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 A_2 HOMÓLOGA DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*

FÁBIO FLORENÇA CARDOSO

BOTUCATU – SP
2016

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 A_2 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 A_2 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,

infindável apoio e incentivo oferecidos

e irrestrita compreensão de minhas decisões

Agradecimentos

Agradecimentos

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, LinoLima, 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 Andrighetti, 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 fraçõescromatográficas 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 A_2 (PLA_2), 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 PLA_2 catalíticas no envenenamento. Neste estudo, foi desenvolvido um novo protocolo de purificação da miotoxina não-catalítica (PLA_2 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 PLA_2 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 PLA_2 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 A_2 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 A_2 (PLA_2), 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 PLA_2 myotoxins in envenomation. In this study, it was developed a new protocol for purification of a non-catalytic botropic myotoxin (PLA_2 homologues or PLA_2-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 characteristiscs. 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 PLA_2 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 A_2 homologue, X-ray crystallography, Myography

Lista de Ilustrações, Tabelas e Abreviaturas

Fig. 1	Enovelamento e estruturas secundárias característicos de um monômero de fosfolipase A_2 secretada dos grupos I/II	Pág. 16
Fig. 2	Etapas do mecanismo catalítico clássico proposto para as fosfolipases A_2 secretadas	Pág. 17
Fig. 3	Região do *loop* de ligação de Ca^{2+} de fosfolipases A_2 (Asp49) e fosfolipases A_2 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 *Bothtops jararacussu*	Pág. 34
Fig. 6	Cromatografia de troca iônica (catiônica) da fração de fosfolipases A_2 (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 A_2 (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 µM) e ácido chicórico (400 µM, 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 µM) e ácido caftárico (800 µM, em agua deionizada) realizada a 20 °C	Pág. 64
Fig. 29	Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 µM) e ácido clorogênico (1000 µM, 1% etanol) realizada a 25 °C	Pág. 65

Fig. 30	Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 µM) e ácido *trans*-ferúlico (800 µM, em 5% de piridina e 5% de etanol) realizada a 20 °C, BthTX-I (20 µM) e ácido *p*-cumárico (800 µM, em 5% de piridina) realizada a 10 °C e BthTX-I (20 µM) e ácido *trans*-cinâmico (400 µM, em 5% de piridina) realizada a 25 °C	Pág. 66
Fig. 31	Etapas estruturais das fosfolipases A_2 homólogas botrópicas envolvidas na desestabilização de membranas	Pág. 69
Fig. 32	Transmissão neuromuscular na vigência das fosfolipases A_2 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-PLA$_2$	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 *Bothrops jararacussu*
BthTX-I/AC	Complexo Bothropstoxina-I/ácido chicórico
BthTX-II	Bothropstoxina-II, isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*
CAS	*Chemical Abstracts Service*
CB	Crotoxina B, encontrada em diversas espécies de *Crotalus*
CETA	Centro de Extração de Toxinas Animais
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
D$_T$	Coeficiente 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-PLA$_2$	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 *Bothrops moojeni*
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Sistemas conjugados com dois analisadores de massas
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
Pd	Polidispersividade
PDB	*Protein Data Base*
PEG	Polietilieno glicol
PLA$_2$	Fosfolipases A$_2$
PLA$_2$-*like*	Fosfolipases A$_2$ homólogas (sem atividade catalítica)
PrTX-I	Piratoxina-I, isolada do veneno de *Bothrops pirajai*
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 ABREVIAÇÕES Pág. 7
SUMÁRIO Pág. 10
INTRODUÇÃO Pág. 13
1. Acidentes ofídicos Pág. 13
2. Miotoxinas ofídicas Pág. 14
2.1. Fosfolipases A_2 Pág. 15
2.2. Fosfolipases A_2 homólogas Pág. 18
2.3. Interação entre inibidores e fosfolipases A_2 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 *trans*-ferúlico, *p*-cumárico e *trans*-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, laquético 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, abcesso 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; Lalloo 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 A_2 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 A_2 (Bustillo et al., 2012).

2.1. Fosfolipases A_2

As fosfolipases A_2 (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 A_2 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 A_2 secretadas, as fosfolipases A_2 citosólicas, as fosfolipases A_2 independentes do íon Ca^{2+}, as acetil-hidrolases do fator de ativação plaquetária, as fosfolipases A_2 lisossomais e as fosfolipases A_2 específicas de tecido adiposo (Dennis et al., 2011).

De caráter geral, as fosfolipases A_2 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 Ca^{2+} para realizar a catálise (Schaloske e Dennis, 2006; Dennis et al., 2011). Deste modo, as fosfolipases A_2 dos venenos ofídicos participam da composição dos grupos I e II, os quais estão distribuídos entre as fosfolipases A_2 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).

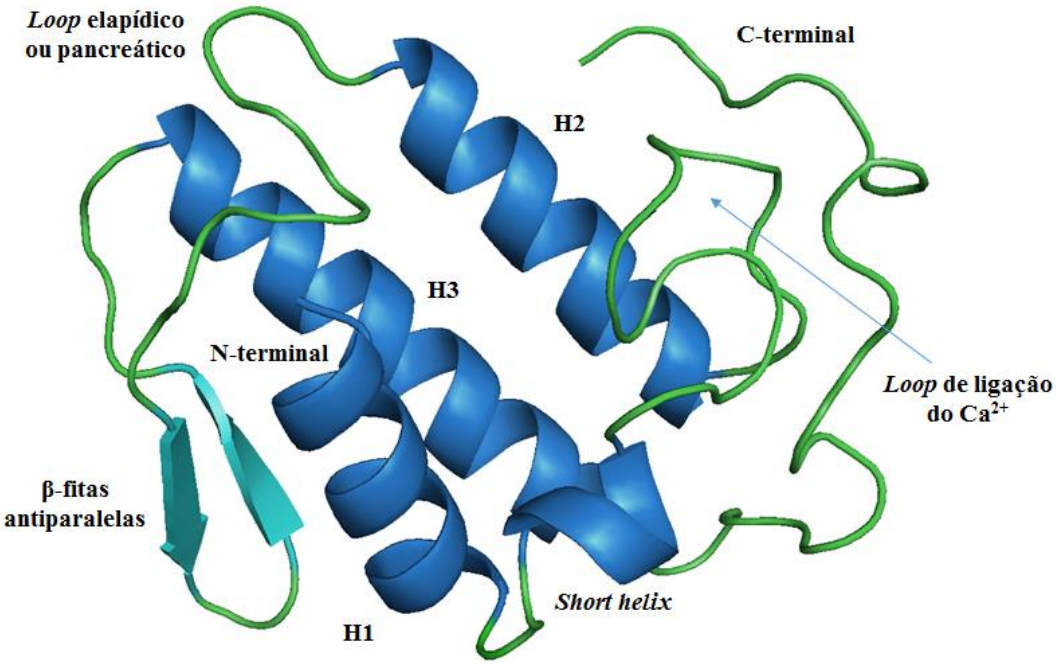

Fig. 1 – Enovelamento e estruturas secundárias característicos de um monômero de fosfolipase A_2 secretada dos grupos I/II.

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 $N^{\delta 1}$ 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 $N^{\delta 1}$ 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.

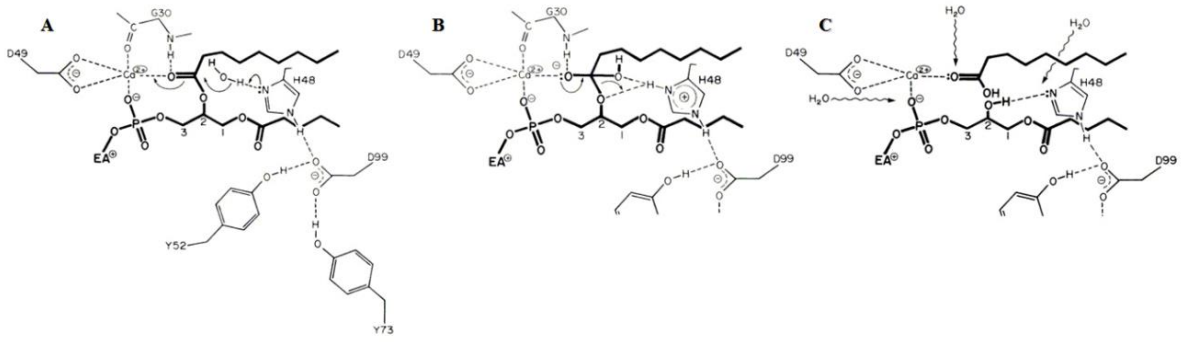

Fig. 2 – Mecanismo catalítico clássico das fosfolipases A_2 secretadas. Etapas dos mecanismos catalíticos propostos para as fosfolipases A_2 secretadas. (A) Ataque catalítico ao substrato. (B) Colapso do intermediário tetraédrico. (C) Produtos da catálise após colapso e direcionamento das moléculas de 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 Ca^{2+} (Bahnson, 2005). Neste complexo, a água catalítica está vinculada ao resíduo His48 através de uma molécula adicional de água (Bahnson, 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 (Bahnson, 2005). Em

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

2.2. Fosfolipases A_2 homólogas

Todavia, a partir da década de 1980, foram descobertas novas proteínas em venenos de serpentes viperídeas, estruturalmente semelhantes às fosfolipases A_2 já encontradas nos demais venenos ofídicos, bem como às fosfolipases A_2 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). A despeito da alta semelhança estrutural entre essas proteínas (com substituições na posição 49) e as fosfolipases A_2 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} (Fernandes et al., 2014). Deste modo, devido às suas essenciais diferenças com as fosfolipases A_2 secretadas (Asp49), as proteínas com as substituições naturais em sua posição 49 são frequentemente referidas como proteínas fosfolipase A_2-símile (PLA_2-*like*) ou fosfolipases A_2 homólogas (Lomonte et al., 2009).

As fosfolipases A_2 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-PLA_2) (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-PLA_2 atuam por um mecanismo independente de Ca^{2+}, devido ao impedimento estérico promovido pelo átomo N^{ζ} 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).

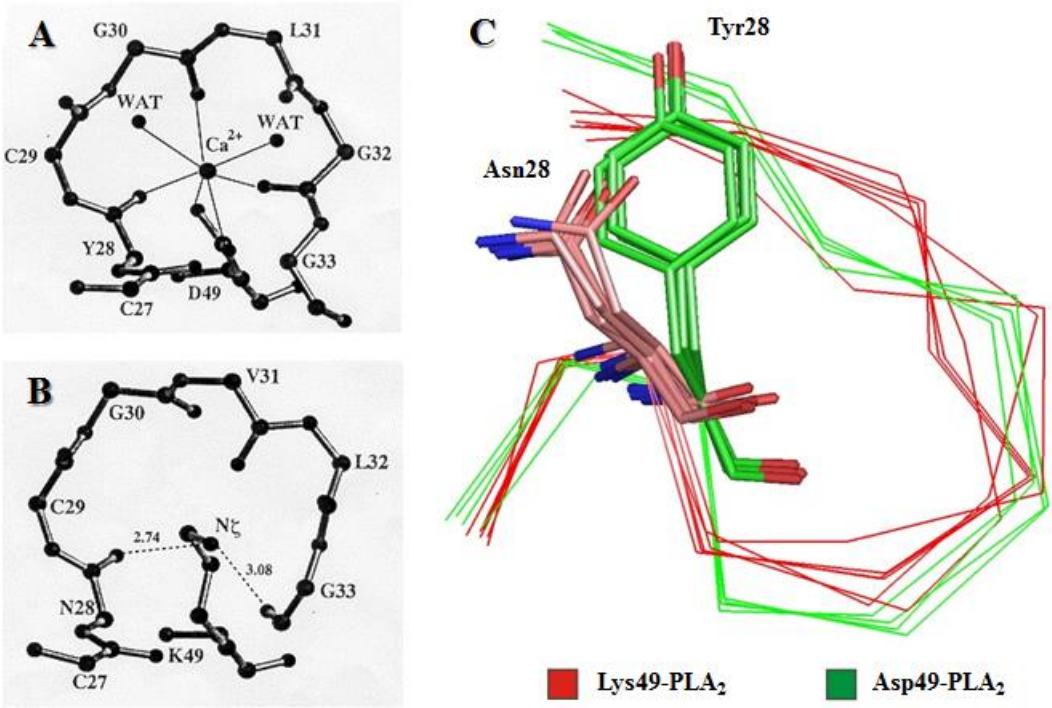

Fig. 3 – Região do *loop* de ligação de Ca^{2+} de fosfolipases A_2 (Asp49) e fosfolipases A_2 homólogas (Lys49). (A) Coordenação do cofator pela fosfolipase A_2 (Asp49). (B) Impedimento estérico em fosfolipases A_2 homólogas (Lys49). (C) Desestabilização da região equivalente ao *loop* de ligação de 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-PLA_2 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-PLA_2 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-PLA_2 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-PLA_2 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-PLA_2, revela potenciais moléculas inibidoras a serem avaliadas em estudos posteriores.

2.3. Interação entre inibidores e fosfolipases A_2

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 A_2 (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 A_2 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 A_2 homóloga encontrada no veneno de *Bothrops jararacussu* (Homsi-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

Objetivos

Em busca de novas alternativas para o tratamento dos efeitos irreversíveis do envenenamento por acidentes ofídicos, este estudo teve por objetivo evoluir no conhecimento da relação estrutura/atividade das fosfolipases A_2 homólogas, bem como encontrar os inibidores de melhor eficiência dentre os compostos cinamatos.

Material e Métodos

1. Material

1.1. Toxina

A Bothropstoxina-I (BthTX-I) foi isolada a partir do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, coletado de espécimes adultos e liofilizados pelo CETA (Centro de Extração de Toxinas Animais, Morungaba/SP). Deste modo, foram realizados dois protocolos de purificação da toxina-alvo.

1.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A princípio, o protocolo do isolamento da BthTX-I foi baseado nos trabalhos primordiais para esta toxina (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Cintra et al., 1993) e complementado por cromatografia de fase reversa, a fim de avaliar a pureza da amostra. Deste modo, a cromatografia de exclusão molecular foi realizada em sistema de HPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare), utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) e fase móvel bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7,9). O veneno bruto liofilizado (10 mg) foi solubilizado em 500 µL da fase móvel, centrifugado (10000 rpm) durante 10 minutos a 0 °C, injetado no sistema e fracionado em um fluxo de 0,5 mL/minuto. A cromatografia de troca iônica, do tipo catiônica, foi realizada no mesmo sistema, com a coluna HiTrap SP FF (GE Healthcare). A fração onde se encontram as fosfolipases A_2 do veneno, obtida na cromatografia de exclusão molecular (Homsi-Brandeburgo et al., 1988), foi concentrada em torno de 10 mg/mL por filtros concentradores Vivaspin MWCO 3000 PES (GE Healthcare). Desta amostra, 1 mL foi injetado no sistema e fracionado em um fluxo de 0,5 mL/minuto, através do gradiente de bicarbonato de amônio (50-1000 mM, pH 7,9). Por fim, a cromatografia de fase reversa foi realizada no sistema de HPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare), com a coluna µRPC C2/C18 SC 2.1/10 (GE Healthcare), através do gradiente de acetonitrila (0-66,7% em TFA 0,1%) e em um fluxo de 0,5 mL/minuto. A fração onde se encontra a BthTX-I (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Andrião-Escarso et al., 2000; Bonfim et al., 2001; Barbosa et al., 2005), foi dialisada e concentrada em torno de 10 mg/mL. Desta amostra, 500 µg foram solubilizados em 200 µL da fase móvel inicial (TFA 0,1%) e injetados no sistema para o teste de pureza.

O segundo protocolo foi desenvolvido por otimização dos trabalhos primordiais e mais recentes para a BthTX-I e outras miotoxinas botrópicas. Assim, a BthTX-I foi isolada a partir da cromatografia de exclusão molecular seguida pela cromatografia de fase reversa. A primeira etapa foi realizada com os mesmos parâmetros do protocolo anterior e a última etapa foi

realizada nos sistemas de HPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare) e UFLC Prominence (Shimadzu), com as colunas µRPC C2/C18 ST 4.6/100 (GE Healthcare) e Shim-Pack CLS-ODS (M) (Shimadzu), através do gradiente de acetonitrila (0-66,7% em TFA 0,1%) em um fluxo de 1 mL/minuto. A fração onde se encontram as fosfolipases A_2 do veneno, obtida na cromatografia de exclusão molecular, foi dialisada e concentrada em torno de 10 mg/mL. Desta amostra, 5 mg foram solubilizados em 500 µL da fase móvel inicial (TFA 0,1%) e injetados no sistema para a realização da cromatografia de fase reversa. A fração majoritária isolada nesta última etapa foi considerada como a BthTX-I, a qual foi liofilizada para armazenamento. A confirmação sequencial da proteína purificada com o segundo protocolo foi realizada por espectrometria de massas.

1.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A cada etapa cromatográfica foi realizada a averiguação do tamanho molecular das frações por SDS-PAGE, no intuito de encontrar as proteínas de tamanho semelhante às fosfolipases A_2, bem como verificar as contaminações por proteínas de outros tamanhos moleculares (SDS-PAGE em condições redutoras) ou possíveis variações no estado oligomérico da amostra (SDS-PAGE em condições não-redutoras).

A eletroforese com agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu do gel de concentração (poliacrilamida 6%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1%) e do gel de separação (poliacrilamida 15%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,1%), além de persulfato de amônio 10% e tetrametiletilenodiamina (TEMED), mantendo a relação de acrilamida/bis-acrilamida em 30%:0,8%. Tais géis foram preparados no sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). As amostras proteicas foram solubilizadas em Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,001% (condições redutoras). Nas condições não-redutoras, as amostras eram mantidas na mesma solução na ausência de β-mercaptoetanol. As amostras das condições redutoras foram submetidas a aquecimento (95 °C) por 5 minutos, ligeiramente centrifugadas (10000 rpm) e aplicadas em gel de eletroforese. Para efeito de comparação de massa molecular das amostras, foram utilizados os padrões da Thermo Scientific, contendo nove proteínas entre 10 e 250 kDa. O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1% pH 8,3. Os ensaios de eletroforese foram realizados em potencial constante de 70 V durante aproximadamente 2,5 horas. Os géis foram corados em

solução de Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) 0,1%, ácido acético 10% e etanol 50% e descorado em solução de ácido acético 10% e etanol 30%, para posterior análise.

1.1.3. Espectrometria de massas

Com a técnica de espectrometria de massas avaliou-se a identidade da proteína isolada pelo novo protocolo de purificação desenvolvido, uma vez que se obteve a estrutura primária da fração, ou seja, a sequência dos resíduos de aminoácidos. Para tanto, as amostras foram reduzidas (submetidas a ditiotreitol 5 mM, por 25 minutos, a 56 °C) e alquiladas (submetidas a iodoacetamida 14 mM, por 30 minutos) anteriormente à adição de tripsina (Sequence Grade Modified Trypsin, Promega). Após a adição de tripsina (20 ng/µL, em solução de bicarbonato de amônio 50 mM), as amostras foram incubadas por 16 horas, a 37 °C. Assim, interrompeu-se a reação adicionando ácido fórmico 0,4% e, em seguida, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, por 10 minutos). Apenas o sobrenadante foi aproveitado, após secagem em concentradores SpeedVac (Thermo Scientific). Os peptídeos resultantes foram separados por uma coluna C18 (100 µm × 100 mm) RP-UPLC (NanoACQUITY UPLC, Waters) acoplada ao espectrômetro de massas (Q-Tof Ultima API, MicroMass/Waters) com eletropulverização, em um fluxo de 600 nL/minuto. O gradiente utilizado foi de acetonitrila 0-90% em ácido fórmico 0,1%, por 20 minutos. Antes de realizar os espectros de massas, um espectro ESI-MS (modo TOF MS) foi adquirido para cada fração ao longo da faixa de massas de 100-2000 M/Z, a fim de selecionar o íon de interesse, onde tais íons foram posteriormente fragmentados na cela de colisão (modo TOF MS/MS). Os dados obtidos a partir do LC-MS/MS foram processados no pacote de *softwares* MassLynx 4.1 (Waters) e analisados com o sistema de buscas MASCOT 2.3 (Matrix Science) e um banco de dados conhecido.

Os procedimentos citados no presente item foram realizados sob assistência da Dr. Bianca A. Pauletti e de Romênia R. Domingues do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, CNPEM, Campinas/SP).

1.1.4. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico possibilita o cálculo do coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula (D_T), a partir de seu movimento browniano em solução (Ferré-D'Amaré e Burley, 1994). Após a obtenção do D_T, calcula-se o raio hidrodinâmico da molécula (R_H) pela equação de Stokes-Einstein. Em seguida se obtém a massa molecular, estimada com a curva de calibração de proteínas globulares de massa conhecida.

Ensaios de DLS são empregados para verificar a polidispersividade (Pd) de uma amostra em solução, uma vez que amostras com baixo índice de Pd (< 15%) apresentam probabilidade 80% maior de cristalização em relação às amostras com alto índice de Pd (Ferré-D'Amaré e Burley, 1994). Ainda, com a estimativa da massa molecular da amostra é possível se obter, em amostras com baixa polidispersividade, uma indicação do estado oligomérico da proteína em solução.

Os experimentos de DLS foram executados com o sistema DynaPro™ Titan (Wyatt Technology). Com o *software* Dynamics 6.10, foram analisadas 100 medidas da toxina em cada temperatura (10 °C, 18 °C e 25 °C), após calibração automática da intensidade do feixe e estabilização da amostra por 5 minutos em tais temperaturas.

