

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Ação de compostos vegetais sobre a atividade da Piratoxina-I,  
isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, em preparação  
neuromuscular de camundongos**

**FÁBIO FLORENÇA CARDOSO**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA GALLACCI  
ORIENTADORA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas  
(Área de Concentração: Farmacologia).**

**BOTUCATU - SP  
2011**

**Fábio Florença Cardoso**

**Ação de compostos vegetais sobre a atividade da Piratoxina-I,  
isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, em preparação  
neuromuscular de camundongos**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas  
(Área de Concentração: Farmacologia).**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA GALLACCI  
ORIENTADORA**

**BOTUCATU - SP  
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Cardoso, Fábio Florença.

Ação de compostos vegetais sobre a atividade da Piratoxina-I, isolada do veneno da *Bothrops pirajai*, em preparação neuromuscular de camundongos / Fábio Florença Cardoso - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Márcia Gallacci

Capes: 21000000

1. *Bothrops*. 2. Cobra venenosa - Veneno.

Palavras-chave: Compostos vegetais; Junção Neuromuscular; Lys49-PLA<sub>2</sub>.

A gradecimentos

## Agradecimentos

No decorrer deste mestrado até a síntese deste trabalho, sinto-me obrigado e afortunado em agradecer...

A minha família, em especial meus pais, por sempre depositarem confiança em minha capacidade e por estarem sempre presentes.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Gallacci, por me acolher em seu laboratório, pela sabedoria em aperfeiçoar as virtudes e corrigir os defeitos alheios, enfim, por todas as oportunidades que me foram conferidas.

Aos professores colaboradores deste estudo, Dr<sup>a</sup>. Maeli Dal Pai Silva, Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes e Dr. Andreimar Martins Soares, por engrandecer este trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clélia Akiko Hiruma Lima, bem como seus alunos (Catarine, Flávia, Hélio, Raquel e Thiago), pelas oportunidades oferecidas no início do curso e pelo conhecimento adquirido da área de produtos naturais.

Aos funcionários dos Departamentos de Farmacologia e Morfologia (Cristina, Luiz, Paulo e Ricardo), pelos auxílios providenciais oferecidos.

Aos antigos e atuais membros do Laboratório de Junção Neuromuscular (Carlos, Cicilia, Fernanda, Renata e Walter) e do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural (Carlos, Juliana e Patrícia) pelo envolvimento neste trabalho e/ou companheirismo durante esses anos.

E aos amigos e colegas da pós-graduação (Michele, Leandro, Celso, Thiago, Juliana, Fernanda, Vanessa, Ênio, Luís Ricardo, Rafael, Eduardo, José Renato, Antônio, Léo, Luís, Ana Elisa, Agnes, Andréa, Ariane, Célio e tantos outros, além dos acima já citados), pelo companheirismo no dia-a-dia...

Resumo

Os acidentes envolvendo as serpentes do gênero *Bothrops* se destacam no Brasil e em outros países da América Latina, representando 90% das notificações. O envenenamento botrópico é caracterizado por intensa mionecrose local que não é eficientemente neutralizada pelo único tratamento disponível, isto é, a soroterapia. Como consequência, em casos graves, este acidente pode levar a amputação de membros, desabilitando a vítima. Os principais responsáveis pelo desenvolvimento da mionecrose são proteínas com estruturas homólogas às enzimas fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). Entre essas se destacam as variantes cataliticamente inativas que apresentam como característica um resíduo de lisina na posição 49 (Lys49-PLA<sub>2</sub>s). Tradicionalmente, as Lys49-PLA<sub>2</sub>s são consideradas miotoxinas não-neurotóxicas, uma vez que não induzem paralisia *in vivo*. No entanto, em preparações isoladas, tal efeito é observado. Recentemente, sugeriu-se que a paralisia muscular *in vitro*, da mesma forma que a lesão muscular, resultaria da atividade desestabilizadora de membrana da fibra muscular induzida por estas toxinas. O presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre os efeitos miotóxico e paralisante das Lys49-PLA<sub>2</sub>s e contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação e da relação estrutura/atividade dessas toxinas. Sendo assim, realizaram-se estudos miográficos e morfológicos em preparações neuromusculares de camundongos utilizando a PrTX-I (Lys49-PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de *Bothrops pirajai*) e potenciais inibidores vegetais (ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido aristolóquico). Os resultados obtidos mostraram as diferentes capacidades dos compostos vegetais em neutralizar os efeitos miotóxico e paralisante da PrTX-I. Assim, o ácido rosmarínico neutralizou ambos os efeitos eficientemente, enquanto que o ácido caféico inibiu parcialmente apenas o efeito miotóxico da PrTX-I, não afetando o seu efeito paralisante. O ácido aristolóquico, na concentração em que não demonstrou sua toxicidade, exibiu comportamento semelhante ao do ácido caféico. Paralelamente,

procedeu-se a co-cristalização dessa toxina com os diferentes compostos vegetais, em estudo de colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural deste Instituto. Constatou-se que o ácido rosmarínico interagiu com o canal hidrofóbico e com a região C-terminal da PrTX-I, estruturas previamente relacionadas com a atividade desestabilizadora de membrana das Lys49-PLA<sub>2</sub>s. O ácido caféico interagiu apenas com a região C-terminal desta toxina, enquanto que o ácido aristolóquico não interagiu com nenhuma destas estruturas. O significado da interação do ácido aristolóquico com a PrTX-I está na dependência de estudos adicionais. Tomados em conjunto, os resultados deste estudo indicam o envolvimento da região C-terminal e do canal hidrofóbico da PrTX-I no estabelecimento de seus efeitos miotóxico e paralisante *in vitro*. Ainda, com estes resultados, é possível corroborar a hipótese de que os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* decorrem da desestabilização do sarcolema, uma vez que o ácido rosmarínico foi capaz de neutralizar ambos os efeitos da PrTX-I. No entanto, o efeito paralisante se mostrou mais susceptível à atividade desestabilizadora de membrana do que o efeito miotóxico. Tal inferência é baseada na observação de que o ácido caféico, por interagir com apenas uma região desta toxina, não inibiu eficientemente a desestabilização de membrana e, conseqüentemente, não neutralizou a paralisia muscular.

**Palavras-chave:** Compostos vegetais; Junção Neuromuscular; Lys49-PLA<sub>2</sub>s.



A bstract

Accidents caused by *Bothrops* snake genus stand out in Brazil and other Latin American countries, representing 90% of notifications. Bothropic envenoming is characterized by intense local myonecrosis, not effectively neutralized by serum therapy, the only available treatment. As a result, in severe cases, these accidents can lead to amputation of limbs, disabling the victim. The main responsables for myonecrosis development are proteins with homologous structures from enzymes phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). Among these stand out catalytically inactive variants that have a characteristic lysine residue at position 49 (Lys49-PLA<sub>2</sub>s). Traditionally, Lys49-PLA<sub>2</sub>s myotoxins are considered non-neurotoxic, since they do not induce paralysis *in vivo*. However, this effect is observed in isolated preparations. It was recently suggested that muscle paralysis *in vitro*, as well as muscle injury, would result from the destabilizing activity of the muscle fiber membrane induced by these toxins. This study aimed to investigate the relationship between paralyzing and myotoxic effects of Lys49-PLA<sub>2</sub>s and contribute to the elucidation of the mechanism of action and structure/activity relationship of these toxins. Therefore, myographical and morphological studies were performed in neuromuscular preparations of mice using PrTX-I (Lys49-PLA<sub>2</sub> isolated from *Bothrops pirajai* venom) and potential inhibitors from plants (rosmarinic acid, caffeic acid and aristolochic acid) as experimental tools. The results showed the different skills of plant compounds to neutralize myotoxic and paralyzing effects of PrTX-I. Thus, the rosmarinic acid efficiently neutralized both effects, whereas caffeic acid only partially inhibited the myotoxic effect of PrTX-I, not affecting its paralyzing effect. Aristolochic acid, at the concentration that showed no toxicity, exhibited behavior similar to caffeic acid. In parallel, the co-crystallization of this toxin with each plant compound was performed, in a collaboration study with the Laboratory of Molecular and Structural Biology of this Institute. It was found that

rosmarinic acid interacted with the hydrophobic channel and C-terminal region of PrTX-I, structures previously related to membrane destabilizing activity of Lys49-PLA<sub>2</sub>s. Caffeic acid only interacted with the C-terminal region of this toxin, whereas aristolochic acid did not interact with any of these structures. The meaning of the interaction between aristolochic acid and PrTX-I requires further studies. All together, the results of this study indicate the involvement of the C-terminus region and hydrophobic channel of PrTX-I in the establishment of its myotoxic and paralyzing effects *in vitro*. Moreover, with these results, it is possible to corroborate the hypothesis that the myotoxic and paralyzing *in vitro* effects result of the sarcolemma destabilization, since rosmarinic acid was able to neutralize both effects of PrTX-I. However, the paralyzing effect was more susceptible to the membrane destabilizing activity than the myotoxic effect. This inference is based on the observation that caffeic acid, by just interacting with one region of this toxin, inefficiently inhibited the membrane destabilization and, consequently, did not neutralize muscle paralysis.

**Keywords:** Lys49-PLA<sub>2</sub>s; Neuromuscular Junction; Plant compounds.

# Sumário

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>08</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>09</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

Introdução

Em países tropicais e subtropicais, os acidentes ofídicos ocorrem com elevada frequência, proporcionando morbidade ou mortalidade (Chippaux, 1998; Pinho & Pereira, 2001; Cheng & Currie, 2004; Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008). Estes acidentes são particularmente importantes em regiões rurais, nas quais a população nem sempre tem acesso aos serviços de saúde e, em algumas situações, está sujeita à escassez do soro antiofídico (Theakston & Warrell, 2000; Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008). Um grande número de vítimas sobrevive com limitações físicas permanentes, devido à necrose do tecido afetado e, sem dúvidas, com seqüelas psicológicas (Kasturiratne et al., 2008). Como a maioria das vítimas desses acidentes são jovens (Hansdak et al., 1998; Brasil, 2001), o impacto econômico dessas limitações é considerável. 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 como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2011).

As informações sobre a epidemiologia dos acidentes ofídicos são escassas e representam uma subestimativa do real número de ocorrências, visto que são baseadas apenas nos casos notificados (Swaroop & Grab, 1954; Chippaux, 1998; White, 2000). Assim, após realizar um levantamento das bases de dados disponíveis, um recente estudo indicou que ocorreram anualmente, entre 1985 e 2007, cerca de 420.000 acidentes e 20.000 mortes no mundo (Kasturiratne et al., 2008). Enquanto isso, entre 2000 e 2007, 24.000 casos/ano foram notificados no Brasil (de Oliveira et al., 2009). Dentre estes, destacam-se, indiscutivelmente, os causados por serpentes do gênero *Bothrops*, que representam a maioria das notificações (aproximadamente 90%) e, secundariamente, as do gênero *Crotalus*, que apresentam o maior índice de letalidade

(em torno de 1%) (Resende et al., 1989; Campbell & Lamar, 1989; Ribeiro et al., 1993, 1995; Brasil, 2001, 2010; Pinho & Pereira, 2001; de Oliveira et al., 2009).

Os venenos ofídicos são constituídos por uma complexa mistura de moléculas, de natureza química diversificada, que provocam diferentes ações tanto no ser humano como em outros animais (Jiménez-Porras, 1964). Cerca de 90% da massa seca desses venenos é representada por componentes protéicos (Ménez, 2002; Calvete et al., 2009), como enzimas (fosfolipases, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases enzimas proteolíticas), toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas (Bjarnason & Fox, 1989). Além disso, tais venenos contêm peptídeos, carboidratos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos (Devi, 1971; Ménez, 2002; Calvete et al., 2009). A proporção desses componentes é variável entre os venenos das diferentes espécies, distinguindo-se também intraespecificamente conforme as variações de idade, distribuição geográfica e alimentação da serpente (Warrell, 1996; Calvete et al., 2009).

No geral, os envenenamentos ofídicos geram um quadro clínico complexo, decorrente da ação simultânea dos diversos componentes do veneno, bem como da reação do organismo a estes componentes. Especificamente, o envenenamento botrópico é caracterizado por sintomas locais que incluem edema, dor, hemorragia e mionecrose (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez et al., 1989; Bjarnason & Fox, 1994; Gutiérrez & Ownby 2003; Kini, 2003; Lomonte et al., 2003; França & