

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2018.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA INTERAÇÃO ENTRE
DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E FOSFOLIPASE A₂ HOMÓLOGA DO
VENENO DE *Bothrops jararacussu*

FÁBIO FLORENÇA CARDOSO

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA INTERAÇÃO
ENTRE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E FOSFOLIPASE A₂
HOMÓLOGA DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*

FÁBIO FLORENÇA CARDOSO

PROF. TIT. MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

ORIENTADOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função.

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cardoso, Fábio Florença.

Estudos estruturais e funcionais da interação entre derivados do ácido cinâmico e fosfolipase A₂ homóloga do veneno de *Bothrops jararacussu* / Fábio Florença Cardoso. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Capes: 20901003

1. Serpente peçonhenta - Peçonha. 2. *Bothrops*. 3. Fosfolipases. 4. Cristalografia. 5. Miografia.

Palavras-chave: *Bothrops*; Cristalografia; Fosfolipase A₂ homóloga; Miografia; Veneno de serpente.

Aos meus pais **Abner** e **Sandra**,
pelo infinito amor e carinho dedicados,
índiaável apoio e incentivo oferecidos
e irrestrita compreensão de minhas decisões

Agradecimientos

Ao meu orientador, Dr. Marcos Fontes, por acreditar em meu potencial, me incluir em seu grupo de pesquisa, oferecer as melhores condições possíveis para o estudo e trabalho, com grande liberdade de proposições e discussões.

À Dra. Márcia Gallacci, por colaborar intensamente no desenvolvimento deste trabalho, sobretudo nas discussões do mesmo, de artigos e temas em geral, além de manter seu laboratório sempre à disposição.

À Dra. Maeli Dal Pai, por colaborar no desenvolvimento deste trabalho, se manter disponível às necessidades suscitadas neste estudo, bem como disponibilizar sucessivamente o auxílio do corpo técnico de seu laboratório/departamento.

As agências CAPES e FAPESP (2012/07112-6) pelos auxílios concedidos que permitiram a execução e divulgação deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo apoio de suas instalações e corpo técnico para a coleta de dados de difração de raios X e de espalhamento de raios X a baixo ângulo.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em especial ao Laboratório de Espectrometria de Massas, pelo apoio de suas instalações e de suas funcionárias para os experimentos de verificação de identidade sequencial das proteínas.

Aos antigos e atuais membros do Lab. de Biologia Molecular Estrutural (LBME), Agnes Takeda, Andrea Barros, Angelo Magro, Antoniel Gomes, Carlos Fernandes, Edson Comparetti, Eloah Biasi, Fábio Matioli, Frey Vargas, Giovanna Bonança, Guilherme Salvador, Juliana Santos, Lino Lima, Natália Bernardes, Rafael Borges, Thiago Dreyere Walter Cavalcante, pelas discussões científicas, auxílio em eventuais atividades do trabalho, por me acolherem no grupo e, claro, pela amizade e companheirismo.

Aos antigos e atuais membros do Lab. de Bioinformática e Biofísica Computacional (LBBC), Guilherme Inocente, Letícia Vieira, Luiz Bovolenta, Marcio Acencio, Marcos Geraldo, Pedro Costa, Rafael Nakajima, Rafael Toledo, Rodrigo Giarola e Tahila Andrichetti, por eventuais conversas científicas de nossas áreas e pelo companheirismo no dia a dia.

Aos membros do Lab. de Biomagnetismo, de maneira geral, por me permitir invadir o espaço de trabalho de seu grupo para a realização da liofilização das frações cromatográficas realizadas neste estudo e por eventuais auxílios técnicos disponibilizados por puro companheirismo.

Aos membros antigos, atuais e agregados da “Rep. 5 de Paus”, pela amizade e companheirismo durante todos esses anos e por proporcionar momentos de alegria e descontração, de grande valor para restaurar as energias física e mental para dar continuidade aos estudos. E, da mesma forma, aos amigos mais antigos e ainda presentes, desde os tempos de graduação e às novas amizades realizadas durante o período deste trabalho.

E, por fim, aos meus familiares, pelo encorajamento em dar continuidade aos estudos ainda que isso possa representar alguns anos extras de distanciamento.

Resumo

Os acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública, afetando regiões de clima tropical e subtropical e áreas rurais e pobres de países da América Latina, África, Ásia e Oceania. No Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos notificados, cujo envenenamento é caracterizado por intensa mionecrose local ineficientemente neutralizada pela soroterapia. O veneno botrópico possui uma classe de proteínas miotóxicas estruturalmente semelhantes às fosfolipases A₂ (PLA₂), responsáveis por induzir lesões musculares por um mecanismo não-catalítico parcialmente explicado por diferentes hipóteses. Contudo, há evidências que os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* são decorrentes de sua atividade desestabilizadora de membranas e que atuam em sinergia com as PLA₂ catalíticas no envenenamento. Neste estudo, foi desenvolvido um novo protocolo de purificação da miotoxina não-catalítica (PLA₂ homólogas ou proteínas PLA_{2-like}) botrópica BthTX-I, a qual foi avaliada em testes cristalográficos, calorimétricos, miográficos e morfológicos. Potenciais inibidores vegetais da classe dos cinamatos foram co-cristalizados com a BthTX-I e testados em inibir as lesões e paralisia musculares *in vitro* promovida pela toxina a fim de evoluir no conhecimento da relação estrutura/atividade das PLA₂ homólogas miotóxicas. Dentre todos os compostos testados, os ácidos chicórico e caftárico apresentaram-se como excelentes inibidores da BthTX-I. Contudo, foi possível apenas realizar a análise estrutural do complexo BthTX-I/ácido chicórico (AC), o qual apresentou características diferentes de outros complexos estudados com outros inibidores e toxinas botrópicas. De acordo com as propostas mais recentes dos componentes estruturais envolvidos na atividade das PLA₂ homólogas miotóxicas, bem como pela interface apresentada entre BthTX-I e AC, é possível que a interação proteína/inibidor gere uma mudança conformacional da toxina para um tetrâmero em solução, de modo que o alinhamento dos sítios de ancoragem à membrana (MDoS) e de ruptura da mesma (MDiS) estejam impedidos.

Palavras-chave: Veneno de serpente, *Bothrops*, Fosfolipase A₂ homóloga, Cristalografia, Miografia

Abstract

Snakebites are a public health problem, concerning tropical and subtropical regions, rural and poor areas of Latin America, Africa, Asia and Oceania countries. In Brazil, *Bothrops* genus accounts for about 90% of reported snakebites, whose envenomation is characterized by intense local myonecrosis inefficiently neutralized by antivenom. A class of myotoxic proteins found in *Bothrops* venoms which is structurally similar to phospholipases A₂ (PLA₂), is responsible for inducing muscle injuries by a non-catalytic mechanism, partially explained by different hypotheses. However, there are evidences that myotoxic and *in vitro* paralyzing effects are due to their destabilizing-membrane activity and they act in synergy with the catalytic PLA₂ myotoxins in envenomation. In this study, it was developed a new protocol for purification of a non-catalytic botropic myotoxin (PLA₂ homologues or PLA₂-like proteins) BthTX-I, which was evaluated by crystallographic, calorimetric, myographic and morphologic assays. Potential plant inhibitors of cinnamates class were co-crystallized with BthTX-I and tested to inhibit *in vitro* paralysis and muscle injuries promoted by the toxin. Among all the compounds tested, the chicoric and caftaric acids presented excellent BthTX-I inhibition characteristics. However, only chicoric acid (CA) we were able to perform crystallographic experiments, which presented different structural characteristics compared to other ligands and bothropic toxins. According to the latest proposals of the structural components involved in the activity of PLA₂ homologue myotoxins, as well as by the interface presented between BthTX-I and AC, it was possible to propose that the interaction between protein and the inhibitor leads to tetrameric oligomerization, preventing the alignment between both in membrane-docking site (MDoS) and membrane-disrupting site (MDiS).