1.2. Drogas e reagentes

As drogas e reagentes utilizados no presente estudo foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich, a fim de garantir um elevado grau de pureza dos sais e solventes. Os compostos vegetais adquiridos possuem os seguintes registros CAS: 140-10-3 (ácido *trans*-cinâmico), 501-98-4 (ácido *p*-cumárico), 537-98-4 (ácido *trans*-ferúlico), 397-97-9 (ácido clorogênico), 67879-58-7 (ácido caftárico) e 6537-80-0 (ácido chicórico). As estruturas moleculares destes compostos encontram-se representadas a seguir (Fig. 4).

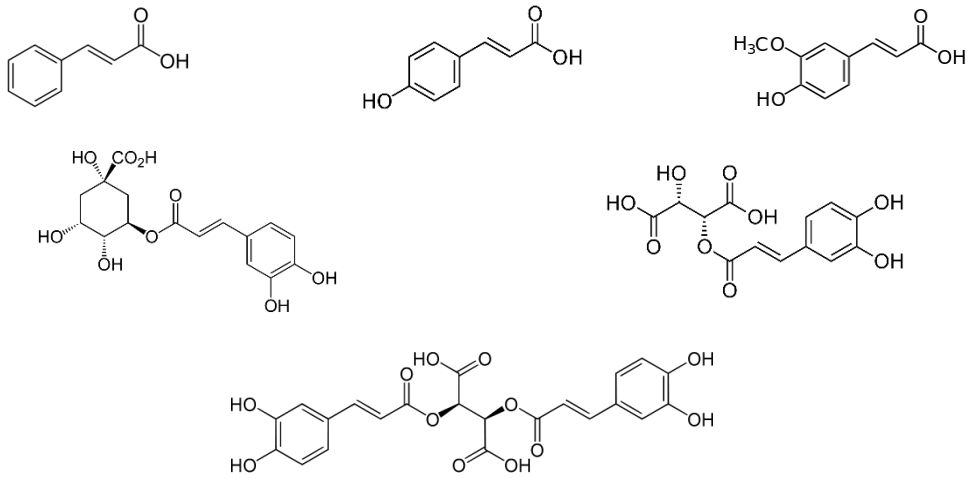

Fig. 4 – Estruturas moleculares dos compostos vegetais utilizados no presente estudo. A) ácido cinâmico. B) ácido *p*-cumárico. C) ácido clorogênico. D) ácido caftárico. E) ácido chicórico.

2. Estudo cristalográfico

2.1. Testes de cristalização

Os experimentos de co-cristalização da BthTX-I e os compostos vegetais foram realizados pelo processo de *salting-out*, que consiste na preparação de uma solução contendo agente precipitante (sais, polietileno glicol ou solvente orgânico) e proteína, com aumento gradativo da concentração deste agente até a supersaturação da proteína. Neste processo, observa-se a precipitação ou cristalização da proteína, caso ocorra lentamente (McPherson, 2009).

Os agentes precipitantes adequados para a cristalização da proteína foram selecionados através do método de matriz esparsa (Jancarik e Kim, 1991). Deste modo, as soluções empregadas com sucesso na formação de cristais (a partir de *kits* comerciais para cristalização de proteínas ou de condições anteriormente utilizadas para miotoxinas botrópicas) foram refinadas até a obtenção da condição de cristalização.

No intuito de se obter o aumento gradativo da concentração do agente precipitante, foi empregado o método de difusão a vapor, onde o processo de equilíbrio de duas soluções (a primeira constituída pela solução do agente precipitante e a seguinte por esta solução em adição à solução de proteína) através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado (McPherson, 2009). Neste método, foram utilizados os sistemas de "gota suspensa" (*hanging drop*) e "gota sentada" (*sitting drop*). Tais sistemas são os mais adequados para os testes iniciais com uma grande variedade de condições de cristalização, uma vez que utilizam volumes pequenos de proteína (0,5 µL a 5,0 µL) e facilitam a análise dos experimentos (McPherson, 2009). Nestes sistemas, a solução de cristalização (precipitante) fica no reservatório e a solução de proteína com a adição de solução precipitante ficam na gota.

Após a realização dos testes iniciais de cristalização, a obtenção de monocristais e/ou aprimoramento dos cristais previamente adquiridos pode ser realizada pelo método de "semeadura" (*seeding*) (Stura, 1999). Especificamente, através do método de *microseeding* novos cristais foram formados a partir de micronúcleos oriundos de monocristais triturados e não utilizados para posterior etapa de coleta de dados de difração de raios X.

2.2. Coleta de dados de difração de raios X

Os cristais obtidos foram retirados de suas respectivas gotas, montados em *loops* de *nylon* e resfriados em nitrogênio líquido (-196 °C) sem a necessidade da adição de crioprotetor,

uma vez que as condições de cristalização utilizadas já possuíam agentes crioprotetores em sua composição. Em seguida, foram coletados os dados provenientes da difração provocada pela incidência do feixe de raios X sobre o cristal, resfriado em nitrogênio gasoso (-173,15 °C). Tal feixe é obtido através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um ânodo rotatório, ou raios X gerados a partir de luz síncrotron (Drenth, 1994). Neste estudo foi utilizada a fonte disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNLS, CNPEM, Campinas/SP).

A partir do conjunto de dados obtido, é possível determinar informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica cristalina e previsão da porcentagem de água no cristal (McPherson, 2009). O processamento dos dados coletados foi realizado pelo *software* HKL (Otwinowski e Minor, 1997). A partir do processamento dos dados, gerou-se o mapa de densidade eletrônica, o qual foi utilizado para a modelagem da estrutura da proteína.

2.3. Elucidação das estruturas cristalográficas

A obtenção da distribuição eletrônica dos átomos das moléculas que formam o cristal é necessária para a determinação da estrutura tridimensional. Deste modo, o conhecimento da intensidade e da fase da radiação difratada pelo cristal é indispensável. No entanto, apenas as intensidades da radiação difratada são mensuradas, tornando obrigatória a determinação das fases da radiação por outros procedimentos (Drenth, 1994). Para tanto, foi utilizado o método de substituição molecular através do *software* Phaser (McCoy et al., 2007), a partir de um modelo proteico previamente elucidado e de alta identidade à amostra. Assim, o modelo foi devidamente posicionado na cela unitária da amostra por função de rotação e translação, baseado na comparação dos fatores de estrutura do modelo utilizado (F_{Calc}) e da amostra (F_{Obs}).

Em seguida, foram realizados ciclos de refinamento e ajustes manuais do modelo através dos *softwares* PHENIX (Adams et al., 2010) e Coot (Emsley et al., 2010), respectivamente. Deste modo, o modelo foi aprimorado ao minimizar a energia livre e ao refinar as distâncias das ligações peptídicas, ângulos diédricos, interações atômicas, entre outros parâmetros, de acordo com os dados coletados. Esse ciclo foi realizado até atingir a máxima concordância entre F_{Calc} e F_{Obs}, avaliada pelos valores de R_{Free} e R_{Cryst} (McPherson, 2009). Através dos *softwares* MolProbity (Chen et al., 2010) e PyMOL (DeLano, 2015), respectivamente, foi avaliado o modelo final e realizada a geração das imagens.

Após a elucidação da estrutura tridimensional, foi possível iniciar os estudos funcionais e avaliar a relação estrutura/atividade da toxina.

3. Estudo miográfico

A partir da preparação neuromuscular isolada de camundongos, foram registradas as contrações musculares evocadas por estimulação elétrica. Tais contrações podem ser promovidas direta- ou indiretamente, respectivamente pelo estímulo direto do músculo ou pela inervação do mesmo. Assim, os efeitos de diferentes tratamentos foram observados pela análise da amplitude das contrações musculares no decorrer do tempo.

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (≈ 25 g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, *Campus* Botucatu e alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências (IBB) da referida universidade. Os animais foram mantidos em gaiolas higienizadas regularmente (20 animais/gaiola), abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura (24 ± 2 °C) e umidade relativa do ar controladas (55 ± 5%) e ciclo claro-escuro (12-12 h).

3.2. Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongos

O camundongo foi sacrificado por deslocamento cervical e exsanguinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (Bülbring, 1946). Durante este período a preparação foi perfundida intermitentemente com solução nutriente de Ringer (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $NaHCO_3$ 15 mM, Na_2HPO_4 1 mM e glicose 11 mM). A seguir, o hemidiafragma esquerdo foi cortado em formato triangular e montado verticalmente no sistema de cubas para órgão isolado (Tecnal, Modelo TE-051), contendo 15 mL da solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2) e mantida a 35 °C (± 2 °C). O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro de formato “L” e o centro tendíneo do músculo diafragma foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass Telefactor, Modelo FT03), o qual estava acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, Modelo 13-6615-50). Os sinais foram registrados em um computador através do sistema de aquisição de dados Summit ACQuire (Gould Systems) e posteriormente submetidos à análise utilizando o *software* Summit DataViewer (Gould Systems).

Os procedimentos do presente item foram realizados sob assistência do Dr. Walter L. G. Cavalcante do Departamento de Farmacologia/Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu

3.3. Registro das contrações evocadas indiretamente

Para evocar as contrações musculares indiretas, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina "de sucção", que se encontrava acoplado a um estimulador elétrico (Grass Telefactor, Modelo S88). Um segundo eletrodo, constituído por um fio de platina enrolado em um suporte de vidro de formato "L", serviu como eletrodo "de referência" e consistiu no local em que o músculo foi conectado. As contrações musculares foram evocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz.

3.4. Protocolo experimental

As preparações foram mantidas a 35 °C (± 2 °C) e submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, durante os quais houve renovação da solução nutriente a cada 15 minutos e estimulação elétrica na frequência de 0,2 Hz. Em seguida, foram registradas as contrações na ausência de qualquer substância durante 15 minutos. Subsequentemente, a BthTX-I, o composto vegetal ou o produto de pré-incubação da toxina com o composto por 30 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado ao banho. A seguir, as contrações musculares foram registradas por um período de 90 minutos.

3.5. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos resultados foi realizada através da Análise de Variância e complementada pelo Teste de Tukey-Kramer (Snedecor e Cochran, 1989). Foi estabelecido o nível de significância de 5%.

4. Estudo morfológico

Após os experimentos miográficos, fragmentos do músculo diafragma foram fixados por solução de Bouin (ácido acético 5,0%, formaldeído 9,0% e ácido pícrico 0,9%) durante 24 horas. Após a retirada do excesso da solução fixativa pela lavagem com solução de hidróxido de amônio, os fragmentos foram desidratados por sucessivas soluções de etanol em

concentração crescente (70, 95 e 100%). Em seguida, os fragmentos foram processados e embebidos em historresina (HistoResin, Leica). Subsequentemente, cortes transversais de 5 μm de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares por microscopia ótica (McManus e Mowry, 1960).

Os danos morfológicos foram analisados a partir das imagens obtidas dos cortes corados em HE através do sistema Analysis Imaging System Software (Leica QWin). Deste modo, a fração do número de fibras lesadas em relação ao número total de fibras (*i.e.*, o índice de lesão/dano muscular) foi quantificada a partir de cinco áreas aleatórias, não-sobrepostas e não-adjacentes, observadas na mesma ampliação em todos os cortes analisados. A partir dos valores dos índices de cada grupo, foi possível indicar o tipo de interferência dos tratamentos dos grupos experimentais nas fibras musculares.

Os procedimentos referentes ao preparo das lâminas foram realizados sob assistência de Vivian T. H. Cypriano do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

5. Estudo calorimétrico

Os ensaios calorimétricos foram realizados por titulação isotérmica (ITC), em que cada composto vegetal foi titulado à toxina (respectivamente, titulante e titulado), a fim de verificar a interação entre tais moléculas através da mensuração da variação de calor.

No estudo, foi utilizado o microcalorímetro iTC_{200} (GE Healthcare), o qual é basicamente composto por duas celas (uma de reação e outra de referência), sensor e controlador de temperatura e micropipeta automatizada. O princípio utilizado pelo equipamento consiste na compensação dinâmica da potência. Nesse tipo de equipamento, anteriormente à titulação, uma potência constante (< 1 mW) é aplicada à célula de referência. Este sinal aciona o aquecedor da célula de reação, e esta potência aplicada representa a linha de base. A quantidade mensurada diretamente em um experimento de ITC é a potência de entrada dependente do tempo para manter as celas de referência e de reação à mesma temperatura. Durante a injeção do titulante na cela de reação, calor é absorvido ou liberado de acordo com a natureza da interação entre as macromoléculas avaliadas (respectivamente, endotérmica ou exotérmica). Para uma reação exotérmica, a temperatura na cela de reação tende a subir e, com isso, a potência de *feedback* deve diminuir para manter as duas celas à mesma temperatura. Nas reações endotérmicas, a potência deve aumentar para a manutenção da temperatura constante (Velázquez-Campoy e Freire, 2005). O calor gerado ou absorvido durante a titulação é

proporcional à fração de ligação de titulante ao titulado. Deste modo, deve-se determinar corretamente as concentrações iniciais das espécies titulante e titulada para as injeções iniciais, bem como promover a interação completa (ou mais próxima possível) destas espécies, resultando em considerável sinal exotérmico ou endotérmico (Freire et al., 1990; Pierce et al., 1999).

No termograma gerado em um experimento típico de ITC, os calores iniciais gerados pela reação entre ambas as espécies são maiores que os gerados nas injeções subsequentes do titulante, pois no início da titulação há um excesso de sítios de ligação não ocupados na espécie titulada. Com isso, os calores gerados no início da titulação são resultado da reação completa do titulante adicionado. Com o prosseguimento da titulação, menores quantidades de titulante se ligam à espécie titulada e novas espécies passam a aparecer na célula de reação (titulante livre, titulado com sítios de ligação não ocupados e complexo formado). Nas últimas injeções, a espécie titulada deve estar saturada e o calor gerado ou absorvido ser proporcional ao calor de diluição do titulante (Biswas e Tsodikov, 2010), terminando a titulação apenas com moléculas do titulante livres e moléculas do complexo titulante-titulado formadas.

A análise dos dados é realizada pelo cálculo das áreas dos picos decorrentes do calor gerado ou absorvido pela interação entre titulado e titulante. Os dados são apresentados na forma de isotermas, as quais correspondem às curvas da energia liberada ou absorvida normalizada pela concentração do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar do titulante pelo titulado (eixo das abcissas) (Wiseman et al., 1989). As características termodinâmicas como variação de entalpia (ΔH) corresponde à diferença de energia entre a primeira e última injeção decrescido do valor do calor de diluição da espécie titulante, enquanto a constante de dissociação (K_D) corresponde à inclinação da reta que melhor se ajusta no ponto de inflexão da isoterma de ligação (Velázquez-Campoy, 2015). Apesar das características geométricas da curva permitirem o cálculo inicial das constantes, os dados são ajustados com base em polinômios de ligação (Vega et al., 2015).

Como forma de otimizar os experimentos, foram realizadas uma série de titulações com diferentes concentrações de titulante e titulado, visando a saturação dos sítios de ligação deste titulado ao final dos testes. A fim de se determinar quais seriam as concentrações ideais para tanto, foram realizados ensaios com a BthTX-I (espécie titulada) e os inibidores (espécie titulante) em diferentes concentrações, a 18 °C e 25 °C com agitação de 1000 rpm. As injeções, com volume de 2 μL administrado em 4 segundos, foram realizadas a cada 2,5 ou 3 minutos.

Os dados das titulações foram tratados no *software* fornecido pelo fabricante (Origin 7.0) ou com os *softwares* NITPIC (Keller et al., 2012) e SEDPHAT (Zhao et al., 2015).

Os procedimentos citados no presente item foram realizados sob assistência do Me. Thiago R. Dreyer do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu.

Resultados

1. Purificação da BthTX-I a partir do veneno bruto

1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC)

A princípio, as etapas de purificação dos componentes do veneno de *Bothrops jararacussu* foram realizadas a temperatura ambiente, em duas etapas: cromatografia de exclusão molecular (Fig. 5) e cromatografia de troca iônica (Fig. 6). Em seguida, a fração da BthTX-I foi submetida a cromatografia de fase reversa (Fig. 7) a fim de testar a pureza da amostra.

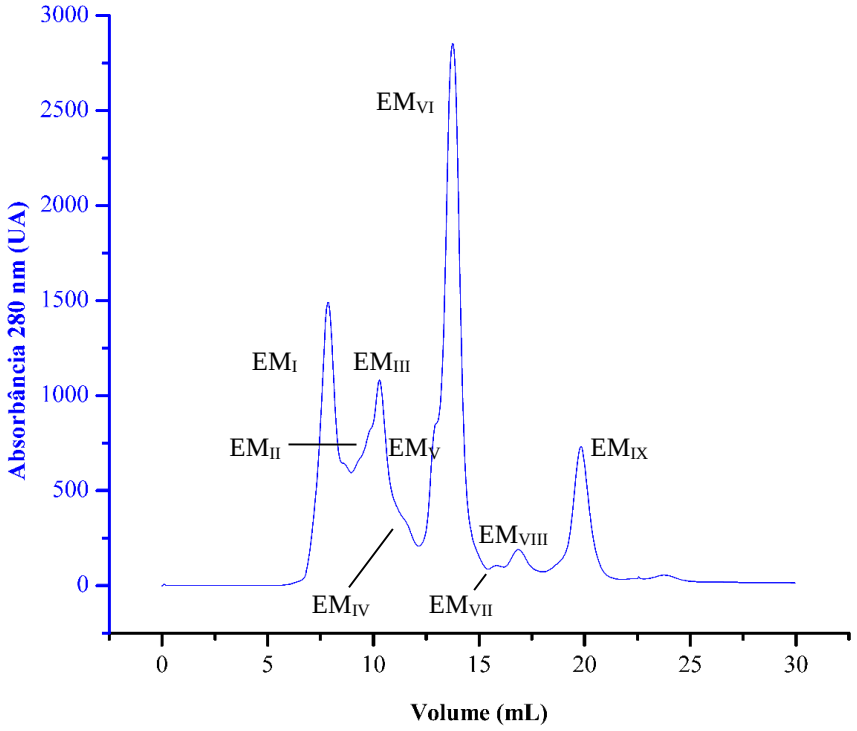

Fig. 5 – Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Bothtops jararacussu*.

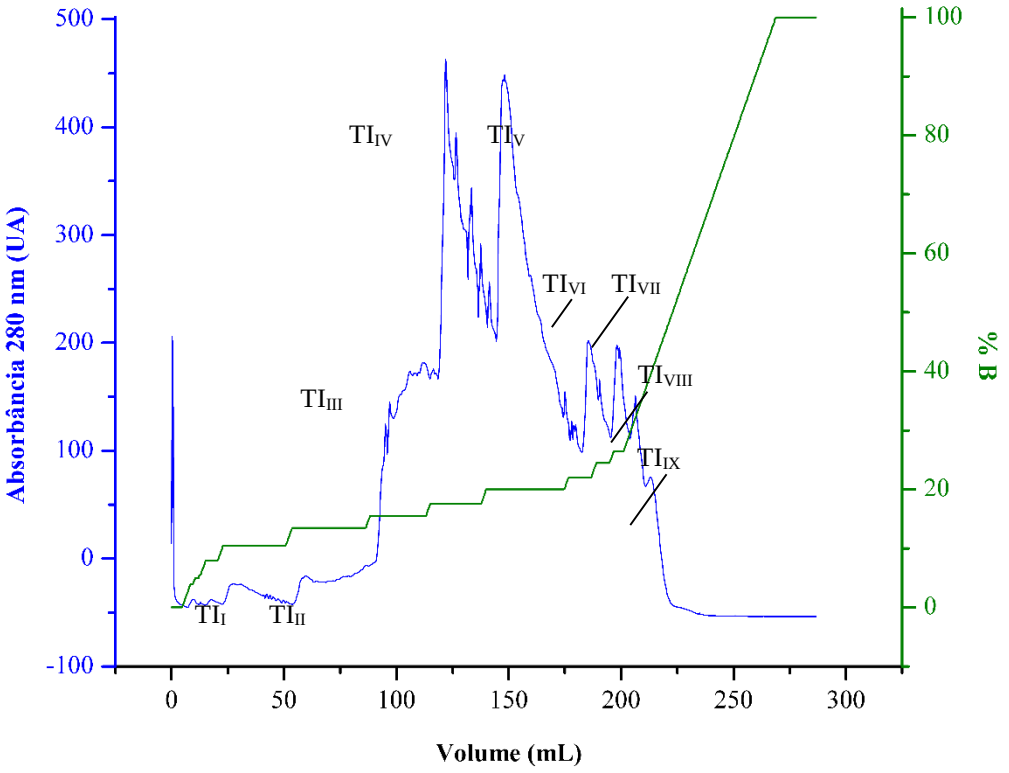

Fig. 6 – Cromatografia de troca iônica (catiônica) da fração de fosfolipases A_2 (EM_{VI}) do veneno de *Bothrops jararacussu*.

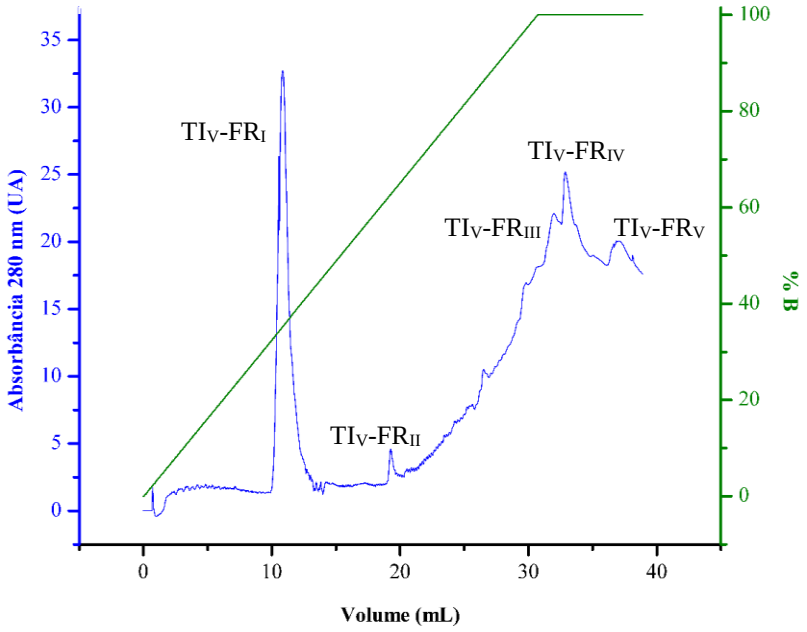

Fig. 7 – Cromatografia de fase reversa da fração TI_V (Fig. 6), onde se encontra a BthTX-I.

O grau de pureza da BthTX-I obtida através dos protocolos convencionais foi aquém do esperado, uma vez que o teste de pureza após duas etapas de cromatografia apresentou um pico predominante acompanhado, em menor expressão, de pelos menos quatro entidades desconhecidas. Deste modo, foi desenvolvido um novo método para o isolamento da BthTX-I e outras miotoxinas do veneno de *B. jararacussu*, em um grau maior de pureza e em menor intervalo de tempo, através do refinamento dos protocolos convencionais. Assim, as toxinas BthTX-I e BthTX-II foram isoladas a partir de uma cromatografia de exclusão molecular (Fig. 5) seguida por uma cromatografia de fase reversa (Fig. 8).

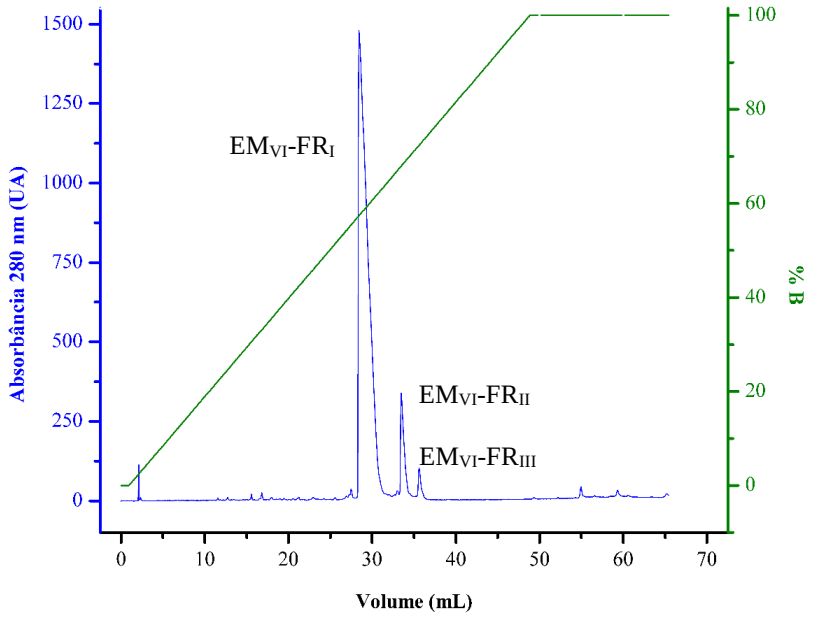

Fig. 8 – Cromatografia de fase reversa da fração de fosfolipases A_2 (EM_{VI}) do veneno de *Bothrops jararacussu*.

1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A seguir, são mostradas as imagens de SDS-PAGE das frações das cromatografias de exclusão molecular (Fig. 9), de troca iônica (Fig. 10), de fase após a cromatografia de troca iônica (Fig. 11) e de fase reversa após a cromatografia de exclusão molecular (Fig. 12).

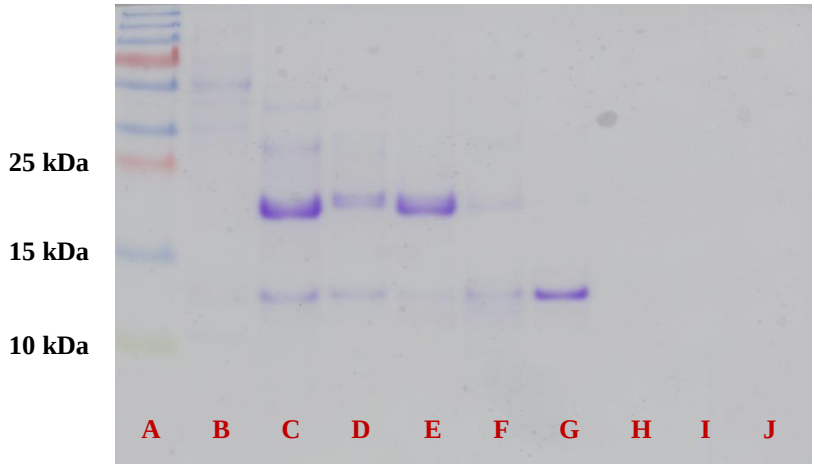

Fig. 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão (A) e das frações da cromatografia de exclusão molecular EM_I (B), EM_{II} (C), EM_{III} (D), EM_{IV} (E), EM_V (F), EM_{VI} (G), EM_{VII} (H), EM_{VIII} (I) e EM_{IX} (J). Todas as amostras foram submetidas a condições desnaturantes e redutoras (SDS, β-mercaptoetanol e aquecimento).

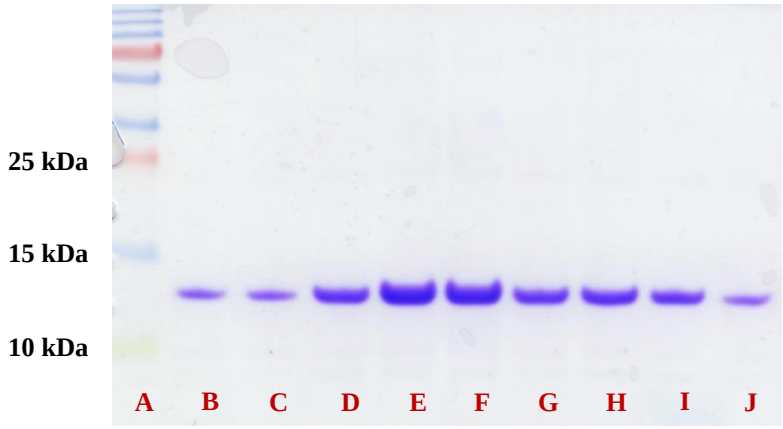

Fig. 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão (A) e das frações da cromatografia de troca iônica TI_I (B), TI_{II} (C), TI_{III} (D), TI_{IV} (E), TI_V (F), TI_{VI} (G), TI_{VII} (H), TI_{VIII} (I) e TI_{IX} (J). Todas as amostras foram submetidas a condições desnaturantes e redutoras (SDS, β-mercaptoetanol e aquecimento).

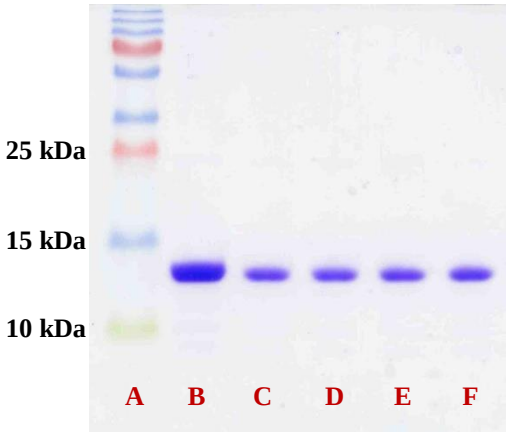

Fig. 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão (A) e das frações da cromatografia de fase reversa após a de troca iônica TI_V-FR_I (B), TI_V-FR_{II} (C), TI_V-FR_{III} (D), TI_V-FR_{IV} (E) e TI_V-FR_V (F). Todas as amostras foram submetidas a condições desnaturantes e redutoras (SDS, β-mercaptoetanol e aquecimento).

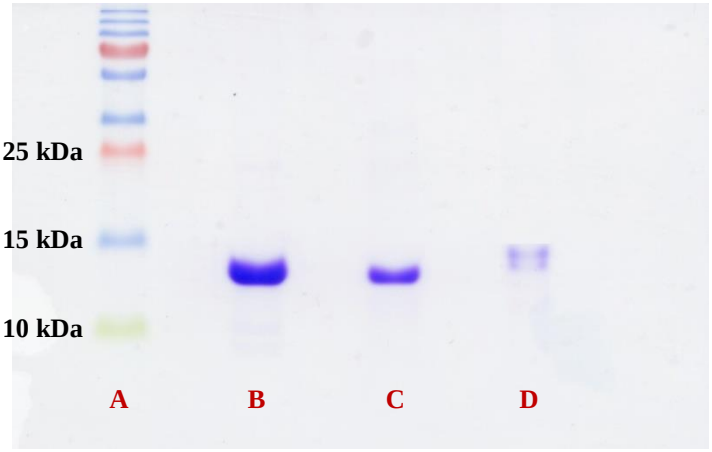

Fig. 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão (A) e das frações da cromatografia de fase reversa após a de exclusão molecular EM_{VI}-FR_I (B), EM_{VI}-FR_{II} (C) e EM_{VI}-FR_{III} (D). Todas as amostras foram submetidas a condições desnaturantes e redutoras (SDS, β-mercaptoetanol e aquecimento).

A partir do primeiro ensaio de SDS-PAGE (Fig. 9), observa-se que a BthTX-I e as demais fosfolipases A_2 estão majoritariamente presentes na fração EM_{VI}, uma vez que as proteínas de tal fração apresentam massa molecular entre 10 e 15 kDa, intervalo em que se encontram as PLA_2 (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Andrião-Escarso et al., 2000; Barbosa et al., 2005; Ponce-Soto et al., 2006).

Baseando-se apenas na massa molecular, a fração EM_{VI} aparentemente já apresenta um alto grau de pureza. Contudo, no segundo ensaio (Fig. 10), observa-se que existem diversas proteínas presentes nesta fração. E, para observar todas em SDS-PAGE, foi necessária a

concentração das amostras, com exceção das frações TI_{IV} e TI_V. Como esperado, todas as frações apresentaram massa molecular entre 10 e 15 kDa, uma vez que a amostra de origem (EM_{VI}) exibiu banda única de mesma massa.

A purificação da BthTX-I a partir de protocolos constituídos pela cromatografia de troca iônica, constituiu-se na coleta da maior e última fração (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Spencer et al., 1998; Andrião-Escarso et al., 2000; Barbosa et al., 2005). Assim, no presente estudo, foi coletada a fração TI_V (Fig. 10). Assim como a fração EM_{VI}, a TI_V apresentou mais de uma proteína em cromatografia de fase reversa (Fig. 7), como observado no terceiro ensaio de SDS-PAGE (Fig. 11). Nesse teste, apenas a fração majoritária TI_V-FR_I não foi concentrada para observação em gel.

No quarto ensaio (Fig. 12), observam-se as frações obtidas da cromatografia de fase reversa após a de exclusão molecular (Fig. 8). Neste ensaio, observou-se três frações mais evidentes, em que a mais abundante (EM_{VI}-FR_I) foi considerada como a BthTX-I.

1.3. Espectrometria de massas

A amostra majoritária da fração total de fosfolipases foi considerada constituída pela BthTX-I, assim como já descrito anteriormente (Homsi-Brandeburgo et al., 1988; Cintra et al., 1993). Para confirmar a identidade da toxina purificada pelo método desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME), os resíduos identificados por espectrometria de massas foram comparados às BthTX-I encontradas no banco de dados NCBI (*National Center For Biotechnology Information*) e PDB (*Protein Data Bank*) (Tab. 1).

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

```
NCBI  SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPK
PDB   SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCDPK
Exp.  SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLG---------RCCYVH----KKLTGCDPK
      ********************************         ******    ******:**

NCBI  KDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLGTYNKKYRYHLKPFCKKADP
PDB   KDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLGTYNKKYRYHLKPFCKKADP
Exp.  ---YSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLGTYNKKYRYHLKPFCK----
         **************************************************

NCBI  C
PDB   C
Exp.  -
```

Os sinais (*) e (:) correspondem, respectivamente, às semelhanças e diferenças entre os resíduos comparados.

A partir desses resultados e considerando os resíduos de aminoácidos identificados, observou-se 100% de identidade da proteína purificada com a BthTX-I depositada no PDB (dos Santos et al., 2009B). Em relação à proteína encontrada no NCBI (Cintra et al., 1993), ocorreu apenas a mutação Asp58Asn. Deste modo, a proteína purificada pelo novo protocolo no LBME trata-se realmente da BthTX-I.

2. Avaliação da oligomerização da BthTX-I em solução

A análise do comportamento da toxina-alvo do estudo em solução foi realizada por espalhamento de luz dinâmico e, em seguida, avaliou-se o seu comportamento oligomérico em diferentes condições por eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.1. Espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Por ensaios de DLS foi possível avaliar a polidispersividade, a presença de agregados na amostra e estimar o raio hidrodinâmico e a massa molecular da toxina. Abaixo estão os resultados do espalhamento de luz dinâmico da BthTX-I (Tab. 2-4), em diferentes meios e temperaturas, após concentração, filtração e centrifugação adequadas.

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)

	R_H (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Int (%)	Massa (%)
10 °C	1,9	11,0	14	100	100
18 °C	1,9	10,5	15	100	100
25 °C	1,9	5,7	15	100	100

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)

	R_H (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Int (%)	Massa (%)
10 °C	2,3	18,6	23	85,0	100
18 °C	2,3	14,0	23	83,5	100
25 °C	2,3	20,4	25	77,9	100

Tab. 4 – Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BthTX-I (3,7 mg/mL em água deionizada)

	R_H (nm)	Pd (%)	MM (kDa)	Int (%)	Massa (%)
10 °C	5,0	10,0	148	2,7	78,0
18 °C	4,9	11,5	139	2,7	80,3
25 °C	8,7	9,7	530	2,9	33,5

Os primeiros testes (Tab. 2) foram realizados com a fase móvel utilizada da primeira etapa cromatográfica (exclusão molecular) para o isolamento da BthTX-I (Homsi-Brandeburgo et al., 1988). Em meio ácido (formato de amônio 50 mM, pH 3,5), o baixo índice de

polidispersividade (Pd) indica que a distribuição de tamanho molecular está homogênea. Os valores de raio hidrodinâmico (R_H) e massa molecular (MM) sugerem que a amostra esteja monomérica em solução. Além disso, não há formação de agregados da proteína, uma vez que a intensidade de espalhamento (Int) da amostra e sua massa referente representaram a totalidade (100%) do analisado.

Em seguida (Tab. 3), as aferições foram realizadas com a fase móvel utilizada na etapa cromatográfica de troca iônica utilizada em diversos trabalhos para o isolamento da BthTX-I (Spencer et al., 1998; Andrião-Escarso et al., 2000; Barbosa et al., 2005). Assim, em meio alcalino (bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0), os índices de Pd não sugerem grande homogeneidade na distribuição de tamanho molecular, em comparação à amostra analisada em meio ácido. Os valores do raio hidrodinâmico e massa molecular sugerem que a BthTX-I esteja dimérica nesta solução. Ainda, por mais que a porcentagem da massa amostra seja praticamente a totalidade da amostra (entre 99,9 e 100%), a intensidade de espalhamento desta massa foi no máximo 85%, provavelmente devido à formação de agregados responsáveis por, no máximo, 0,1% da massa total da amostra.

Por fim, a toxina foi solubilizada sem tamponamento salino, ou seja, apenas em água deionizada (Tab. 4). Neste meio, em 10 °C e 18 °C, a maior parte da amostra (78% e 80,3%, respectivamente) mostrou-se em uma conformação oligomérica de alta ordem (aproximadamente decamérica). Entretanto, essa fração respondeu por apenas 2,7% da intensidade de espalhamento. Assim, as aglomerações da toxina foram responsáveis pelos 97,3% da intensidade restante. Enquanto isso, aos 25 °C, ocorreu a formação de diversos aglomerados proteicos, sendo apresentado apenas a entidade com o percentual de massa majoritário.

Através dos dados coletados por espalhamento de luz dinâmico das amostras de BthTX-I, descartou-se a utilização da água deionizada para solubilizar a toxina. Com os valores de polidispersividade obtidos com a solubilização da BthTX-I em formato de amônio (Ferré-D'Amaré e Burley, 1994), não houve restrições nas temperaturas avaliadas para o emprego do tamponamento ácido. Por outro lado, os dados obtidos com a solubilização em bicarbonato de amônio não foram tão satisfatórios (Ferré-D'Amaré e Burley, 1994), o que implicou sua utilização sem restrições em apenas uma das temperaturas avaliadas (18 °C).

2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Em complemento aos dados obtidos acerca do comportamento oligomérico da BthTX-I observado por DLS, foi realizado ensaios de SDS-PAGE em diferentes condições de tratamento (Fig. 13).

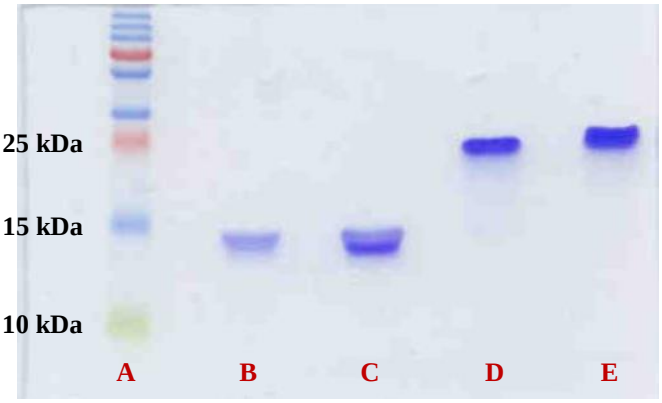

Fig. 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de marcadores padrão (A), fração EM_{VI} (B) e BthTX-I (C, D, E). B e C foram submetidas à condição redutora (SDS, β-mercaptoetanol e aquecimento); D, a uma condição intermediária (SDS e aquecimento) e E, à condição não-redutora (apenas SDS).

Em condições desnaturantes e redutoras, as fosfolipases A_2 (fração EM_{VI}) e a BthTX-I apresentam-se na forma monomérica (entre 10 e 15 kDa). A amostra em condições não-redutoras foi observada como dímero (cerca de 25 kDa). Possivelmente, as sete ligações dissulfeto do monômero da BthTX-I lhe conferem ampla estabilidade, pois mesmo sem interações dissulfeto entre monômeros (Murakami et al., 2007; dos Santos et al., 2009B; Fernandes et al., 2010), a toxina mantém-se como dímero. Deste modo, ainda sob condições desnaturantes (SDS e aquecimento, ou apenas SDS), a BthTX-I apresentou-se em gel na forma dimérica.

3. Estudo cristalográfico

Nesta etapa, a toxina purificada pelo protocolo convencional (fração TI_V, Fig. 6) e pelo desenvolvido no estudo (fração EM_{VI}-FR_I, Fig. 8) foram utilizadas para os testes de cristalização. Em suma, os cristais obtidos com a amostra de BthTX-I proveniente da cromatografia de troca iônica (Fig. 6) consistiram em policristais, de baixa qualidade para difração de raios X. Por outro lado, os cristais da amostra de BthTX-I proveniente da cromatografia de fase reversa (Fig. 8) consistiram majoritariamente em monocristais, de melhor qualidade para difração de raios X.

Apesar do sucesso em gerar cristais com a BthTX-I na presença de cada composto vegetal, apenas o ácido chicórico foi encontrado na estrutura tridimensional elucidada. Os conjuntos de dados obtidos com os cristais da BthTX-I pré-incubada com ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido *trans*-ferúlico foram processados e refinados em alta resolução (entre 1,4 e 2,0 Å), no grupo espacial primitivo hexagonal. Entretanto, não foi encontrada densidade eletrônica referente a estas moléculas em interação à proteína, uma vez que a estrutura se encontra no estado não-ligado (*i.e.*, estado nativo). Os dados obtidos com os cristais da toxina pré-incubada com ácido clorogênico e caftárico foram processados e refinados em resoluções inferiores aos demais compostos vegetais (acima de 2,0 Å), nos grupos espaciais primitivo ortorrômbico e primitivo hexagonal. A seguir são apresentados os resultados do complexo BthTX-I/ácido chicórico (BthTX-I/AC).

3.1. Co-cristalização de BthTX-I/ácido chicórico

A toxina liofilizada, oriunda do protocolo de purificação desenvolvido no LBME, foi solubilizada em bicarbonato de amônio (50 mM, pH 9,0), na concentração de 12 mg/mL após filtração (membrana de PVDF, 0,22 µm de poro e 13 mm de diâmetro). O ácido chicórico foi dissolvido em etanol (50%, v/v) em diferentes concentrações, a fim de se obter a razão molar de 1:10 (toxina/ligante) nas gotas de cristalização. Os cristais (Fig. 14) foram obtidos através do método de difusão a vapor, em sistema de "gota sentada" (*sitting drop*), a 10 °C, em cerca de 10 semanas. O cristal coletado pertencia à gota composta por 0,385 µL da solução de BthTX-I, 0,115 µL da solução de ácido chicórico e 0,500 µL da solução de reservatório, equilibrado contra 50 µL desta mesma solução. A solução de cristalização consistiu de polietileno glicol 4000 (PEG 4000, 30%, p/v), trisaminometano (Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0) e sulfato de lítio (0,1 M).

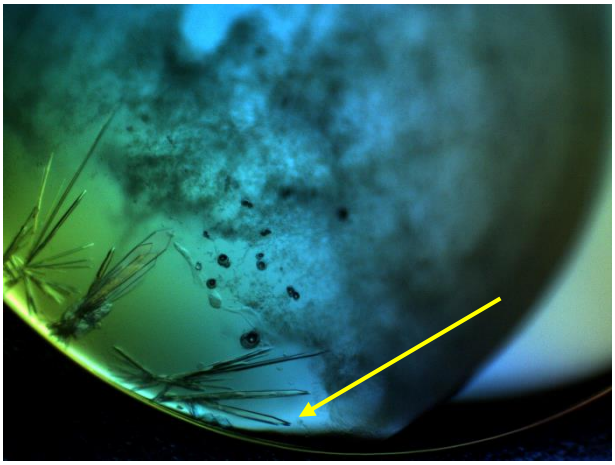

Fig. 14 – Cristais de BthTX-I/AC. A estrutura apontada refere-se ao cristal coletado e posteriormente submetido à coleta de difração de raios X.

3.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios X

Os dados de difração de raios X do monocristal (Fig. 14) foram coletados em um comprimento de onda de 1,459 Å, com a placa detectora de imagens MAR CCD (MAR Research) da linha de luz MX2 (LNLS, CNPEM, Campinas/SP). O cristal, mantido a 80 mm do detector, teve cada imagem dos pontos de difração obtida através da oscilação de 1° e em 100 segundos de exposição ao feixe. Os dados processados foram realizados na resolução de 1,92 Å, com o programa HKL2000. As estatísticas de coleta e processamento dos dados estão descritas na tabela abaixo (Tab. 5).

Tab. 5 – Estatísticas de coleta de dados e processamento do cristal de BthTX-I/AC

Cela unitária (Å, ^{o})	a = 51,50; b = 64,08; c = 88,69
	$\alpha = 90$; $\beta = 109$; $\gamma = 90$
Grupo espacial	$P2_1$
Resolução (Å)	27,35 - 1,93 (2,00 - 1,92) [a]
Reflexões únicas	17598 (1695) [a]
Completeza (%)	97,8 (99,8) [a]
R_{Merge} (%) [b]	7,9 (25,2) [a]
Linha de luz	Síncrotron (MX2, LNLS)
Temperatura de coleta de dados (°C)	-173,15
I/σ (I)	8,21 (3,96) [a]
Multiplicidade	3,2 (3,2) [a]
Moléculas na unidade assimétrica	2

[a]Valores para a camada de maior resolução representados entre parênteses.

[b] $R_{Merge} = \Sigma_{hkl} [\Sigma_i (| I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle |)] / \Sigma_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller “h”, “k”e “l”, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades da reflexão. Calculado para $I > -3\sigma (I)$.

3.3. Refinamento e elucidação da estrutura do complexo BthTX-I/AC

A substituição molecular foi realizada utilizando, como modelo, a estrutura da BthTX-I modificada pelo brometo de *p*-bromofenacil (PDB 3HZW, Fernandes et al., 2010). A melhor solução encontrada pelo *software* Phaser foi submetida a ciclos de refinamento no *software* PHENIX. Os processos de modelagem manual e inspeção da densidade eletrônica foram realizados no *software* Coot. Assim, foram inseridos os íons sulfato e bicarbonato, bem como as moléculas de água, etanol e ácido chicórico, para posteriores refinamentos restritos no *software* PHENIX. Os dados gerados pelo refinamento das estruturas estão descritos na tabela a seguir (Tab. 6).

Tab. 6 – Estatísticas de refinamento do modelo BthTX-I/AC

Resolução (Å)	27,35 - 1,92
R_{Cryst}	16,15
R_{Free}	18,99
Número de átomos (exceto H)	
▪ Proteína	1829
▪ Ligante	69
▪ Água	253
Fator B médio ($Å^2$)	28,73
Fator B do ligante ($Å^2$)	41,16
Resíduos em regiões favoráveis (%)	97
Resíduos em regiões não permitidas	0,42

Pela ausência de densidade eletrônica em algumas regiões, as cadeias laterais dos resíduos Leu31, Lys52, Lys60, Lys61, Lys69, Pro113 e Lys117 do monômero A e Phe3, Lys19, Lys35, Lys52, Lys53, Thr55, Lys60, Lys61, Arg63, Lys106 e Lys117 do monômero B não foram modeladas. A estrutura final revelou um dímero (Fig. 15), 5 íons sulfato, 1 íon bicarbonato, 1 molécula de ácido chicórico, 2 moléculas de etanol e 253 moléculas de água. Os resíduos Phe3, Gly6 e Lys7 do monômero A e Gly6, Asn16 e Pro17 do monômero B se relacionaram com o ácido chicórico por interação hidrofóbica (Fig. 16).

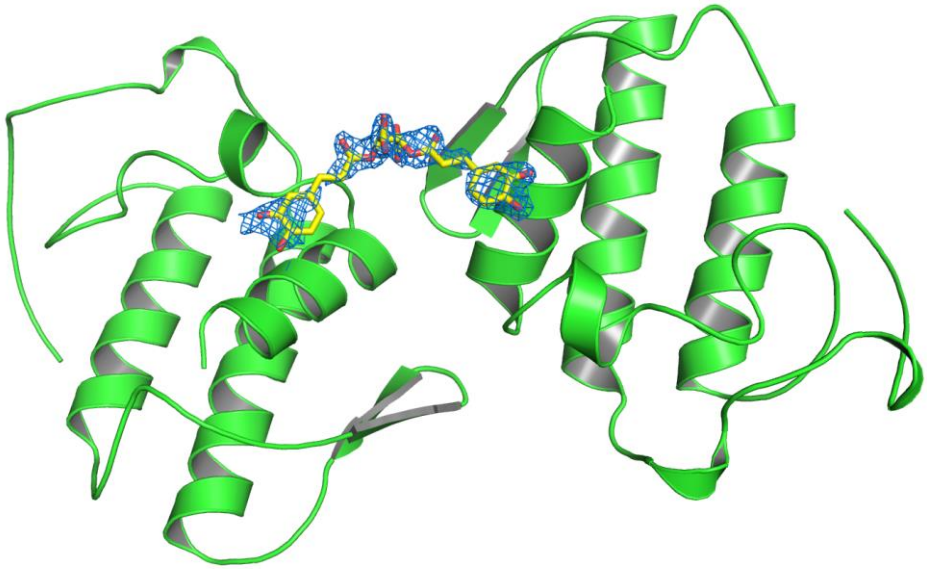

Fig. 15 – Estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/AC. Observa-se a molécula de ácido chicórico (em amarelo/vermelho) e sua densidade eletrônica (em azul) entre os dois monômeros da BthTX-I (em verde). Os mapas foram calculados com os coeficientes 2 | F_{Obs} | - | F_{Calc} | e contorno de 1,0 σ.

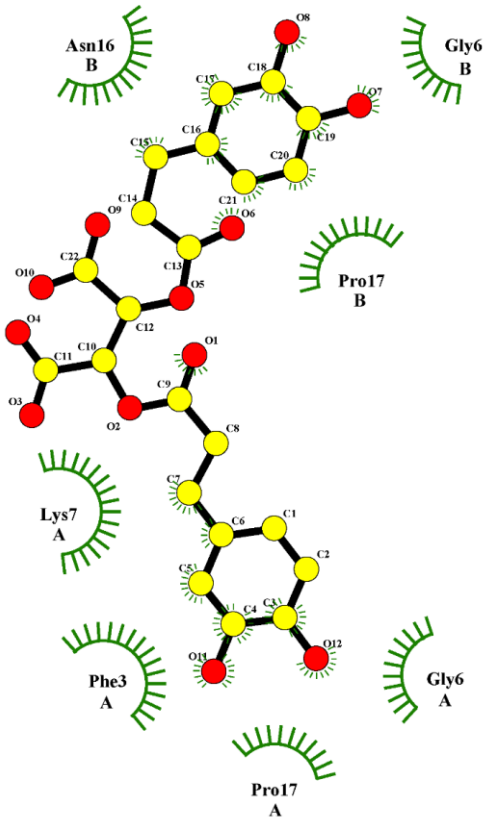

Fig. 16 – Interações entre os resíduos de aminoácidos dos monômeros da BthTX-I (em dímero convencional) e o ácido chicórico. Desenvolvida no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995).

4. Estudo miográfico

Nesta etapa, devido aos resultados obtidos com a cristalização da BthTX-I e os compostos vegetais, a toxina utilizada para os ensaios foi obtida pelo protocolo desenvolvido no estudo (fração EM_{VI}-FR_{I}, Fig. 8).

Apesar de ter sido resolvida apenas a estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/AC, procurou-se avaliar a influência de todos os compostos vegetais propostos frente à atividade desestabilizadora de membranas da BthTX-I. Contudo, os ácidos cinâmico, *p*-cumárico e ferúlico foram posteriormente descartados no estudo miográfico devido à insolubilidade dos mesmos em solventes que não afetassem a preparação neuromuscular de camundongos.

4.1. Efeito da BthTX-I sobre as contrações evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongo

A BthTX-I (1 µM, isto é 13,725 µg/mL) promoveu bloqueio irreversível e tempo-dependente das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações frênico-diafragma de camundongo (Fig. 17). Ao final do protocolo experimental, o bloqueio das contrações musculares indiretas foi de 89,8% em relação ao seu grupo Controle.

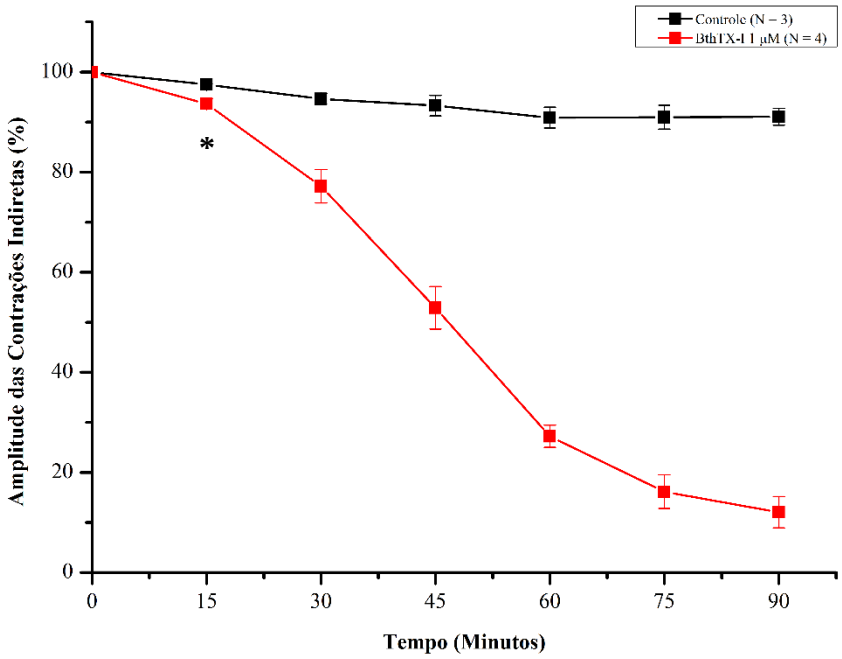

Fig. 17 – Efeito da BthTX-I sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongos. Dados apresentados em média ± EPM. * Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos BthTX-I e Controle ($P < 0,05$).

4.2. Influência do ácido chicórico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O produto de pré-incubação da BthTX-I com o ácido chicórico na proporção 1:10 (peso/peso) não promoveu paralisia significativa das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Deste modo, o ácido chicórico conferiu proteção total ao efeito paralisante da BthTX-I.

O ácido chicórico, administrado isoladamente na concentração de 137,25 µg/mL, não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Os dados referentes aos ensaios realizados com este inibidor estão representados a seguir (Fig. 18).

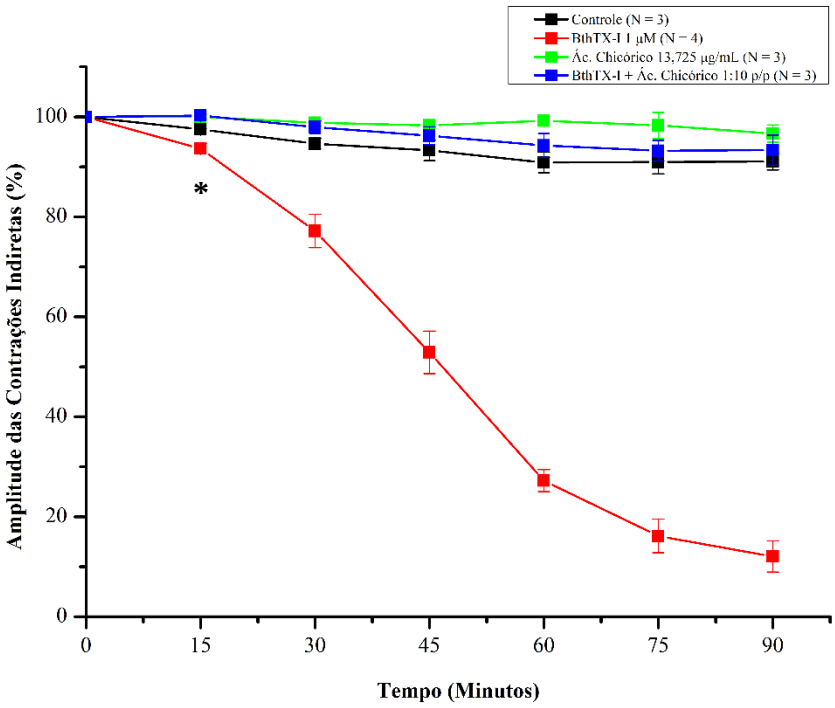

Fig. 18 – Efeito da BthTX-I, do ácido chicórico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados em média ± EPM. * Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos BthTX-I e BthTX-I pré-incubada com ácido chicórico ($P < 0,05$).

4.3. Influência do ácido caftárico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O produto de pré-incubação da BthTX-I com o ácido caftárico na proporção 1:10 (peso/peso) não promoveu paralisia significativa das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Deste modo, a proteção conferida pelo ácido caftárico ao efeito paralisante da BthTX-I foi de 91,6%.

O ácido caftárico, administrado isoladamente na concentração de 137,25 µg/mL, não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Os dados referentes aos ensaios realizados com este inibidor estão representados a seguir (Fig. 19).

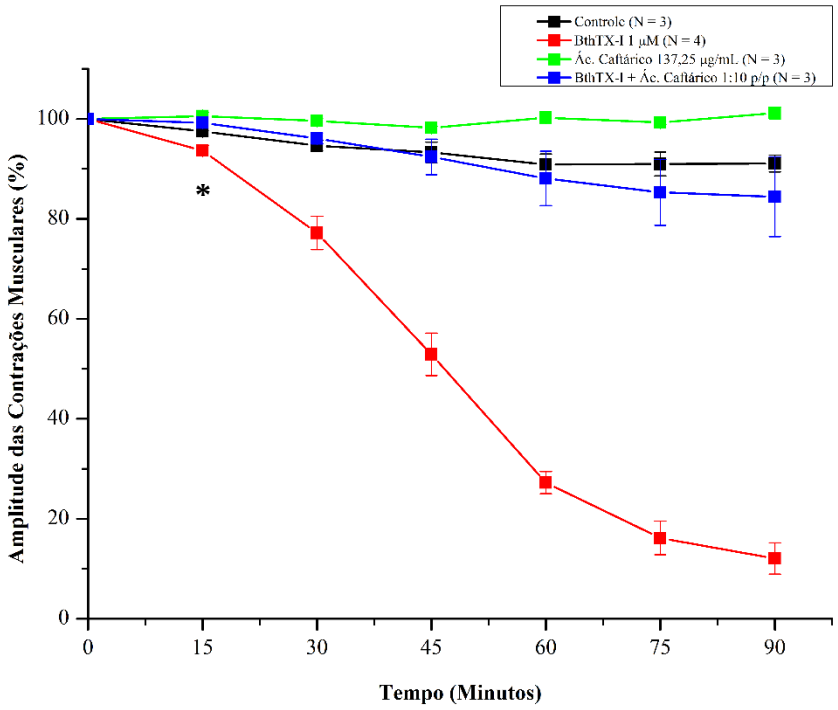

Fig. 19 – Efeito da BthTX-I, do ácido caftárico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados em média ± EPM. * Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos BthTX-I e BthTX-I pré-incubada com ácido caftárico ($P < 0,05$).

4.4. Influência do ácido clorogênico sobre o efeito da BthTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O ácido clorogênico não apresentou a mesma eficácia contra o efeito paralisante da BthTX-I, em comparação aos dois inibidores anteriores. Na proporção 1:10 (peso/peso) entre toxina e composto vegetal, o produto de pré-incubação de ambos promoveu paralisia parcial das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Deste modo, a proteção conferida pelo ácido clorogênico ao efeito paralisante da BthTX-I foi de 40%.

O ácido clorogênico, administrado isoladamente na concentração de 137,25 µg/mL, não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle. Os dados referentes aos ensaios realizados com este inibidor estão representados a seguir (Fig. 20).

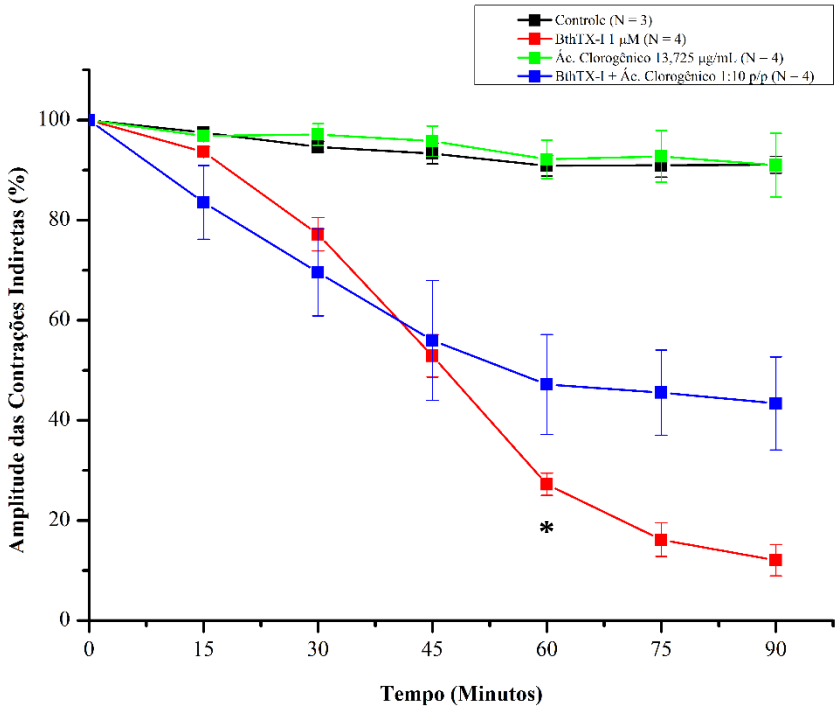

Fig. 20 – Efeito da BthTX-I, do ácido clorogênico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados em média ± EPM. * Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos BthTX-I e BthTX-I pré-incubada com ácido clorogênico ($P < 0,05$).

5. Estudo morfológico

Nesta etapa, as preparações neuromusculares avaliadas pelos ensaios miográficos foram submetidos às avaliações morfológicas por microscopia óptica, onde foi possível demonstrar o aspecto geral das fibras musculares em cada tratamento realizado, bem como quantificar as lesões ou a proteção determinada pelos mesmos.

5.1. Morfologia ótica das preparações neuromusculares após os tratamentos realizados no estudo miográfico

As figuras 21, 22 e 23 expõem imagens dos músculos diafragma de camundongos obtidas por microscopia óptica. Observa-se que o grupo Controle (Fig. 21-A, 22-A e 23-A), os grupos dos tratamentos com os compostos vegetais (Fig. 21-C, 22-C e 23-C), bem como dos tratamentos com os produtos da pré-incubação entre a BthTX-I com o ácido chicórico (Fig. 21-D) e o ácido caftárico (Fig. 22-D) apresentaram a maioria das fibras com aspecto normal (fibras poligonais), sarcoplasma acidófilo e núcleo periférico. O grupo BthTX-I (Fig. 21-B, 22-B e 23-B) apresentou danos musculares, apresentando alterações como fibras arredondadas, edema entre as fibras, áreas do sarcoplasma desprovidas de miofibrilas e núcleo central. O grupo do tratamento com o produto da pré-incubação entre a toxina e o ácido clorogênico (Fig. 23-D) apresentou algumas características do grupo tratado isoladamente com a toxina, porém, de forma moderada.

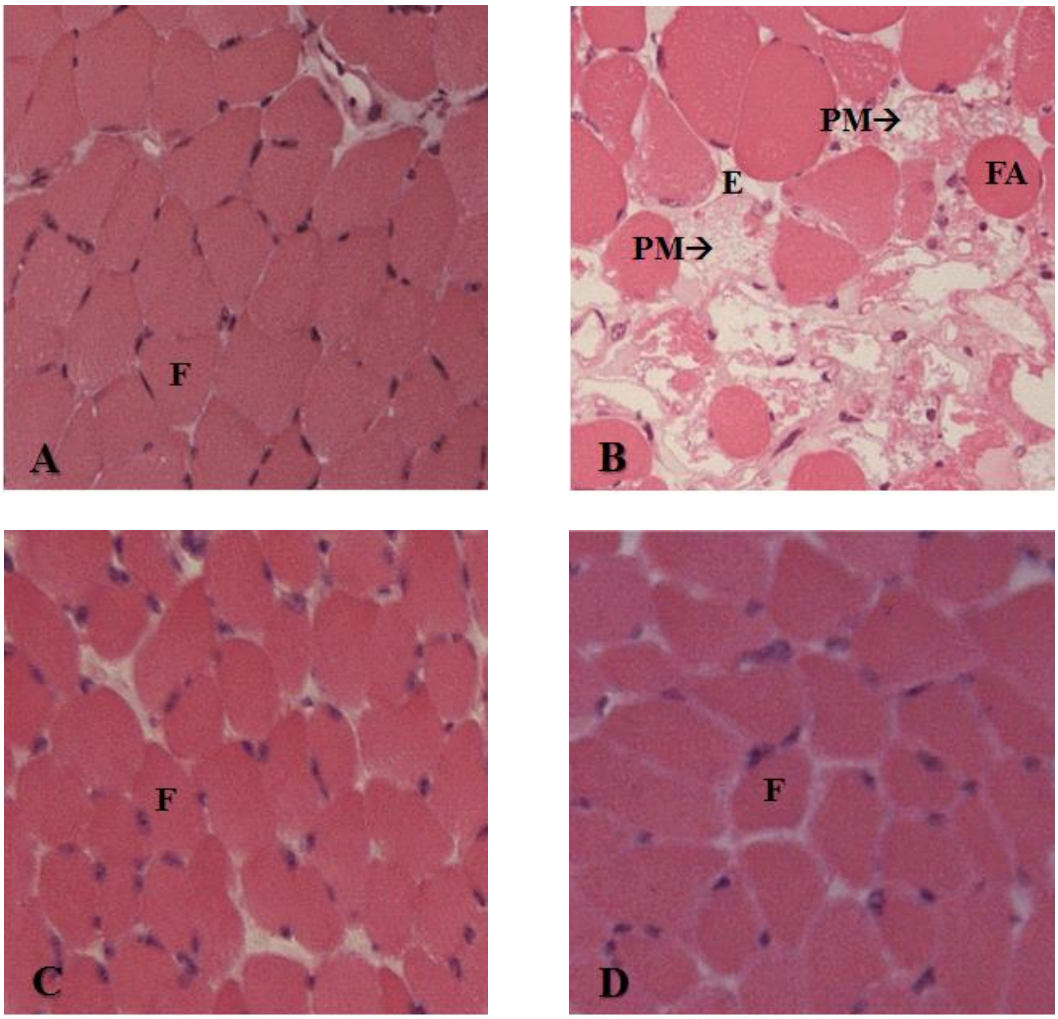

Fig. 21 – Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Grupos: Controle (A), BthTX-I (B), Ác. Chicórico 13,725 µg/mL (C) e BthTX-I + Ác. Chicórico 1:10 p/p (D). Marcações: Fibras poligonais (F), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (E). Escala: 1 cm = 10 µm.

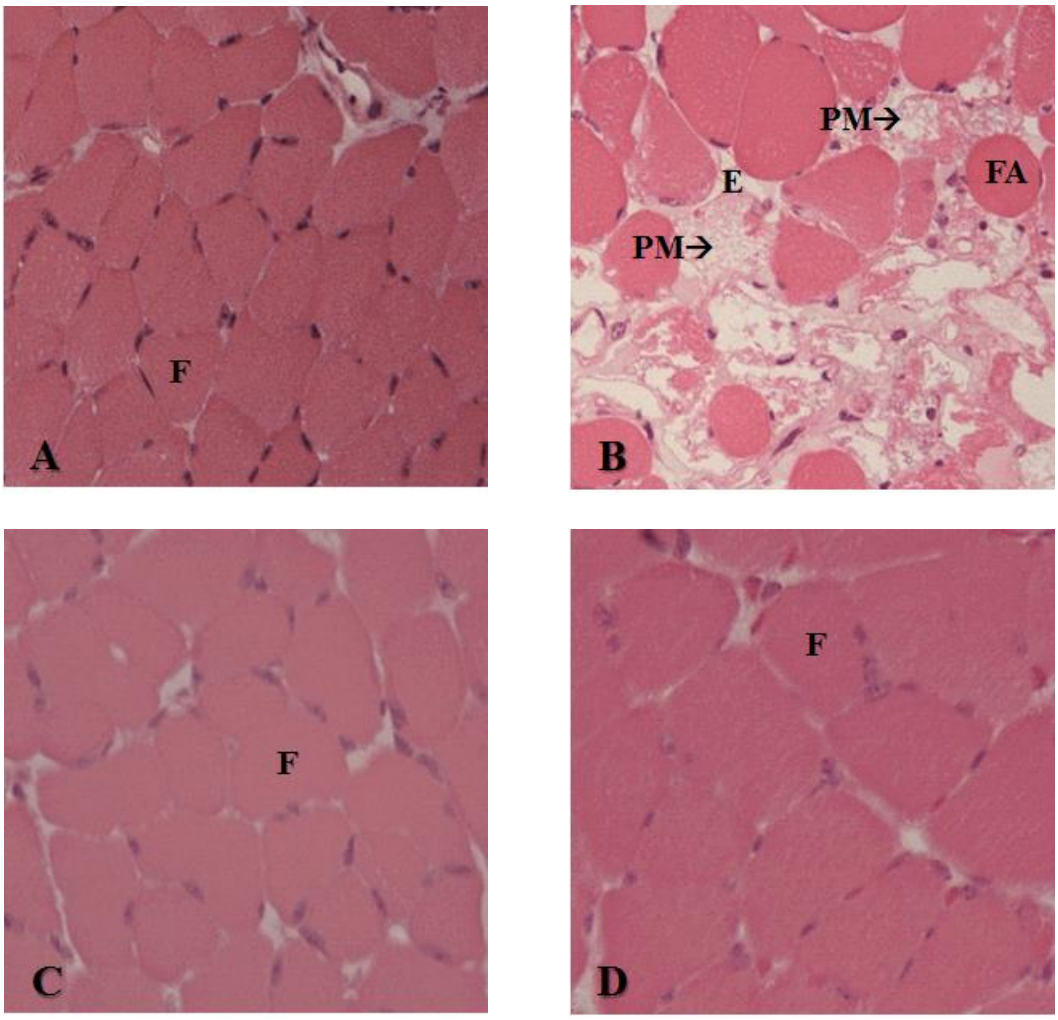

Fig. 22 – Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Grupos: Controle (A), BthTX-I (B), Ác. Caftárico 13,725 µg/mL (C) e BthTX-I + Ác. Caftárico 1:10 p/p (D). Marcações: Fibras poligonais (F), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (E). Escala: 1 cm = 10 µm.

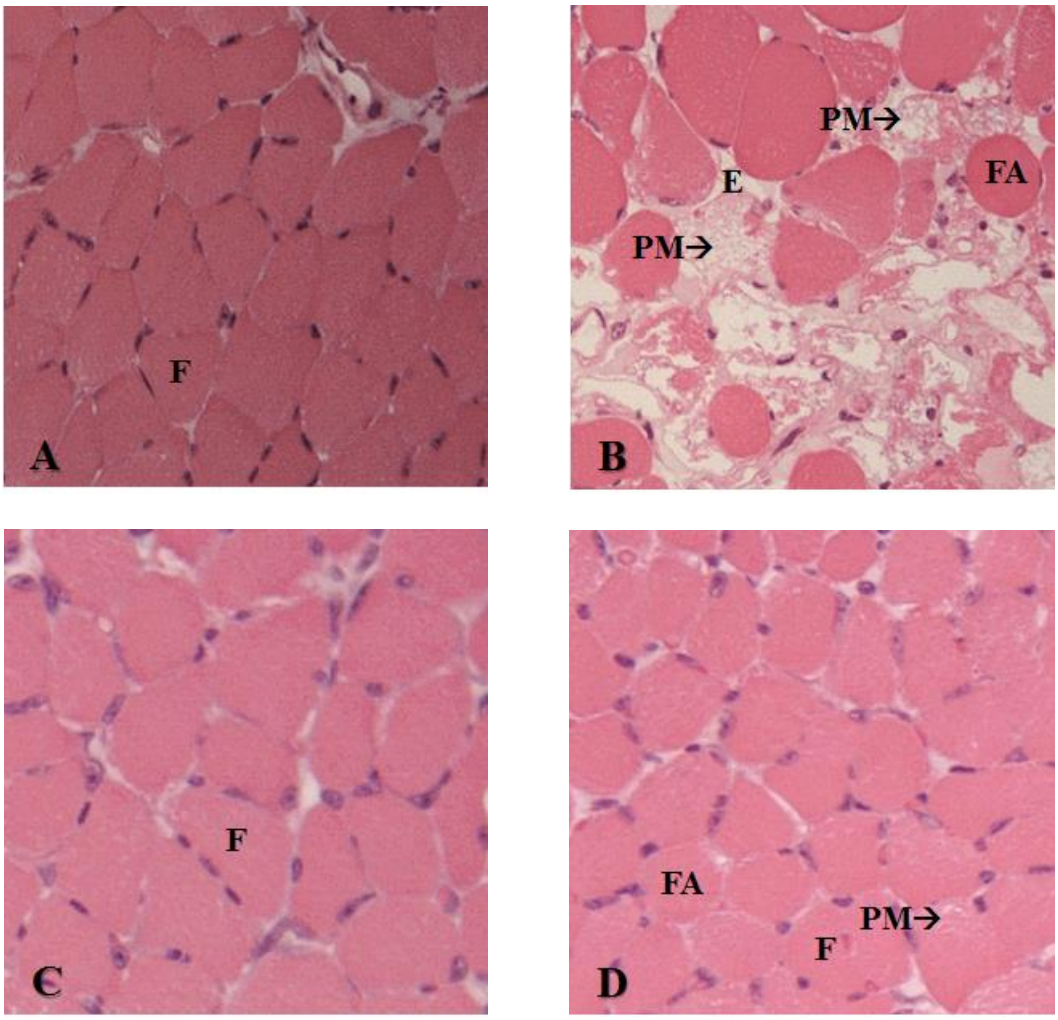

Fig. 23 – Microscopia ótica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Grupos: Controle (A), BthTX-I (B), Ác. Clorogênico 13,725 µg/mL (C) e BthTX-I + Ác. Clorogênico 1:10 p/p (D). Marcações: Fibras poligonais (F), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (ED). Escala: 1 cm = 10 µm.

5.2. Índice de lesão muscular promovido pelos tratamentos realizados no estudo miográfico

As figuras 24, 25 e 26 apresentam o índice de lesão muscular (ILM), calculado a partir das imagens obtidas por microscopia óptica. Nessas imagens, podemos observar que o grupo BthTX-I (1 µM) apresentou índice de lesão muscular significativamente maior em relação ao grupo Controle e aos grupos dos compostos vegetais administrados isoladamente ($P < 0,001$).

Na figura 24, foi observado que os grupos Controle e Ácido Chicórico (137,25 µg/mL) apresentaram baixo índice de lesão muscular (5,4% e 7,5%, respectivamente), não havendo diferença significativa entre ambos. A pré-incubação com o ácido chicórico (1:10, p/p) (ILM = 7,9%) reduziu de forma significativa a miotoxicidade da BthTX-I. Desse modo, a proteção conferida pelo ácido chicórico ao efeito miotóxico da BthTX-I foi de 99,2%.

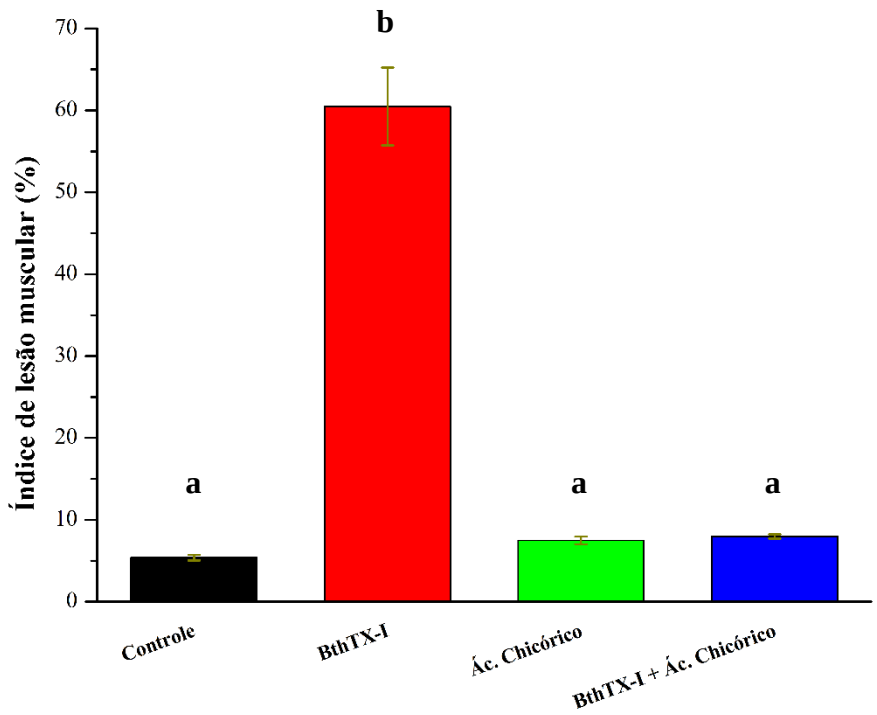

Fig. 24 – Efeito do ácido chicórico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I. Dados apresentados em média ± EPM. Diferentes letras correspondem às diferenças significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$).

Observa-se na figura 25 que o grupo Ácido Caftárico (137,25 µg/mL) apresentou baixo índice de lesão muscular (7,3%), o qual não foi significativo em relação ao do grupo Controle. O produto de incubação entre a BthTX-I e tal composto (1:10, p/p) (ILM = 9,9%) reduziu de forma significativa o índice de lesão muscular em relação ao índice observado para o grupo BthTX-I (1 µM). Desse modo, o ácido caftárico promoveu proteção de 95,1% ao efeito miotóxico da toxina.

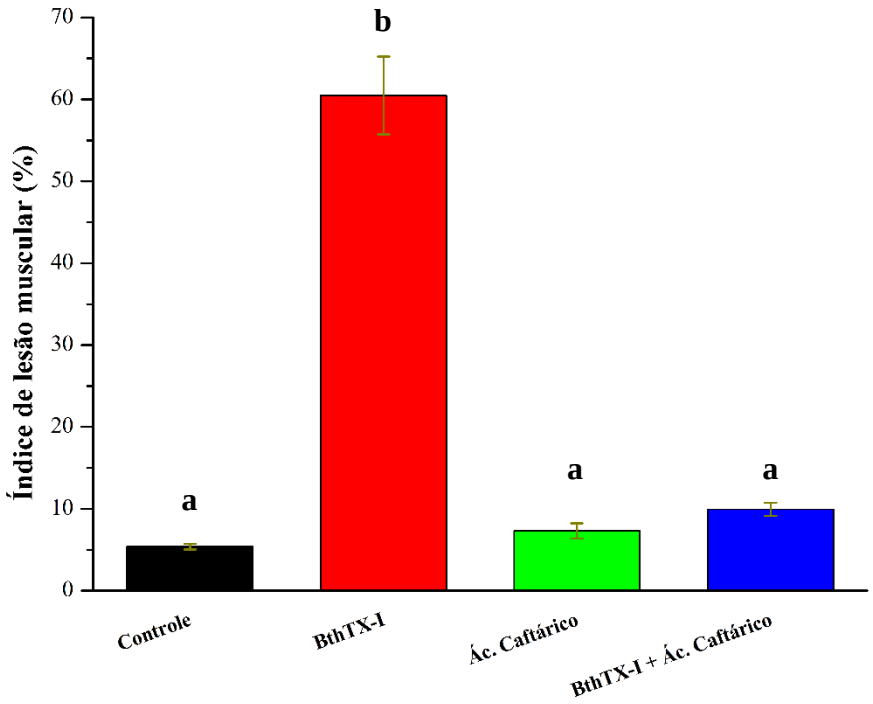

Fig. 25 – Efeito do ácido caftárico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I. Dados apresentados em média ± EPM. Diferentes letras correspondem às diferenças significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$).

Como ilustrado na figura 26, a pré-incubação com ácido clorogênico (1:10, p/p) (ILM = 23,2%) reduziu significativamente o dano muscular promovido pela BthTX-I e, isoladamente, o grupo Ácido Clorogênico (137,25 µg/mL) não apresentou índice de lesão muscular (7,6%) significativo em relação ao do grupo Controle. Deste modo, o composto vegetal protegeu em 70,6% o efeito miotóxico da toxina.

No entanto, a pré-incubação da toxina com o ácido clorogênico (1:10, p/p) também apresentou diferença significativa com o tratamento com este composto isoladamente, caracterizando a proteção observada como parcial.

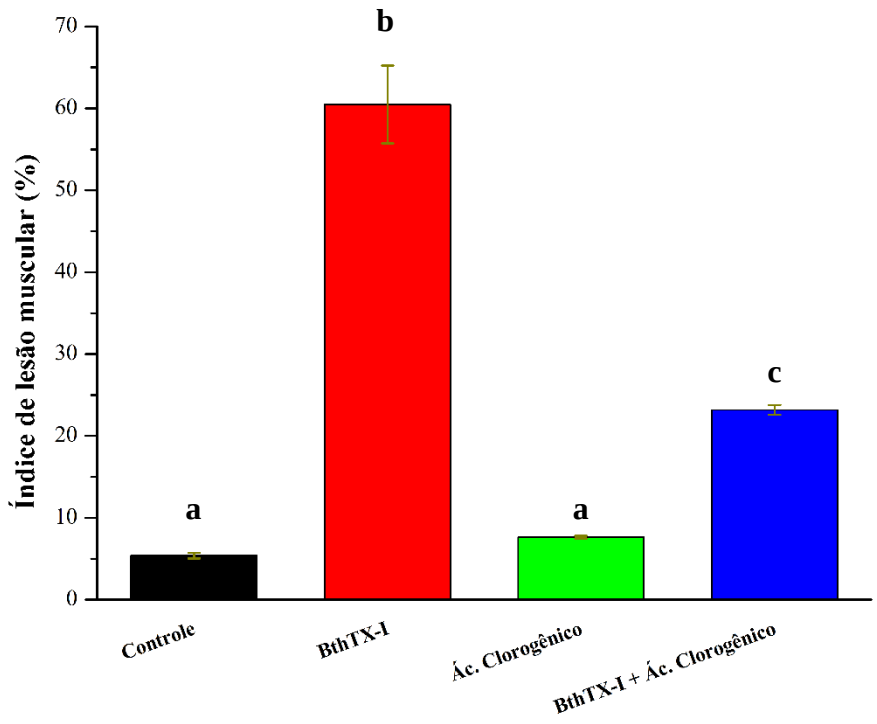

Fig. 26 – Efeito do ácido clorogênico sobre o índice de lesão muscular induzido pela BthTX-I. Dados apresentados em média ± EPM. Diferentes letras correspondem às diferenças significativa entre os tratamentos ($P < 0,01$).

6. Estudo calorimétrico

Nesta etapa, devido aos resultados obtidos com a cristalização da BthTX-I e os compostos vegetais e com a observação da atividade biológica em preparação neuromuscular de camundongo, foi continuada a utilização da toxina obtida pelo protocolo desenvolvido no estudo (fração EM_{VI}-FR_{I}, Fig. 8).

Além disso, os testes de calorimetria não sofreram restrições de solubilização dos compostos vegetais, permitindo a avaliação de interação em solução da BthTX-I e tais compostos em condições em que não se observaram precipitação das espécies.

6.1. Interação entre ácido chicórico e BthTX-I

Após a realização de algumas titulações a fim de otimizar as condições experimentais, foi verificada interação entre o ácido chicórico e a BthTX-I, conforme representado no termograma abaixo (Fig. 27).

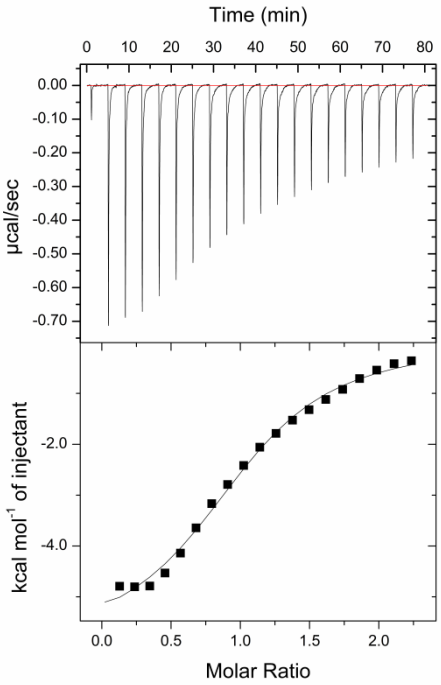

Fig. 27 – Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 µM) e ácido chicórico (400 µM, em 5% de piridina e 5% de etanol) realizada a 20 °C. (Parte superior) Dados brutos da titulação. (Parte inferior) Isoterma da titulação obtido pela integração da área dos picos (calor total liberado na adição de cada injeção do titulante) normalizado pela concentração do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar da espécie titulante pela titulada (eixo das abcissas), corrigida pelos calores de diluição do titulante.

