito do fucCS-CR (50 $\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$ vs BJU e ($n=4$). No painel D observa-se a variação da exposição a soluções contendo apenas o veneno ou o veneno associado ao fucCS. No painel E observa-se o efeito do fucCS quando incubado com a polilisina (25 $\mu\text{g/mL}$) e o painel F quando incubado ao triton X-100 (0,1%) * $p < 0,01$ vs BJU e ($n=4$).

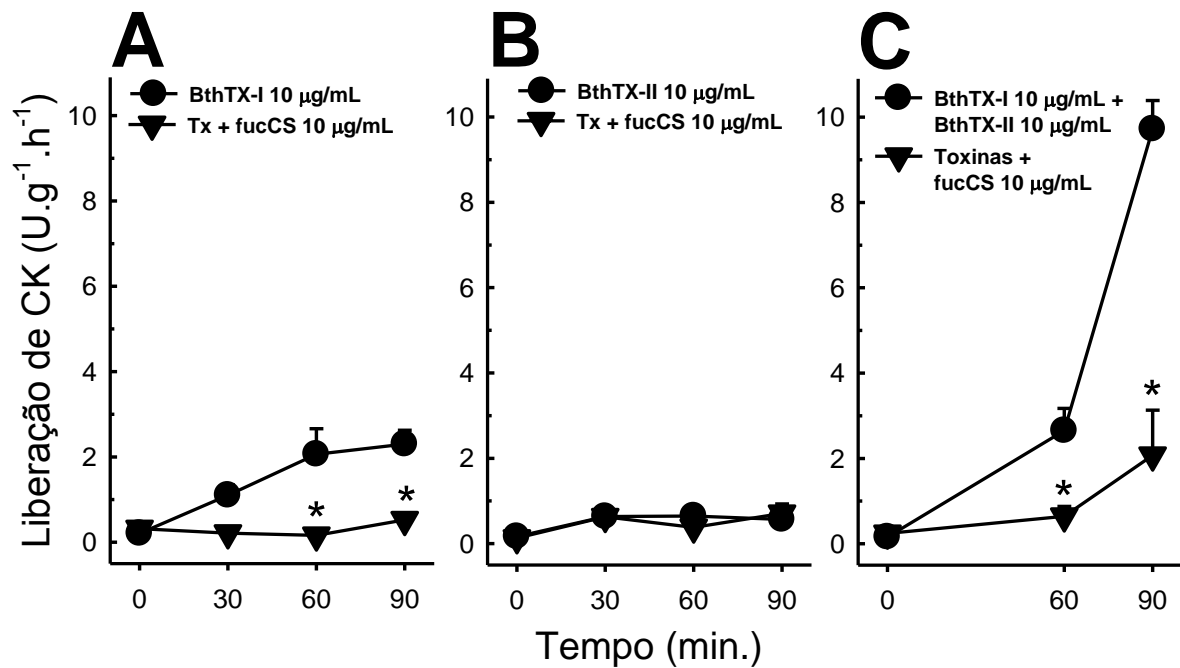


Figura 12 Avaliação do efeito miotóxico após exposição do músculo EDL às toxinas do veneno de BJU sozinhas ou associadas ao fucCS. No painel **A** observa-se a exposição do músculo a BthTX-I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sozinha e associada ao fucCS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e no painel **B** o efeito da BthTX-II (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sozinha e associada ao fucCS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No painel **C** associou-se a mesma concentração das duas toxinas, que foram perfundidas sozinhas ou associadas ao fucCS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0,01$ vs BJU e (n=4).

4.3. Avaliação da atividade de CK no plasma, conteúdo de CK e atividade mieloperoxidásica no músculo EDL

O efeito miotóxico *in vivo* do veneno de *B. jararacussu* e de suas toxinas foi avaliado 2 horas após a injeção do veneno (1 mg/kg) ou toxinas (1 mg/kg) por via perimuscular. Observou-se que o aumento dos níveis plasmáticos de creatinoquinase induzido pelo veneno bruto foi antagonizado quando misturado previamente ao fucCS e ao fucCS-CR, mas não pelo defucCS (fig. 13A). Quando misturado às toxinas, BthTX-I e BthTX-II, fucCS foi capaz de antagonizar esse efeito em ambas concentrações testadas (fig. 13D). Após 24 horas, o músculo EDL foi dissecado, homogeneizado, e analisados o conteúdo de CK e mieloperoxidase (MPO) no mesmo. Observou-se que o tanto o veneno bruto quanto as toxinas reduziram em mais de 50% o conteúdo de CK no músculo, e fucCS antagonizou parcialmente esse efeito induzido pelo veneno bruto (fig. 13B) e toxinas (fig. 13E). Observa-se que a dose de 10 mg/kg não foi capaz de antagonizar a miotoxicidade induzida por BthTX-II. O fucCS-CR (1 mg/kg) impediu a redução parcial dos níveis de CK, e o defucCS foi incapaz de impedir a miotoxicidade. O aumento da mieloperoxidase (MPO) foi maior quando ocorreu injeção do veneno bruto quando comparado às BthTX-I e BthTX-II. O fucCS 1 mg/kg antagonizou parcialmente esse efeito enquanto que a dose de 10 mg/kg antagonizou quase totalmente a migração de neutrófilos para o músculo EDL. Já o defucCS foi incapaz de antagonizar esse efeito e o fucCS-CR (1 mg/kg) teve um efeito semelhante ao fucCS (1 mg/kg) (fig. 13C). Ambas as doses de fucCS foram capazes de impedirem significativamente o aumento de MPO no músculo EDL induzido pelas toxinas (fig. 13F).

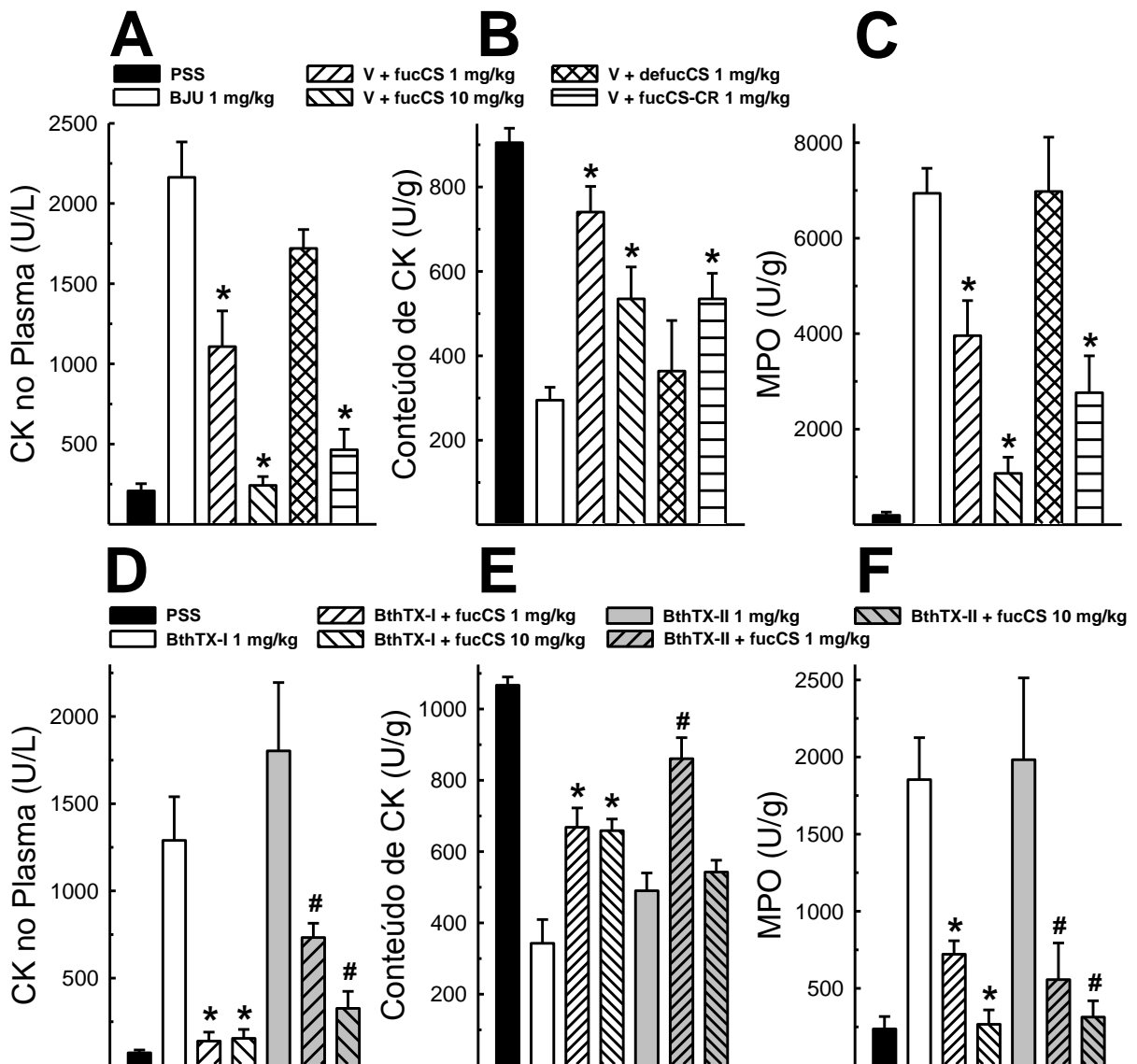


Figura 13 Efeito miotóxico *in vivo* e da mieloperoxidase do veneno de *B. jararacussu* e toxinas e seu antagonismo por fucCS e derivados. Pode-se observar no painel **A** o efeito do veneno de BJU (1 mg/kg) e seu antagonismo pelo fucCS (1 mg/kg) e fucCS-CR (1 mg/kg); e no painel **D** o das toxinas e seu antagonismo quando misturado a fucCS (1-10 mg/kg) duas horas após a injeção intramuscular do veneno. Os painéis **B** e **E** demonstram os níveis do conteúdo de CK no músculo nos mesmos protocolos experimentais, e a mioproteção pelo fucCS e fucCS-CR na exposição ao veneno de BJU, e do fucCS na exposição às toxinas. Os painéis **C** e **F** demonstram a inibição do aumento de mieloperoxidase no músculo EDL por fucCS e fucCS-CR, no protocolo do veneno bruto e antagonismo por fucCS no protocolo das toxinas isoladas. * $p < 0,05$ vs BJU, * $p < 0,05$ vs BthTX-I, # $p < 0,05$ vs BthTX-II (n=4-6).

4.4. Atividade Edematogênica

O veneno bruto de *B. jararacussu* possui atividade edematogênica quando comparado à injeção de PSS, claramente evidenciado pela área sob a curva (fig. 14B). Entre 15 e 30 minutos após a injeção ocorre o pico edematogênico e 60 minutos o retorno aos níveis basais (fig. 14A). O fucCS quando misturado ao veneno anteriormente à injeção foi capaz de impedir o efeito edematogênico na dose de 1 mg/kg. No entanto, a dose de 10 mg/kg foi incapaz de reduzir o edema e, inclusive, causou um aumento do mesmo (fig. 14A). Na figura 14C observa-se o efeito das toxinas no edema e que o mesmo foi antagonizado por fucCS em ambas as doses utilizadas, conforme evidenciado pela área sob a curva (fig. 14D).

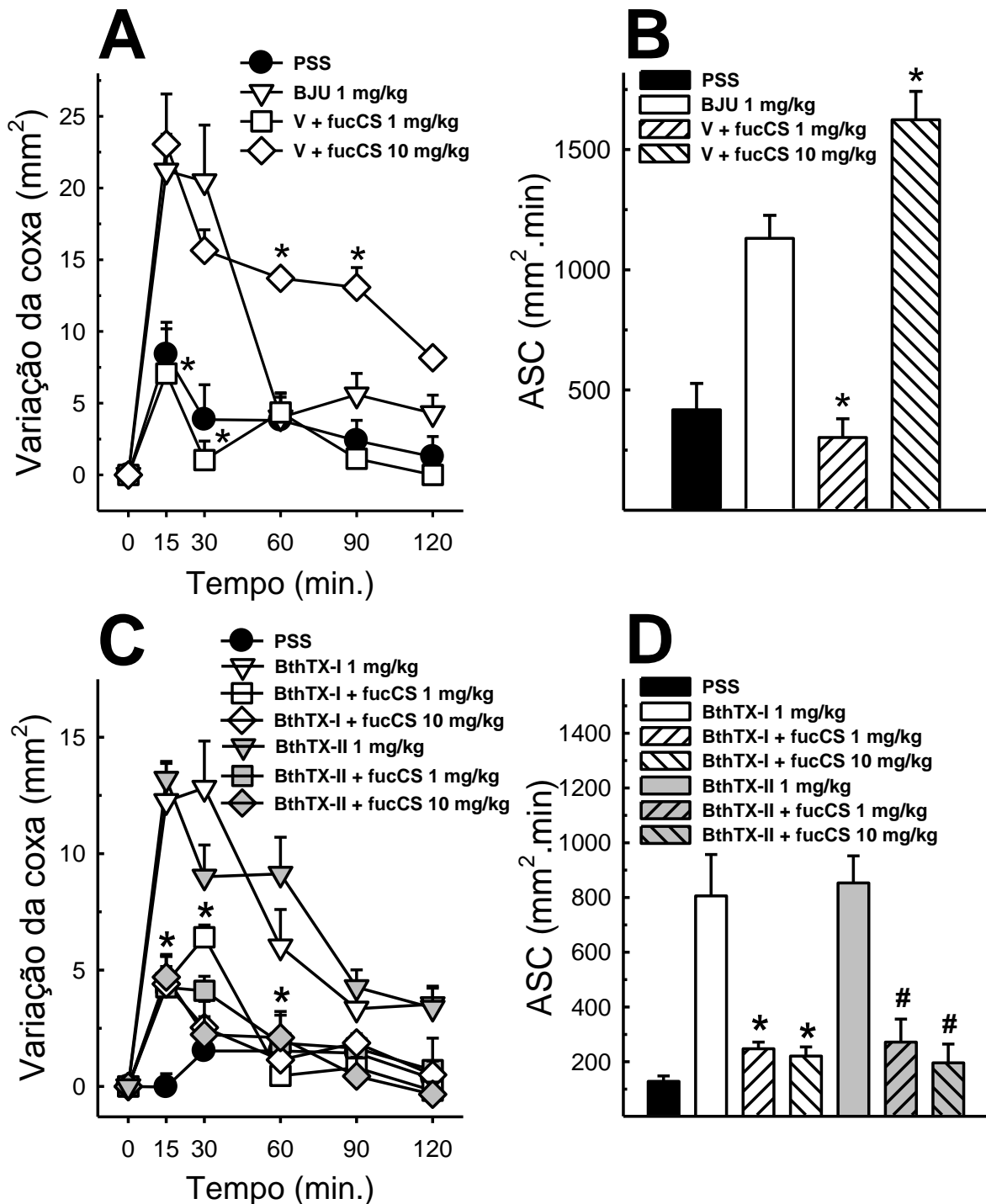


Figura 14 Atividade edematogênica do veneno de *B. jararacussu* e suas toxinas e antagonismo pelo fucCS. O painel **A** mostra o edema induzido pelo veneno por duas horas após a injeção e seu antagonismo pelas doses de 1 e 10 mg/kg de fucCS. * $p < 0,05$ vs BJU. (n=5); No painel **B** observa-se as áreas sob as curvas do painel A demonstram o efeito protetor da dose 1 mg/kg e o agravamento do edema na dose de 10 mg/kg. * $p < 0,05$ vs BJU (n=5). O painel **C** mostra o edema induzido pelas toxinas e antagonismo por 1 e 10 mg/kg de fucCS. * $p < 0,05$ vs BthTX-I e BthTX-II. (n=5); No painel **D** observa-se as áreas sob as curvas do painel. * $p < 0,05$ vs BthTX-I, # $p < 0,05$ vs BthTX-II (n=5).

4.5. Leucometria Total

O veneno bruto de *B. jararacussu* causa uma diminuição de quase 50% no número total de leucócitos circulantes após 4 horas da administração do mesmo. A dose de 1 mg/kg de fucCS foi capaz de impedir a queda do número de leucócitos circulantes 2 horas após a injeção. No entanto, esse antagonismo não foi sustentado quando avaliado o número de leucócitos 4 horas após a injeção. Já a dose de 10 mg/kg foi capaz de antagonizar o efeito do veneno 2 e 4 horas após a injeção do veneno com o fucCS (fig. 15). O defucCS não alterou o número de leucócitos quando comparado ao veneno bruto. Por sua vez, o fucCS-CR reduziu a migração de leucócitos apenas nas duas horas iniciais, assim como o fucCS.