Keywords: Snake venom, *Bothrops*, Phospholipase A₂ homologue, X-ray crystallography, Myography

Lista de Ilustrações, Tabelas e Abreviaturas

- Fig. 1** Enovelamento e estruturas secundárias característicos de um monômero de fosfolipase A₂ secretada dos grupos I/II Pág. 16
- Fig. 2** Etapas do mecanismo catalítico clássico proposto para as fosfolipases A₂ secretadas Pág. 17
- Fig. 3** Região do *loop* de ligação de Ca²⁺ de fosfolipases A₂ (Asp49) e fosfolipases A₂ homólogas (Lys49) Pág. 19
- Fig. 4** Estruturas moleculares dos compostos vegetais utilizados no presente estudo Pág. 26
- Fig. 5** Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Bothrops jararacussu* Pág. 34
- Fig. 6** Cromatografia de troca iônica (catiônica) da fração de fosfolipases A₂ (EM_{VI}) do veneno de *Bothrops jararacussu* Pág. 35
- Fig. 7** Cromatografia de fase reversa da fração TI_V (Fig. 6), onde se encontra a BthTX-I Pág. 35
- Fig. 8** Cromatografia de fase reversa da fração de fosfolipases A₂ (EM_{VI}) do veneno de *Bothrops jararacussu* Pág. 36
- Fig. 9** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão e das frações da cromatografia de exclusão molecular Pág. 37
- Fig. 10** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão e das frações da cromatografia de troca iônica Pág. 37
- Fig. 11** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão e das frações da cromatografia de fase reversa após a de troca iônica Pág. 38
- Fig. 12** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão e das frações da cromatografia de fase reversa após a de exclusão molecular Pág. 38
- Fig. 13** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão, fração EM_{VI} e BthTX-I Pág. 43
- Fig. 14** Cristais de BthTX-I/AC Pág. 45
- Fig. 15** Estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/AC Pág. 48
- Fig. 16** Interações entre os resíduos de aminoácidos dos monômeros da BthTX-I (em dímero convencional) e o ácido chicórico Pág. 48

- Fig. 17** Efeito da BthTX-I sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongos Pág. 50
- Fig. 18** Efeito da BthTX-I, do ácido chicórico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente Pág. 51
- Fig. 19** Efeito da BthTX-I, do ácido caftárico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente Pág. 52
- Fig. 20** Efeito da BthTX-I, do ácido clorogênico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente Pág. 53
- Fig. 21** Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE) Pág. 55
- Fig. 22** Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE) Pág. 56
- Fig. 23** Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE) Pág. 57
- Fig. 24** Efeito do ácido chicórico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I Pág. 58
- Fig. 25** Efeito do ácido caftárico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I Pág. 59
- Fig. 26** Efeito do ácido clorogênico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I Pág. 60
- Fig. 27** Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 μ M) e ácido chicórico (400 μ M, em 5% de piridina e 5% de etanol) realizada a 20 °C Pág. 62
- Fig. 28** Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 μ M) e ácido caftárico (800 μ M, em água deionizada) realizada a 20 °C Pág. 64
- Fig. 29** Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 μ M) e ácido clorogênico (1000 μ M, 1% etanol) realizada a 25 °C Pág. 65

- Fig. 30** Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 μ M) e ácido *trans*-ferúlico (800 μ M, em 5% de piridina e 5% de etanol) realizada a 20 °C, BthTX-I (20 μ M) e ácido *p*-cumárico (800 μ M, em 5% de piridina) realizada a 10 °C e BthTX-I (20 μ M) e ácido *trans*-cinâmico (400 μ M, em 5% de piridina) realizada a 25 °C Pág. 66
- Fig. 31** Etapas estruturais das fosfolipases A₂ homólogas botrópicas envolvidas na desestabilização de membranas Pág. 69
- Fig. 32** Transmissão neuromuscular na vigência das fosfolipases A₂ homólogas Pág. 71
- Fig. 33** Representação tetramérica do complexo BthTX-I/AC Pág. 77
- Fig. 34** Interações entre o ácido chicórico e as duas conformações diméricas da BthTX-I Pág. 77
- Fig. 35** Sobreposição das estruturas dos complexos PrTX-I/ácido rosmarínico (PDB 3QNL) e do complexo BthTX-I/AC na conformação dimérica alternativa Pág. 78
- Fig. 36** Representação tetramérica do complexo BthTX-I/AC Pág. 79
- Fig. 37** Interações entre os resíduos de aminoácidos dos monômeros da BthTX-I (em tetrâmero) e o ácido chicórico Pág. 80
- Fig. 38** Estruturas tetraméricas dos complexos BthTX-I/AC e MjTX-II/suramina (PDB 4YV5) Pág. 81

Tab. 1	Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da BthTX-I depositada no banco de dados (NCBI e PDB) e da toxina identificada por espectrometria de massas	Pág. 40
Tab. 2	Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BthTX-I (3,0 mg/mL em formato de amônio 50 mM, pH 3,5)	Pág. 41
Tab. 3	Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BthTX-I (4,0 mg/mL em bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0)	Pág. 41
Tab. 4	Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BthTX-I (3,7 mg/mL em água deionizada)	Pág. 41
Tab. 5	Estatísticas de coleta de dados e processamento do cristal de BthTX-I/AC	Pág. 46
Tab. 6	Estatísticas de refinamento do modelo BthTX-I/AC	Pág. 47

ΔH	Entalpia
AC	Ácido chicórico
Asp49-PLA₂	Fosfolipases A ₂ clássicas (catalíticas, com um resíduo de ácido aspártico na posição 49)
ATP	Adenosina trifosfato
BthTX-I	Bothropstoxina-I, isolada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I/AC	Complexo Bothropstoxina-I/ácido chicórico
BthTX-II	Bothropstoxina-II, isolada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CB	Crotoxina B, encontrada em diversas espécies de <i>Crotalus</i>
CETA	Centro de Extração de Toxinas Animais
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
D_T	Coefficiente de difusão translacional
EPM	Erro padrão da média
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletropulverização
F_{Calc}	Fatores de estrutura calculados após a realização da substituição molecular
F_{Obs}	Fatores de estrutura observados a partir da difração de raios X por um monocristal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Int	Intensidade de espalhamento
LBME	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural

LC-MS/MS	Acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial
LNLS	Laboratório de Luz Síncrotron
Lys49-PLA₂	Fosfolipases A ₂ homólogas (sem atividade catalítica, com um resíduo de lisina na posição 49)
MDiS	Sítio de ruptura da membrana
MDoS	Sítio de ancoragem à membrana
MjTX-II	Moojenitoxina-II, isolada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Sistemas conjugados com dois analisadores de massas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
Pd	Polidispersividade
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PEG	Polietileno glicol
PLA₂	Fosfolipases A ₂
PLA₂-like	Fosfolipases A ₂ homólogas (sem atividade catalítica)
PrTX-I	Piratoxina-I, isolada do veneno de <i>Bothrops pirajai</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
R_{Cryst}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F _{Calc}) e os valores de estrutura observados (F _{Obs})
R_{Free}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F _{Calc}) e os valores de estrutura observados (F _{Obs}) calculado a partir de um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são utilizadas durante o refinamento da estrutura
R_H	Raio hidrodinâmico

R_{Merge}	Medida de coerência interna de um conjunto de dados, a partir da união de medições múltiplas da mesma reflexão, inclusive relacionados à simetria, para calcular a intensidade média para uma determinada reflexão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Analisador de massas por tempo de voo
Tris	Trisaminometano
v/v	Volume/volume

Sumário

RESUMO	Pág. 1
ABSTRACT	Pág. 2
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	Pág. 3
LISTA DE TABELAS	Pág. 6
LISTA DE ABREVIACÕES	Pág. 7
SUMÁRIO	Pág. 10
INTRODUÇÃO	Pág. 13
1. Acidentes ofídicos	Pág. 13
2. Miotoxinas ofídicas	Pág. 14
2.1. Fosfolipases A₂	Pág. 15
2.2. Fosfolipases A₂ homólogas	Pág. 18
2.3. Interação entre inibidores e fosfolipases A₂	Pág. 20
OBJETIVOS	Pág. 22
MATERIAL E MÉTODOS	Pág. 23
1. Material	Pág. 23
1.1. Toxina	Pág. 23
1.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Pág. 23
1.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Pág. 24
1.1.3. Espectrometria de massas	Pág. 25
1.1.4. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	Pág. 25
1.2. Drogas e reagentes	Pág. 26
2. Estudo cristalográfico	Pág. 27
2.1. Testes de cristalização	Pág. 27
2.2. Coleta de dados de difração de raios X	Pág. 27
2.3. Elucidação das estruturas cristalográficas	Pág. 28
3. Estudo miográfico	Pág. 29
3.1. Animais	Pág. 29
3.2. Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongos	Pág. 29
3.3. Registro das contrações evocadas indiretamente	Pág. 30
3.4. Protocolo experimental	Pág. 30
3.5. Análise estatística	Pág. 30
4. Estudo morfológico	Pág. 30

5. Estudo calorimétrico	Pág. 31
RESULTADOS	Pág. 34
1. Purificação da BthTX-I a partir do veneno bruto	Pág. 34
1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC)	Pág. 34
1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Pág. 37
1.3. Espectrometria de massas	Pág. 40
2. Avaliação da oligomerização da BthTX-I em solução	Pág. 41
2.1. Espalhamento de luz dinâmico	Pág. 41
2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Pág. 43
3. Estudo cristalográfico	Pág. 44
3.1. Co-cristalização de BthTX-I/ácido chicórico	Pág. 45
3.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios X	Pág. 46
3.3. Refinamento e elucidação da estrutura do complexo BthTX-I/AC	Pág. 47
4. Estudo miográfico	Pág. 49
4.1. Efeito da BthTX-I sobre as contrações evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongo	Pág. 50
4.2. Influência do ácido chicórico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo	Pág. 51
4.3. Influência do ácido caftárico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo	Pág. 52
4.4. Influência do ácido clorogênico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo	Pág. 53
5. Estudo morfológico	Pág. 54
5.1. Morfologia ótica das preparações neuromusculares após os tratamentos realizados no estudo miográfico	Pág. 54
5.2. Índice de lesão muscular promovido pelos tratamentos realizados no estudo miográfico	Pág. 58
6. Estudo calorimétrico	Pág. 61
6.1. Interação entre ácido chicórico e BthTX-I	Pág. 62
6.2. Interação entre ácido caftárico e BthTX-I	Pág. 64
6.3. Interação entre ácido clorogênico e BthTX-I	Pág. 65

6.4. Interação entre ácido <i>trans</i> -ferúlico, <i>p</i> -cumárico e <i>trans</i> -cinâmico e BthTX-I	Pág. 66
DISCUSSÃO	Pág. 67
1. Elementos estruturais e funcionais das fosfolipases A2 homólogas envolvidos na desestabilização de membranas biológicas	Pág. 67
2. Isolamento/purificação da BthTX-I a partir do veneno bruto	Pág. 72
3. Comportamento da BthTX-I em solução e em preparações frênico-diafragma de camundongo	Pág. 74
4. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido chicórico	Pág. 76
5. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido caftárico	Pág. 83
6. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido clorogênico	Pág. 84
7. Ausência de interação entre a BthTX-I e os derivados cinâmicos não-esterificados	Pág. 85
CONCLUSÕES	Pág. 86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 87
ANEXOS	Pág. 108

Introdução

1. Acidentes ofídicos

Em países de regiões tropicais e subtropicais, os acidentes ofídicos ocorrem em alta frequência, promovendo morbidade e mortalidade às vítimas (Chippaux, 1998; Kasturiratne et al., 2008; Gutiérrez et al., 2010; Warrell et al., 2010; Williams et al., 2010). Esses acidentes são particularmente importantes em áreas rurais e pobres, nas quais a população pode não possuir acesso aos serviços de saúde, bem como estar sujeita à escassez do soro antiofídico (Theakston e Warrell, 2000; Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008; Harrison et al., 2009; Gutiérrez et al., 2010; Warrell et al., 2010). Após as ocorrências, um grande número de vítimas sobrevive com limitações físicas permanentes e/ou com sequelas psicológicas (Kasturiratne et al., 2008; Warrell et al., 2010; Williams et al., 2011). Apesar da dimensão dos seus efeitos sobre as populações, os acidentes ofídicos não têm recebido atenção por parte dos órgãos competentes nacionais e internacionais, sendo, portanto, adequadamente classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2011).

O conhecimento acerca da gravidade clínica global dos acidentes ofídicos está limitada a informações baseadas principalmente em relatórios hospitalares (Swaroop e Grab, 1954), dados epidemiológicos (Chippaux, 1998; White, 2000) e, de modo recente, pela combinação dessas informações com os dados de mortalidade obtidos pela OMS (Kasturiratne et al., 2008). Deste modo, através de estimativas conservadoras, podem ocorrer cerca de 5,4 milhões de acidentes ofídicos por ano, dos quais cerca de 125 mil casos evoluem a óbito (Chippaux, 1998). Em uma análise mais contemporânea de dados obtidos entre 1985 e 2006, foi sugerido que podem ocorrer anualmente pelo menos 20 mil mortes dentre a estimativa mínima de 420 mil envenenamentos ofídicos. (Kasturiratne et al., 2008). Todavia, há a possibilidade dessa avaliação estar subestimada pelo fato de uma considerável parcela destes acidentes ocorrerem em áreas afastadas dos grandes centros, com estrutura ineficiente para notificação dos envenenamentos. Ao considerar esses fatos, foi sugerida a incidência de até 94 mil mortes em cerca de 1,8 milhão de envenenamentos ofídicos por ano (Kasturiratne et al., 2008). Em nosso país, dados oficiais do Ministério da Saúde e das instituições brasileiras de estudo de venenos permitiram estimar cerca de 30 mil envenenamentos anuais causados por serpentes (Kasturiratne et al., 2008).

No Brasil, do mesmo modo que no restante da América Latina, as serpentes do gênero *Bothrops* são as protagonistas dos envenenamentos, uma vez que são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos (Ribeiro e Jorge, 1997; Araújo et al., 2003; França e Malaque, 2003). Apesar dos índices de letalidade do veneno botrópico serem inferiores aos demais

acidentes ofídicos de importância médica no país (crotálico, laquélico e elapídico, respectivamente promovidos pelas serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*), o envenenamento botrópico torna-se particularmente relevante devido à caracterizada manifestação de sintomas locais na vítima, tais como dor, edema, hemorragia, formação de bolhas, abscesso e necrose (Ribeiro e Jorge, 1997; França e Malaque, 2003; Gutiérrez et al., 2006).

A soroterapia, fundamentada nos estudos de Albert Calmette (Calmette, 1894) e Vital Brazil (Brazil, 1903), ainda permanece como o único tratamento específico para envenenamentos ofídicos (Wen, 2003; Gutiérrez et al., 2006). Os soros antiofídicos consistem de concentrados de imunoglobulinas (IgG) obtidas, principalmente, por sensibilização de equinos ou ovinos (Gutiérrez et al., 2006). Tais soros podem ser formulados por moléculas inteiras de IgG ou por seus fragmentos, seja F(ab')₂ ou Fab, provenientes da digestão destas moléculas por pepsina e papaína (Gutiérrez et al., 2003; Laloo e Theakston, 2003; Theakston et al., 2003). De qualquer modo, apesar de investigações clínicas demonstrarem que a soroterapia geralmente é eficaz na neutralização das toxinas responsáveis pelos sintomas sistêmicos (Gutiérrez et al., 2006), este tratamento apresenta eficácia problemática em relação aos sintomas locais dos envenenamentos (Warrell, 1992). Tal problema não ocorre pela ausência de anticorpos inibidores das toxinas que promovem os sintomas locais no soro antiofídico, mas provavelmente é decorrente do rápido desenvolvimento da patologia local, dificultando o acesso das imunoglobulinas do soro antes da ocorrência dos danos teciduais irreversíveis (Gutiérrez et al., 1998). Assim, as limitações da soroterapia elevam a importância da compreensão do modo de ação dos componentes dos venenos, sobretudo os que promovem as reações locais do envenenamento.

2. Miotoxinas ofídicas

Dentre os efeitos locais dos envenenamentos ofídicos, a mionecrose é particularmente relevante, uma vez que pode resultar em perda tecidual permanente, incapacitação ou amputação da região afetada (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Lomonte et al., 2003). Tal efeito é promovido diretamente pelas miotoxinas dos venenos ofídicos, as quais podem ser classificadas em três principais grupos de proteínas estruturalmente diferentes (Harris e Cullen, 1990). Esses grupos são consistidos por I) miotoxinas pequenas, de baixa massa molecular, II) cardiotoxinas e III) fosfolipases A₂ miotóxicas (Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Em adição a estes grupos, têm sido considerados como proteínas miotóxicas os componentes dos venenos

ofídicos que podem promover lesão na musculatura esquelética por mecanismos indiretos (Gutiérrez e Cerdas, 1984; Lomonte et al., 2003). Deste modo, metaloproteases promovem a lesão muscular a partir de seu potencial isquêmico (Gutiérrez et al., 1995), bem como por ação sinérgica entre estas proteases e fosfolipases A₂ (Bustillo et al., 2012).

2.1. Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (EC 3.1.1.4) são proteínas particularmente abundantes e difundidas nos venenos de serpentes (Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003; Gallacci e Cavalcante, 2010). Tais proteínas são enzimas que promovem a catálise da hidrólise de glicerofosfolipídios em sua posição *sn*-2, convertendo-os em ácidos graxos e lisofosfolipídios (van Deenen e de Haas, 1963; Schaloske e Dennis, 2006; Burke e Dennis, 2009). Ambos produtos dessa catálise representam precursores de moléculas de sinalização em diversas funções biológicas (Schaloske e Dennis, 2006). Deste modo, os ácidos graxos liberados são convertidos em eicosanoides, os quais estão envolvidos em processos inflamatório, hiperalgésico e pirogênico (Funk, 2001). Ao passo que os lisofosfolipídios estão relacionados com adesão e motilidade celular, alterações no citoesqueleto, proliferação, angiogênese, processo de retração e sobrevivência celular (Rivera e Chun, 2008).

As fosfolipases A₂ constituem atualmente uma superfamília composta por 16 grupos diferentes (Dennis et al., 2011). Esses grupos estão dispersos entre os distintos tipos principais dessas enzimas, de acordo com os respectivos mecanismos catalíticos, bem como suas características funcionais e estruturais (Schaloske e Dennis, 2006). De tal modo, esses grupos compõem as fosfolipases A₂ secretadas, as fosfolipases A₂ citosólicas, as fosfolipases A₂ independentes do íon Ca²⁺, as acetil-hidrolases do fator de ativação plaquetária, as fosfolipases A₂ lisossomais e as fosfolipases A₂ específicas de tecido adiposo (Dennis et al., 2011).