Para a obtenção das constantes termodinâmicas que governam a reação de interação entre toxina e composto vegetal, foi subtraído o calor de diluição e agitação do ácido chicórico através de uma linha de base concentração-dependente (de Barros et al., 2016). A estequiometria da reação obtida inicialmente apresentou valor não inteiro para a espécie titulante (1,458), possivelmente devido a erros na determinação da concentração de uma ou ambas espécies (titulante e titulado). Como a determinação da concentração da proteína foi realizada por método espectrofotométrico, esta foi assumida como a concentração fidedigna, ajustando-se a concentração do titulante visando garantir a estequiometria de 1:1, como observado na unidade assimétrica da estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/CA. Tal

ajuste se faz necessário em alguns casos para melhor determinação das demais constantes termodinâmicas e cinética da reação, uma vez que passam a ser determinados apenas dois parâmetros (K_D e ΔH) e não três (n, K_D e ΔH) a partir dos dados experimentais (Hansen et al., 2011). Deste modo, foi considerada a interação entre um dímero de BthTX-I e uma molécula do ácido chicórico, a qual apresentou constante de dissociação (K_D) de 8,19 ± 0,91 µM, característica de interação de média afinidade. A reação é entalpicamente favorável, pois apresentou perfil exotérmico (ΔH = -5,93 ± 0,18 kcal/mol) e é entropicamente impulsionada (-T.ΔS = -0,90 kcal/mol).

6.2. Interação entre ácido caftárico e BthTX-I

Após experimentos de otimização da isoterma de interação entre o ácido caftárico e a BthTX-I (Fig. 28), foi possível determinar apenas a variação de entalpia da reação, de aproximadamente -1,5 kcal/mol. Os demais parâmetros cinéticos (K_D), estequiométrico (n) e mesmo a variação de entalpia para o processo não foi determinada com margem de erro, pois não foi possível ajustar os dados com confiabilidade à isoterma de interação. Apesar disso, não se deve descartar a interação entre ambas as espécies. Um dos fatores que pode ter influenciado a ausência de interação nas titulações é a baixa solubilidade do titulante em soluções aquosas com baixa porcentagem de solvente orgânico. Deste modo, novos ensaios devem ser realizados utilizando-se diferentes solventes orgânicos que permitam a solubilidade do titulante, sem interferir na estabilidade da toxina.

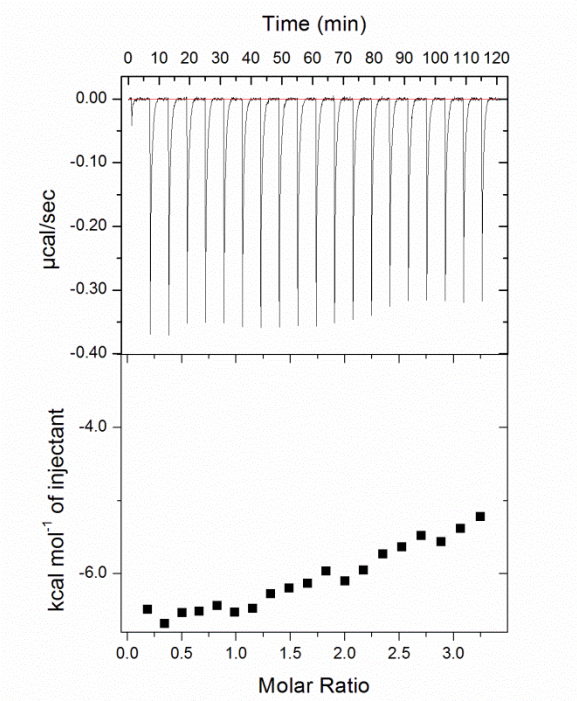

Fig. 28 – Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 µM) e ácido caftárico (800 µM, em agua deionizada) realizada a 20 °C. (Parte superior) Dados brutos da titulação. (Parte inferior) Isoterma da titulação obtido pela integração da área dos picos (calor total liberado na adição de cada injeção do titulante) normalizado pela concentração do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar da espécie titulante pela titulada (eixo das abcissas), corrigida pelos calores de diluição do titulante.

6.3. Interação entre ácido clorogênico e BthTX-I

De modo similar à titulação da BthTX-I com o ácido caftárico, a titulação dessa toxina com o ácido clorogênico também apresentou dificuldades à otimização experimental (Fig. 29). Esse fato pode estar também relacionado à solubilidade do titulante em meios aquosos com baixa concentração de solvente orgânico.

Na melhor isoterma obtida nas titulações realizadas não foi possível ajustar os dados cinéticos e termodinâmicos. Entretanto, não pode ser descartada a interação entre as espécies, pois a curva obtida pode ser representada como um sistema de baixa afinidade. Deste modo, é necessário elevar a concentração da proteína e do composto vegetal, visando a obtenção de um padrão sigmoide da curva e maiores valores de energia liberada em cada injeção, possibilitando melhor definição dos picos. Contudo, há o desafio de elevar a concentração do composto vegetal em concentrações de solvente orgânico que não interfiram na estabilidade da proteína e no sinal obtido nas titulações.

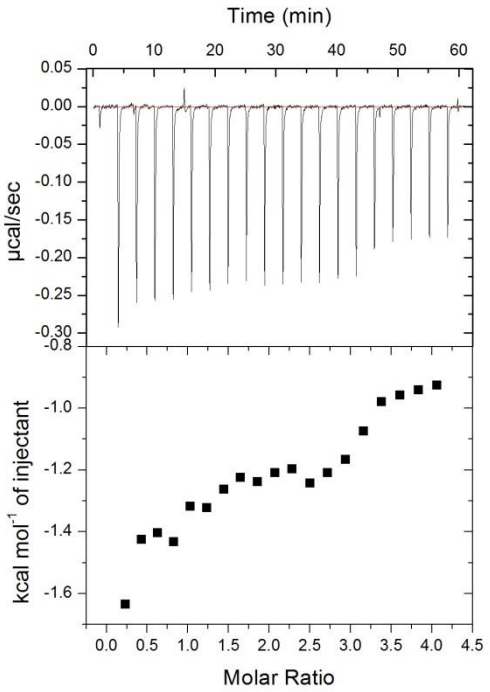

Fig. 29 – Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre BthTX-I (50 µM) e ácido clorogênico (1000 µM, 1% etanol) realizada a 25 °C. (Parte superior) Dados brutos da titulação. (Parte inferior) Isoterma da titulação obtido pela integração da área dos picos (calor total liberado na adição de cada injeção do titulante) normalizado pela concentração do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar da espécie titulante pela titulada (eixo das abcissas), corrigida pelos calores de diluição do titulante.

6.4. Interação entre ácido *trans*-ferúlico, *p*-cumárico e *trans*-cinâmico e BthTX-I

A titulação dos cinamatos não-esterificados do presente estudo junto à BthTX-I, todos solubilizados em seus melhores meios testados, não permitiram a determinação das constantes termodinâmicas de interação. Ademais, as isotermas apresentadas referem-se às titulações em que as espécies titulada (BthTX-I) e titulante (ácido *trans*-ferúlico, *p*-cumárico e *trans*-cinâmico) não apresentam interação (Fig. 30).

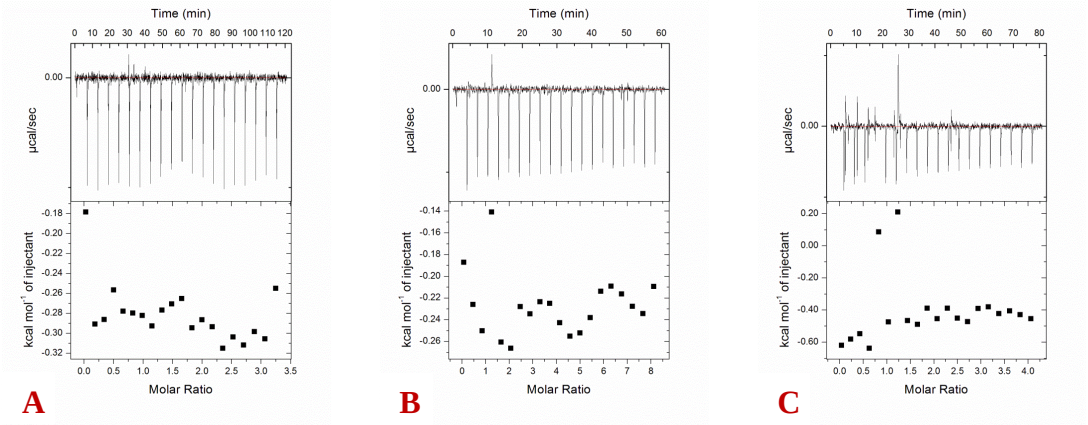

Fig. 30 – Dados do experimento de calorimetria de titulação isotérmica entre (A) BthTX-I (50 µM) e ácido *trans*-ferúlico (800 µM, em 5% de piridina e 5% de etanol) realizada a 20 °C, (B) BthTX-I (20 µM) e ácido *p*-cumárico (800 µM, em 5% de piridina) realizada a 10 °C e (C) BthTX-I (20 µM) e ácido *trans*-cinâmico (400 µM, em 5% de piridina) realizada a 25 °C. (Parte superior) Dados brutos da titulação. (Parte inferior) Isoterma da titulação obtido pela integração da área dos picos (calor total liberado na adição de cada injeção do titulante) normalizado pela concentração do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar da espécie titulante pela titulada (eixo das abcissas), corrigida pelos calores de diluição do titulante.

Discussão

1. Elementos estruturais e funcionais das fosfolipases A_2 homólogas envolvidos na desestabilização de membranas biológicas

As fosfolipases A_2 homólogas dos venenos de serpentes são capazes de proporcionar diversos efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* (para maior aprofundamento, Lomonte et al., 2003). Neste contexto, foi sugerido pelas evidências experimentais disponíveis que estes efeitos estão relacionados com sua capacidade de interação com membranas biológicas, assim como sua competência em desestabilizá-las (Lomonte et al., 2003). Do mesmo modo, pelos dados experimentais reportados ao longo dos anos, correlacionou-se os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* das fosfolipases A_2 homólogas como decorrência da desestabilização da membrana plasmática da musculatura esquelética (Gallacci e Cavalcante, 2010).

Algumas proposições foram realizadas acerca do envolvimento de receptores de membrana para ação direta das fosfolipases A_2 homólogas (Yamazaki et al., 2005; Fujisawa et al., 2008; Cintra-Franscischinelli et al., 2009). Contudo, a maioria das hipóteses foram baseadas na interação eletrostática entre essas proteínas miotóxicas e o sarcolema (Lomonte et al., 1994; Lomonte et al., 2003; da Silva-Giotto et al., 1998; Ambrosio et al., 2005; dos Santos et al., 2009B; Fernandes et al., 2013, 2014). Inicialmente, foi proposta a importância da região C-terminal na indução da lesão de membranas provocada por tais miotoxinas (Lomonte et al., 1994). Anos mais tarde, empregando a conformação convencional do dímero da BthTX-I, foi sugerido que a desestabilização do sarcolema era dada pelas alterações entre as formas "aberta" e "fechada" da toxina no momento de interação com o sarcolema, resultando em desarranjo da camada lipídica e perda de sua integridade (da Silva-Giotto et al., 1998). Tal proposta foi aprimorada, relacionando o mecanismo miotóxico das fosfolipases A_2 homólogas à fraca interação eletrostática dos resíduos positivamente carregados da região N- e C-terminal dessas proteínas com regiões negativamente carregadas da membrana (Lomonte et al., 2003). Em seguida, essa interação poderia ser reforçada pela contribuição dos resíduos aromáticos e hidrofóbicos da região C-terminal das toxinas (Lomonte et al., 2003). Após a revisão de Lomonte et al. (2003) acerca do tema, foi proposto um mecanismo de ativação das fosfolipases A_2 homólogas, o qual relaciona a retenção de ácidos graxos por essas toxinas a mudanças conformacionais na região C-terminal (Ambrosio et al., 2005). Deste modo, a interação do ácido graxo no sítio catalítico putativo dessas miotoxinas promoveriam a exposição de uma superfície hidrofóbica em direção à região C-terminal, sugerindo o envolvimento de ambas regiões no mecanismo de ação das miotoxinas não-catalíticas (Ambrosio et al., 2005).

Até o momento, as proposições descritas dos componentes estruturais envolvidos no mecanismo de ação das fosfolipases A_2 homólogas foram fundamentadas nas conformações monomérica e dimérica convencional de miotoxinas botrópicas. No entanto, uma conformação dimérica alternativa foi proposta após elucidação cristalográfica e análise do envelope proteico por espalhamento de raios X a baixo ângulo (Murakami et al., 2005, 2007; dos Santos et al., 2009B). Através desta conformação, foi proposto um novo mecanismo de ação não-catalítico ao analisar resíduos positivamente carregados da região N- e C-terminal de fosfolipases A_2 homólogas botrópicas em interação com íons sulfato (dos Santos et al., 2009B). Deste modo, ao sugerir que esses íons poderiam mimetizar a porção carregada negativamente dos fosfolipídios do sarcolema, os resíduos Lys20, Lys115 e Arg118 poderiam constituir um "sítio miotóxico" das proteínas fosfolipases A_2 homólogas botrópicas. Posteriormente, foi indicado que tais resíduos básicos eram responsáveis pela interação com o grupo fosfatidil da camada lipídica da membrana plasmática (Fernandes et al., 2013). Tais resíduos foram relacionados a outros resíduos catiônicos expostos (Lys80, Lys122 e Lys127) e denominados como "sítio catiônico de ancoragem/acoplamento à membrana" (MDoS) (Fernandes et al., 2013). Neste estudo, com a presença de uma molécula hidrofóbica no canal de mesma denominação, observou-se uma alteração na conformação das miotoxinas, a qual promoveu o alinhamento dos resíduos do MDoS do dímero, provavelmente resultando na melhor interação ao sarcolema. Os autores ainda evidenciaram dois resíduos hidrofóbicos (Leu121 e Phe125) conservados em 98% das fosfolipases A_2 homólogas botrópicas, expostos ao solvente e alinhados após a interação de uma molécula no canal hidrofóbico. Devido aos indicadores de hidrofobicidade e permeabilidade desses resíduos, foi proposto que ambos estariam envolvidos no desarranjo da membrana, sendo denominados como "sítio hidrofóbico de desestabilização/rompimento à membrana" (MDiS) (Fernandes et al., 2013, 2014).

Deste modo, adotando o dímero alternativo como a conformação ativa farmacologicamente, o mecanismo da ação desestabilizadora de membranas proposto recentemente para as fosfolipases A_2 botrópicas (dos Santos et al., 2009B; Fernandes et al., 2013, 2014) (Fig. 31) inicia-se com a ativação das mesmas pela interação de uma molécula de ácido graxo no canal hidrofóbico, promovendo a reorientação de um monômero. Tal alteração conformacional resulta na transição do estado "inativo" ao "ativo" da toxina, expondo ao solvente os resíduos das regiões MDoS e MDiS, assim como alinhando tais sítios no mesmo plano. Através dos resíduos catiônicos (MDoS), a toxina promove interação com o grupamento

fosfatidil dos fosfolipídios da membrana. Por fim, por meio dos resíduos hidrofóbicos (MDiS), a proteína se insere na matriz lipídica, promovendo seu desarranjo estrutural.

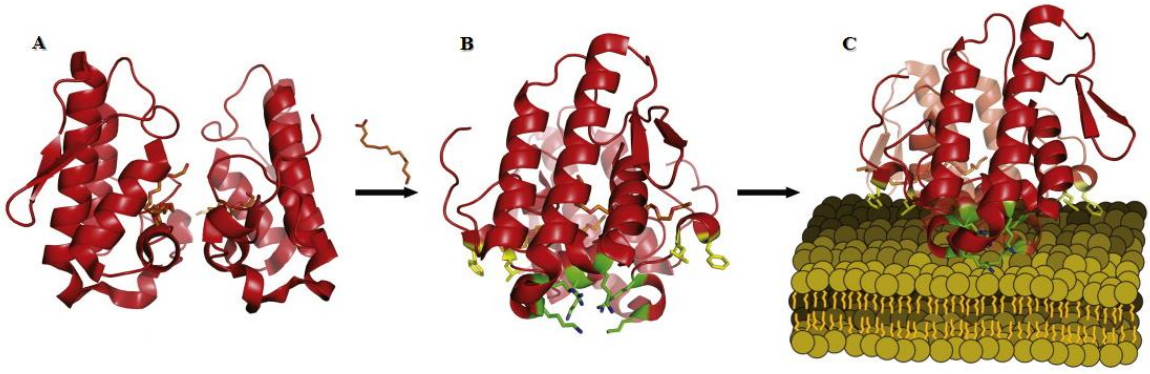

Fig. 31 – Etapas estruturais das fosfolipases A_2 homólogas botrópicas envolvidas na desestabilização de membranas. (A) Toxina em estado "inativo". (B) Ativação "alostérica" pela interação com o ácido graxo no canal hidrofóbico, expondo e alinhando os resíduos do MDoS (em verde) e MDIS (em amarelo). (C) Interação com a membrana através dos resíduos do MDoS e inserção na matriz lipídica realizado pelos resíduos MDIS. Adaptado de Fernandes et al., 2014.

O desarranjo da membrana celular resulta, inicialmente, na perda da regulação da permeabilidade a íons e macromoléculas (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). Desse modo, ocorre despolarização celular, provavelmente, em virtude do reequilíbrio dos íons Na^+, K^+ e Cl^- (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Montecucco et al., 2008; Gallacci e Cavalcante, 2010). A perturbação da membrana promove também o influxo de Ca^{2+} extracelular para o interior da fibra muscular (Gutiérrez e Ownby, 2003; Villalobos et al., 2007), bem como a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (Johnson e Ownby, 1994). Assim, o aumento da concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático gera uma série de eventos, tais como contratura muscular (Rodrigues-Simioni et al., 1983), hipercontração de miofilamentos, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de Ca^{2+} (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999), que ampliam o processo de lesão muscular (Gutiérrez e Ownby, 2003; Montecucco et al., 2008). Por fim, a ATP liberada pelo sarcolema lesado difunde-se para locais distantes da lesão inicial e ativa receptores purinérgicos P_{2X} na fibra muscular, aumentando a condutância para os íons K^+, Na^+ e Ca^{2+} (Burnstock, 2007; Di Virgilio, 2007; Abbracchio et al., 2009; Cintra-Francischinelli et al., 2010). O fluxo destes íons causa despolarização e amplifica o processo de lesão muscular em regiões afastadas do ponto de interação da toxina com o sarcolema.

Conforme já afirmado, a análise dos dados disponíveis na literatura levou à hipótese de que a desestabilização de membrana também desempenharia ação crucial no estabelecimento da paralisia muscular *in vitro* promovido pelas fosfolipases A_2 homólogas dos venenos ofídicos (Gallacci e Cavalcante, 2010). No entanto, é essencial ressaltar que o processo de transmissão neuromuscular envolve uma série de eventos elétrico-químicos que resultam na contração muscular. Como detalhado no trabalho de revisão citado (Gallacci e Cavalcante, 2010), a despolarização da terminação nervosa motora, pelo potencial de ação, promove a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e o influxo deste íon para seu meio intracelular. A concentração elevada deste íon no citoplasma procede a liberação exocitótica de acetilcolina. Esse neurotransmissor se difunde pela fenda sináptica (entre a terminação nervosa e a fibra muscular), interagindo com receptores nicotínicos presentes na região da placa motora da fibra muscular. Assim, é gerada uma despolarização desta região, denominada potencial de placa terminal. Este potencial se difunde para regiões adjacentes à placa motora. A ativação de canais de Na^+ voltagem-dependentes nestas regiões deflagra o potencial de ação muscular, liberando íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e, assim, inicia o processo de contração muscular.

Levando isso em consideração, a ampliação do processo das lesões em regiões distantes auxilia no estabelecimento da paralisia muscular pela disfunção das fibras afetadas, porém outros fatores podem influenciar no bloqueio neuromuscular *in vitro* exercido pela toxina. Assim, foi proposto que a entrada de íons Na^+ em direção ao meio intracelular provocaria a despolarização persistente da fibra muscular e, consequentemente, a inativação dos canais de Na^+ voltagem-dependentes (Gallacci e Cavalcante, 2010). Portanto, seriam criadas áreas de inexcitabilidade no sarcolema, tornando-o incapaz de gerar e propagar os potenciais de ação necessários à contração da fibra muscular (Gallacci e Cavalcante, 2010). Ainda, o efluxo de íons K^+ oriundos da fibra lesada poderia promover a despolarização parcial da terminação nervosa motora e, assim, reduzir a liberação de acetilcolina, uma vez que os potenciais de ação então gerados apresentam menor magnitude (Bowman e Rand, 1980; Gallacci e Cavalcante, 2010; Correia de Sá et al., 2013). Esse decréscimo na liberação no neurotransmissor também poderia ocorrer pelo excesso de ATP liberada das fibras lesadas (Correia de Sá et al., 2013), por ação direta (Giniatullin e Sokolova, 1998; Salgado et al., 2000) e indireta (Ribeiro e Walker, 1975; Correia de Sá et al., 1996; Silinsky et al., 1999; Noronha Matos et al., 2011) sobre os receptores purinérgicos P_2 e P_1, respectivamente. Em suma, a atividade das fosfolipases A_2 sobre a terminação nervosa e fibras musculares devem reduzir a margem de segurança da

transmissão neuromuscular e, consequentemente, contribui para o desenvolvimento da paralisia muscular *in vitro* (Fig. 32).