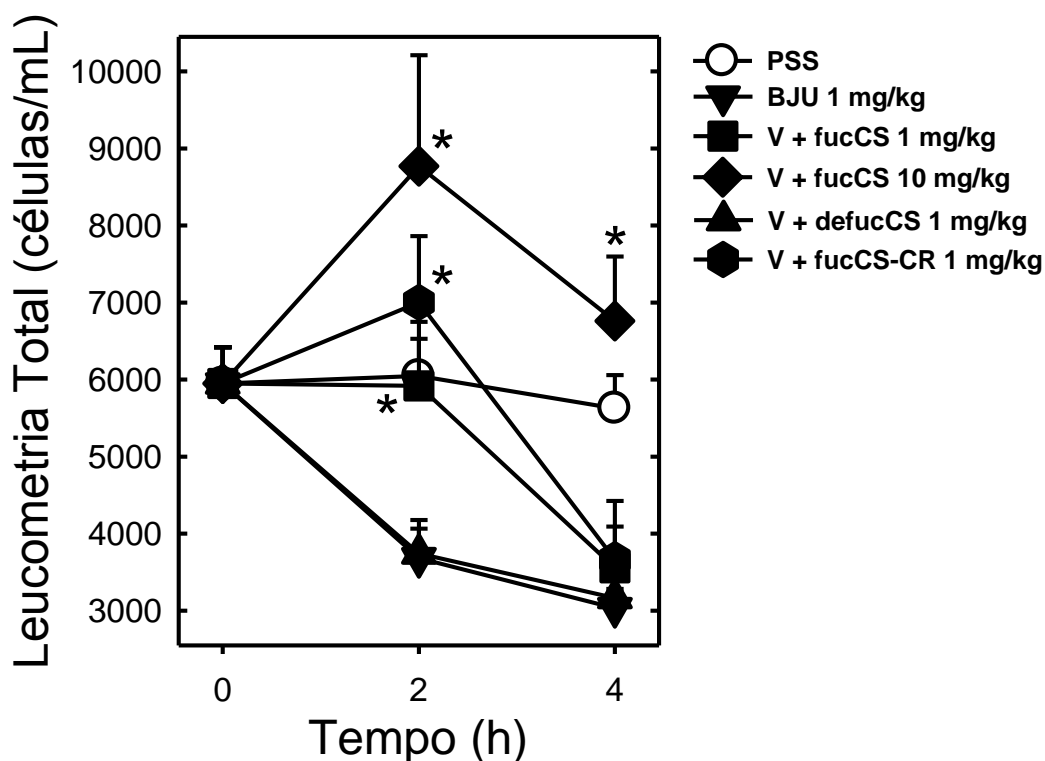


Figura 15 Contagem total de leucócitos após a injeção do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJU). Observa-se o efeito redutor de leucócitos na corrente sanguínea induzido pelo veneno (V) bruto (1 mg/kg). Quando se mistura diferentes doses de fucCS (1 e 10 mg/kg) ao veneno, observa-se que ocorre antagonismo parcial. Duas horas após a injeção ambas as doses foram capazes de impedir a queda de número de leucócitos induzida pelo veneno. No entanto, esse efeito não foi impedido quatro horas após a injeção o fucCS associado ao veneno. O defucCS não antagonizou esse efeito e fucCS-CR (1 mg/kg) teve um efeito semelhante ao fucCS na mesma dose avaliada (n=6-8).

4.6. Hemostasia

Na avaliação do sangramento na cauda induzido pelo veneno de *B. jararacussu*, percebeu-se que apenas a dose de 0,3 mg/kg foi capaz de causar um aumento significativo da coloração da solução, reflexo da quantidade de hemoglobina presente na mesma (fig. 16A). Dessa forma, essa dose foi escolhida para a indução da hemorragia nos animais. Avaliou-se a capacidade de fucCS (1 mg/kg) de antagonizar o sangramento induzido pelo veneno quando misturado a ele antes de ser injetado no animal. Observou-se que a dose administrada foi incapaz de reduzir o sangramento causado nos camundongos e, essa mesma dose também não alterou o tempo de sangramento quando injetada na ausência do veneno (fig. 16B).

O veneno bruto de *Bothrops jararaca* possui uma atividade hemorrágica significativa na dose de 1 mg/kg, sendo capaz de elevar a absorbância da pele em 146% quando comparado ao grupo controle. As doses de 1, 3 e 10 mg/kg de fucCS foram incapazes de reduzir essa atividade hemorrágica quando misturadas ao veneno previamente à injeção intradérmica. Essas mesmas doses também não causaram um aumento significativo na hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* (fig. 16C).

O efeito pró-coagulante do veneno de *Bothrops jararacussu* ocorre em baixas concentrações, sendo que a concentração de 0,1 µg/µL escolhida para induzir a coagulação de forma extremamente rápida (Machado, 2010). Observou-se que o efeito pró-coagulante foi abolido por concentrações crescentes, sendo que apenas a concentração de 0,8 µg/µL foi capaz de antagonizar totalmente essa atividade (fig. 16D). Essa concentração de fucCS quando adicionada na mesma concentração ao sangue na ausência do veneno tornou o sangue incoagulável em um limite de

observação de 20 minutos. O IC_{50} da inibição da atividade pró-coagulante foi de 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

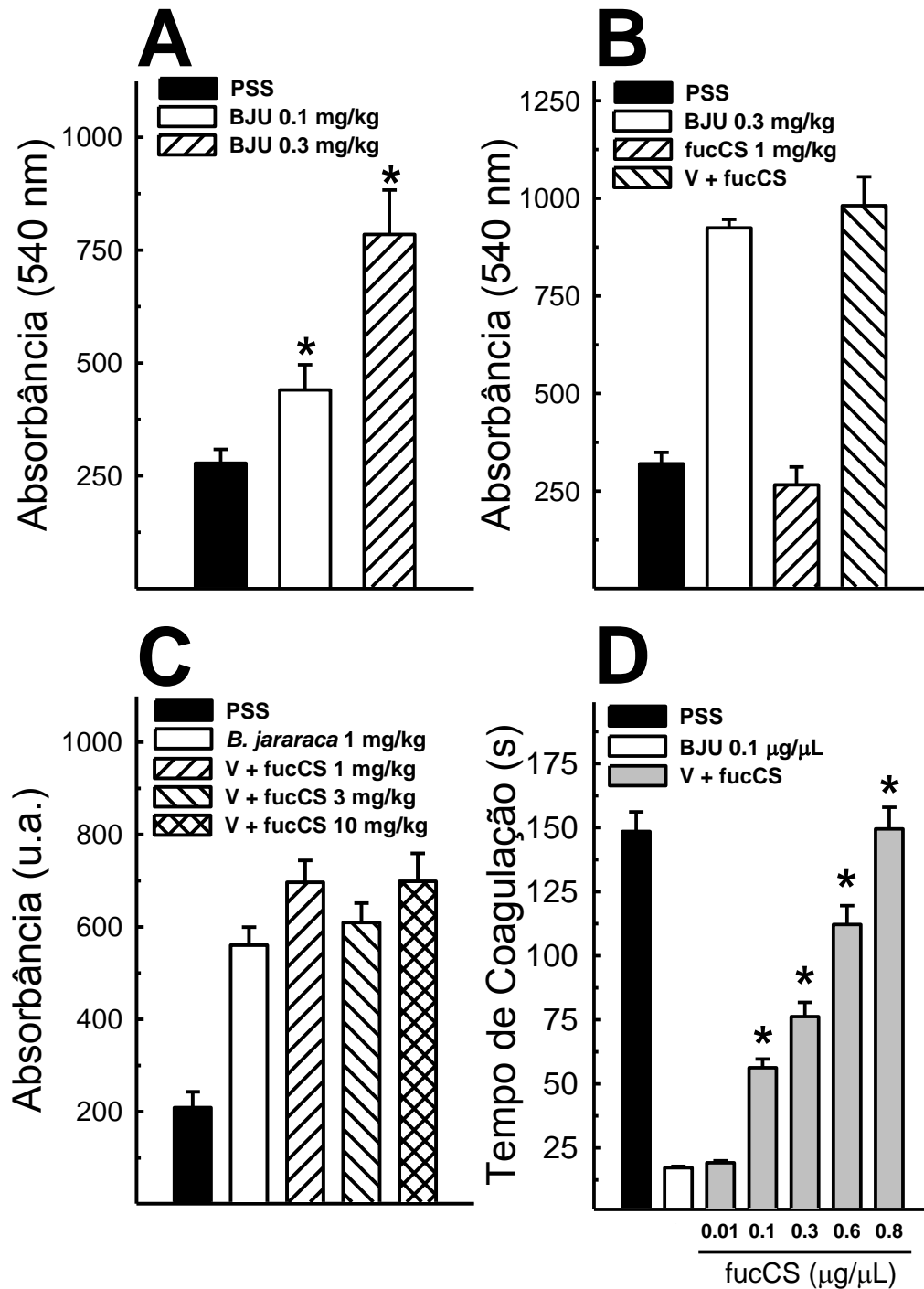


Figura 16 Efeito do fucCS nas alterações hemostáticas causadas por venenos botrópicos. No painel **A** observa-se o aumento do sangramento na cauda causado por BJU. O painel **B** demonstra que o fucCS (1 mg/kg) não foi capaz de antagonizar esse efeito. O painel **C** exibe a incapacidade do fucCS de impedir a hemorragia na pele causado pelo veneno de *B. jararaca*. No painel **D** pode-se observar a capacidade do fucCS em antagonizar o efeito pró-coagulante do veneno de BJU de maneira concentração dependente. * $p < 0,05$ vs solução salina fisiológica (PSS) (n=5).

4.7. Coluna de Afinidade e Eletroforese

A coluna de afinidade de sulfato de condroitina fucosilada ligada ao sistema de HPLC foi utilizada para avaliar a ligação de proteínas ao fucCS. Após a eluição do veneno, observou-se um pico de material não retido pela coluna de fucCS e, com o aumento do gradiente de NaCl, o deslocamento da coluna de dois picos (P1 e P2) que demonstraram afinidade ao fucCS e absorvência a 280 nm (fig. 17A). As frações foram unificadas, dializadas em água destilada e liofilizadas. Cerca de 10 µg de cada pico foram utilizados para uma corrida em gel de poliacrilamida para se determinar a massa molecular. A figura 17B mostra que o P2 teve uma massa molecular semelhante às massas das BthTX-I e BthTX-II, em torno de 14 kDa.

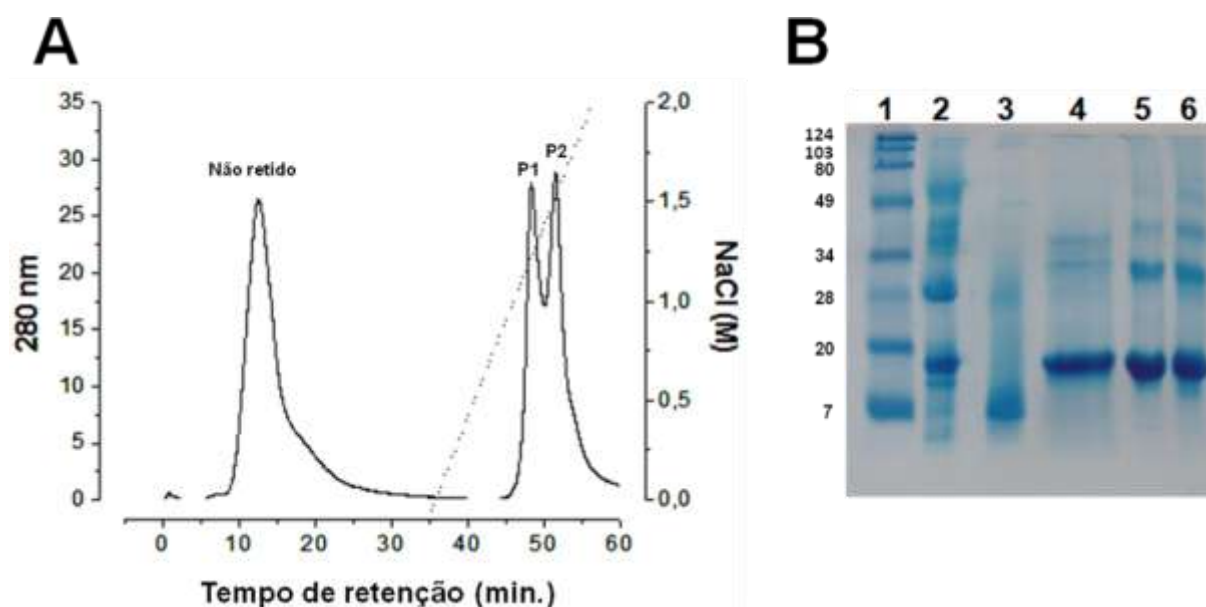


Figura 17 Coluna de afinidade ao fucCS e eletroforese dos picos do veneno *B. jararacussu*. No painel **A** observa-se um pico de material não retido pela coluna de fucCS e, dois picos (P1 e P2) retidos na coluna. No painel **B**, observa-se a eletroforese dos (1) marcadores, (2) veneno bruto de BJU, (3) P1, (4) P2, (5) BthTX-I, (6) BthTX-II.

4.8. Histologia

Avaliou-se a morfologia do músculo EDL após o tratamento do veneno bruto de BJU com o fucCS. Realizou-se uma injeção perimuscular do veneno bruto de BJU (1 mg/kg) sozinho ou incubado com fucCS (1 e 10 mg/kg). A microscopia de luz demonstrou que o veneno bruto induziu um proeminente edema, presença de células inflamatórias e necrose após 24h da injeção (fig. 18B), quando comparado ao PSS (fig., 18A). Ambas as doses de fucCS (fig. 18C e 18D) preservaram o aspecto poligonal das células musculares, prevenindo a mionecrose e migração de células inflamatórias.

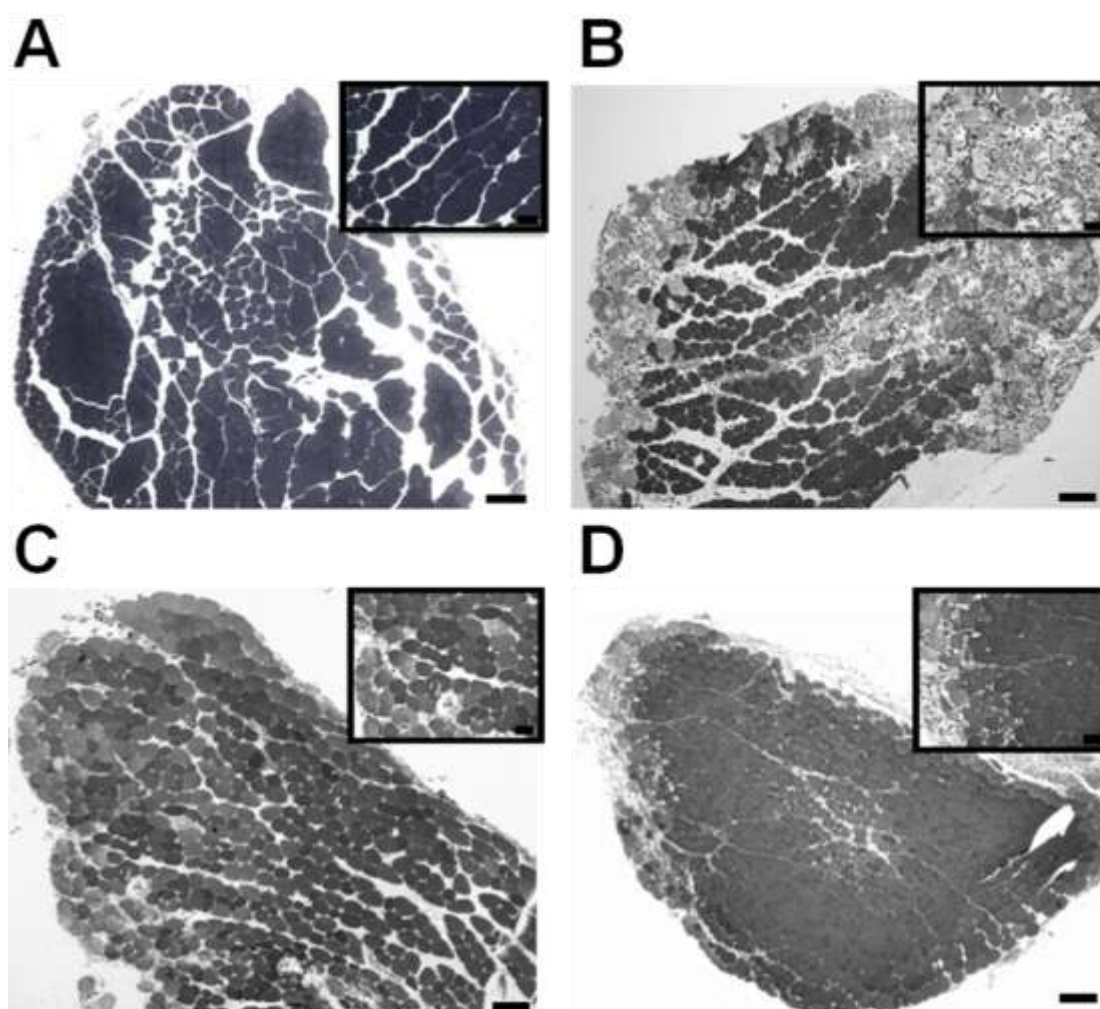


Figura 18 Histologia do músculo EDL exposto ao veneno de BJU e tratado com fucCS. No painel **A** observa-se a exposição ao PSS, no painel **B** observa-se o efeito do veneno de BJU e os painéis **C** e **D** o tratamento com fucCS nas doses de 1 e 10 mg/kg, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O objetivo foi avaliar a capacidade do fucCS em antagonizar diferentes atividades do veneno bruto de *B. jararacussu* e suas toxinas e revelar importantes aspectos de sua relação estrutura-atividade para esse efeito. No presente estudo demonstrou-se que o fucCS e o fucCS-CR foram capazes de antagonizar a maioria das atividades induzidas pelos venenos de *Bothrops* avaliados, efeitos estes que não foram observados com o defucCS. Os componentes presente no veneno de *B. jararacussu* promovem diferentes disfunções teciduais, como necrose, hemorragia e edema e suas principais toxinas fosfolipásicas, BthTX-I e BthTX-II, induzem severo dano muscular esquelético e edema (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; da Silva et al., 2007; Montecucco et al., 2008; Fernandes et al., 2014). Demonstrou-se que o fucCS antagonizou atividades do veneno de *B. jararacussu* *in vitro* e *in vivo*, como a procoagulação, miotoxicidade, edema, migração de leucócitos e atividade mieloperoxidásica, sendo que o fucCS-CR manteve esse efeito nas atividades avaliadas, enquanto que o defucCS demonstrou-se ser incapaz de neutralizar esses efeitos em todos ensaios em que foi avaliado.