De caráter geral, as fosfolipases A₂ secretadas são proteínas pequenas (14-18 kDa), exibindo I) de 6 a 8 ligações dissulfeto, II) um resíduo de histidina em seu sítio ativo próximo de um conservado resíduo de ácido aspártico e III) a necessidade do íon Ca²⁺ para realizar a catálise (Schaloske e Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). Deste modo, as fosfolipases A₂ dos venenos ofídicos participam da composição dos grupos I e II, os quais estão distribuídos entre as fosfolipases A₂ secretadas (Six e Dennis, 2000; Schaloske e Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). Entre as proteínas de ambos os grupos, há alta identidade na sequência de aminoácidos, o que permite a observação de ampla homologia de conformações estruturais das mesmas (Ward et al., 1998). Assim, a principal característica estrutural das proteínas desses grupos

consiste na plataforma formada pelas duas longas α -hélices (H2 e H3) antiparalelas, mantida por ligação dissulfeto (Arni e Ward, 1996; Ward et al., 1998). As estruturas α -hélice da região N-terminal, hélice curta (*short helix*), *loop* de ligação de Ca^{2+} , *loop* pancreático ou elapídico (apenas nas proteínas do grupo I), β -fitas antiparalelas (β -*sheet* ou β -*wing*) e extensão C-terminal consistem nas demais estruturas conservadas das proteínas dos grupos I e II, porém com orientações variáveis (Murakami e Arni, 2003; Magro et al., 2009).

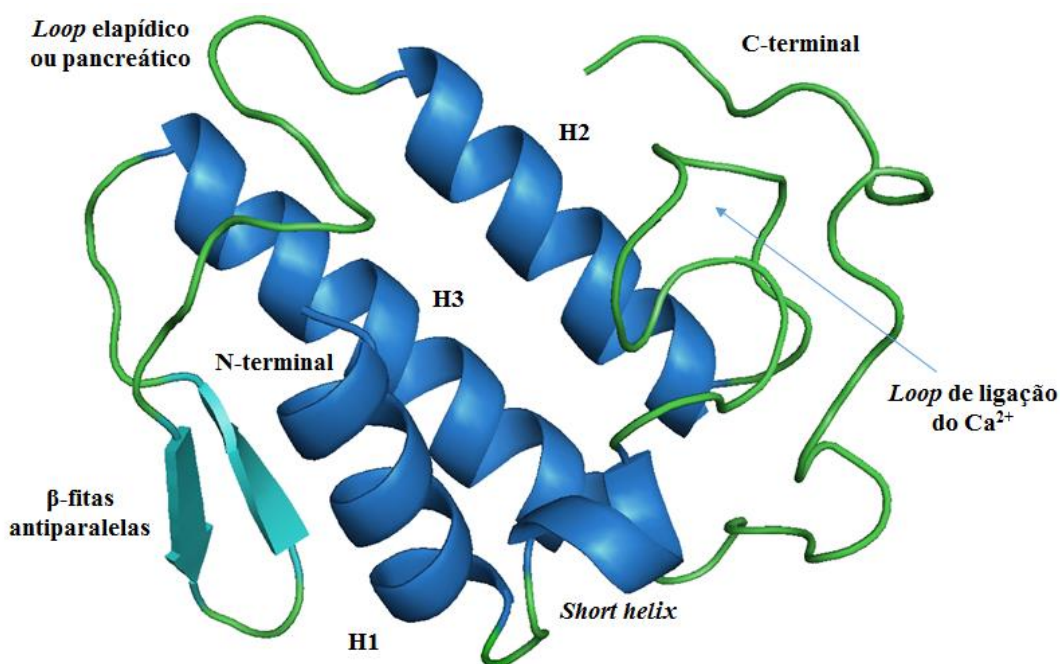


Fig. 1 – Enovelamento e estruturas secundárias característicos de um monômero de fosfolipase A_2 secretada dos grupos I/II.

Através de estruturas cristalográficas de fosfolipase A_2 de veneno de serpente e abelha (Scott et al., 1990A, 1990B; White et al., 1990) se propôs o mecanismo da ação catalítica destas enzimas, denominado “mecanismo da água única” (*single-water mechanism*) (Scott et al., 1990A). Deste modo, o sítio catalítico destas enzimas em sua forma ativa possui um íon Ca^{2+} , o qual está coordenado pelos átomos O do grupo carboxila da cadeia lateral do resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) e do grupo carbonila das cadeias principais dos resíduos de tirosina (Tyr28) e glicina (Gly30 e Gly32), bem como pelos átomos de O de duas moléculas de água estruturais. Ainda no sítio catalítico, o átomo $\text{N}^{\delta 1}$ da cadeia lateral do resíduo de histidina (His48) auxilia na coordenação de uma molécula adicional de água. A seguir, há a formação do complexo entre a enzima na forma ativa e o substrato após a substituição da coordenação das águas estruturais, através do cofator Ca^{2+} , por um dos átomos O do grupo fosfonato e outro do

grupo carbonila da posição *sn*-2 do substrato fosfolipídico. Esse átomo O do grupo carbonila interage adicionalmente ao átomo de N da cadeia principal do resíduo Gly30, assegurando a orientação adequada do substrato. Ao mesmo tempo, o resíduo His48 está estabilizado por sua interação com o resíduo Asp99, o qual também permanece ao interagir com os conservados resíduos Tyr52 e Tyr73, formando a rede catalítica. Deste modo, o átomo N^{δ1} do resíduo His48 realiza a desprotonação da molécula de água remanescente, acarretando no ataque nucleofílico da mesma junto ao grupo carbonila da posição *sn*-2 do substrato e, portanto, no desenvolvimento do complexo entre a enzima ativa e intermediário tetraédrico. No entanto, o resíduo His48 se conserva próximo da região desse ataque nucleofílico, permitindo a protonação do grupo alcóxido resultante de tal ataque, bem como o colapso do intermediário tetraédrico em direção aos produtos finais. Após a liberação do ácido graxo e do lisofosfolipídio, três moléculas de água direcionam ao sítio ativo para substituir os produtos liberados.

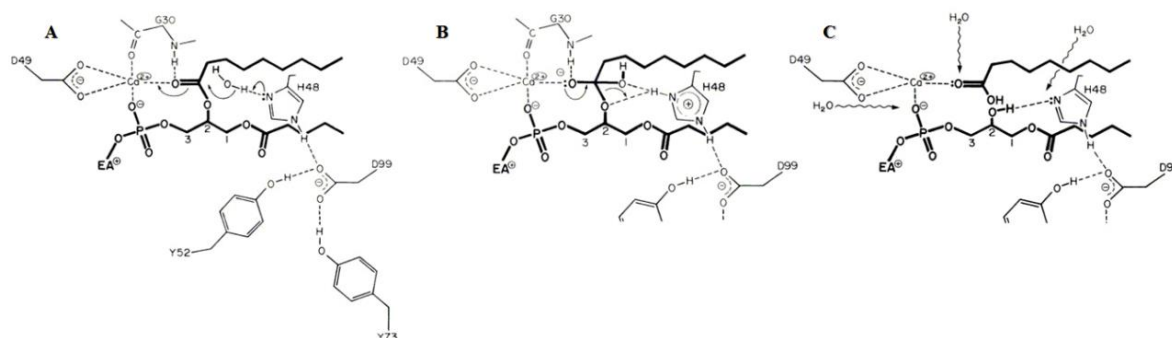


Fig. 2 – Mecanismo catalítico clássico das fosfolipases A₂ secretadas. Etapas dos mecanismos catalíticos propostos para as fosfolipases A₂ secretadas. (A) Ataque catalítico ao substrato. (B) Colapso do intermediário tetraédrico. (C) Produtos da catálise após colapso e direcionamento das moléculas de água em substituição aos produtos. Adaptado de Scott et al. (1990A).

Posteriormente, foi sugerido alternativamente o “mecanismo da água assistente” (*assisting-water mechanism*) a partir de evidências cinéticas da catálise (Rogers et al., 1996; Yu et al., 1998). Em comparação ao anterior, tal mecanismo necessita que o complexo inicial formado por enzima ativada e substrato apresente uma molécula de água catalítica, coordenada pelo íon Ca²⁺ (Bahnsen, 2005). Neste complexo, a água catalítica está vinculada ao resíduo His48 através de uma molécula adicional de água (Bahnsen, 2005). A seguir, espera-se que a molécula de água “assistente” promova interações com o resíduo His48, bem como com o intermediário tetraédrico anteriormente vinculado à água catalítica (Bahnsen, 2005). Em

adição, deve ocorrer a formação de um segundo intermerdiário antes da liberação dos produtos da catálise (Bahnon, 2005).

2.2. Fosfolipases A₂ homólogas

Todavia, a partir da década de 1980, foram descobertas novas proteínas em venenos de serpentes viperídeas, estruturalmente semelhantes às fosfolipases A₂ já encontradas nos demais venenos ofídicos, bem como às fosfolipases A₂ de origem pancreática (Maraganore et al., 1984). Essas proteínas apresentaram algumas alterações em sua sequência de aminoácidos, entre as quais a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) pelo resíduo de lisina (Lys) (Maraganore et al., 1984). Posteriormente, diferentes substituições para a mesma posição dessas proteínas foram encontradas em alguns venenos de serpentes elapídeas e viperídeas, como os resíduos de alanina (Liu et al., 1992), arginina (Chijiwa et al., 2006; Mebs et al., 2006), asparagina (Pan et al., 1998; Wei et al., 2006), cisteína (Jabeen et al., 2006), glutamina (Bao et al., 2005) e serina (Krizaj et al., 1991; Polgár et al., 1996). Apesar da alta semelhança estrutural entre essas proteínas (com substituições na posição 49) e as fosfolipases A₂ ofídicas (com o resíduo Asp49 conservado), as mesmas não apresentam atividade catalítica (Liu et al., 1992; Ward et al., 2002; Bao et al., 2005; Mebs et al., 2006; Wei et al., 2006; Petan et al., 2007; Zhou et al., 2008). A ausência de tal atividade se deve às alterações estruturais na região equivalente ao *loop* de ligação de Ca²⁺ dessas proteínas e às modificações dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação com este íon, respectivamente apontadas às substituições observadas nas posições 28 e 49 destas proteínas de espécies viperídeas, com consequente incapacidade de coordenação do cofator Ca²⁺ (Fernandes et al., 2014). Deste modo, devido às suas essenciais diferenças com as fosfolipases A₂ secretadas (Asp49), as proteínas com as substituições naturais em sua posição 49 são frequentemente referidas como proteínas fosfolipase A₂-símile (PLA₂-like) ou fosfolipases A₂ homólogas (Lomonte et al., 2009).

As fosfolipases A₂ homólogas dos venenos ofídicos frequentemente encontradas e, por conseguinte, analisadas em maior extensão são as proteínas que apresentam a substituição por um resíduo de lisina na posição 49 (Lys49-PLA₂) (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999; Lomonte et al., 2003, 2009; dos Santos et al., 2009; Gallacci e Cavalcante, 2010; Lomonte e Gutiérrez, 2011; Lomonte e Rangel, 2012; Fernandes et al., 2014). Visto que essas proteínas são cataliticamente inativas, as Lys49-PLA₂ atuam por um mecanismo independente de Ca²⁺, devido ao impedimento estérico promovido pelo átomo N^ε do resíduo de lisina na

posição 49 (Ward et al., 1998) e à desestabilização da região equivalente ao *loop* de ligação de Ca^{2+} resultante da substituição do resíduo de tirosina pelo de asparagina na posição 28 que evitam a coordenação deste cofator (Fernandes et al., 2010). Apesar da ausência de atividade enzimática, essas proteínas mantêm a capacidade de comprometer a integridade de membranas biológicas (eucarióticas e procarióticas) e artificiais (Lomonte et al., 2003).

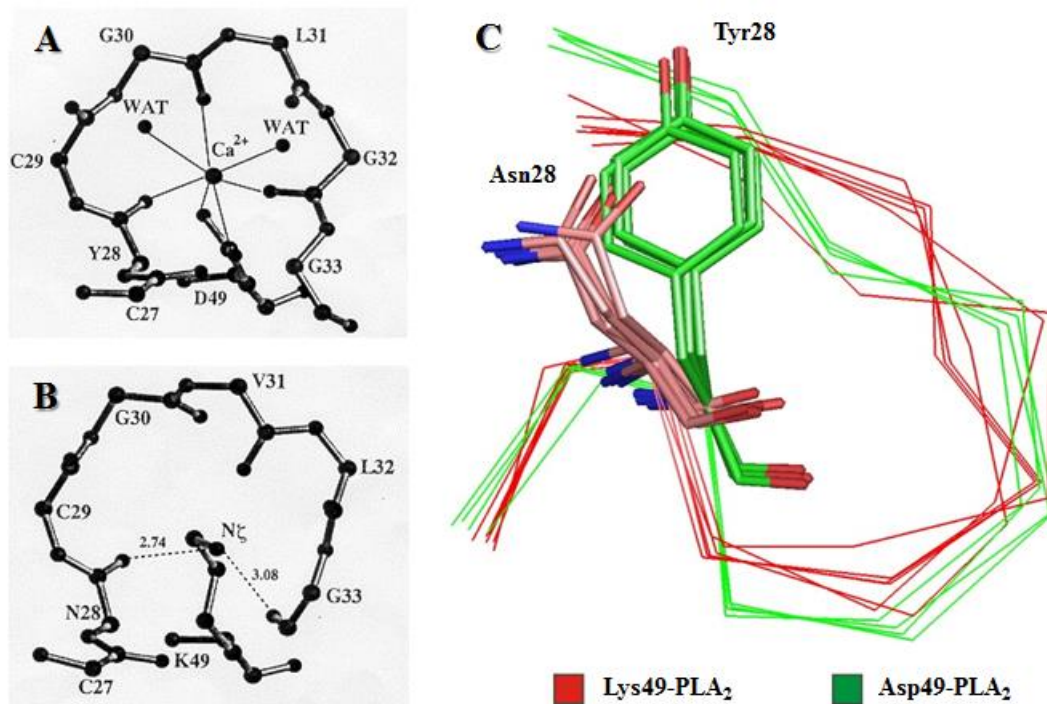


Fig. 3 – Região do *loop* de ligação de Ca^{2+} de fosfolipases A_2 (Asp49) e fosfolipases A_2 homólogas (Lys49). (A) Coordenação do cofator pela fosfolipase A_2 (Asp49). (B) Impedimento estérico em fosfolipases A_2 homólogas (Lys49). (C) Desestabilização da região equivalente ao *loop* de ligação de Ca^{2+} em fosfolipases A_2 homólogas (Lys49) decorrente da substituição natural Asn28Tyr. Adaptado de Ward et al. (1998) e Fernandes et al. (2010).

A capacidade de induzir lesões musculares locais constitui a atividade principal das Lys49-PLA₂ dos venenos ofídicos (Lomonte et al., 2003). Embora a atividade miotóxica *in vivo* dessas proteínas esteja acompanhada de determinados efeitos inflamatórios, compreendendo a formação de edema, o recrutamento leucocitário e hiperalgesia (Teixeira et al., 2003), não existem evidências relatadas de neurotoxicidade (Lomonte et al., 2003; Gallacci e Cavalcante, 2010). Apesar disso, estudos demonstram a paralisia muscular *in vitro* efetuada por proteínas Lys49-PLA₂ de venenos botrópicos em preparações neuromusculares de diferentes espécies (Soares et al., 2000; de Oliveira et al., 2003; Cavalcante et al., 2007; Ponce-Soto et al., 2007). Deste modo, a partir da revisão das evidências experimentais disponíveis, sugeriu-se que os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* são consequência da desestabilização das membranas

das fibras musculares promovidas por essas proteínas (Gallacci e Cavalcante, 2010). Portanto, a avaliação dos efeitos das Lys49-PLA₂ sobre o processo de transmissão neuromuscular em preparações isoladas revela-se como uma abordagem útil para o avanço no conhecimento da atividade desestabilizadora de membranas destas proteínas.

Tendo em vista a participação fundamental das proteínas Lys49-PLA₂ na patogênese da mionecrose, o esclarecimento do mecanismo de ação destas proteínas e dos determinantes estruturais envolvidos é fundamental para o aperfeiçoamento do tratamento dos acidentes promovidos por serpentes viperídeas. Para tanto, é possível empregar uma série de técnicas, abrangendo modificações da estrutura química dessas proteínas (Andrião-Escarso et al., 2000), análise comparativa da sequência de aminoácidos (Chioato e Ward, 2003), estudo com peptídeos sintéticos (Lomonte et al., 2010), mutagênese sítio-dirigida (Ward et al., 2002; Chioato e Ward, 2003) e interação com moléculas neutralizadoras (dos Santos et al., 2011; Fernandes et al., 2015). Particularmente, o emprego da última metodologia mencionada desponta como uma conveniente abordagem, pois além de auxiliar no esclarecimento da atividade das proteínas Lys49-PLA₂, revela potenciais moléculas inibidoras a serem avaliadas em estudos posteriores.

2.3. Interação entre inibidores e fosfolipases A₂

As espécies vegetais representam uma fonte de compostos bioativos, com a possibilidade de apresentar capacidade terapêutica aos efeitos tóxicos dos acidentes ofídicos e/ou agir em complemento à soroterapia (Soares et al., 2005). Ao mesmo tempo, o emprego de extratos vegetais como antídoto aos venenos animais consiste em uma antiga prática adotada por comunidades tradicionais, com acesso tardio ou inviável ao soro específico (Soares et al., 2005). Nos últimos anos, foram divulgadas compilações das espécies vegetais medicinais com propriedades antiofídicas, bem como de seus extratos, frações e compostos envolvidos (Mors et al., 2000; Soares et al., 2005; Guimarães et al., 2014). Igualmente, foram descritas revisões acerca dos estudos de interação entre extratos vegetais, ou seus compostos bioativos, e fosfolipases A₂ (Marcussi et al., 2007; Carvalho et al., 2013; Hage-Melim et al., 2013). Nesse contexto, a relativa eficácia de compostos derivados do ácido cinâmico em combater os efeitos miotóxico (Ticli et al., 2005; Aung et al., 2011; dos Santos et al., 2011; Toyama et al., 2014; Fernandes et al., 2015), paralisante (dos Santos et al., 2011), hemolítico (Agoro, 1978), hemorrágico (Aung et al., 2010A, 2010B, 2011) e edematogênico (Ticli et al., 2005; Aung et al., 2011; Toyama et al., 2014) de diferentes venenos ofídicos e/ou suas toxinas isoladas suporta

o aprofundamento dos estudos acerca da atividade antiofídica destes derivados fenilpropanoides.

No sentido de avançar no entendimento do mecanismo de desestabilização de membranas exercido pelas fosfolipases A₂ homólogas dos venenos ofídicos, buscou-se no presente estudo novas evidências experimentais dos determinantes estruturais desta ação. Deste modo, através das técnicas cristalográfica e calorimétrica, foi avaliada a possibilidade de interação entre diferentes derivados do ácido cinâmico e a Bothropstoxina-I (BthTX-I), a principal fosfolipase A₂ homóloga encontrada no veneno de *Bothrops jararacussu* (Homs-Brandeburgo et al., 1988). Entre os cinamatos testados estão o ácido cinâmico e seus derivados ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido caftárico e ácido chicórico. Finalmente, as consequências da incubação dos compostos solúveis junto à toxina foram avaliadas em preparação neuromuscular isolada de camundongos, através das técnicas miográfica e histológica

Conclusões

A partir do exposto no presente estudo, é possível pontuar algumas considerações acerca do trabalho:

- O novo protocolo de isolamento da BthTX-I apresentou-se satisfatório pela diminuição da quantidade de etapas necessárias, pelo grau de pureza atingido, pela melhora na qualidade dos cristais obtidos, bem como pela conservação das características físico-químicas e farmacológicas da proteína isolada.
- O ácido chicórico e o ácido caftárico são potenciais agentes neutralizadores de fosfolipases A₂ homólogas de veneno ofídico.
- O ácido chicórico é uma importante ferramenta farmacológica para o estudo da relação estrutura/atividade das fosfolipases A₂ homólogas de veneno ofídico ao indicar a possibilidade de oligomerização como modo de inibição da BthTX-I.
- O ácido caftárico e ácido clorogênico apresentam grande potencial como importantes ferramentas farmacológicas para o estudo da relação estrutura/atividade das fosfolipases A₂ homólogas de veneno ofídico.
- Cinamatos não-esterificados, ou de características lipossolúveis, devem ser repensados como ferramenta farmacológica, de acordo com as limitações técnicas do método a ser utilizado.

Referências Bibliográficas

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhatsky A et al. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci** 32: 19-29.

Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 66: 213-21.

Agoro JW (1978) Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite. **US Patent. 4,124,724.**

Ambrosio AL, Nonato MC, de Araújo HS et al. (2005) A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J Biol Chem** 280: 7326-35.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM et al. (2000) Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** 82: 755-63.

Araújo FAA, Santalucia M, Cabral RF (2003) Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH et al. (Editores) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, Sarvier, São Paulo, 6-12.

Arimoto-Kobayashi S, Zhang X, Yuhara Y et al. (2013) Chemopreventive effects of the juice of *Vitis coignetiae* Pulliat on two-stage mouse skin carcinogenesis. **Nutr Cancer** 65: 440-50.

Arni RK, Ward RJ, Gutiérrez JM et al. (1995) Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 51: 311-7.

Aung HT, Nikai T, Niwa M et al. (2010A) Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **J Nat Med** 64: 482-6.

Aung HT, Nikai T, Komori Y et al. (2010B) Biological and pathological studies of rosmarinic acid as an inhibitor of hemorrhagic *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. **Toxins (Basel)** 2: 2478-89.

Aung HT, Furukawa T, Nikai T et al. (2011) Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage. **Bioorg Med Chem** 19: 2392-6.

Ayres R, Feijó PR, Cintra AC et al. (2015) Different effects of myotoxins bothropstoxin-I and II from *Bothrops* snake venom on cation transport ATPases from murine fast twitch skeletal muscle. **Toxicon** 103: 80-84.

Bahnson BJ (2005) Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: insight from the anion-assisted dimer. **Arch Biochem Biophys** 433: 96-106.

Bao Y, Bu P, Jin L et al. (2005) Purification characterization and gene cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Int J Biochem Cell Biol** 37: 558-65.

Barbosa PS, Martins AM, Havt A et al. (2005) Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon** 46: 376-86.

Biswas T, Tsodikov OV (2010) An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. **Anal Biochem** 406: 91-3.

Blanco VZ, Auw JM, Sims CA et al. (1998) Effect of processing on phenolics of wines. **Adv Exp Med Biol** 434: 327-40.

Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC et al. (2001) Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Protein Chem** 20: 239-45.

Bowman WC, Rand MJ (1980) Striated muscle and neuromuscular transmission. Em: Bowman WC, Rand MJ (Editores) **Textbook of pharmacology**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1-56 (Capítulo 17).

Brazil V (1903) Contribuição ao estudo do veneno ophidico: tratamento de mordeduras das cobras. **Rev Med São Paulo** 13: 265-78.

Bülbring E (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br J Pharmacol Chemother** 1: 38-61.

Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev** 87: 659-797.

Bustillo S, Gay CC, García Denegri ME et al. (2002) Sinergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. **Toxicon** 59: 338-43.

Calmette A (1894) Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann Inst Pasteur** 8: 275-91.

Carvalho BM, Santos JD, Xavier BM et al. (2013) Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. **Biomed Res Int** 2013: 153045.

Cavalcante WL, Campos TO, Dal Pai-Silva M et al. (2007) Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol** 112:490-7.

Charvat TT, Lee DJ, Robinson WE et al. (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of chicoric acid analogs as inhibitors of HIV-1 integrase. **Bioorg Med Chem** 14: 4552-67.

Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 66: 12-21.

Chijiwa T, Tokunaga E, Ikeda R et al. (2006) Discovery of novel [Arg⁴⁹]phospholipase A₂ isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A₂ isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. **Toxicon** 48: 672-82.

Chioato L, Ward RJ (2003) Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon** 42: 869-83.

Chiou YL, Lin SR, Hu WP et al. (2012) Quercetin modulates activities of Taiwan cobra phospholipase A₂ via its effects on membrane structure and membrane-bound mode of phospholipase A₂. **J Biosci** 37: 277-87.

Chippaux JP (1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull World Health Organ** 76: 515-24.

Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B et al. (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem** 12: 57-64.

Cintra-Francischinelli M, Pizzo P, Rodrigues-Simioni L et al. (2009) Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell Mol Life Sci** 66: 1718-28.

Cintra-Francischinelli M, Caccin P, Chiavegato A et al. (2010) *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc Natl Acad Sci USA** 107: 14140-5.

Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric** 79: 362-72.

Corona G, Vauzour D, Hercelin J et al. (2003) Phenolic acid intake, delivered via moderate champagne wine consumption, improves spatial working memory via the modulation of hippocampal and cortical protein expression/activation. **Antioxid Redox Signal** 19: 1676-89.

Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA (1996) Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. **J Neurophysiol** 76: 3910-9.

Correia-de-Sá P, Noronha-Matos JB, Timóteo MA et al. (2013) Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: radiochemical and real-time video-microscopy studies. **Toxicon** 61: 16-25.

da Silva Giotto MT, Garratt RC, Oliva G et al. (1998) Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins** 30: 442-54.

de Barros AC, Takeda AA, Dreyer TR et al. (2016) Structural and calorimetric studies demonstrate that *Xeroderma pigmentosum* type G (XPG) can be imported to the nucleus by a classical nuclear import pathway via a monopartite NLS sequence. **J Mol Biol** (In press, Accepted manuscript).

de Oliveira AH, Giglio JR, Andrião-Escarso SH et al. (2001) A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry** 40: 6912-20.

de Oliveira M, Cavalcante WL, Arruda AZ et al. (2003) Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon** 42: 373-9.

DeLano WL (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

Dennis EA, Cao J, Hsu YH et al. (2011) Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev** 111: 6130-85.

Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X₇ and the inflammasome. **Trends Pharmacol Sci** 28: 465-72.