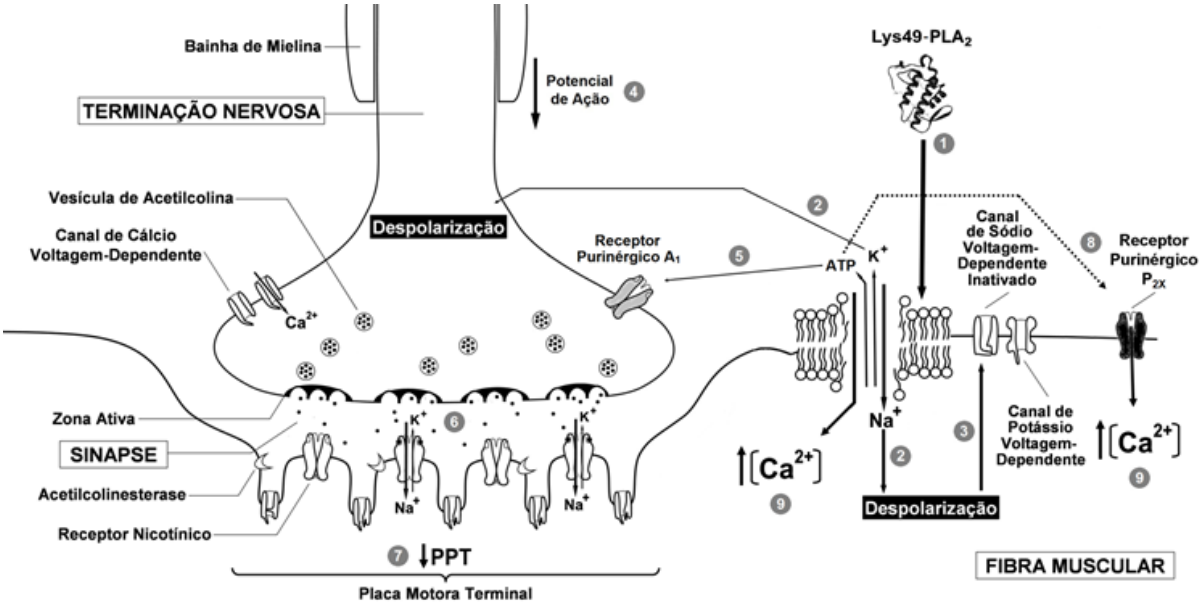

Fig. 32 – Transmissão neuromuscular na vigência das fosfolipases A_2 homólogas. (1) Desestabilização estrutural do sarcolema pela toxina. (2) Colapso dos gradientes iônicos e despolarização do sarcolema e da terminação nervosa, devido ao re-equilíbrio dos gradientes de Na^+ e K^+. (3) Inativação dos canais de Na^+ voltagem-dependentes e criação de áreas de inexcitabilidade elétrica. (4) Incidência do impulso nervoso na terminação despolarizada. (5) ATP liberada da fibra interage com os receptores purinérgicos inibitórios. (6) Diminuição da liberação de acetilcolina. (7) Diminuição do potencial de placa (PPT). (8) ATP liberado da fibra interage com receptores P_{2X}. (9) Aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} pelo evento 8 e pelo influxo desse íon pelo sarcolema lesado, com consequente ampliação da lesão muscular. Adaptado de Gallacci e Cavalcante, 2010.

Uma vez abordado os possíveis determinantes estruturais das atividades farmacológicas expostas até então, buscou-se aprimorar o conhecimento acerca do tema. Com este intuito, a relação entre os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* das fosfolipases A_2 homólogas foi avaliada pela interação da BthTX-I (um exemplar das fosfolipases A_2 homólogas de veneno ofídico) e derivados do ácido cinâmico (possíveis neutralizadores destas proteínas de origem vegetal). No entanto, anteriormente aos estudos de interação entre toxina e compostos vegetais, foram realizados o isolamento da toxina de seu veneno bruto e breves estudos acerca de seu comportamento em solução e atividade nos sítios farmacológicos de interesse.

2. Isolamento/purificação da BthTX-I a partir do veneno bruto

As fosfolipases A_2 (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). Assim, é imprescindível possuir o conhecimento da identidade da proteína, bem como de suas possíveis variações e contaminações, antes da realização dos ensaios para avaliação da relação estrutura/atividade da toxina-alvo.

A proteína-alvo do presente estudo, a BthTX-I, foi isolada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* pela primeira vez por Homsi-Brandeburgo et al. (1988), em um estudo em que foi avaliado o potencial miotóxico desta toxina e desvendada a identidade dos resíduos iniciais de sua região N-terminal. A identidade completa desta toxina foi divulgada anos mais tarde por Cintra et al. (1993), corroborando a presença da mutação natural Asp49Lys e os efeitos miotóxicos promovidos por um mecanismo não-catalítico.

A partir dos estudos primordiais com a BthTX-I, surgiram diversos outros trabalhos com esta toxina, avaliando outras propriedades farmacológicas (Heluany et al., 1992; Landucci et al., 1998; Gebrim et al., 2009; Correia de Sá et al., 2013; Ayres et al., 2015). A obtenção da BthTX-I para estes estudos seguiu o método de isolamento de Homsi-Brandeburgo et al. (1988), com sutis modificações técnicas empregadas no isolamento desta e outras proteínas fosfolipases A_2 homólogas (Cintra et al., 1993; Spencer et al., 1998; Andrião-Escarso et al., 2000; Bonfim et al., 2001; Barbosa et al., 2005). Esses métodos foram reproduzidos neste estudo, porém o grau de pureza alcançado através destes protocolos foi aquém do esperado, uma vez que o teste de pureza por cromatografia de fase reversa apresentou uma fração predominante acompanhada, em menor expressão, de pelos menos quatro entidades desconhecidas (Fig. 7). Deste modo, a utilização destes métodos de purificação foi questionada no presente estudo, uma vez que tais entidades contaminantes poderiam influenciar nos ensaios realizados ainda que presentes em menor concentração (Mora-Obando et al., 2014).

Nos trabalhos de purificação do veneno da *B. jararacussu* está amplamente difundido a utilização, em cromatografia de troca iônica, de fase móvel com valores de pH (7,8-8,0) relativamente próximos ao ponto isoelétrico (pI) da proteína a ser purificada (8,2, para BthTX-I) (Homsi-Brandeburgo et al., 1988). Isto, possivelmente, pode influenciar na separação da BthTX-I de outros componentes do veneno. Os contaminantes obtidos no presente estudo poderiam ser isoformas da BthTX-I, apesar de não haver relatos para mais de uma isoforma desta toxina (dos Santos et al., 2008), como podemos observar para a BthTX-II (Ponce-Soto et al., 2006) ou, em maior frequência, para a CB encontrada em espécies de serpentes do gênero

Crotalus (Faure et al., 1994; Marchi-Salvador et al., 2008; Pereañez et al., 2009). Além disso, concluiu-se que havia etapas em demasia para o isolamento e conferição de pureza (Fig. 4-7 e 9-11), bem como a necessidade de outras etapas para purificação de diferentes miotoxinas da mesma amostra de veneno bruto. Deste modo, os métodos de purificação de fosfolipases A_2 foram otimizados às necessidades de um grau maior de pureza, diminuição de etapas e isolamento de um número maior de toxinas. Com o protocolo desenvolvido no presente estudo, a BthTX-I e outras toxinas de mesmo tamanho molecular foram isoladas do restante do veneno bruto e seus respectivos níveis de pureza foram avaliados junto ao processo de separação.

3. Comportamento da BthTX-I em solução e em preparações frênico-diafragma de camundongo

Diversas fosfolipases A_2 homólogas foram observadas em dímeros em solução através de técnicas eletroforéticas e espectroscópicas (Arni et al., 1995; da Silva-Giotto et al., 1998; Murakami et al., 2007). Contudo, em algumas situações essas proteínas comportam-se de modo diferente em solução, apresentando outras conformações oligoméricas (Salvador et al., 2013). No que diz respeito à BthTX-I, seu comportamento oligomérico foi previamente avaliado na conformação dimérica pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Murakami et al., 2007), corroborando os dados cristalográficos para a mesma toxina (Fernandes et al., 2010).

No presente estudo, para avaliar as melhores condições para solubilização da BthTX-I para os testes cristalográficos, estudou-se indiretamente o estado oligomérico desta toxina em solução por meio das técnicas de espalhamento de luz dinâmico. Assim, verificou-se que tal estado era alterado conforme o controle salino e do potencial hidrogeniônico (pH) do meio (Tab. 2-4). A BthTX-I exibiu comportamento dimérico próximo ao pH fisiológico (Tab. 3), confirmando os dados para esta toxina e outras proteínas fosfolipases A_2 homólogas (Arni et al., 1995; da Silva-Giotto et al., 1998; Murakami et al., 2007; Fernandes et al., 2010). Do mesmo modo, os resultados obtidos em meio ácido (Tab. 2) ratificaram os experimentos que demonstravam a possibilidade de dissociação dos dímeros por manipulação do pH do meio (de Oliveira et al., 2001).

Com a intenção de avaliar as etapas de purificação realizadas no presente estudo, pela aferição do tamanho molecular das proteínas isoladas em cada etapa cromatográfica, foi empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Nesse contexto, foi possível observar o comportamento e estabilidade da BthTX-I em diferentes soluções (desnaturantes, redutoras e não-redutoras) e condições (temperatura ambiente ou sob aquecimento). Deste modo, foi possível observar a manutenção dessa toxina em dímeros em tratamento não-redutor como revisado previamente (Arni et al., 1995; Murakami et al., 2007), bem como sua ampla estabilidade apesar de seu pré-tratamento sob aquecimento.

Em concordância aos estudos com fosfolipases A_2 homólogas de venenos de serpente (Cavalcante et al., 2007; dos Santos et al., 2011; Fernandes et al., 2015), observou-se no presente estudo que a BthTX-I induziu decréscimo (89,8%) da amplitude das contrações evocadas indiretamente em preparações frênico-diafragma de camundongo. Este efeito esteve acompanhado de lesões em cerca de 60,5% das fibras musculares. A ocorrência de ambos os efeitos em concomitância foi previamente descrita para esta e outras fosfolipases A_2 homólogas

(Cavalcante et al., 2007; dos Santos et al., 2011; Fernandes et al., 2015). Em adição, os experimentos miográficos e morfológicos foram realizados em pH fisiológico (ligeiramente alcalino, pH 7,4), evidenciando a relevância da conformação dimérica da BthTX-I para o desenvolvimento de suas atividades farmacológicas avaliadas.

4. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido chicórico

O ácido chicórico é um composto vegetal fenólico derivado do ácido caféico e ácido tartárico, isolado pela primeira vez a partir das folhas de *Cichorium intybus* (Scarpati e Oriente, 1958). Após sua descoberta, tal composto já foi encontrado em plantas de 13 ordens diferentes, em maior frequência em espécies da família *Asteraceae* (Lee e Scagel, 2013). Além disso, diversas propriedades foram relacionadas ao ácido chicórico, através de estudos contra obesidade (Xiao et al., 2013), diabetes (Tousch et al., 2008; Schlernitzauer et al., 2013), envelhecimento (Schlernitzauer et al., 2013), câncer (Tsai et al., 2012), infecções virais (King e Robinson Jr., 1998; Charvat et al., 2006; Queffélec et al., 2008; Zhang et al., 2014), estresse oxidativo e inflamação (Park et al., 2011; Jiang et al., 2014).

No presente estudo, foram realizados os primeiros testes do ácido chicórico frente aos efeitos tóxicos de um componente de veneno ofídico. De tal modo, este composto neutralizou completamente (100%) o bloqueio das contrações indiretas promovido pela BthTX-I, bem como inibiu 99,2% das lesões causadas pelo tratamento com esta toxina. Vale ressaltar que não foi verificada diferença significativa entre os grupos da interação toxina/inibidor e Controle em ambos os ensaios. Além disso, o composto vegetal administrado isoladamente não interferiu na resposta do tratamento, uma vez que não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle.

A partir dos resultados observados nos ensaios miográficos, buscou-se o entendimento sobre os mecanismos envolvidos na inibição da BthTX-I pelo ácido chicórico, por meio de estudos cristalográficos. Deste modo, foram coletados dados de difração de raios X de um monocristal do complexo BthTX-I/AC, cuja estrutura tridimensional resolvida mostra a toxina disposta na forma dimérica em interação com uma molécula do inibidor. Embora os trabalhos estruturais contemporâneos das fosfolipases A_2 ofídicas disponham suas estruturas diméricas em uma conformação alternativa (dos Santos et al., 2009B, 2011; Fernandes et al., 2010, 2013, 2015), a estrutura elucidada da BthTX-I/AC foi representada na conformação convencional (da Silva Giotto et al., 1998; Ward et al., 1998), da mesma forma que eram apresentadas nos estudos anteriores à proposta dos dímeros atuais (Fig. 33). No dímero alternativo, o ácido chicórico apresenta menos interações com a BthTX-I, resultando em regiões livres expostas ao solvente (Fig. 34). Enquanto isso, na conformação convencional, o inibidor apresenta um número maior de interações com a toxina, mantendo-se estável em comparação ao dímero alternativo.

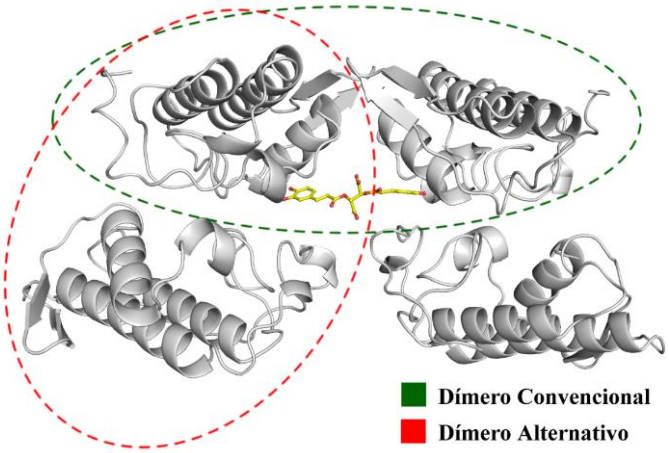

Fig. 33 – Representação tetramérica do complexo BthTX-I/AC. Em evidência, os dímeros convencional e alternativo.

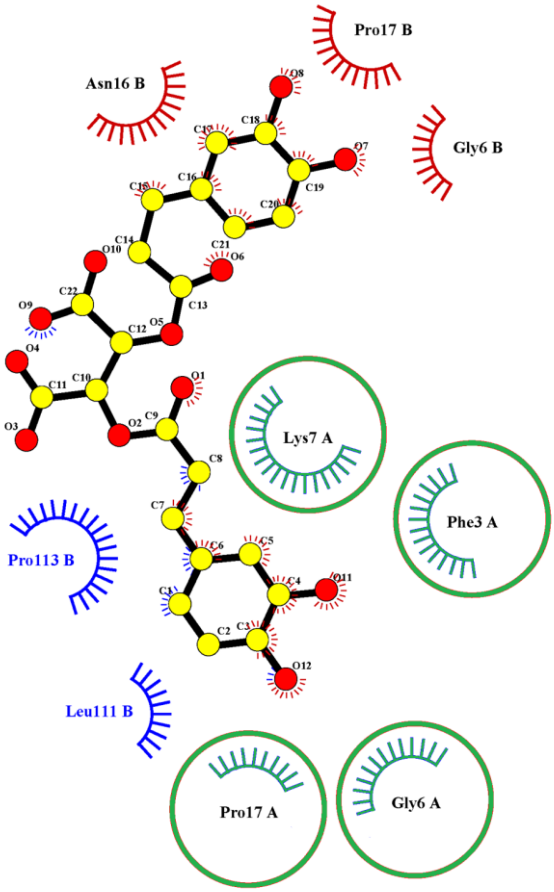

Fig. 34 - Interações entre o ácido chicórico e as duas conformações diméricas da BthTX-I. Os resíduos marcados em azul representam as interações do inibidor com o dímero alternativo. Os resíduos marcados em vermelho representam as interações do inibidor com o dímero convencional. Os resíduos evidenciados em verde representam as interações do inibidor com ambas as conformações diméricas. Desenvolvida no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995).

Existem evidências de que a BthTX-I em solução apresenta melhor ajuste de seu envelope proteico pela conformação alternativa (Murakami et al., 2007), bem como tal conformação apresentar maior área de interface e melhores valores de energia livre para as interfaces hidrofóbicas (dos Santos et al., 2009B; Fernandes et al., 2010, 2013). De acordo com as hipóteses recentemente propostas, as miotoxinas botrópicas devem se apresentar na conformação dimérica alternativa e em sua forma ativa para promover sua atividade desestabilizadora de membranas (dos Santos et al., 2009B; Gallacci e Cavalcante, 2010; Fernandes et al., 2014). Esta forma pode ser observada pela "ativação alostérica" da toxina ao interagir com alguma molécula em seu canal hidrofóbico, tal como ácidos graxos ou moléculas de polietileno glicol (Fernandes et al., 2014). Apesar de presente na condição de cristalização do complexo BthTX-I/AC, não foram encontradas moléculas de PEG 4000 interagindo com o canal hidrofóbico da proteína. E, observando o complexo na conformação dimérica alternativa por operação de simetria da rede cristalina, o ácido chicórico bloqueia a entrada do canal hidrofóbico (Fig. 35), de forma semelhante ao realizado pelo ácido rosmarínico junto à PrTX-I isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (dos Santos et al., 2011).

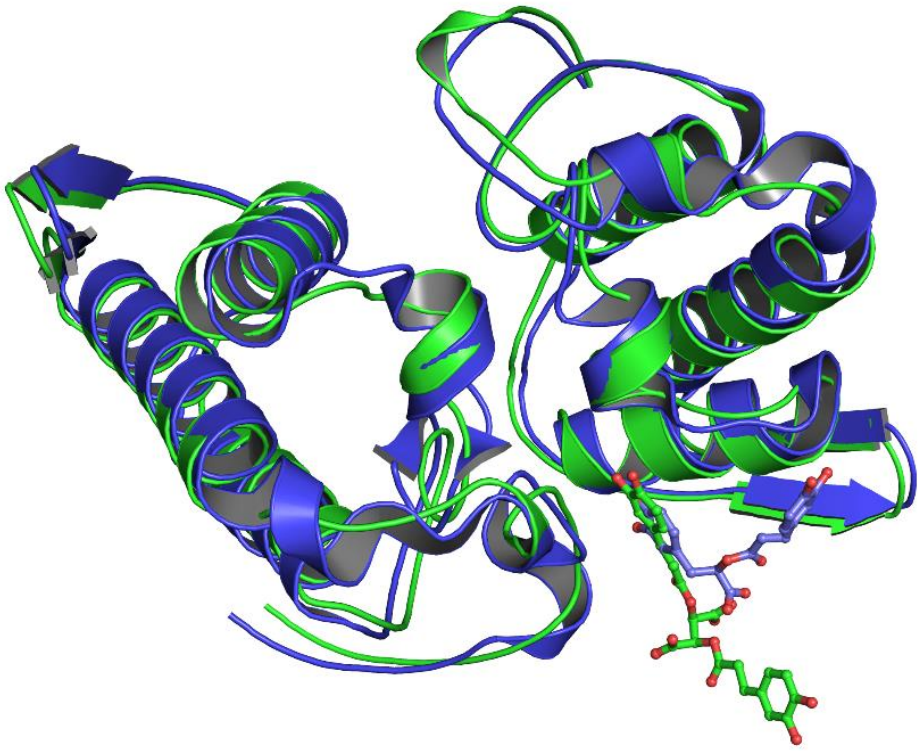

Fig. 35 – Sobreposição das estruturas dos complexos PrTX-I/ácido rosmarínico (PDB 3QNL) (em azul) e do complexo BthTX-I/AC (em verde) na conformação dimérica alternativa.

A despeito das recentes evidências e hipóteses acerca da estrutura das fosfolipases A_2 homólogas, foi observado o dímero convencional na unidade assimétrica da estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/AC. Deste modo, a formação de um dímero sem teórica atividade biológica pôde resultar na inibição das atividades miotóxica e paralisante *in vitro* da BthTX-I. No entanto, foi possível observar quatro moléculas de BthTX-I na cela unitária da estrutura do complexo (Fig. 36). Levando-se isso em consideração, aliando os dados cristalográficos obtidos, as informações sobre o dímero em solução, os resultados dos ensaios miográficos e morfológicos, bem como a instabilidade da solução toxina/inibidor observada nos testes estruturais e funcionais, a neutralização do bloqueio neuromuscular pode ser consequência da formação de um complexo tetramérico em solução (Fig. 36). Neste modelo, o ácido chicórico realiza interações de caráter hidrofóbico com todos os monômeros da toxina (Fig. 37). Deste modo, o ácido chicórico estabiliza dois dímeros alternativos, com resultante formação do complexo tetramérico (Fig. 33 e 36).

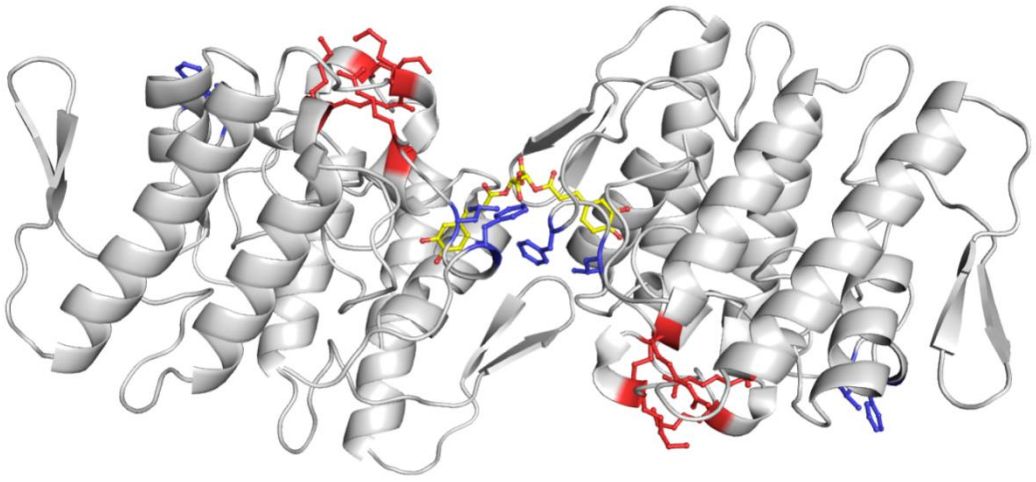

Fig. 36 – Representação tetramérica do complexo BthTX-I/AC. Resíduos do MDoS (responsáveis pela ancoragem à membrana) (em vermelho) e resíduos do MDiS (responsáveis pelo desarranjo da membrana (em azul).