Inicialmente avaliou-se a capacidade do fucCS e seus derivados de inibirem *in vitro* algumas atividades enzimáticas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Observou-se que o fucCS e o fucCS-CR foram capazes de inibir completamente as atividades fosfolipásica induzidas pelo veneno bruto (Fig. 6A) e pela BthTX-II (Fig. 7). A inibição da atividade fosfolipásica é importante, uma vez que é usada como indicador de possível efeito antimiotóxico por inibir as fosfolipases do veneno, o que foi comprovado através da inibição da atividade miotóxica *in vitro* (figs. 10A, 10C), exceto para a BthTX-II, que não induziu miotoxicidade na concentração e tempo avaliados (fig. 11B). O fucCS também inibiu a atividade miotóxica *in vitro*, induzida

pela BthTX-I, uma fosfolipase enzimaticamente inativa (fig. 11A), e quando associadas ambas as toxinas (fig. 11C), associação essa que potencializou o efeito da BthTX-I. Esse resultado condiz com a observação de que a BthTX-II, na mesma concentração de BthTX-I, não induziu miotoxicidade, sendo descrito que a BthTX-II possui um perfil de cargas positivas fraco, quando comparado ao perfil da BthTX-I (Murakami et al., 2008), o que justificaria um menor dano tecidual. A perfusão das toxinas associadas induziram um dano muscular maior que sozinhas, semelhante a experimentos que demonstraram miotoxinas de *B. asper* que são Lys49 e Asp49 atuando sinergicamente induzindo morte celular em miotubos devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Cintra-francischinelli et al., 2009, 2010), o que também foi descrito em experimentos *in vivo* (Mora-Obando et al., 2014), que demonstraram a potencialização da mionecrose com a combinação desses dois tipos de toxinas em camundongos. A avaliação da atividade fosfolipásica *in vitro* da BthTX-II na presença de BthTX-I ou polilisina reforça a existência desse efeito potencializador (figs. 8 e 9), e que o mesmo não somente ocorre em tecidos isolados ou *in vivo*, mas também em fosfolipídeos isolados. Dessa forma, esse efeito potencializador não estaria ocorrendo devido a presença de lisolecitinas que potencializam o efeito das toxinas, sendo elas liberadas após dano muscular (Cintra-Francischinelli e cols., 2009). Assim, essa inibição da miotoxicidade *in vitro* das toxinas fosfolipásicas indica que o fucCS foi capaz de impedir essa potencialização. Também observou-se a capacidade de ambos polissacarídeos de antagonizarem o aumento da atividade de CK no plasma induzido pelo veneno (fig. 10A) e toxinas (fig. 12 D), e antagonizar a redução do conteúdo de CK no músculo EDL (fig. 12B, fig. 12E). O defucCS demonstrou não possuir eficácia nos ensaios fosfolipásicos (figs. 6A), na miotoxicidade *in vitro* (fig. 10B), na atividade de CK no plasma (fig.

12A) e no conteúdo de CK no músculo (fig. 12B). Além disso, a microscopia de luz do músculo EDL demonstrou que o fucCS foi capaz de impedir a intensa presença de um infiltrado de células inflamatórias, mionecrose e edema, que ocorre no músculo exposto ao veneno de *B. jararacussu* (fig. 17), um efeito com importante participação de fosfolipases. Outros polianíons como a heparina e suramina também são capazes de impedir a mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (Melo et al. 1993; Arruda et al., 2002).

Outras evidências apontam para essa inibição da atividade miotóxica pelo fucCS, como o protocolo de alternância da exposição do músculo EDL ao veneno sozinho ou associado ao fucCS. Esse experimento permitiu observar que a reexposição ao veneno na ausência do fucCS causou um menor nível de liberação de CK ao meio nutritivo quando comparada à exposição do veneno a um músculo virgem. Além disso, em outro protocolo, observou-se que o fucCS protege o músculo do dano induzido pela polilisina (fig. 10E), uma molécula polianiónica que induz dano no sarcolema *in vitro*. Assim sendo, a neutralização da atividade miotóxica pelo fucCS e pelo fucCS-CR, mas não pelo defucCS, é um indicativo de que os substituintes de fucose sulfatada são importantes na proteção do sarcolema às agressões pelas toxinas, possivelmente por uma neutralização das cargas positivas das toxinas do veneno, de maneira semelhante à polilisina e dados da literatura (Melo et al., 1993; Murakami et al., 2005, 2007; Gutierrez & Lomonte, 2013). Uma possível interferência do fucCS com a enzima creatinoquinase foi descartada no experimento de lesão muscular induzida pelo triton-X 100 (fig. 10F), um detergente que danifica membranas biológicas, dano esse que não foi antagonizado pelo fucCS. Dessa forma, esses protocolos permitiram demonstrar a importância da interação do fucCS com o veneno para prevenir o dano muscular, o que está de

acordo com observações prévias de diversos outros antagonistas como a heparina (Melo et al., 1988, 1993; Calil-Elias et al., 2002b), o fucoidan (Azofeifa et al., 2008), a suramina (Arruda et al., 2002), assim como cumestanos sintéticos (Melo et al., 2010). Embora outros fatores possam contribuir para a miotoxicidade *in vivo*, como a angiorrexia causada por outros componentes do veneno, as fosfolipases são descritas como as principais substâncias responsáveis pelo aumento dos níveis de CK no plasma (Gutierrez and Ownby, 2003; Mora-Obando et al., 2014).

Essa interação foi demonstrada também pela coluna de afinidade (fig. 16A) e eletroforese (fig. 16B), que confirmaram que substâncias de mesma faixa de massa molecular se ligaram com alta afinidade ao fucCS, que possuem a mesma faixa de massa molecular que as bothropstoxinas. Melo e cols. (1993) mostraram que após misturar heparina e BthTX-I e eluir a mistura em uma coluna de Sephadex, ocorre a formação de um complexo entre a heparina e a toxina, que são incapazes de se ligarem à coluna.

A inibição da atividade hialuronidásica pode contribuir para reduzir o espalhamento das toxinas e efeito miotóxico induzido pelas fosfolipases. Outros glicosaminoglicanos, como a heparina, heparan sulfato e dermatan sulfato, também são inibidores de hialuronidases presentes em veneno de animais. Possivelmente, de maneira semelhante, o fucCS (fig. 6B) atue como um substrato para a enzima e não como um inibidor direto como sugerido por Mio & Stern (2002), Kemparaju & Girish (2006) e Girish & Kemparaju (2007). Assim, as hialuronidases do veneno de *B. jararacussu* se ligariam ao fucCS e não ao ácido hialurônico.

Os experimentos *in vivo* demonstraram redução do edema induzido pelo veneno bruto (fig. 13A) e toxinas (fig. 13C), redução da mieloperoxidase no músculo EDL (fig. 12C, 12F), redução da migração de neutrófilos (fig. 14) e preservação do

músculo como evidenciado na histologia (fig. 17). Credita-se o efeito protetor do fucCS na inflamação a dois mecanismos: a habilidade de neutralização direta das toxinas do veneno de *B. jararacussu*, através da interação de cargas; e a inibição da resposta inflamatória avaliadas pela inibição da migração leucocitária e redução dos níveis de MPO no EDL. Patrão-neto e cols. (2013) demonstraram que a presença de células inflamatórias estão relacionadas com a miotoxicidade induzida por venenos de serpentes, e que o tratamento com dexametasona reduziu os níveis de MPO e a inflamação, assim como o dano muscular. No entanto, observou-se um aumento do número de leucócitos sanguíneos quando utilizada a dose de 10 mg/kg de fucCS, o que pode ser explicado pela possível capacidade do mesmo em promover a mobilização de leucócitos na medula óssea, um processo no qual participam os glicosaminoglicanos (Gordon et al., 1987). Além disso, o fucCS é capaz de inibir P- e L-selectinas e sialil-Lewis^x, o que impediria a migração de neutrófilos para área inflamada, contribuindo com a redução do efeito inflamatório (Borsig et al., 2007). Essas evidências corroboram as observações de que fucCS reduz o edema (1 mg/kg) e migração de neutrófilos para sítio de injeção do veneno (contagem de leucócitos e MPO no EDL), reduzindo assim o efeito inflamatório do veneno de *B. jararacussu*, que desempenha um importante papel na miotoxicidade (Landucci et al., 1998; Gutierrez & Rucavado, 2000; Teixeira et al., 2003, 2005; Elifio-Esposito et al., 2011; Patrão-Neto et al., 2013). O fucCS antagoniza o edema induzido pelo veneno bruto de *B. jararacussu*, que está relacionado com mediadores locais produzidos por ação fosfolipásica sobre o ácido araquidônico e seus metabólitos. Dessa forma, a inibição do edema pelo fucCS é particularmente interessante uma vez que o soro antibotrópico não possui esse efeito sobre o veneno de *B. jararaca* (Araújo et al., 2007). Curiosamente, o edema induzido pelo veneno de *B.*

jararacussu foi antagonizado por 1 mg/kg de fucCS, o que não ocorreu com a dose de 10 mg/kg. Esse fenômeno pode estar relacionado a modificações no complexo de interação da toxina com fucCS e a proporção entre esses componentes, assim como numa curva em formato de sino, onde altas concentrações de fucCS reduzem a eficácia do complexo, como observado com o fucoïdan, um polissacarídeo natural sulfatado, contra atividades citotóxicas e miotóxicas de miotoxinas fosfolipásicas de venenos crotalídeos (Angulo & Lomonte, 2003). Outro fator que pode contribuir para esse efeito no edema é um maior aumento no tempo de coagulação induzido pela dose de 10 mg/kg, o que não ocorre com a dose de 1 mg/kg (Mourão et al., 1996). É interessante notar que esse aumento do tempo de coagulação ocorreu apenas com o veneno bruto e não no edema induzido pelas BthTX-I e BthTX-II, o que sugere que possa ocorrer um aumento do tempo de coagulação devido a sinergismo com efeitos anticoagulantes induzidos por metaloproteases e serino-proteases, o que contribuiria para o aumento do edema.

Na avaliação da hemostasia, observou-se que redução do tempo de coagulação induzido pelo veneno de *B. jararacussu*, devido à ação de serino-proteases “thrombin-like”, que aceleram a conversão do fibrinogênio em fibrina (Markland, 1988; Sanchez et al., 1992; Zaganelli et al., 1996), efeito esse antagonizado pelo fucCS (fig. 15D). Assim como outros glicosaminoglicanos, como a heparina, possivelmente o fucCS não seja capaz de inibir diretamente as serino-proteases do veneno, mas atue como um antagonista fisiológico através da habilidade de inibir a trombina, seja pelo estímulo da heparina cofator II ou da antitrombina (Mourão et al., 1996). Melo e cols. (1994) defendem que a propriedade pró-coagulante do veneno pode ser responsável por limitar o fluxo sanguíneo na microcirculação, o que favorece a mionecrose, o que poderia ser antagonizado pelo

fucCS. A redução desse efeito pró-coagulante também favoreceria a drenagem da creatinoquinase e o processo de regeneração muscular (Melo & Ownby, 1996). O fucCS não foi capaz de antagonizar a hemorragia promovida pelo veneno de *B. jararacussu* no modelo de sangramento pela cauda (fig. 15B), nem a hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* no modelo de hemorragia na pele (fig. 15C). As metaloproteases, especialmente as das famílias P-I e P-III, são responsáveis pelo aumento da hemorragia induzida por esses venenos, e juntamente com as collagenases auxiliam na destruição da lâmina basal, resultando em hemorragia na pele (Markland, 1998; Isbister, 2009). Além disso, soma-se a atividade das metaloproteases à depleção de fibrinogênio e fibrina induzidos pelas serino proteases, o que acarreta a impossibilidade de formação do tampão de fibrina, e dessa forma, auxilia no processo hemorrágico, fundamental para a hemorragia em ambos os modelos. No protocolo de sangramento da cauda, o fucCS foi incapaz de prevenir a perda sanguínea. No protocolo de hemorragia na pele, também foi incapaz de reduzir esse efeito, e inclusive o intensificou, possivelmente devido a interação de componentes do veneno e sua capacidade de aumentar o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina ativada (Mourão et al., 1996; Fonseca and Mourão, 2006). A pouca capacidade de fucCS e fucCS-CR em inibir as atividades collagenásica (fig. 6C) e proteolítica (fig. 6D) se correlacionam com a baixa capacidade de inibição das metaloproteases.

Por fim, a eficácia do fucCS em diferentes protocolos experimentais reforçam a sua importância como promissora substância capaz de ser utilizada clinicamente com a finalidade de se reduzir a miotoxicidade causada pelo veneno de serpentes epidemiologicamente importantes, como é o caso da *B. jararacussu*. Vale ressaltar que o fucCS é obtido de uma origem natural marinha, que é desprovida do risco de

contaminação com príons, o que ocorre com a heparina, de origem animal. Além disso, ela é menos hemorrágica que a heparina, pode ser utilizado por via oral e também é candidato a ser usada com outras finalidades devido a propriedades antitrombóticas, anticoagulante e anticancerígenas.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o resíduo de fucose sulfatada é essencial para a atividade antiofídica do fucCS. Após a defucosilação observou-se que diversas atividades, antes inibidas pelo fucCS, deixaram de possuir tal capacidade tais como: atividade fosfolipásica, hialuronidásica, colagenásica e proteolítica; miotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (CK no plasma e conteúdo de CK no músculo), mieloperoxidase, número total de leucócitos. Já a carboxi-redução, que não alterou a estrutura da fucose, não teve perda da capacidade de antagonizar os efeitos biológicos do veneno da serpente de *Bothrops jararacussu*.

O fucCS foi capaz de inibir também atividades induzidas pelas toxinas fosfolipásicas do veneno de BJU, a BthTX-I e a BthTX-II em atividades como: miotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, atividade edematogênica e mieloperoxidásica.

O veneno bruto ao passar na coluna de afinidade de fucCS reteve dois picos, um deles (P2) com mesma massa molecular próxima a das toxinas, indicando que possivelmente as toxinas possam se ligar ao fucCS. O fato do fucCS e do fucCS-CR inibirem a atividade fosfolipásica da BthTX-II reforça essa possível ligação.

O fucCS inibiu consideravelmente a miotoxicidade *in vivo*, *in vitro* e como observado na histologia do músculo EDL, indicando que o mesmo pode ser uma possível terapia a ser utilizada que auxilie no tratamento dos danos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu*.