Drenth J (1994) **Principles of protein X-ray crystallography**. Springer-Verlag, New York.

dos Santos JI, Fernandes CA, Magro AJ et al. (2009A) The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein Pept Lett** 16: 887-93.

dos Santos JI, Soares AM, Fontes MR (2009B) Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol** 167: 106-16.

dos Santos JI, Cardoso FF, Soares AM et al. (2011) Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. **PLoS One** 6: e28521.

dos Santos ML, Fagundes FH, Teixeira BR et al. (2008) Purification and preliminary crystallographic analysis of a new Lys49-PLA₂ from *B. jararacussu*. **Int J Mol Sci** 9: 736-50.

Emsley P, Lohkamp B, Scott WG et al. (2010) Features and development of Coot. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 66: 486-501.

Faure G, Choumet V, Bouchier C et al. (1994) The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur J Biochem** 223: 161-4.

Fernandes CA, Marchi-Salvador DP, Salvador GM et al. (2010) Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **J Struct Biol** 171: 31-43.

Fernandes CA, Comparetti EJ, Borges RJ et al. (2013) Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim Biophys Acta** 1834: 2772-81.

Fernandes CA, Borges RJ, Lomonte B et al. (2014) A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta** 1844: 2265-76.

Fernandes CA, Cardoso FF, Cavalcante WG et al. (2015) Structural basis for the inhibition of a phospholipase A₂-like toxin by caffeic and aristolochic acids. **PLoS One** 10: e0133370.

Ferré-D'Amaré AR, Burley SK (1994) Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure** 2: 357-9.

Fischer HOL, Dangschat G (1932) Konstitution der Chlorogensäure. III. Mitteilung über Chinasäure und Derivate. **Chemische Berichte** 65: 1037-40.

França FOS, Malaque CMS (2003) Acidente botrópico. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH et al. (Editores) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, Sarvier, São Paulo, 72-86.

Freire E, Mayorga OL, Straume M (1990) Isothermal Titration Calorimetry. **Anal Chem** 62: 950-59.

Freyer MW, Lewis EA (2008) Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. **Methods Cell Biol** 84: 79-113.

Fujisawa D, Yamazaki Y, Lomonte B et al. (2008) Catalytically inactive phospholipase A₂ homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region. **Biochem J** 411: 515-22.

Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science** 294: 1871-75.

Gallacci M, Cavalcante WL (2010) Understanding the *in vitro* neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon** 55: 1-11.

Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL et al. (2009) Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals** 37: 222-9.

Giniatullin RA, Sokolova EM (1998) ATP and adenosine inhibit transmitter release at the frog neuromuscular junction through distinct presynaptic receptors. **Br J Pharmacol** 124: 839-44.

Giordo R, Cossu A, Pasciu V et al. (2013) Different redox response elicited by naturally occurring antioxidants in human endothelial cells. **Open Biochem J** 7: 44-53.

Guimarães CL, Moreira-Dill LS, Fernandes RS et al. (2014) Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Curr Med Chem** 21: 295279.

Gutiérrez JM, Cerdas L (1984) Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev Biol Trop** 32: 213-22.

Gutiérrez JM, Lomonte B (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-24.

Gutiérrez JM, Romero M, Núñez J et al. (1995) Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp Mol Pathol** 62: 28-41.

Gutiérrez JM, León G, Rojas G et al. (1998) Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** 36: 1529-38.

Gutiérrez JM, León G, Lomonte B (2003) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clin Pharmacokinet** 42: 721-41.

Gutiérrez JM, Ownby CL (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon** 42: 915-31.

Gutiérrez JM, Theakston RD, Warrell DA (2006) Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med** 3: e150.

Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW et al. (2010) Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon** 56: 1223-35.

Hage-Melim LI, Sampaio SV, Taft CA et al. (2013) Phospholipase A₂ inhibitors isolated from medicinal plants: alternative treatment against snakebites. **Mini Rev Med Chem** 13: 1348-56.

Hansen LD, Fellingham GW, Russell DJ (2011) Simultaneous determination of equilibrium constants and enthalpy changes by titration calorimetry: Methods, instruments, and uncertainties. **Anal Biochem** 409: 220-9.

Harris JB, Cullen, MJ (1990) Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microscop Rev** 3: 183-211.

Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC et al. (2009) Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Negl Trop Dis** 3: e569.

Heluany NF, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR et al. (1992) Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** 30: 1203-10.

Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H et al. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26: 615-27.

Jabeen T, Singh N, Singh RK et al. (2006) Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A₂ from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA₂-like protein with a novel Cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site. **Proteins** 62: 329-37.

Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J Appl Cryst** 24: 409-11.

Jiang L, Li W, Wang Y et al. (2014) Effects of cichoric acid extract from *Echinacea purpurea* on collagen-induced arthritis in rats. **Am J Chin Med** 42: 679-92.

Johnson EK, Ownby CL (1994) The role of extracellular ions in the pathogenesis of myonecrosis induced by a myotoxin isolated from Broad-Banded copperhead (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) venom. **Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol** 107: 359-66.

Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N et al. (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med** 5: e218.

Keller S, Vargas C, Zhao H et al. (2012) High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. **Anal Chem** 84: 5066-73.

King PJ, Robinson WE Jr (1998) Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase. **J Virol** 72: 8420-4.

Korciem KM, Soliman RE (2014) Chlorogenic and caftaric acids in liver toxicity and oxidative stress induced by methamphetamine. **J Toxicol** 2014: 583494.

Krizaj I, Bieber AL, Ritonja A et al. (1991) The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur J Biochem** 202: 1165-8.

Landucci EC, Castro RC, Pereira MF et al. (1998) Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol** 343: 257-63.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-5.

Laloo DG, Theakston RD (2003) Snake antivenoms. **J Toxicol Clin Toxicol** 41: 277-90.

Leavitt S, Freire S (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Curr Opin Struct Biol** 11: 560-6.

Lee J, Scagel CF (2013) Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. **Front Chem** 1: 40.

Lindahl M, Tagesson C (1993) Selective inhibition of group II phospholipase A₂ by quercetin. **Inflammation** 17: 573-82.

Liu CS, Kuo PY, Chen JM et al. (1992) Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A₂ in the venom of *Bungarus fasciatus* (banded krait). **J Biochem** 112: 707-13.

Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A et al. (1994) Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem** 269: 29867-73.

Lomonte B, Angulo Y, Calderón L (2003) An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon** 42: 885-901.

Lomonte B, Angulo Y, Sasa M et al. (2009) The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein Pept Lett** 16: 860-76.

Lomonte B, Angulo Y, Moreno E (2010) Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from Viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Curr Pharm Des** 16: 3234-30.

Lomonte B, Gutiérrez JM (2011) Phospholipases A₂ from viperid snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chim Slov** 58: 647-59.

Lomonte B, Rangel J (2012) Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon** 60: 520-30.

Magro AJ, Fernandes CA, dos Santos JI et al. (2009) Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂ from snake venoms. **Protein Pept Lett** 16: 852-9.

Maraganore JM, Merutka G, Cho W et al. (1984) A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J Biol Chem** 259: 13839-43.

Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Magro AJ et al. (2008) Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins** 72: 883-91.

Marcussi S, Sant'Ana CD, Oliveira CZ et al. (2007) Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr Top Med Chem** 7: 743-56.

McManus JFA, Mowry RW (1960) **Staining methods: histologic and histochemical medical division**. Harper & Brother, New York, 283-310.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2007) Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr** 40: 658-74.

McPherson A (2009) **Introduction to macromolecular crystallography**. Wiley-Blackwell.

Mebis D, Kuch U, Coronas CV et al. (2006) Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhafermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon** 47: 797-811.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B (2008) Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci** 65: 2897-912.

Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C et al. (2014) Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. **PLoS One** 9: e109846.

Mors WB, Nascimento MB, Pereira BM et al. (2000) Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry** 55: 627-42.

Murakami MT, Arni RK (2003) A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon** 42: 903-13.

Murakami MT, Arruda EZ, Melo PA et al. (2005) Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J Mol Biol** 350: 416-26.

Murakami MT, Viçoti MM, Abrego JR et al. (2007) Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon** 49: 378-87.

Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D (2008) Modeling studies on phospholipase A₂-inhibitor complexes. **Indian J Biochem Biophys** 45: 256-62.

Noronha-Matos JB, Morais T, Trigo D et al. (2011) Tetanic failure due to decreased endogenous adenosine A_{2A} tonus operating neuronal Cav1 (L-type) influx in *Myasthenia gravis*. **J Neurochem** 117: 797-811.

Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Em: Carter CW Jr, Sweet RM (Editores) **Methods in enzymology, Macromolecular crystallography, Part A (Volume 276)**, Academic Press, New York, 307-26.

Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP et al. (1999) Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon** 37: 411-45.

Pan H, Liu XL, Ou-Yang LL et al. (1998) Diversity of cDNAs encoding phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon**, 36: 1155-63.

Park CM, Jin KS, Lee YW et al. (2011) Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF-κB translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. **Eur J Pharmacol** 660: 454-59.

Payen S (1846A) Untersuchung des Kaffe's. **Jahresbericht Chemie** 60: 286-94.

Payen S (1846B) Memoire sur le café (3^o Part). **Comptes Rendus Chimie** 23: 244-51.

Pellati F, Benvenuti S, Magro L et al. (2004) Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **J Pharm Biomed Anal** 35: 289-301.

Pellati F, Benvenuti S, Melegari M et al. (2005) Variability in the composition of anti-oxidant compounds in *Echinacea* species by HPLC. **Phytochem Anal** 16: 77-85.

Pereañez JA, Núñez V, Huancahuire-Vega S et al. (2009) Biochemical and biological characterization of a PLA₂ from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon** 53: 534-42.

Petan T, Krizaj I, Pungercar J (2007) Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry** 46: 12795-809.

Pierce MM, Raman CS, Nall BT (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods** 19: 213-21.

Polgár J, Magnenat EM, Pleitsch MC et al. (1996) Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M_r phospholipases A₂: purification, characterization and computer

modeling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem J** 319: 961-8.

Ponce-Soto LA, Bonfim VL, Rodrigues-Simioni L et al. (2006) Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. **Protein J** 25: 147-55.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM et al. (2007) Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim Biophys Acta** 1770: 585-93.

Queffélec C, Bailly F, Mbemba G et al. (2008) Synthesis and antiviral properties of some polyphenols related to *Salvia* genus. **Bioorg Med Chem Lett** 18: 4736-40.

Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H et al. (2013) Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. **Curr Med Chem** 20: 4436-50.

Ribeiro LA, Jorge MT (1997) Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev Soc Bras Med Trop** 30: 475-80.

Ribeiro JA, Walker J (1975) The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. **Br J Pharmacol** 54: 213-8.

Rivera R, Chun J (2008) Biological effects of lysophospholipids. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 160: 25-46.

Robiquet, Boutron (1837) Ueber den Kaffee. **Ann Pharmacie** 23: 93-5.

Rodrigues-Simioni L, Borgese N, Ceccarelli B (1983) The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience** 10: 475-89.

Rogers J, Yu BZ, Serves SV et al. (1996) Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A₂. **Biochemistry** 35: 9575-84.

Salgado AI, Cunha RA, Ribeiro JA (2000) Facilitation by P₂ receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors. **Brain Res** 877: 245-59.

Salvador GH, Fernandes CA, Magro AJ et al. (2013) Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin - a novel feature in Lys49-PLA₂s protein class. **PLoS One** 8: e60610.

Salvador GH, Dreyer TR, Cavalcante WL et al. (2015) Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 71: 2066-78.

Scarpati ML, Oriente G (1958) Chicoric acid (dicaffeoyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. **Tetrahedron** 4: 43-8.

Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta** 1761: 1246-59.

Schlernitzauer A, Oiry C, Hamad R et al. (2013) Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One** 8: e78788.

Scott DL, White SP, Otwinowski Z et al. (1990A) Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science** 250:1541-6.

Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH et al. (1990B) Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. **Science** 250:1563-6.

Silhár P, Capková K, Salzameda NT et al. (2010) *Botulinum* neurotoxin A protease: discovery of natural product exosite inhibitors. **J Am Chem Soc** 132: 2868-69.

Silinsky EM, Hirsh JK, Searl TJ et al. (1999) Quantal ATP release from motor nerve endings and its role in neurally mediated depression. **Prog Brain Res** 120: 145-58.

Six DA, Dennis, EA (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta** 1488: 1-19.

Snedecor GW, Cochran WG. **Statistical methods**, Iowa State University Press, 1989.

Soares AM, Guerra Sá R, Borja-Oliveira CR et al. (2000) Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys** 378: 201-9.

Soares AM, Ticli FK, Marcussi S et al. (2005) Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem** 12: 2625-41.

Spencer PJ, Aird SD, Boni-Mitake M et al. (1998) A single-step purification of bothropstoxin-1. **Braz J Med Biol Res** 31: 1125-7.

Stura EA (1999) Seeding. Em: Bergfors TM (Editor) **Protein crystallization techniques, strategies and tips - a laboratory manual**. International University Line, La Jolla, California, 142-62.

Swaroop S, Grab B (1954) Snakebite mortality in the world. **Bull World Health Organ** 10: 35-76.

Szwajgier D (2013) Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. **Z Naturforsch C** 68: 125-32.

Sørensen AD, Durand E, Laguerre M et al. (2014) Antioxidant properties and efficacies of synthesized alkyl caffeates, ferulates, and coumarates. **J Agric Food Chem** 62: 12553-62.

Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E et al. (2003) Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon** 42: 947-62.

Theakston RD, Warrell DA (2000) Crisis in snake antivenom supply for Africa. **Lancet** 356: 2104.

Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E (2003) Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon** 41: 541-57.

Ticli FK, Hage LI, Cambraia RS et al. (2005) Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon** 46: 318-27.

Tousch D, Lajoix A, Hosy E et al. (2008) Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. **Biochem Biophys Res Commun** 377: 131-5.

Toyama DO, Ferreira MJ, Romoff P et al. (2014) Effect of chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid) isolated from *Baccharis oxyodonta* on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus*. **Biomed Res Int** 2014: 726585.

Tribuiani N, da Silva AM, Ferraz MC et al. (2014) *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complement Altern Med** 14: 48.

Tsai YL, Chiu CC, Yi-Fu Chen J et al. (2012) Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. **J Ethnopharmacol** 143: 914-19.

van Deenen LL, de Haas GH (1963) The substrate specificity of phospholipase A. **Biochim Biophys Acta**, 70: 538-53.

Vanzo A, Cecotti R, Vrhovsek U et al. (2007) The fate of *trans*-caftaric acid administered into the rat stomach. **J Agric Food Chem** 55: 1604-11.

Vega S, Abian O, Velázquez-Campoy A (2015) A unified framework based on the binding polynomial for characterizing biological systems by isothermal titration calorimetry. **Methods** 76: 99-115.

Velázquez-Campoy A, Freire E (2015) ITC in the post-genomic era...? Priceless. **Biophys Chem** 115: 115-24.

Velázquez-Campoy A (2015) Geometric features of the Wiseman isotherm in isothermal titration calorimetry. **J Therm Anal Calorim** 122: 1477-83.

Villalobos JC, Mora R, Lomonte B et al. (2007) Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicol In Vitro** 21: 1382-9.

Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng** 8: 127-34.

Ward RJ, de Azevedo WF Jr, Arni RK (1998) At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon** 36: 1623-33.

Ward RJ, Chioato L, de Oliveira AH et al. (2002) Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J** 362: 89-96.

Warrell DA (1992) The global problem of snake bite: Its prevention and treatment. Em: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Editores) **Recent advances in toxinology research**, Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore, Cingapura, 121-53.

Warrell DA (2010) Snake bite. **Lancet** 375: 77-88.

Wei JF, Wei XL, Chen QY et al. (2006) N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta** 1760: 462-71.

Wen FH (2003) Soroterapia. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH et al. (Editores) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, Sarvier, São Paulo, 380-93.

White SP, Scott DL, Otwinowski Z et al. (1990) Crystal structure of cobra-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. **Science** 250:1560-3.

White J (2000) Bites and stings from venomous animals: a global overview. **Ther Drug Monit** 22: 65-8.

Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R et al. (2010) The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet** 375: 89-91.

Williams SS, Wijesinghe CA, Jayamanne SF et al. (2011) Delayed psychological morbidity associated with snakebite envenoming. **PLoS Negl Trop Dis** 5: e1255.

Wiseman T, Williston S, Brandts JF et al. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal Biochem** 179: 131-7.

Xiao H, Wang J, Yuan L et al. (2013) Chicoric acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes through ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **J Agric Food Chem** 61: 1509-20.

Yamazaki Y, Matsunaga Y, Nakano Y et al. (2005) Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of eastern cottonmouth. A new role of snake venom myotoxic Lys49-phospholipase A₂. **J Biol Chem** 280: 29989-92.

Yu BZ, Rogers J, Nicol GR et al. (1998) Catalytic significance of the specificity of divalent cations as K_S^* and k_{cat}^* cofactors for secreted phospholipase A₂. **Biochemistry** 37: 12576-87.

Zhang X, Ishida R, Yuhara Y et al. (2011) Anti-genotoxic activity of *Vitis coignetiae* Pulliat towards heterocyclic amines and isolation and identification of caftaric acid as an antimutagenic component from the juice. **Mutat Res** 723: 182-9.

Zhang HL, Dai LH, Wu YH et al. (2014) Evaluation of hepatocyteprotective and anti-hepatitis B virus properties of Cichoric acid from *Cichorium intybus* leaves in cell culture. **Biol Pharm Bull** 37: 1214-20.

Zhao H, Piszczek G, Schuck P (2015) SEDPHAT - a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. **Methods** 76: 137-48.

Zhou X, Tan TC, Valiyaveetil S et al. (2008) Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophys J** 95: 3366-80.