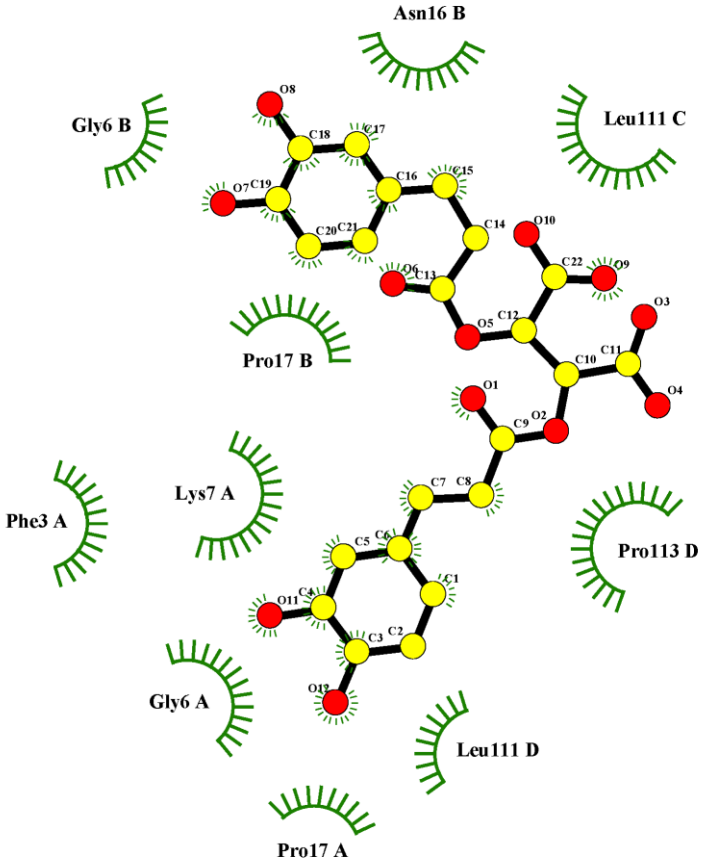

Fig. 37 - Interações entre os resíduos de aminoácidos dos monômeros da BthTX-I (em tetrâmero) e o ácido chicórico. Desenvolvida no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995).

Portanto, na hipótese da formação deste complexo tetramérico em solução, inicialmente ocorre a interação do ácido chicórico na região da entrada do canal hidrofóbico do dímero alternativo livre em solução, de forma análoga ao ácido rosmarínico (dos Santos et al., 2011). Todavia, o inibidor não permanece completamente estável junto a esta conformação dimérica da toxina, pois expõe ao solvente parte de sua estrutura, com inclusão da porção catecol do inibidor, um grupamento altamente reativo dos compostos hidroxicinâmicos (Razzaghi-Asl et al., 2013; Sørensen et al., 2014). Por fim, essa porção reativa do inibidor inicia interações físico-químicas com a aproximação de outro dímero alternativo. Deste modo, o tetrâmero formado pela estabilização do inibidor parcialmente exposto seria incapaz de promover os efeitos tóxicos, uma vez que seus respectivos sítios de aproximação à membrana (MDoS) foram impossibilitados de alinhar-se devidamente (Fig. 36).

Essa proposta de novo método de inibição das fosfolipases A_2 homólogas promovido pelo ácido chicórico não constitui uma forma totalmente inovadora, uma vez que foi recentemente observado pela interação entre a suramina e a MjTX-II (Salvador et al., 2015). O

ácido chicórico, do mesmo modo que a suramina, interagiu com regiões da proteína de grande relevância para a atividade desestabilizadora de membranas, induzindo sua oligomerização com resultante perda de tal atividade (Fig. 38).

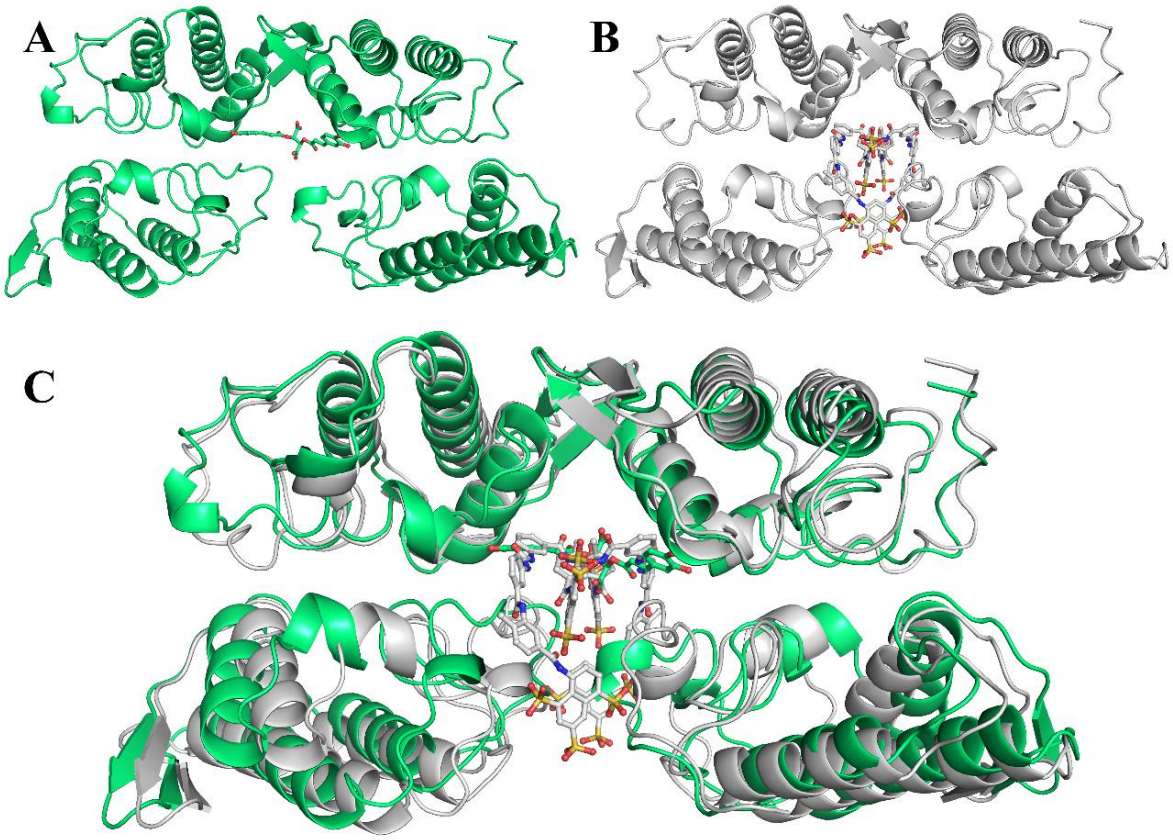

Fig. 38 – Estruturas tetraméricas dos complexos BthTX-I/AC e MjTX-II/suramina (PDB 4YV5). (A) BthTX-I/AC. (B) MjTX-II/suramina. (C) Sobreposição das estruturas dos complexos MjTX-II/suramina (em cinza) e do complexo BthTX-I/AC (em verde).

A partir dos dados calorimétricos, porém, foi estimada a relação entre 1 molécula dimérica da BthTX-I e 1,458 molécula do ácido chicórico, considerando-se que as concentrações de ambos permaneceram invariáveis no decorrer dos ensaios (*i.e.*, sem a ocorrência de precipitação da toxina e/ou inibidor). Assim, os valores não inteiros observados na estequiometria de interação estão relacionados a concentrações reais das substâncias diferentes das mensuradas inicialmente para os ensaios realizados (Freyer e Lewis, 2008). Esse fato frequentemente ocorre, uma vez que tais concentrações são determinadas espectrofotometricamente ou por determinação da massa (em balanças analíticas, preferencialmente) e diluições da mesma, gerando imprecisões dos valores obtidos. Deste modo, a concentração da solução do ácido chicórico foi ajustada, com resultante relação

estequiométrica de 1:1, pois equívocos na determinação da concentração fidedigna do titulante distorcem a mensuração da variação da entalpia (Freyer e Lewis, 2008). A solução inicial do ácido chicórico foi selecionada para sofrer ajuste em sua concentração, pois a mesma esteve sujeita a maiores imprecisões experimentais, tais como o fato de sua massa ser determinada por pesagem, sofrer diluições posteriormente, bem como apresentar solubilidade menor ao solvente utilizado em relação a espécie titulada (BthTX-I). Com base nos ajustes propostos e com a linha de base subtraída, foi verificada que a interação entre BthTX-I e ácido chicórico é entalpicamente favorável, caracterizada como uma reação exotérmica ($\Delta H < 0$). Pelo fato das interações entre as espécies ser de natureza hidrofóbica (Fig. 16), a variação de entalpia foi modesta ($\Delta H = -5{,}93 \pm 0{,}18$ kcal/mol). Além disso, a interação foi entropicamente impulsionada ($-T.\Delta S = -0{,}90$ kcal/mol), sugerindo a ligação do ácido chicórico à proteína em um evento único, sendo a variação de entropia relacionada majoritariamente à entropia de solvatação (Leavitt e Freire, 2001) da liberação/deslocamento de moléculas de água na região de interação entre toxina e composto vegetal. Ao considerar o modelo dimérico da BthTX-I em solução na conformação alternativa (Murakami et al., 2007; dos Santos et al., 2009B; Fernandes et al., 2010, 2013), a variação da entropia também estaria relacionada à entropia conformacional (Leavitt e Freire, 2001), pois a molécula do ácido chicórico apresentaria uma de suas extremidades livre à solução, com incremento de seu grau de liberdade e, consequentemente de sua vibração. Pelo modelo cristalográfico, corrobora-se esta afirmação, uma vez que os átomos da referida região apresentaram fator B maior em relação ao restante da molécula, bem como aos resíduos de aminoácidos da toxina.

Apesar das observações calorimétricas não favorecerem a hipótese da formação em solução de tetrâmeros (ou complexos de maior ordem) da BthTX-I na presença de ácido chicórico, não se exclui tal possibilidade. A técnica calorimétrica sugeriu o evento da formação do complexo BthTX-I/AC decorrente de sua parcela solúvel. Contudo, ela não explana a precipitação e/ou formação de agregados tempo-dependente dessas espécies após promover a pré-incubação dos mesmos. Esse evento foi observado anteriormente aos ensaios cristalográficos e miográficos, bem como nas tentativas de experimentos de espalhamento de luz dinâmico e de raios X a baixo ângulo com a interação da BthTX-I e AC. Deste modo, é possível que ambos complexos (dímeros e tetrâmeros) coexistam em solução, bem como elementos de maior ordem e menor estabilidade.

5. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido caftárico

O ácido caftárico é um composto derivado do ácido caféico e ácido tartárico, extensivamente analisado a partir de diferentes variedades de uvas (gênero *Viti*) e seus vinhos (Vanzo et al., 2007; Blanco et al., 1998). Este composto análogo ao ácido chicórico pode ser obtido a partir de outras espécies vegetais, principalmente através de plantas do gênero *Echinacea* (Pellati et al., 2005). Recentemente, diversas propriedades foram credenciadas ao ácido caftárico, demonstrando este composto potencialmente útil contra fatores mutagênicos (Zhang et al., 2011) e carcinogênicos (Arimoto-Kobayashi et al., 2013), falência hepática (Koriem e Soliman, 2014), efeitos tóxicos de proteases (Silhár et al., 2010), oxidação (Pellati et al., 2004; Giordo et al., 2013; Koriem e Soliman, 2014) e inflamação (Arimoto-Kobayashi et al., 2013). Ainda, o ácido caftárico pode estar envolvido no melhoramento da memória espacial através da modulação na sinalização do hipocampo e expressão proteica do córtex cerebral (Corona et al., 2013).

Da mesma forma como realizado para o ácido chicórico, foram realizados os primeiros testes do ácido caftárico frente aos efeitos tóxicos de um componente de veneno ofídico. Assim este composto reduziu em 91,6% o bloqueio das contrações indiretas promovida pela BthTX-I, assim como em 95,1% as lesões musculares oriundas do tratamento com esta toxina. Igualmente ao tratamento com o ácido chicórico, o ácido caftárico apresentou tais percentuais de inibição sem apresentar diferença significativa entre os grupos da interação toxina/inibidor e Controle. Embora o ácido caftárico apresente atividade anticolinesterásica (Szwajgier, 2013), a inibição da paralisia muscular provavelmente não está relacionada a esta ação, pois este composto tem a mesma capacidade do ácido rosmarínico para esta atividade, o qual fora avaliado no mesmo modelo experimental (dos Santos et al., 2011). O fato do ácido caftárico, administrado isoladamente, não proporcionar alterações significativas na amplitude das contrações musculares corrobora tal suposição.

A investigação dos componentes estruturais envolvidos na inibição das atividades farmacológicas observadas foi impossibilitada pela ausência de estruturas cristalográficas do complexo formado por BthTX-I e ácido caftárico. Entretanto, é possível que o mecanismo de inibição desse composto seja semelhante ao efetuado pelo ácido chicórico, pela semelhança de suas estruturas químicas e pelos resultados obtidos no presente estudo. Ou, ainda, observar nesta relação toxina/inibidor o impedimento do acesso ao canal hidrofóbico da proteína, como realizado pelo ácido rosmarínico (dos Santos et al., 2011).

6. Implicações da interação entre a BthTX-I e o ácido clorogênico

A primeira alusão ao ácido clorogênico, provavelmente, foi realizada por Robiquet e Boutron (1837) através do estudo dos polifenóis encontrados no café. Entretanto, tal denominação foi utilizada inicialmente por Payen (1846A, 1846B) em descrições de uma fração isolada de grãos de café verde. Várias décadas depois, Fisher e Dangschat (1932) demonstraram que o principal componente desta fração era um composto conjugado pelo ácido caféico e ácido quínico. Contudo, os ácidos clorogênicos são classicamente referidos aos ésteres formados entre diferentes ácidos *trans*-cinâmicos e ácido quínico (Clifford, 1999).

O ácido clorogênico apresenta diversas atividades biológicas, incluindo antagonismo aos efeitos tóxicos da fosfolipase A_2 de *Crotalus durissus terrificus* (Toyama et al., 2014). Informações geradas por modelagem *in silico* sugeriram a interação deste composto com a região do sítio ativo da toxina de *Daboia russelii* (*Viperinae*) (Nirmal et al., 2008). Além disso, esse composto pode estar envolvido na inibição da paralisia muscular *in vitro* promovida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, pois o extrato vegetal utilizado em interação ao veneno contém, principalmente, os compostos quercetina e ácido clorogênico (Tribuiani et al., 2014). No presente estudo, porém, o ácido clorogênico proporcionou proteção parcial do bloqueio neuromuscular *in vitro* (40,0%) e das lesões musculares (70,6%) causados pela BthTX-I. A proteção foi caracterizada como parcial, uma vez que o grupo da interação entre a toxina e o composto vegetal apresentou diferenças significativas das amplitudes das contrações indiretas e do índice de lesão muscular com o grupo Controle e o grupo tratado com a BthTX-I isoladamente.

Apesar do estudo realizado por Tribuiani et al. (2014) expor as preparações a diferentes miotoxinas de forma atrelada, a melhor eficiência da neutralização da paralisia em comparação ao presente estudo pode ser esclarecida pelas concentrações de inibidor e extrato utilizadas. Enquanto foi empregada a relação 1:10 (p/p, toxina/ligante) no presente estudo, Tribuiani et al. (2014) observaram a neutralização da paralisia ao utilizar a proporção 1:25 (p/p, veneno/extrato). Além disso, o extrato vegetal utilizado também era constituído por quercetina, cujos efeitos provavelmente influenciaram na neutralização da paralisia. Este composto apresenta relatos de inibição de fosfolipases A_2 (Lindahl e Tagesson, 1993; Chiou et al., 2012), provavelmente devido a sua interação com membranas e à modificação da forma de interação entre fosfolipase A_2 e tais membranas (Chiou et al., 2012). Deste modo, a melhor eficácia obtida com o extrato vegetal provavelmente está relacionada às concentrações elevadas do mesmo, bem como ao sinergismo entre seus componentes.

A investigação dos componentes estruturais envolvidos na inibição das atividades farmacológicas observadas também foi impossibilitada pela ausência de estruturas cristalográficas do complexo formado por BthTX-I e ácido clorogênico. Além disso, em comparação aos resultados de proteção dos efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* oferecidos pelo ácido chicórico e ácido rosmarínico (dos Santos et al., 2011), especula-se que a região de interação da BthTX-I com o ácido clorogênico não esteja relacionada com o canal hidrofóbico da proteína.

7. Ausência de interação entre a BthTX-I e os derivados cinâmicos não-esterificados

Os compostos vegetais ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido *trans*-ferúlico apresentaram previamente reduzida ação contra o efeito hemorrágico provocada pelo veneno de *Protobothrops flavoviridis* (Aung et al., 2011). Esses compostos cinâmicos não-esterificados foram submetidos aos ensaios cristalográfico e calorimétrico no presente estudo. Contudo, tais compostos não foram encontrados presentes nas estruturas tridimensionais elucidadas. Em solução, por calorimetria, a interação entre a BthTX-I e esses compostos não ocorreu nas condições experimentais testadas. Além disso, os experimentos miográficos e morfológicos não foram realizados pela impossibilidade de solubilizá-los em meio inerte às preparações frênico-diafragma de camundongo. Em suma, no presente estudo, não foi possível avaliar o potencial antiofídico desses compostos vegetais com os métodos empregados.

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 A_2 homólogas de veneno ofídico.

- O ácido chicórico é uma importante ferramenta farmacológica para o estudo da relação estrutura/atividade das fosfolipases A_2 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 A_2 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, Verkhratsky 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 A_2 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 A_2 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 allosterism in phospholipase A_2: 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 A_2 from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussuren*sis. **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 A_2 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 PLA_2 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 PLA_2s 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 A_2 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 [Arg^{49}]phospholipase A_2 isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A_2 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 A_2 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 A_2 via its effects on membrane structure and membrane-bound mode of phospholipase A_2. **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-Franscischinelli 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-Franscischinelli 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 A_2 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 A_2 abolishes Ca^{2+}-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 A_2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev** 111: 6130-85.

Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: $P2X_7$ 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 A_2 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 A_2 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-PLA_2 inhibition. **PLoS One** 6: e28521.

dos Santos ML, Fagundes FH, Teixeira BR et al. (2008) Purification and preliminary crystallographic analysis of a new Lys49-PLA_2 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 Ca^{2+}-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA_2s. **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 A_2-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 A_2-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 A_2-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 A_2 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 A_2 homologues. **Toxicon** 55: 1-11.

Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL et al. (2009) Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A_2-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 A_2 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 A_2: 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 A_2 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 Miscrosc 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, Homsi-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.

Homsi-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 A_2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA_2-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.

Koriem 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 A_2 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 A_2 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.

Lalloo 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 A_2 by quercetin. **Inflammation** 17: 573-82.

Liu CS, Kuo PY, Chen JM et al. (1992) Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A_2 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 A_2 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 A_2 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 A_2 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 A_2 homologues from Viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Curr Pharm Des** 16: 3234-30.

Lomonte B, Gutiérrez JM (2011) Phospholipases A_2 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 A_2 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 A_2 from snake venoms. **Protein Pept Lett** 16: 852-9.

Maraganore JM, Merutka G, Cho W et al. (1984) A new class of phospholipases A_2 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 A_2 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 A_2 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.

Mebs D, Kuch U, Coronas CV et al. (2006) Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaoermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A_2 myotoxin. **Toxicon** 47: 797-811.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B (2008) Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A_2 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 A_2 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. **Phytochemestry** 55: 627-42.

Murakami MT, Arni RK (2003) A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipases A_2. **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 PLA_2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA_2 homologues. **Toxicon** 49: 378-87.

Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D (2008) Modeling studies on phospholipase A_2-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 Ca_V1 (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 A_2 proteins. **Toxicon** 37: 411-45.

Pan H, Liu XL, Ou-Yang LL et al. (1998) Diversity of cDNAs encoding phospholipase A_2 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 (3º 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 PLA_2 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 A_2 homologue decreases its Ca^{2+}-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemestry** 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 A_2: purification, characterization and computer

modeling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A_2, 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 PLA_2 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 A_2 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 A_2. **Biochemistry** 35: 9575-84.

Salgado AI, Cunha RA, Ribeiro JA (2000) Facilitation by P_2 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-PLA_2s 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 A_2-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 71: 2066-78.

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

Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A_2 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 A_2. **Science** 250:1541-6.

Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH et al. (1990B) Crystal structure of bee-venom phospholipase A_2 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 A_2 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 A_2 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 A_2. **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 A_2 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 A_2 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 A_2 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 A_2. **Toxicon** 36: 1623-33.

Ward RJ, Chioato L, de Oliveira AH et al. (2002) Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A_2: 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 A_2, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A_2. **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 A_2 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 A_2. **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 A_2. **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, Valiyaveettil S et al. (2008) Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophys J** 95: 3366-80.