Embora sejam necessários novos estudos, o fucCS surge como um novo candidato a fármaco a ser utilizado no tratamento do empeçonhamento por serpentes do gênero *Bothrops*, possivelmente como um adjuvante a terapia com o soro antibotrópico, que possui um efeito limitado na miotoxicidade induzida por essas serpentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SAMPAIO, S. V.; CUNHA, O. A.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1043-1052, 1997.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochemie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A(2). **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1993-2000, 2003.

ARAÚJO, S. D.; DE SOUZA, D.; NUNES, F. P.; GONÇALVES, L. R. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Inflammation Research**, v. 56, n. 10, p. 409-413, 2007.

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

ARRUDA, E. Z.; SILVA, N. M.; MORAES, R. A.; MELO, P. A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 723-726, 2002.

AYRES, R.; FEIJÓ, P. R. O.; CINTRA, A. C. O.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; CUNHA, V. M. N.; QUINTAS, L. E. M. Different effects of myotoxins bothropstoxin-I and II from *Bothrops* snake venom on cation transport ATPases from murine fast twitch skeletal muscle. **Toxicon**, v. 103, p. 80-84, 2015.

AZOFEIFA, K.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: Comparison of high- and low-molecular weight fractions. **Toxicon**, v. 51, n. 3, p. 373-780, 2008.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.

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

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Aspectos ambientais e sócio-econômicos relacionados à incidência de acidentes ofídicos no Estado do Rio de Janeiro de 1990 a 1996: uma análise exploratória. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 4, p. 976-985, 2004.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p. 21 -30, 2000.

BORSIG, L.; WANG, L.; CAVALCANTE, M. C.; CARDILO-REIS, L.; FERREIRA, P. L.; MOURÃO, P. A.; ESKO, J. D.; PAVÃO, M. S. Selectin Blocking Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan from Sea Cucumber. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14984-14991, 2007.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1307-1312, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde, Situação Epidemiológica – Dados, DATASUS**. Acesso em 13/07/2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>>

BROWN, N.; LANDON, J. Antivenom: The most cost-effective treatment in the world?. **Toxicon**, v. 55, p. 1405-1407, 2010.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009.

CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A. M.; MELO, P. A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1233-1235, 2002a.

CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A. M. B.; MELO, P. A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. **Histology & Histopathology**, v. 17, p. 463-470, 2002b.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L.; CHUDZINSKI, A. M.; CASTRO, S. C.; KAMIGUTI, A. S.; KELEN, E. M.; HIRATA, M. H.; MIRANDOLA, R. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315-325, 1993.

CHAVIRA JR., R.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 446-450, 1984.

CHIPPAUX, J. Estimating the Global Burden of Snakebite Lack of Antivenom: A Market. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 11-12, 2008.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PONCE-SOTO, L. A.; ROSSETO, O.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; POZZAN, T.; MONTECUCCO, C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. 1718-1728, 2009.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca^{2+} influx in C2C12 myotubes. **Toxicon**, v. 55, p. 590-596, 2010.

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

DA SILVA, N. M.; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L.; MORAES, R. A.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 196-205, 2007.

DEJANA, E.; CALLIONI, A.; QUINTANA, A.; DE GAETANO, G. Bleeding time in laboratory animals. II – A comparison of different assay conditions in rats. **Thrombosis Research**, v. 15, n. 1-2, p. 191-197, 1979.

DI FERRANTE, Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303-306, 1956.

DOS SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R.; FORTES-DIAS, C. L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. T. The efficacy of the bothropic-crotalic antivenom in the neutralization of the main *Bothrops jararacussu* venom effects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

DU, X.; SIM, D. S.; LEE, W.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 36, n. 3, p. 414-421, 2006.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F. M.; STUELPE-CAMPELO, P. M.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunology**, v. 12:10, 2011.

FAGUNDES, F. H. R.; APARÍCIO, R.; DOS SANTOS, M. L.; FILHO, E. B. S. D.; OLIVEIRA, S. C. B.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. A Catalytically Inactive Lys49 PLA2 Isoform from *Bothrops jararacussu* venom that Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1133-1139, 2011.

FERNANDES, C. M.; PEREIRA TEIXEIRA, C. F.; LEITE, A. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROCHA, F. A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE₂-dependent mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 8, p. 1254-1261, 2007.

FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; MONTEIRO-MACHADO, M.; STRAUCH, M. A.; CONS, B. L.; TAVARES-HENRIQUES, M. S.; CINTRA, A. C. O.; FACUNDO, V. A., MELO, P. A. Counteraction of *Bothrops* snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 552-562, 2014.

FERRAZ, M. C.; YOSHIDA, E. H.; TAVARES, R. V. S.; COGO, J. C.; CINTRA, A. C. O.; DAL BELO, C. A.; FRANCO, L. M.; DOS SANTOS, M. G.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; HYSLOP, S.; PUEBLA, P.; SAN FELICIANO, A.; OSHIMA-FRANCO, Y. An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the *in Vitro* Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Molecules**, v. 19, 5790-5805, 2014.

FERRAZ, C. R.; CALIXTO-CAMPOS, C.; MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; CLISSA, P. B.; BALDO, C.; VERRI, W. A. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF κ B in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 119-128, 2015.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

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

FONSECA, R. J.; MOURÃO, P. A. S. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 96, n. 6, p. 822-829, 2006.

FONSECA, R. J.; OLIVEIRA, S. N.; POMIN, V. H.; MECAWI, A. S.; ARAUJO, I. G.; MOURÃO, P. A. Effects of oversulfated and fucosylated chondroitin sulfates on coagulation: Challenges for the study of anticoagulant polysaccharides. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 5, p. 994-1004, 2010.

FROST, G. I.; CSÓKA, T.; STERN, R. A. The Hyaluronidases: A Chemical, Biological and Clinical Overview. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 8, n. 44, p. 419-434, 1996.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. Understanding the *in vitro* neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon**, v. 55, p. 1-11, 2010.

GARCIA, E. S.; GUIMARÃES, J. A.; PRADO, J. L. Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 188, n. 2, p. 315-322, 1978.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. **Life Sciences**, v. 80, p. 1921-1943, 2007.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K.; NAGARAJU, S.; VISHWANATH, B. S. Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2261-2288, 2009.

GORDON, M. Y.; RILEY, G. P.; WATT, S. M.; GREAVES, M. F. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. **Nature**, v. 326, p. 403-405, 1987.

GUIMARÃES, C. L. S.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; MOREIRA-DILL, L. S.; CARVALHO, B. M. A.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, C. A. H.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; BARRAVIERA, B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERÓN, L. A.; STÁBELI, R. G.; ALBERICIO, F.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Alkylation of Histidine Residues of *Bothrops jararacussu* Venom Proteins and Isolated Phospholipases A₂: A Biotechnological Tool to Improve the Production of Antibodies. **BioMed Research International**, v. 2014, article ID 981923, 12 p., 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming : The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006.

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

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27-39, 2013.

HARRISON, R. A.; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, 2009.

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

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-627, 1988.

ISBISTER, G. K. Procoagulant snake toxins: laboratory studies, diagnosis, and understanding snakebite coagulopathy. **Seminars in Thrombosis Hemostasis**, v. 35, n. 1, p. 93-103, 2009.

INWOOD, M. J.; THOMSON, S.; BRYANT, N. J. **Lynch's Medical Laboratory Technology**, editado por S. Raphael, W. B. Saunders Company, 4^a ed., p.674-675, 1983.

JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11-12, p. 1269-1276, 1996.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1041-1049, 2005.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA, M. JR.; XAVIER, M. A.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects 1: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.

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

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 218-224, 2001.

KINI, R. M.; JOSEPH, J. S.; RAO, V. S. Protrombin Activators from Snake Venoms. **Perspectives in Molecular Toxinology**, editado por A. Menéz, John Wiley & Sons, p. 341-355, 2002.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005.

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

KREIL, G. Hyaluronidases – A group of neglected enzymes. **Protein Science**, v. 4, n. 9, p. 1666-1669, 1995.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2-3, p. 257-263, 1998.

LEE, R. I.; WHITE, P. D. A clinical study of the coagulation time of blood. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 145, n. 4, p. 495-503, 1913;

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L. A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1509-1518, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

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

MACHADO, M. M. Estudo da atividade antiofídica do sulfato de condroitina fucosilada (fucCS). **Dissertação de Mestrado**, 70 p., Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

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

MARINETTI, G. V. The action of phospholipase A on lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 98, n. 3, p. 554-565, 1965.

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

MARKLAND JR., F. S. Snake Venom Fibrinogenolytic and Fibrinolytic Enzymes: An Update Inventory. **Thrombosis and Haemostasis**, n. 79, n. 3, p. 668-674, 1998.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; ANAI, K.; YOSHIDA, E. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1223-1226, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO, H. D.; FERNANDES, F. F.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STRAUCH, M. A.; DA FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N.; CALIL-ELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; COSTA, P. R.; DA SILVA, A. J. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.

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

MIO, K.; STERN, R. Inhibitors of the hyaluronidases. **Matrix Biology**, v. 21, n. 1, p. 31-37, 2002.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A₂ Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. **PLOS One**, v. 9, n. 10, e109846, 2014.

MORS, W. B.; DO NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; DA SILVA, M. H.; MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 1003-9, 1989.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOUNIER, C. M.; BON, C.; KINI, R. M. Anticoagulant Venom and Mammalian Secreted Phospholipases A₂: Protein- versus Phospholipid-Dependent Mechanism of Action. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 279-287, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2893-2905, 2007.

MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S.; MULLOY, B. TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M.; ABILDGAARD, U. Structure and Anticoagulant Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, 1996.

MOURÃO, P. A.; GUIMARÃES, M. A.; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **British Journal of Haematology**, v. 101, n. 4, p. 647-652, 1998.

MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S. Searching for Alternatives to Heparin Sulfated Fucans from Marine Invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1647-1654, 1999.

MOURÃO, P. A.; BOISSON-VIDAL, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; BROS, A.; FISCHER, A. Inactivation of Thrombin by a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm. **Thrombosis Research**, v. 102, n. 2, p. 167-176, 2001.

MOURÃO, P. A. Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 967-981, 2004.

MOURÃO, P. A. S. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2770-2784, 2015.

MURAKAMI, M. T.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. M. B.; CALIL-ELIAS, S.; TOMAZ, M. A.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of Molecular Biology**, v. 350, p. 416-426, 2005.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, p. 378-387, 2007.

MURAKAMI, M. T.; LOURENZONI, M. R.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Biochemical and structural investigations of Bothropstoxin-II, a myotoxic Asp49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, p. 1002-1008, 2008.

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

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; DA SILVA, R. F.; LEITE, P. M. C.; COGO, J. C.; QUIRICO-SANTOS, T.; LAGROTA-CANDIDO, J. TLR4 signaling protects from excessive muscular damage induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1396-1403, 2012.

PATRAO-NETO, F. C.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; ROCHA-JÚNIOR, J. R. S.; BORGES, P. A.; CALIL-ELIAS, S.; MELO, P. A. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 69, p. 55-64, 2013.

PÉREZ, A. V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M., GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 1063-1069, 2007.

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

POMIN, V.H. Holothurian fucosylated chondroitin sulfate. **Marine Drugs**, v. 12, p. 232-254, 2014.

POMIN, V. H. A Dilemma in the Glycosaminoglycan-Based Therapy: Synthetic or Naturally Unique Molecules? **Medicinal Research Reviews**, v. 00, n. 0, p. 1-25, 2015.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

RODRIGUES, M. A.; DIAS, L.; RENNÓ, A. L.; SOUSA, N. C.; SMAAL, A.; DA SILVA, D. A.; HYSLOP, S. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom. **Toxicology**, v. 323, p. 109-124, 2014.

ROSTELATO-FERREIRA, S.; LEITE, G. B.; CINTRA, A. C. O.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Heparin at low concentration acts as antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. **Journal of Venom Research**, v. 1, p. 54-60, 2010.

RUCAVADO, A.; HENRÍQUEZ, M.; GARCÍA, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 754-759, 2008.

SCHAFFAZICK, N.; AMARAL, L. S.; FONSECA, T. F.; TOMAZ, M. A.; GABAN, G. A.; BORGES, P. A.; CALIL-ELIAS, S.; NOEL, F.; MELO, P. A.; QUINTAS, L. E. M.; CUNHA, V. M. N. Effect of heparin treatment on the expression and activity of different ion-motive P-type ATPase isoforms from mouse extensor digitorum longus muscle during degeneration and regeneration after *Bothrops jararacussu* venom injection. **Toxicon**, v. 55, p. 52-60, 2010.

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

SANT'ANA, C. D.; BERNARDES, C. P.; IZIDORO, L. F.; MAZZI, M. V.; SOARES, S. G.; FULY, A. L.; ZINGALI, R. B.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; FONTES, M. R.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 500-507, 2008.

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

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

SILVA-JUNIOR, F. P.; GUEDES, H. L.; GARVEY, L. C.; AGUIAR, A. S.; BOURGUIGNON, S. C.; DI CERA, E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 18-31, 2007.

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

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

SUAREZ-KURTZ, G.; EASTWOOD, A. B. Release of sarcoplasmic enzymes from frog skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 241, n. 3, p. 98-105, 1981.

SUNDELL, I. B.; AZIZ, K. A.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. The role of phospholipases A₂ in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 459-468, 2003.

TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; CHABUT, D.; ZIERER, M.; MATOU, S.; HELLEY, D.; BROS, A.; MOURÃO, P. A.; FISCHER, A. M. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 84, n. 2, p. 332-337, 2000.

TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; MATOU, S.; MOURÃO, P. A.; BROS, A.; LETOURNEUR, D.; FISCHER, A. M. A Fucosylated Chondroitin Sulfate From Echinoderm Modulates in Vitro Fibroblast Growth Factor 2-Dependent Angiogenesis. **Molecular Cancer Research**, v. 1, n. 2, p. 96-102, 2002.

TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, C. F. P.; CHAVES, F.; ZAMUNER, S. R.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIERREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, p. 107-115, 2005.

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

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

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, 2000a.

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

VIEIRA, R. P.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure of a Fucose-branched Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 13530-13536, 1991.

WANDERLEY, C. W. S.; SILVA, C. M. S.; WONG, D. V. T.; XIMENES, R. M.; MORELO, D. F. C.; COSKER, F.; ARAGÃO, K. S.; FERNANDES, C.; PALHETA-JÚNIOR, R. C.; HAVT, A.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-147, 2014.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; ON BE HALF OF THE GLOBAL SNAKE BITE INITIATIVE WORKING GROUP AND INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, 2010.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-967, 2005.

ZAMUNÉR, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2004.

ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R.; LIMA, M. E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 807-819, 1996.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Some Consideration About their Functional Characterization. **Protein & Peptide Letters**, n. 16, n. 8, p. 908-912, 2009.

8. ANEXO

Toxicon 98 (2015) 20–33



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Occurrence of sulfated fucose branches in fucosylated chondroitin sulfate are essential for the polysaccharide effect preventing muscle damage induced by toxins and crude venom from *Bothrops jararacussu* snake



Marcos Monteiro-Machado ^a, Marcelo A. Tomaz ^a, Roberto J.C. Fonseca ^a,
 Marcelo A. Strauch ^a, Bruno L. Cons ^a, Paula A. Borges ^a, Fernando C. Patrão-Neto ^a,
 Matheus S. Tavares-Henriques ^a, Jhonatha M. Teixeira-Cruz ^a, Sabrina Calil-Elias ^c,
 Adélia C.O. Cintra ^d, Ana Maria B. Martinez ^e, Paulo A.S. Mourão ^b, Paulo A. Melo ^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Programa de Glicobiologia, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Farmácia e Administração Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^e Programa de Pesquisa em Neurociência Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2015

Received in revised form

10 February 2015

Accepted 18 February 2015

Available online 19 February 2015

Keywords:

Fucosylated chondroitin sulfate

Bothrops

Snake venom

Myotoxicity

Bothrotoxin

ABSTRACT

Snake envenoming is an important public health problem around the world, particularly in tropics. Beyond deaths, morbidity induced by snake venoms, such as myotoxicity, is of pivotal consequence to population. *Bothrops jararacussu* is the main venomous snake in southeast region of Brazil, and particularly presents strong myotoxic effect. The only available therapy, antivenom, poorly affects venom-induced myotoxicity. The aim of this study is to assess the ability of fucosylated chondroitin sulfate (fucCS), a glycosaminoglycan with anticoagulant and antithrombotic properties, and its derivatives to inhibit toxic activities of *B. jararacussu* crude venom and its isolated toxins, named bothrotoxins (BthTX-I and BthTX-II). The *in vitro* myotoxic activities induced by crude venom, by BthTX-I alone and by toxins together were abolished by fucCS. Carboxyl reduction (fucCS-CR) kept this ability whereas defucosylation (defucCS) abrogates myoprotection. We observed the same pattern in the response of these polysaccharides in antagonizing the increase in plasma creatine kinase (CK) levels, the reduction of skeletal muscle CK content and the rise of myeloperoxidase (MPO) activity induced by crude venom and isolated toxins. FucCS inhibited edematogenic activity and partially prevented the reduction of total leukocytes in blood when pre-incubated with crude venom. Furthermore, the venom procoagulant effect was completely antagonized by increasing concentrations of fucCS, although this polyanion could stop neither the tail bleeding nor the skin hemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom. The *B. jararacussu* phospholipase, hyaluronidase, proteolytic and collagenase activities were inhibited *in vitro*. The results suggest that fucCS could be able to interact with both toxins, and it is able to inhibit BthTX-II phospholipase activity. Light microscopy of *extensor digitorum longus* muscle (EDL) muscle showed myoprotection by fucCS, once necrotic areas, edema and inflammatory cells were all decreased as

* Corresponding author. Laboratório de Farmacologia das Toxinas, Avenida Brigadeiro Trompowski, s/n – Centro de Ciências de Saúde-CCS, bloco J, sala 18, Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
 E-mail address: melo.pa@gmail.com (P.A. Melo).

compared to venom injection alone. Altogether, data show that fucCS was able to inhibit myotoxicity and inflammation induced by *B. jararacussu* venom and its phospholipase toxins, BthTX-I and BthTX-II. Thus, fucosylated chondroitin sulfate is a new polyanion with potential to be used as an adjuvant in the treatment of snakebites in the future.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Snakebite affects a large number of individuals, mostly in tropics, and can lead to permanent injuries or death. Its incidence and mortality are higher than other neglected diseases such as hemorrhagic fever induced by dengue fever, cholera, Chagas disease, leishmaniasis, yellow fever and schistosomiasis (Williams et al., 2010). In Brazil, genus *Bothrops* is the main responsible for those accidents, with venom components that induce local and systemic damage (Andrião-Escarso et al., 2000; Gutiérrez and Ownby, 2003; Chippaux, 2008; Montecucco et al., 2008; Warrell, 2010; Kang et al., 2011; Gutiérrez and Lomonte, 2013). Although the available anti-venom protects from hemodynamic changes, it is not effective against some markedly common and clinically relevant local effects such as skeletal muscle destruction, i.e. myonecrosis, being a major cause of disabilities among the affected individuals (Mebs, 1986; Cardoso et al., 1993; Zamuner et al., 2004; da Silva et al., 2007; Gutiérrez et al., 2009).

Recent studies have shown that polyanions such as heparin, suramin and fucoidan are effective in the neutralization of myotoxins both *in vitro* and *in vivo* (Melo et al., 1993; Lomonte et al., 1994; Arruda et al., 2002; Azofeifa et al., 2008). It has been shown that these substances antagonize muscle damage induced by Bothropstoxin-I (BthTX-I), a Lys49 non-catalytic enzyme from *Bothrops jararacussu* venom. On the other hand, heparin and suramin could not as effectively inhibit the enzymatic activity induced by Bothropstoxin-II (BthTX-II), an Asp49 myotoxin which hydrolyzes membrane phospholipids (Murakami et al., 2008).

Fucosylated chondroitin sulfate (fucCS) is a polysaccharide extracted from the body wall of the sea cucumber *Ludwigothurea grisea*, and its structure is similar to mammalian chondroitin sulfate, although its chondroitin sulfate-like core is substituted in position 3 of the acid β -D-glucuronic acid chains with mono- (49%) or disulfated (37%) fucose moieties (Fig. 1). The repeating units of the central core have a complex sulfation pattern, with approximately 12% being disulfated, 57% monosulfated, and 31% non-sulfated residues. FucCS presents an estimated molecular mass of ~40 kDa (Fonseca et al., 2010). Defucosylated chondroitin sulfate (defucCS) is obtained after partial acid hydrolysis, removing the residues of fucose sulfate, and reduction of the hexuronic acid carboxyl groups in the polysaccharide by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-NaBH₄ generate a carboxyl reduced chondroitin sulfate (fucCS-CR). FucCS has potent anticoagulant activity due to its ability to potentiate thrombin inhibition by both heparin cofactor 2 and antithrombin (Mourão et al., 2001), and also has antithrombotic, proangiogenic, anti-inflammatory and antimetastatic properties (Mourão et al., 1996, 1998; Tapon-Bretaidère et al., 2002; Borsig et al., 2007; Pomin, 2014). Moreover, fucCS has presented therapeutic potential use in atherosclerosis, hemodialysis, fibrosis, viral infection and hyperglycemia (Pomin, 2014). Thus, the aim of this study was to evaluate whether fucCS and derivatives were able to inhibit toxic activities induced

by *B. jararacussu* venom and its myotoxins (BthTX-I and BthTX-II).

2. Material and methods

Bothrops jararaca and *B. jararacussu* venoms were obtained from Instituto Vital Brazil, Niterói-RJ. BthTX-I and BthTX-II was purified from *B. jararacussu* venom as described by Homsí-Brandeburgo et al. (1988), and modified by Cintra et al. (1993). Briefly, crude venom was gel filtered on Sephadex G-75 and the catalytic active fraction SIII was re-chromatographed on SP-Sephadex C-25. Toxins were then dialyzed and lyophilized. Creatine kinase (CK) activity was determined using a CK NAC[®] kit from BIOCLIN[®]. Azocasein[®], azocol[®], hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and o-Dianisidine were purchased from Sigma Chemical Co, USA and hyaluronic acid was purchased from Fluka, USA. Male Swiss mice were provided by the Rodent Vivarium of the Institute of Microbiology Paulo de Góes – Federal University of Rio de Janeiro. Mice (25.0 ± 1.0 g) used for the study received water and food *ad libitum* and were kept under a natural light cycle (12 h) at 25 °C. Protocols were approved (DFB/CICB 026) by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Rio de Janeiro (CEUA-UFRJ).

2.1. Native and chemically modified polysaccharides

Native fucosylated chondroitin sulfate was extracted from the sea cucumber *L. grisea* collected from Guanabara Bay, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Fucosylated chondroitin sulfate was extracted from the body wall of the sea cucumber *L. grisea* by papain digestion, and purified by procedures previously described (Mourão et al., 1996). Partial removal of sulfated fucose branches from the fucosylated chondroitin sulfate was performed by mild acid hydrolysis. In these experiments, the fucosylated chondroitin sulfate (50 mg) was dissolved in 1.0 mL of 150 mM H₂SO₄, maintained at 100 °C for 30 min, and the pH of the solution was adjusted to 7.0 with 0.3 mL of ice-cold 1.0 M NaOH. Reduction of the hexuronic acid carboxyl groups in the polysaccharide by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-NaBH₄ was performed as described previously. For further details about the extraction, preparation, purification and characterization of the native, partially defucosylated (defucCS) and carboxyl-reduced chondroitin sulfate (fucCS-CR) see Mourão et al. (1996).

2.2. Myotoxicity *in vitro*

In vitro CK assays were performed as previously described (Melo and Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Melo and Ownby, 1996). Briefly, mice isolated *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were carefully removed, mounted in sample collecting units and continuously perfused with a physiologic saline solution (PSS), whose composition in mM was: NaCl (135), KCl (5), CaCl₂ (2), MgCl₂ (1), NaHPO₄ (1), NaHCO₃ (15) and dextrose (11). The pH of this solution was equilibrated to pH 7.3 with 5% CO₂/95% O₂. Muscle

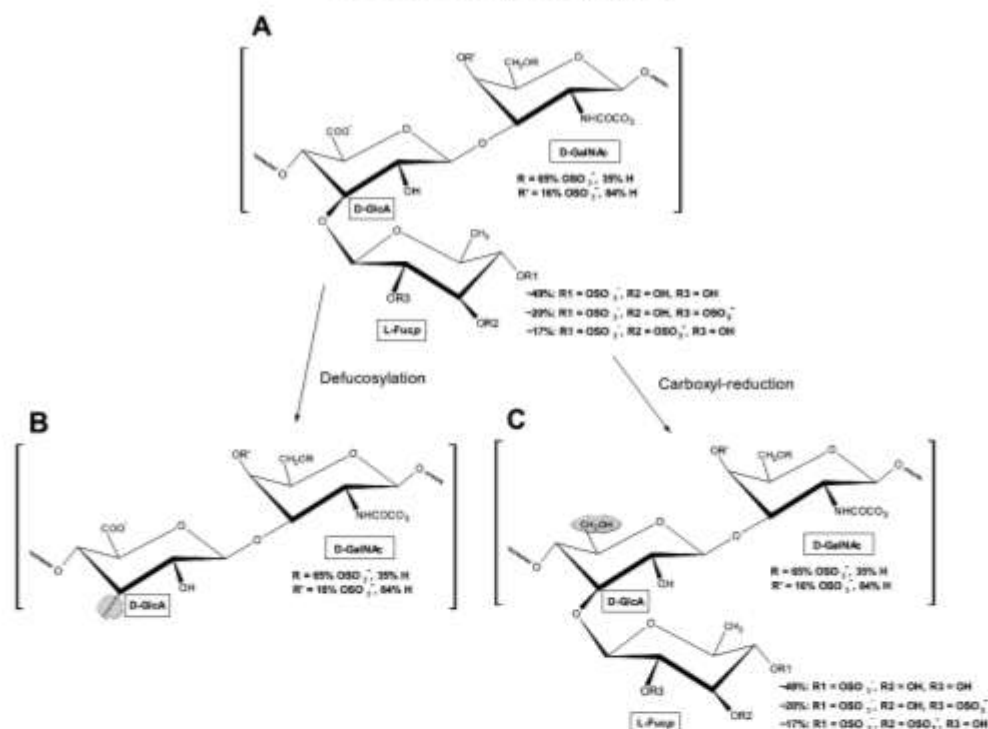


Fig. 1. Fucosylated chondroitin sulfate (fucCS) and derivatives structure. The backbone of this polysaccharide is made up of repeating disaccharide units of alternating β -D-glucuronic acid and N-acetyl- β -D-galactosamine, the same structure as mammalian chondroitin sulfate. In the sea cucumber polysaccharide, however, the β -D-glucuronic acid residues bear sulfated fucose branches at the 3-position (A). These branches are removed by mild acid hydrolysis (B), while the hexuronic acid carboxyl groups are reduced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/ NaBH_4 (C). Yield and integrity of the polysaccharides obtained after these two procedures were the same as in our previous study. See Moura et al. (1996) for further details about the structures and compositions of the native and chemically modified polysaccharides.

preparations were initially perfused for 30 min, when the basal CK release rate was measured. Then, muscles were exposed to *B. jararacussu* venom (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), polylysine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Triton-X (0.1%), all alone or associated with the tested compounds in different concentrations at room temperature. The perfusates were collected and replaced every 30 min. The collected samples were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for posterior analysis of CK activity, which was determined by using a diagnostic kit (BIOCLIN[®]). At the end of 90 min the EDL muscles were removed, dried and weighed. The rate of CK release from the isolated muscles was expressed as the increase in CK release compared to control values. Basal release rate refers to the enzyme loss from the muscles into the PSS medium during the equilibration period of perfusion (30 min), starting immediately after the preparation had been mounted in the sample-collection unit. The CK activity was expressed in international units (U), where 1 U is the amount that catalyzes the transformation of 1 μmol of substrate at 25 $^{\circ}\text{C}$. The rate of CK release from the isolated muscle was expressed as enzyme units released into the medium per gram per hour of collection ($\text{U g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

2.3. Myotoxicity *in vivo* and thigh edema

In vivo myotoxicity was evaluated by intramuscular (i.m.) injection of *B. jararacussu* venom (1 mg/kg) dissolved in physiological saline solution (PSS, 0.1 mL) alone or associated with fucCS and

derivatives (15 min preincubation prior to injection, room temperature). Intramuscular injection was performed at the posterior aspect of the right thigh. Edema was measured, with a digital micrometer caliper, evaluating the lateral–lateral and anterior–posterior diameters of mice thighs at time 0, 15, 30, 60, 90, 120 min. The animals that received i.m. injection with PSS were used as control. In the same experiments, the animals were lightly anesthetized with diethyl-ether and blood was collected by orbital puncture, immediately before and 2 h after the i.m. injection. Plasma was separated by centrifugation and the subsequent determination of CK activity in plasma was performed as described previously (Melo and Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al. 1993, 1994; Calil-Elias et al., 2002a).

2.4. EDL CK content and MPO activity

To assay the CK content within EDL muscle, we performed a perimuscular injection (0.06 mL) of *B. jararacussu* venom (1 mg/kg) alone or associated to fucCS or derivatives (1 and 10 mg/kg). Perimuscular injection was performed just beside EDL muscle, without causing it direct mechanical damage, according to Melo and Ownby (1999) and Calil-Elias et al. (2002a). After 24 h, mice were sacrificed under diethyl ether anesthesia, and muscles were removed, freed from fat and tendons, dried with absorbent paper and weighed. To evaluate muscle MPO and CK content, muscles were homogenized in 1 mL hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) (5 mg/mL)

solution, from which 100 μ L were added 900 μ L of o-dianisidine 1 μ M + 0.001% H₂O₂ solution to measure MPO activity for 3 min with 30 s intervals at 450 nm. A volume of 250 μ L of the homogenized solution was added to 150 μ L of PSS and 100 μ L of albumin 2%. 5 μ L of this solution was used to measure CK content. Both analyses were expressed in enzyme units per gram of muscle tissue (U/g). The injection of PSS alone was used as control. Each experimental protocol was repeated at least twice (Posadas et al., 2004; Saturnino-Oliveira et al., 2012).

2.5. Leukocytes count

For the total leukocyte count 20 μ L of anticoagulated blood (citrate 3.8%) were diluted in 380 μ L Turk's solution (2 mL glacial acetic acid in 1 L distilled water with a few drops of gentian violet). This solution promotes hemolysis by acetic acid and mild staining of leukocytes by gentian violet, allowing visualization in microscope. A volume of 10 μ L was added to a Neubauer chamber and leukocytes were counted. The results were expressed as variation of the number of cells per mL (Inwood et al., 1983).

2.6. Tail bleeding time and skin hemorrhage

To evaluate the increase in tail bleeding time induced by *B. jararacussu* swiss mice were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital (i.m.) and 2.5 mg/kg xylazine (i.p.), then the tip of their tail was cut and the tail immersed in a tube with 4 mL distilled water. After one hour, each test tube was placed on a vortex for about 10 s, 100 μ L of the solution were added to 900 μ L of distilled water and the absorbance of the solution was measured at 540 nm. Results were expressed as absorbance values (Dejana et al., 1979; Fernandes et al., 2014). To assess the skin hemorrhagic activity the method described by Melo et al. (1994) was used. The animals had their abdominal skin shaved and injected (i.d.) with 100 μ L of physiological saline solution (PSS), *B. jararaca* venom (1 mg/kg) alone or associated with fucCS (1–10 mg/kg). Two hours after injection, the animals were sacrificed under anesthesia with diethyl ether, skins were removed, stretched and stored for 72 h at room temperature (± 25 °C). After drying, the skins were cut into squares of 3.0 cm around the center point of bleeding. The skin was fixed to a lucite base plate, and the entire area at the injection site and the surrounding area were transilluminated using an incandescent light. Light transmitted over an area of 109 mm² was read, and light transmission or the absorbance was normalized by taking the mean values of the readings over skin injected with either PSS (calibrated to zero) or venom as arbitrary units of absorbance (AU) (Melo et al., 1994).

2.7. Venom procoagulant activity

To assess the ability of fucCS and derivatives in antagonize the venom procoagulant effect we determined the blood coagulation time using a modified Lee and White (1913) method. Microhematocrit capillary tubes were previously filled with PSS, *B. jararacussu* crude venom (0.1 μ g/ μ L) alone or associated to fucCS (0.01–0.8 μ g/ μ L). Blood was collected by orbital puncture in non-heparinized capillary tubes and the coagulation time determined (Fernandes et al., 2014).

2.8. Venom phospholipase activity

The phospholipase activity was determined using the modified Marinetti (1965) turbidimetric method. First, a stock solution (SS) was prepared using a fresh egg yolk, which was separated, filtered and diluted in 150 mM NaCl until the volume of 100 mL. From SS, a work solution (WS) was prepared after 1:10 dilution in saline. Each

well was filled with a solution contained 4 μ L CaCl₂ 0.5 M (10 mM), 5 μ L sodium taurocholate 0.4% (0.01%), 5 μ L Tris-HCl 0.2 M (pH 7.5, 5 mM), 60 μ L of WS and sufficient saline to a final volume of 200 μ L. The volume corresponding to BJU venom, fucCS and derivatives was subtracted from saline. The reaction occurred at 37 °C for 30 min and absorbance was measured on ELISA at 925 nm 5 and 30 min after addition of substances. The results were expressed as percentage of change in absorbance compared between each group and saline-only group.

2.9. Venom hyaluronidase activity

Hyaluronidase activity was assessed by using the Di Ferrante (1956) method. Bovine hyaluronic acid (Fluka[®], St. Louis, USA) was used as a substrate to evaluate the reduction of the solution's turbidity. Hyaluronic acid was reconstituted with acetate buffer 0.2 M acetic acid + 0.15 M NaCl pH 6.0 solution and added in plastic tubes (20 μ g/mL). Venom (50 μ g/mL), fucCS and derivatives (1–10 μ g/mL) were added after 30 min of incubation at 37 °C and completed with buffer up to 333.3 μ L of final volume. The solution was kept in a water bath at 37 °C for 60 min. At the end, it was added 666.6 μ L of 2.5% Cetremide[®] solution and after 10 min at room temperature the absorbance was measured on spectrophotometer at 400 nm. The acetic acid-acetate buffer was used as blank tube and the results expressed percentage of venom activity.

2.10. Venom collagenase activity

B. jararacussu venom collagenase activity was assessed by a colorimetric method adapted from Chavira Jr. et al. (1984). A 0.3% azo-dye impregnated collagen solution (Azocol[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was prepared with Tris-HCl 0.2 M pH 7.5 as buffer. To each assay tube 200 μ L of this solution (0.2%) was added, 6 μ L of a solution of 1 M CaCl₂ (20 mM) buffer q.s. to 300 μ L. In the working groups we added venom (50 μ g/mL), fucCS and derivatives, whose volumes were subtracted from buffer. Test tubes were maintained at 37 °C for 90 min and stirred gently every 10 min. At the end of this period, tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 2 min and the absorbance was measured on ELISA at 520 nm. Results were expressed as percentage of venom collagenase activity.

2.11. Venom proteolytic activity

The proteolytic activity was performed according to the method described by Garcia et al. (1978). Briefly, an azocasein solution (0.4%) diluted 1:1 in 0.9% saline and 0.05 M NaOH was prepared, and for each test tube it were added 100 μ L of this solution, 50 μ L of Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, 4 μ L of CaCl₂ 1 M (20 mM) and distilled water q.s. to 200 μ L. The volume corresponding to venom (10 μ g/mL), fucCS and derivatives was subtracted from the volume of distilled water. The reaction occurred during 90 min at 37 °C and was stopped by adding 100 μ L of a 15% trichloroacetic acid solution. Each test tube was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. After this process, 150 μ L of supernatant were removed and then added to 75 μ L of a 2 M NaOH solution. Absorbance was measured at 420 nm on ELISA, and zero activity was considered corresponding to distilled water group, and results were shown as percentage of inhibition.

2.12. Column affinity and electrophoresis

Affinity column (1 mL) was constructed through coupling fucCS to CNBr-activated Sepharose resin according to manufacturer's recommendations (Amersham Pharmacia Biotech). The efficacy of fucCS binding to resin was evaluated by measuring the

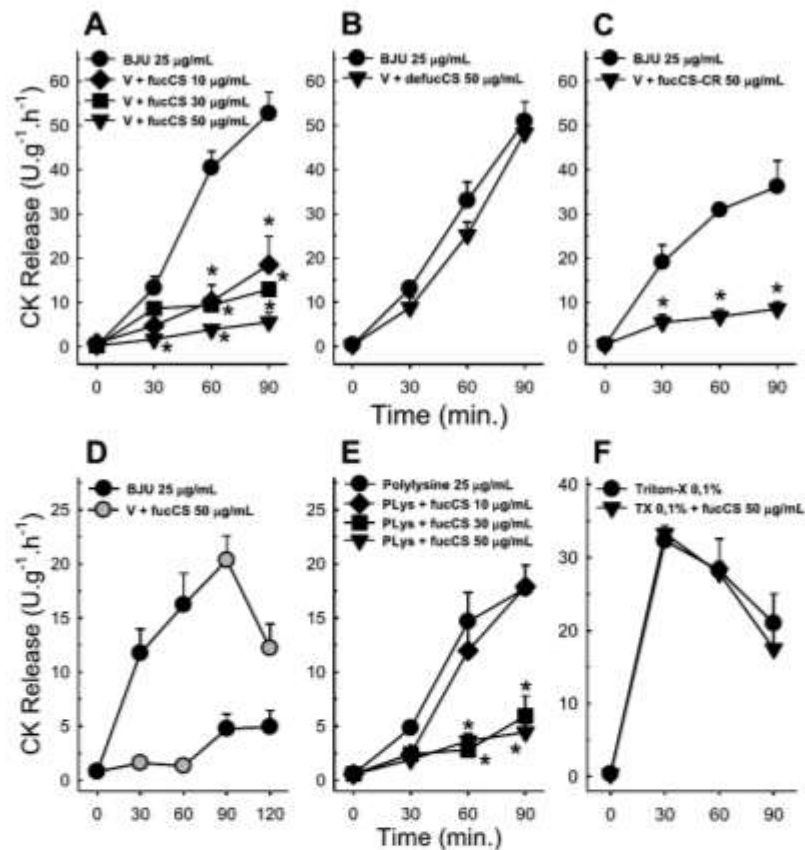


Fig. 2. BJU crude venom *in vitro* myotoxicity. Panels A–C show CK release induced by BJU crude venom (25 µg/mL) and its antagonism by fucCS (10–50 µg/mL) (A) and fucCS-CR (50 µg/mL) (C), but not by defucCS (50 µg/mL) (B). Panel D shows the muscle response after changing the solutions with venom alone or associate to fucCS. Panel E demonstrates the antagonism of myotoxicity induced by polylysine (25 µg/mL) and influence of fucCS (10–50 µg/mL), and panel F the effect of fucCS on muscle damage induced by Triton-X alone and in the presence of fucCS (50 µg/mL). Two-Way ANOVA Bonferroni's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs BJU or PLys ($n = 4–8$).

metachromatic properties of the resin. A control column was performed by treating the resin without the addition of sulfated polysaccharides. Next, *B. jararacussu* venom (100 µg) was applied to the pre-equilibrated column of Sepharose with 20 mM Tris–HCl, pH 7.4, and connected to a HPLC system. The column was washed with 10 ml. of the same buffer and eluted at a flow rate of 0.5 mL/min using a linear gradient of NaCl (from 0 to 2.0 M). The fractions were monitored at A_{280nm} and the NaCl concentration determined by conductivity. The affinity columns were carefully tested with different concentrations of *B. jararacussu* crude venom to ensure non-saturating conditions, thus, providing a good binding comparison of fucCS to venom proteins (Fonseca et al., 2010).

The molecular masses of the preparations were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis. In this experiment, 10 µg of each preparation was applied to a 14% polyacrylamide slab gel in 0.02 M sodium barbital, pH 8.6, and run for 60 min at 100 V. The gel was stained with Coomassie Blue in 1% acetic acid and then washed for 4 h in 1% acetic acid. The molecular masses of the preparations were determined by comparison with the electrophoretic mobility of standard compounds.

2.13. Histological examination

Twenty four hours after perimuscular EDL injection of 1.0 mg/kg venom, the mice were anesthetized with ethyl ether and killed by cervical dislocation. The EDL muscles were dissected and fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Next, they were washed three times in the same buffer and postfixed for 1 h in 1% OsO_4 . The tissue was then dehydrated in increasing acetone concentrations (30–100%) and embedded in Polybed 812 resin. Sections (500 nm) for light microscopy examination were obtained using an RMC ultramicrotome, stained with 1% toluidine blue, and then observed and photographed under light microscopy (Melo and Ownby, 1999; Calil-Elias et al., 2002b).

2.14. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM, and One-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used to compare groups with one variable, followed by Dunnett's post-hoc test. For two variables the Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used followed by

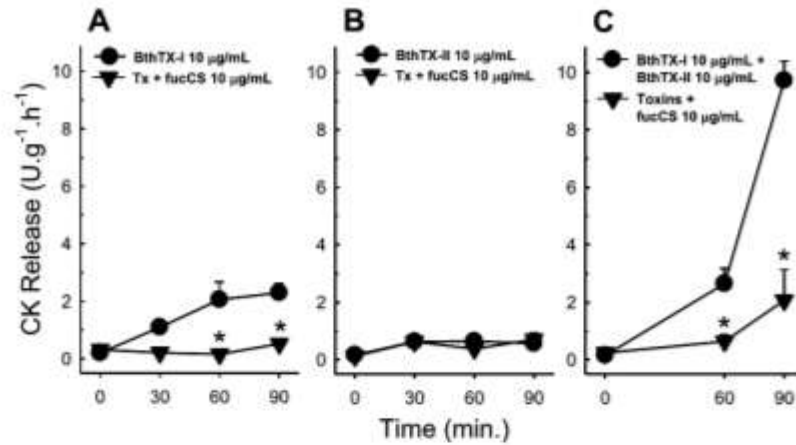


Fig. 3. Toxins in vitro myotoxicity. Panel A shows the effect of BthTX-I (10 µg/mL) on CK release and antagonism by fucCS (10 µg/mL), while BthTX-II (10 µg/mL) is shown in panel B. Panel C demonstrates the potentiated effect of gathering both toxins, and the antagonism by fucCS. Two-Way ANOVA Bonferroni's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs BthTX-I or BthTX-I + BthTX-II ($n = 3-4$).

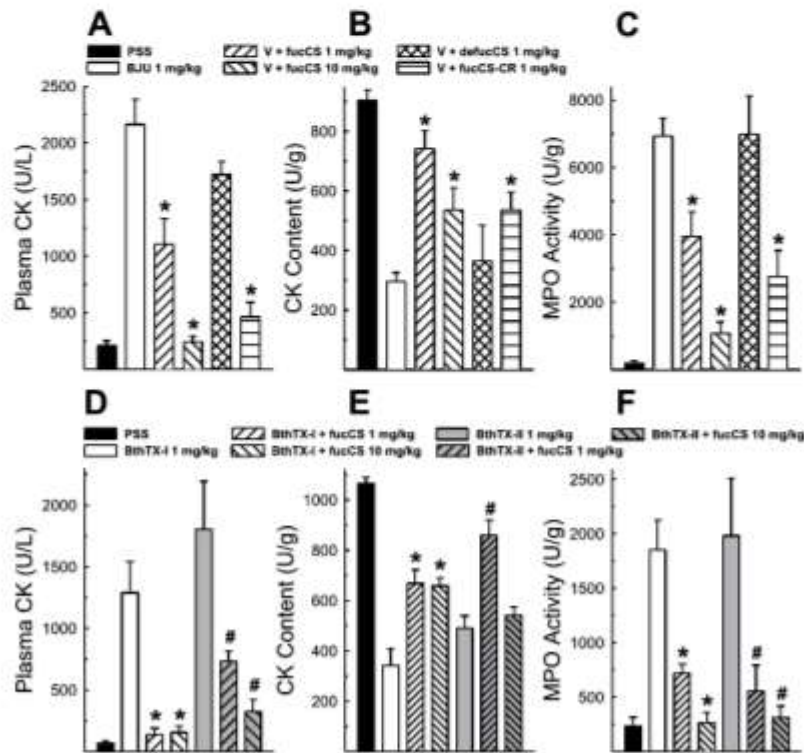


Fig. 4. BJU crude venom in vivo activities. Panels A–C show plasma CK, CK content and MPO activity, respectively, after BJU crude venom (1 mg/kg) injection and the antagonism by fucCS (1 and 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) and fucCS-CR (1 mg/kg). The same protocol is shown in panels D–F, which show damage induced by both toxins (1 mg/kg) separately and the antagonism by fucCS (1 and 10 mg/kg). One-Way ANOVA Dunnett's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs BJU or BthTX-I and # $p < 0.05$ vs BthTX-II ($n = 4-5$).

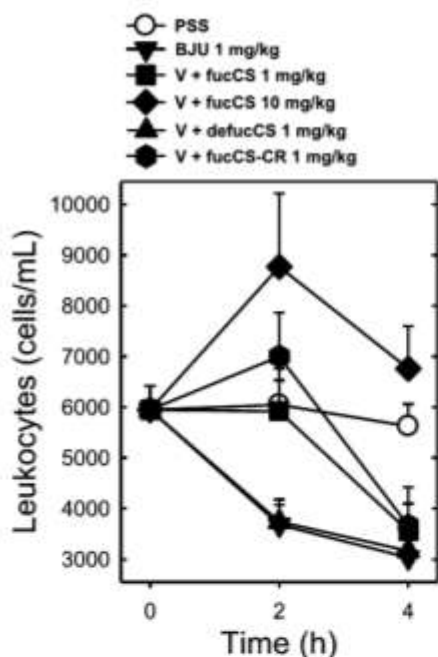


Fig. 5. Leukocytes in blood after BJU crude venom. Number of leukocytes in blood after injection of BJU alone or together with fucCS (1 and 10 mg/kg), defucCS (1 mg/kg) and fucCS-CR (1 mg/kg). Two-Way ANOVA Bonferroni's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs BJU ($n = 4-5$).

Bonferroni's post-hoc test. The p value < 0.05 was used to indicate a significant difference between means. The software GraphPad Prism version 5.01 was used to provide statistical analysis. The four parameters nonlinear regression were used for the IC_{50} curves determination using Sigmaplot program version 8.02.

3. Results

To evaluate the ability of fucCS to antagonize myotoxicity, we exposed the EDL muscle to *B. jararacussu* venom alone (25 μ g/mL) or associated with fucCS (10–50 μ g/mL) (Fig. 2A). The rate of creatine kinase (CK) release after 90 min of venom perfusion increased from 0.22 ± 0.05 up to 52.71 ± 4.87 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$. Different concentrations of fucCS inhibited this effect in a concentration-dependent manner, reducing CK release down to 5.59 ± 2.01 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$, when associated with fucCS 50 μ g/mL. The defucosylation of fucCS abolished this protection (48.24 ± 3.24 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 2B) while the carboxi-reduction preserved this property (8.56 ± 1.58 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 2C). To investigate if this effect is reversible, we exposed the EDL muscles to venom alone during 60 min (16.21 ± 2.88 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) and then to venom associated with 50 μ g/mL fucCS (12.20 ± 2.24 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$). The inverse protocol showed a protection in the first 60 min (1.34 ± 0.34 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) and damage after venom exposure (8.56 ± 1.58 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 2D). To determine the importance of negatively charged fucose moieties in preventing myotoxicity induced by positively charged myotoxic substances, we exposed some muscles to polylysine (25 μ g/mL). It was observed that 50 μ g/mL fucCS was capable of preventing the polylysine-induced increase of CK release (17.74 ± 2.14 vs. 4.45 ± 0.79 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 2E). Finally, to exclude any direct interaction between fucCS and CK itself, we perfused EDL muscle

with a detergent, Triton-X (0.1%), and observed that fucCS was unable to prevent muscle damage induced by this agent (33.27 ± 0.46 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 2F).

Subsequently, we investigated direct effect of fucCS over the main myotoxins isolated from *B. jararacussu* venom. We exposed the muscles to BthTX-I, BthTX-II and both toxins together in the absence and in the presence of fucCS. Results showed a protection against BthTX-I (0.52 ± 0.06 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) and toxins together (2.07 ± 1.05 $U\ g^{-1}\ h^{-1}$) (Fig. 3A, C), whereas BthTX-II did not induce muscle damage alone at the concentration analyzed (Fig. 3B).

The plasma CK activity, the CK content within EDL muscles and EDL myeloperoxidase (MPO) activity were all assessed with intramuscular or perimuscular injections. First, we performed a perimuscular injection of *B. jararacussu* venom alone (1 mg/kg) or associated with the tested substances (1–10 mg/kg), just beside the EDL muscles. The plasma CK activity increased from 207 ± 45 up to 2163 ± 220 U/L two hours after venom injection, and this effect was antagonized by fucCS 1 and 10 mg/kg (1107 ± 222 and 242 ± 55 U/L, respectively) and fucCS-CR 1 mg/kg (464 ± 127 U/L), but only limitedly by defucCS 1 mg/kg (1719 ± 118 U/L) (Fig. 4A). The same profile was observed with CK content and myeloperoxidase (MPO) activity assays. In the first, venom injection decreased CK content from 904 ± 34 down to 295 ± 31 U/g. We observed that fucCS 1 mg/kg (740 ± 61 U/g) was better than fucCS 10 mg/kg (535 ± 76 U/g) in antagonizing CK reduction (Fig. 4B). Once again, fucCS-CR partially protected the muscles from CK loss (535 ± 61 U/g) while defucCS did not (363 ± 120 U/g). In the second, EDL MPO activity increased from 193 ± 71 up to 6941 ± 524 U/g with venom injection. Treatment with fucCS 10 mg/kg (1071 ± 340 U/g) was superior to fucCS 1 mg/kg (3958 ± 735 U/g) in decreasing MPO activity. FucCS-CR reduced the venom-induced MPO activity down to 2763 ± 773 U/g, while the defucosylation of fucCS abrogated protection (6979 ± 1138 U/g) (Fig. 4C).

Similarly, we performed the experiments with the isolated toxins. Again, fucCS was able to prevent the increase in plasma CK activity induced by BthTX-I (1290 ± 250 U/L) and BthTX-II (1803 ± 392 U/L), both with 1 mg/kg (BthTX-I: 139 ± 51 U/L and BthTX-II: 733 ± 82 U/L) and 10 mg/kg (BthTX-I: 155 ± 51 U/L and BthTX-II: 327 ± 97 U/L) (Fig. 4D). On its turn, the loss of CK content was assessed: BthTX-I and BthTX-II decreased the CK content from 1067 ± 23 (control) down to 342 ± 66 and 490 ± 50 , respectively (in U/g). This effect was prevented by both doses of fucCS but, just as with crude venom, fucCS 1 mg/kg was more effective than fucCS 10 mg/kg against BthTX-II in the CK content assay (BthTX-I: 668 ± 54 U/g and 658 ± 32 U/g, BthTX-II: 860 ± 59 U/g and 542 ± 33 U/g, respectively) (Fig. 4E). The myeloperoxidase activity in EDL muscle increased from 237 ± 80 U/g (PSS) up to 1853 ± 272 U/g (BthTX-I) or up to 1982 ± 530 U/g (BthTX-II). Both doses of fucCS antagonized the toxins' inflammatory effect (BthTX-I: 721 ± 87 U/g and 267 ± 93 U/g, BthTX-II: 556 ± 237 U/g and 313 ± 106 U/g, respectively) (Fig. 4F).

To investigate the effect upon inflammatory cells we performed perimuscular injection of *B. jararacussu* crude venom and assessed the number of leukocytes in blood. It was observed a reduction from 5948 ± 471 cells/mL down to 3032 ± 250 cell/mL within 4 h. This reduction was partially prevented by fucCS 1 mg/kg and fucCS-CR 1 mg/kg, and completely prevented by fucCS 10 mg/kg (6762 ± 834 cells/mL). In the association with defucCS we observed a reduced cell account similarly to crude venom (3163 ± 369 cells/mL) (Fig. 5).

Another protocol evaluated the edema induced by *B. jararacussu* venom (Fig. 6A, B) and toxins (Fig. 6C, D). After an i.m. injection, we measured for 120 min the thigh edema. After 15 min, the thigh area increased up to 21.2 ± 2.5 mm^2 , from baseline and this effect was completely inhibited by fucCS 1 mg/kg, whereas fucCS 10 mg/kg

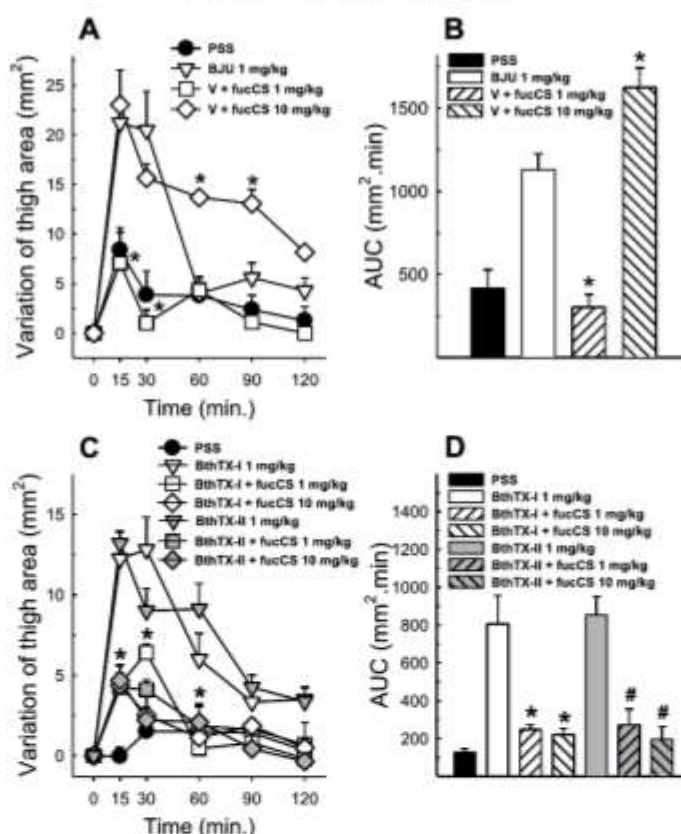


Fig. 4. Edematogenic Activity. Panels A and C show edema variation after IJUV crude venom (1 mg/kg) and toxins (1 mg/kg) injections, respectively, and its antagonism by fucCS (1 and 10 mg/kg). Panels B and D show the area under the curves of these experiments. Two-Way ANOVA Bonferroni's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs IJUV or BthTX-I and BthTX-II (Panels A and C), One-Way ANOVA Dunnett's post-hoc test * $p < 0.05$ vs IJUV or BthTX-I and # $p < 0.05$ vs BthTX-II (Panels B and D) ($n = 4$).

cannot protect edema induced by venom ($23.1 \pm 3.5 \text{ mm}^2$). When faced to toxins, both doses were able to avoid edema formation as noted by similar PSS area under curve.

The ability of fucCS to interfere with hemostasis was evaluated through a tail bleeding assay. First, we performed an intravenous injection of *B. jararacussu* venom (0.1 and 0.3 mg/kg) in anesthetized mice, cut the tip of mice tails and collected blood for 1 h, then we evaluated the amount of bleeding by the change in absorbance (PSS: 278 ± 31 , 0.1 mg/kg: 440 ± 56 , 0.3 mg/kg: 785 ± 98) (Fig. 7A). Next, we injected venom (0.3 mg/kg) with fucCS 1 mg/kg and noted its incapacity in preventing the increase in hemorrhage (981 ± 74) (Fig. 7B). To investigate the skin hemorrhage, we performed an intradermic injection of 1 mg/kg *B. jararacussu* venom, which caused an increase in skin absorbance (from 209 ± 35 with PSS up to 560 ± 39 arbitrary units), and we observed that fucCS also was also unable to prevent this type of hemorrhage (1 mg/kg: 696 ± 47 , 3 mg/kg: 609 ± 42 , 10 mg/kg: 698 ± 60) (Fig. 7C). Lastly, the procoagulant effect of *B. jararacussu* crude venom was evaluated (17.2 ± 0.6 s vs. 148.5 ± 7.6 s with PSS), and increasing concentrations of fucCS were capable of antagonizing coagulation induced by the venom, restoring the coagulation time to normal (149.5 ± 8.5 s) at $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 7D). With this concentration, when applied without venom, the blood was incoagulable

(data not shown).

We also evaluated the ability of fucCS and derivatives to inhibit *B. jararacussu* venom enzymatic activities (Fig. 8). All of them were inhibited in different extents by fucCS and fucCS-CR, being this inhibition more pronounced for hyaluronidase (94%) and phospholipase (90%) activities, but also significant for collagenase (60%) and proteolytic (42%) activities. In all assays, defucCS was unable to inhibit venom enzymatic activities.

Then, we used a fucosylated chondroitin sulfate affinity column attached to a HPLC system to evaluate interaction with *B. jararacussu* crude venom. After elution we collected the samples and observed retention of two peaks (P1 and P2) showing affinity to fucCS at 280 nm (Fig. 9A). The fractions P1 and P2 were pooled, dialyzed against distilled water, lyophilized and $\sim 10 \mu\text{g}$ of each preparation was run on a polyacrylamide gel to estimate the molecular mass, as described. As shown in Fig. 9B, P2 had the same molecular mass than BthTX-I and BthTX-II, i.e. around 14 kDa. Thus, we challenged fucCS and derivatives against BthTX-II in the phospholipase protocol. As we expected, the same pattern occurred with crude venom (Fig. 9C), being fucCS (100%) and fucCS-CR (76%) able to inhibit this effect while defucCS was not.

Finally, we evaluated the morphology of EDL muscle. A perimuscular injection of *B. jararacussu* (1 mg/kg) alone or associated to

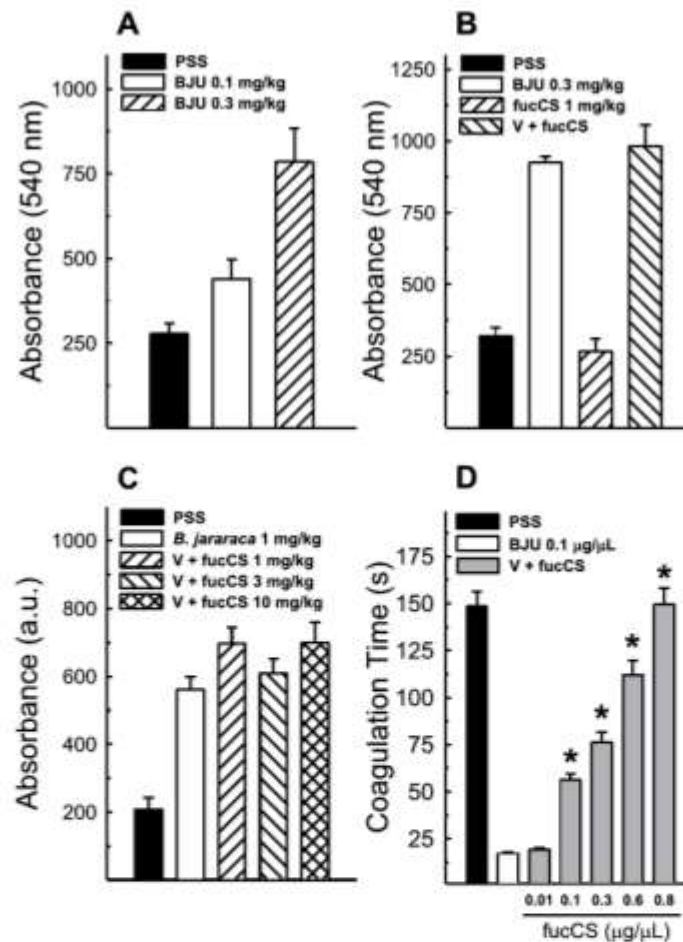


Fig. 7. BJU effect on hemostasis. Panels A shows the dose dependent effect of BJU crude venom on bleeding amount and panel B shows the venom alone (0.3 mg/kg) and associated to fucCS (1 mg/kg). Panel C demonstrates skin bleeding after intradermic injection of *B. jararaca* crude venom (1 mg/kg) and effect of mixture with fucCS (1–10 mg/kg). Panel D shows BJU crude venom (0.1 μg/ml) procoagulant activity and its antagonism by fucCS (0.01–0.8 μg/ml). One-Way ANOVA Dunnett's Post-hoc test * $p < 0.05$ vs BJU ($n = 4$) (Panel D, $n = 10$ –12).

fucCS (1 and 10 mg/kg) was performed. Light microscopy showed that crude venom induced a marked edema, the presence of inflammatory cells and necrosis after 24 h (Fig. 10B). Both doses of fucCS (Fig. 10C, D) were capable of preserving the polygonal muscle cell shape, preventing myonecrosis and inflammatory cells migration.

4. Discussion

In this study we demonstrated that fucCS and fucCS-CR were able to antagonize many activities induced by venoms of *Bothrops* sp. The components present in *B. jararacussu* crude venom induce different tissue dysfunction, such as necrosis, hemorrhage and edema and its main PLA2 toxins, BthTX-I and BthTX-II, induce severe cell muscle damage (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; da Silva et al., 2007; Montecucco et al., 2008; Fernandes et al., 2014). We showed that fucCS and fucCS-CR antagonized *in vitro* and *in vivo* *B.*

jararacussu venom activities, such as procoagulation, myotoxicity, edema, leucocytes migration and MPO activity, whereas defucCS was not able to neutralize these effects.

On the experiments performed *in vitro* on mouse EDL muscle, we showed that fucCS and fucCS-CR, but not defucCS, diminish the damage induced by the venom, and this effect of fucCS was reversible. This protocol allowed us to demonstrate the importance of interaction between fucCS and venom in preventing muscle damage, in accordance with previous observations with different antagonists (Melo and Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Fernandes et al., 2014). This protective effect was also observed when muscles were exposed to myotoxins BthTX-I and BthTX-II, either isolated or combined in the same solution. In addition, we observed that fucCS protected muscles exposed to polylysine, a highly positively charged molecule which induces sarcolemmal damage *in vitro*. However, fucCS did not inhibit the increase of CK release from muscles exposed to triton-X 100, in the same experimental

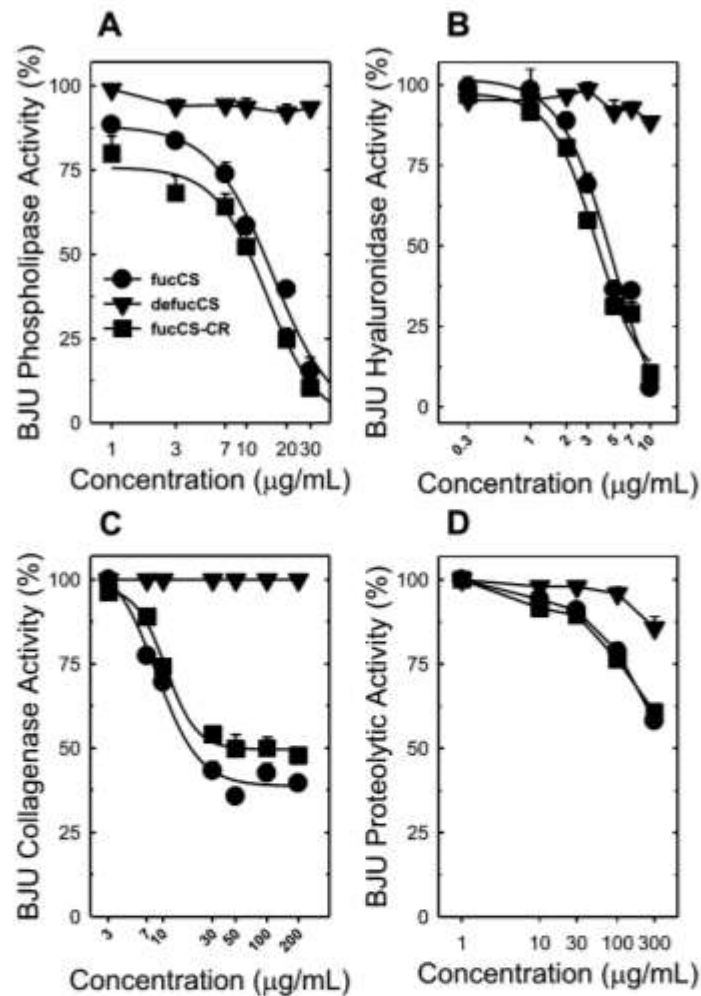


Fig. 8. Enzymatic activities. Panels A, B, C and D show a complete inhibition of phospholipase and hyaluronidase activities and a partial inhibition of collagenase and proteolytic activities of *B. jararacussu* crude venom (BJU) (A and D 10 μg/mL, B and C 50 μg/mL) by fucCS and fucCS-CR, but not by defucCS. Concentrations in the X axis refer to concentrations of the inhibitors.

conditions. The neutralization of such cytotoxic agents by fucCS is indicative that negatively charged fucose moieties are important on the sarcolemmal protection, so that a possible mechanism to explain the inhibitory effect of fucCS on venom toxins is through charge interaction, which agrees with previous data on the subject (Melo et al., 1993; Murakami et al., 2005, 2007; Gutiérrez and Lomonte, 2013). This interaction was demonstrated on the fucCS affinity column and in the electrophoresis experiments, which confirmed that a negatively charged substance combined with the toxins. The charge interaction model is supported by the observation that BthTx-II, in the same dose of BthTx-I, did not cause significant muscle damage, and it has been described that BthTx-II is only weakly positively charged, while BthTx-I display strong positive charge (Murakami et al., 2008). Perfusion with both toxins together induced more extensive muscle damage, which agrees

with previous data showing that, in myotubes, Asp49 and Lys49 myotoxins act synergistically to increase the plasma membrane Ca^{2+} permeability, and consequently cell death (Cintra-francischinelli et al., 2009, 2010), which has recently been observed *in vivo* by Mora-Obando et al. (2014), who demonstrated a clear enhancement of myonecrosis by the combined action of these two kinds of toxins in mice.

The *in vivo* assays showed that, in a dose-dependent manner, fucCS prevented mouse muscle damage, evaluated by plasma CK activity and muscle MPO activity induced by injections of *B. jararacussu* crude venom or BthTx-I and BthTx-II in mice. We ascribe the muscle protection by the fucCS to two effects. First, the direct polyanion's ability to neutralize the venom toxins with positive charges, and the second effect is the inhibition of the inflammatory response evaluated by the antagonism of

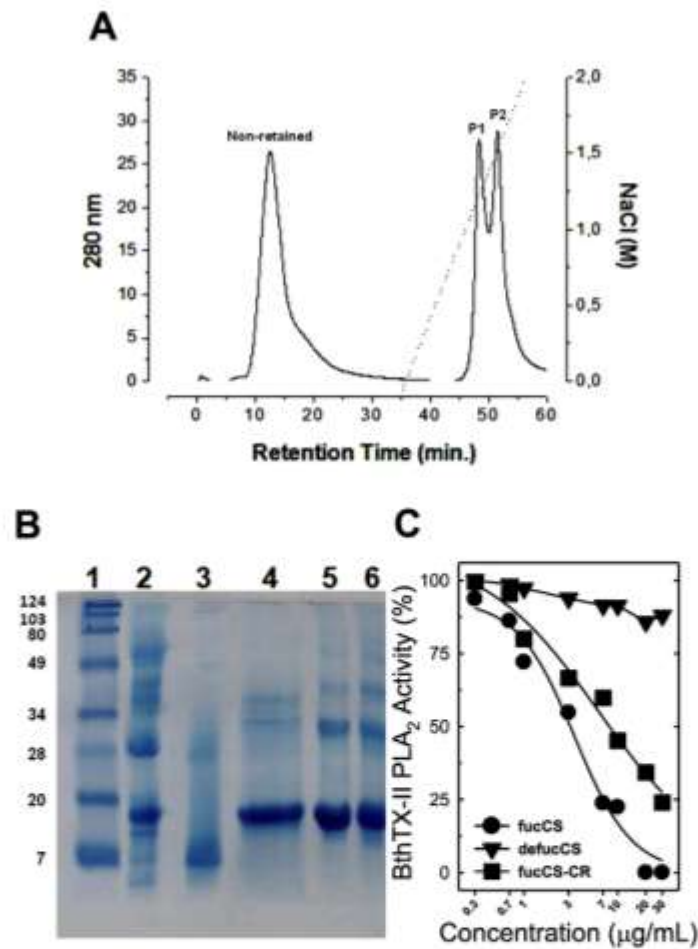


Fig. 9. FucCS column affinity, electrophoresis of *B. jararacussu* crude venom and BthTX-I and BthTX-II PLA₂ activity. Panel A shows the elution profile of crude venom (~100 µg) through a fucCS affinity column (1 mL) connected to an HPLC system. The column was washed with 20 mM Tris/HCl, pH 7.4 and then eluted with a linear gradient of 0.15–2.0 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The fractions P1 and P2 were pooled, dialyzed against distilled water, lyophilized and ~30 µg of each preparation was run on a 14% polyacrylamide gel to estimate the molecular mass, as described. The electrophoresis is shown in Panel B: (1) standard molecular weight markers, (2) crude venom, (3) P1, (4) P2, (5) BthTX-I, and (6) BthTX-II. In panel C was observed the inhibition of BthTX-II PLA₂ activity by fucCS and fucCS-CR, but not by defucCS.

phospholipase activity and the decreased local muscle leukocyte MPO induced by the venom components. Previous observations demonstrated that the presence of inflammatory cells is related with myonecrosis induced by snake venoms, and the treatment with dexamethasone or plant extract decreases the MPO and inflammation, as well as the muscle damage (Patrão-Neto et al., 2013; Strauch et al., 2013). The increase of leukocytes observed in groups treated with fucCS may be explained by a possible increase in leukocyte mobilization from bone marrow, induced by inflammatory response after venom injection, a process in which glycosaminoglycans can be important (Gordon et al., 1987; Patrão-Neto et al., 2013; Strauch et al., 2013). It has been described that fucCS inhibits sialyl-Lewis and P- and L-selectins, preventing neutrophil migration, which also can contribute to this effect (Borsig et al., 2007). It all supports the observations showing that fucCS decreases neutrophil migration to EDL muscle (MPO in EDL

and blood cell count) and edema formation (1 mg/kg), which indicate that this substance can prevent the complex inflammatory response induced by *B. jararacussu* venom, which plays an important role in myotoxicity (Landucci et al., 1998; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Teixeira et al., 2003, 2005; Elifio-Esposito et al., 2011; Patrão-Neto et al., 2013).

FucCS antagonized the inflammatory edema induced by the crude venom, which is related to local mediators resulted from PLA₂ activity upon arachidonic acid and its metabolites. Thus, inhibition of edema by fucCS is particularly interesting since the antivenom is limited in inhibiting edema induced by other *Bothrops* venom such as *B. jararaca* crude venom (Araújo et al., 2007). Curiously, the edema induced by *B. jararacussu* venom was antagonized by fucCS 1 mg/kg, which was not observed with 10 mg/kg. This phenomenon could be related to modifications in the interaction of fucCS-toxins based on the proportion of these

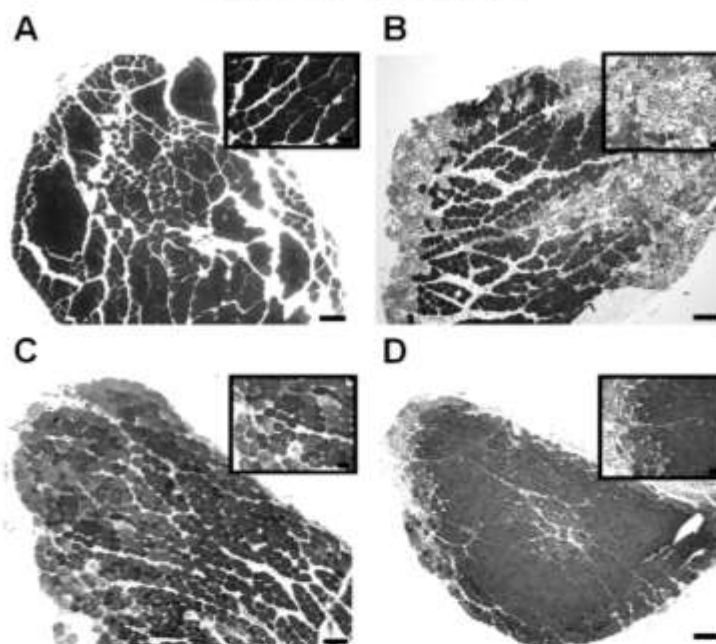


Fig. 10. Histological examination. Cross section of extensor digitorum longus muscle 24 h after (A) saline, (B) *B. jararacussu* 1 mg/kg, (C) BJU + fucCS 1 mg/kg and (D) BJU + fucCS 10 mg/kg injections. Panel A shows organized bundles and fibers, and in the insert we can see polygonal aspects and absence of inflammatory cells. In panel B, note cell disorganization in periphery, and in the insert, edema, intense presence of inflammatory cells and grouping of myofibrils. Panels C and D show preserved muscle with few periphery damaged cells. Figure bar scale: 50 µm, Insert bar scale: 20 µm.

components, just like in a bell-shaped curve where higher concentrations of fucCS decreases the efficiency of the complex, which has been observed previously with the natural sulfated polysaccharide fucoidan against cytotoxic and myotoxic activities of a group of PLA₂ myotoxins from crotaline snake venoms (Angulo and Lomonte, 2003). Inhibition of snake venom PLA₂ and myotoxicity also occur with other polyanions like heparin (Melo et al., 1988, 1993; Cali-Elias et al., 2002b), fucoidan (Azofeifa et al., 2008), suramin (Arruda et al., 2002), as well as a synthetic coumestan (Melo et al., 2010). Histological study showed an intense presence of inflammatory cells, myonecrosis and edema in muscle exposed to *B. jararacussu* venom, which was prevented by treatment with fucCS.

The *B. jararacussu* procoagulant activity *in vitro* probably occurs due to the action of thrombin-like serine proteases, which accelerates the conversion of fibrinogen to fibrin (Sanchez et al., 1992; Zaganelli et al., 1996). This procoagulant effect was antagonized by fucCS. Because it is a glycosaminoglycan similar to heparin, it is possible that fucCS does not have a direct inhibitory action over serine proteases as well. Thus, inhibition of procoagulant activity of venom may be due to its ability to potentiate inhibition of thrombin by both heparin cofactor II and antithrombin (Mourão et al., 1996). It is suggested that local venom procoagulant property may be responsible for limiting blood flow in the microcirculation favoring tissue necrosis, which could be antagonized by fucCS. FucCS was unable to antagonize hemorrhage induced by *B. jararacussu* crude venom in a tail bleeding model, and hemorrhage induced by *B. jararaca* crude venom in a skin hemorrhage model. Metalloproteases, especially P-I and P-III family, are responsible for the increased bleeding activity induced by venom, once along with

collagenases they are responsible for basal lamina destruction, resulting in skin hemorrhage (Isbister, 2009; Markland, 1998). Thus, metalloprotease activity allied to depletion of fibrinogen and fibrin induced by serino proteases, which culminates with the impossibility of formation of the fibrin cap, promote the hemorrhagic process. In the protocol of tail bleeding fucCS was unable to prevent blood loss. FucCS was not able to reduce skin hemorrhage and still exacerbated the intensity of bleeding possibly due to interaction with venom components and its ability to increase prothrombin time and activated partial thromboplastin time (Mourão et al., 1996; Fonseca and Mourão, 2006).

We observed that fucCS and fucCS-CR were able to completely inhibit phospholipase and hyaluronidase activities, and partially inhibit collagenase and azocaseinolytic activities of *B. jararacussu* crude venom in different concentrations. Further, we investigated the inhibitory effect of these glycosaminoglycans upon BthTX-II phospholipase activity and observed that fucose moieties were essential to inhibit this activity. Although other factors may act upon *in vivo* myotoxicity, such as angiorrhhexis caused by other components of the venom, phospholipases are described as the main substances responsible for increased plasma levels of CK (Gutiérrez and Ownby, 2003; Mora-Obando et al., 2014). Column affinity showed that fucCS was capable to bind substances around 14 kDa, probably BthTX-I and BthTX-II, indicating the same ability of heparin to interact with these toxins through charge interaction. Melo et al. (1993) have shown that after mixing heparin and BthTX-I and eluting them in a Sephadex column, it forms a complex between the toxin and heparin, that cannot bind to column. Just like heparin, heparan sulfate and dermatan sulfate, fucCS inhibited hyaluronidase, possibly by acting as a substrate for this enzyme.

and not as a direct inhibition, as suggested by Mio and Stern (2002), Kemparaju and Girish (2006) and Girish and Kemparaju (2007).

In conclusion, we showed that fucCS demonstrated consistent effects against some venoms of epidemiologically important Brazilian snakes. Importantly, fucCS is obtained from a natural source (devoid of prions), is less hemorrhagic than heparin, and is also a candidate as antithrombotic, anticancer and anticoagulant agent, although more study is necessary to characterize fucCS as a possible candidate to act as adjuvant to the available serum therapy, which is limited in effect, aiming to reduce the myotoxicity induced by *B. jararacussu* venom.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.010>.

References

- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A₂ in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothrospoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763.
- Angulo, Y., Lomonte, B., 2003. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1993–2000.
- Araújo, S.D., de Souza, A., Nunes, F.P.B., Gonçalves, L.R.C., 2007. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararacussu* venom-induced paw edema in mice. *Inflamm. Res.* 56, 409–413.
- Arruda, E.Z., Silva, N.M.V., Moraes, R.A.M., Melo, P.A., 2002. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 723–726.
- Azofeifa, K., Angulo, Y., Lomonte, B., 2008. Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: comparison of high- and low-molecular weight fractions. *Toxicon* 51, 373–380.
- Borsig, L., Wang, L., Cavalcante, M.C.M., Cardão-Reis, L., Ferreira, P.L., Mourão, P.A.S., Esão, J.D., Pivão, M.S.G., 2007. Selection blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J. Biol. Chem.* 282, 14984–14991.
- Calil-Eliás, S., Thattasery, E., Martinez, A.M.B., Melo, P.A., 2002a. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1233–1235.
- Calil-Eliás, S., Martinez, A.M.B., Melo, P.A., 2002b. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. *Histol. Histopathol.* 17, 463–470.
- Cardoso, J.L., Fan, H.W., França, F.O., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C., Kamiguti, A.S., Kelen, E.M., Hirata, M.H., Miranda, R.M., Theakston, R.D., Warren, D.A., 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 1986, 315–325.
- Chavira Jr., R., Burnett, T.J., Hageman, J.H.A., 1984. Assaying proteinases with azocoll. *Anal. Biochem.* 136, 446–450.
- Chippaux, J., 2008. Estimating the global burden of snakebite lack of antivenom: a market. *PLoS Med.* 5, e221.
- Cintra-Franchinelli, M., Pizzo, P., Rodrigues-Simoni, L., Ponce-Soto, L.A., Rossetto, O., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Pozzan, T., Montecucco, C., 2009. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1718–1728.
- Cintra-Franchinelli, M., Pizzo, P., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Montecucco, C., Lomonte, B., 2010. The C-terminal region of a lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. *Toxicon* 55, 590–596.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B.O., Giglio, J.R., 1993. Bothrospoxin-E amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* 12, 57–64.
- Da Silva, N.M.V., Arruda, E.Z., Murakami, Y.L.B., Moraes, R.A.M., El-Gor, C.Z., Tomaz, M.A., Fernandes, F.F.A., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Giglio, J.R., Melo, P.A., 2007. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon* 50, 196–205.
- Dejara, E., Callioni, A., Quintana, A., De Gaetano, G.B., 1979. Bleeding time in laboratory animals. II – a comparison of different assay conditions in rats. *Thromb. Res.* 15, 191–197.
- Di Ferrante, N., 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J. Biol. Chem.* 220, 303–306.
- Elife-Eposito, S., Tomazeli, L., Schwartz, C., Gimenez, A.P., Foggi, G.M., Fernandes, L.C., Zibler, L.F.M., Stuelp-Campelo, P.M., Moreno, A.N., 2011. Human neutrophil migration and activation by BJCul, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Immunol.* 12, 10.
- Fernandes, F.F.A., Tomaz, M.A., El-Gor, C.Z., Monteiro-Machado, M., Strauch, M.A., Costa, B.L., Tavares-Henriques, M.S., Cintra, A.C.O., Facundo, V.A., Melo, P.A., 2014. Counteraction of *Bothrops* snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 155, 552–562.
- Fonseca, R.J.C., Mourão, P.A.S., 2006. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. *Thromb. Haemost.* 96, 822–829.
- Fonseca, R.J.C., Oliveira, S.N.M.C.G., Pomini, V.H., Mecawi, A.S., Araújo, L.G., Mourão, P.A.S., 2010. Effects of oversulfated and fucosylated chondroitin sulfates on coagulation. Challenges for the study of anticoagulant polysaccharides. *Thromb. Haemost.* 103, 994–1004.
- García, E.S., Guimarães, J.A., Prado, J.L., 1978. Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 315–322.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921–1943.
- Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M., Greaves, M.F., 1987. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326, 403–405.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841–850.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915–931.
- Gutiérrez, J.M., Fan, H.W., Silvera, C.L.M., Angulo, Y., 2009. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 53, 625–630.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39.
- Homs-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simoni, L., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization of biological activity of bothrospoxin. *Toxicon* 26, 615–627.
- Inwood, M.J., Thomson, S., Bryant, N.J., 1983. Practice of hematology. In: Raphael, S.S. (Ed.), *Lynch's Medical Laboratory Technology*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 674–675.
- Ibbister, G.K., 2009. Procoagulant snake toxins: laboratory studies, diagnosis, and understanding snakebite coagulopathy. *Semin. Thromb. Hemost.* 1, 93–103.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Gennov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumac, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieland, A., Botzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* 278, 4544–4576.
- Kemparaju, K., Girish, K.S., 2006. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* 24, 7–12.
- Landucci, E.C., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257–263.
- Lee, R.L., White, P.D., 1913. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am. J. Med. Sci.* 145, 495–503.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U., Hanson, L.A., 1994. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1509–1518.
- Marinetti, G.V., 1965. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 98, 554–565.
- Markland, E.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800.
- Mebs, D., 1986. Myotoxic activity of phospholipases A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. *Toxicon* 24, 1001–1008.
- Melo, P.A., Suarez-Kurtz, G., 1988. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon* 26, 87–95.
- Melo, P.A., Homs-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., Suarez-Kurtz, G., 1993. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothrospoxin by polyamines. *Toxicon* 31, 285–291.
- Melo, P.A., do Nascimento, M.C., Mors, W.B., Suarez-Kurtz, G., 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Exiloptera prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* 32, 595–603.
- Melo, P.A., Ownby, C.L., 1996. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to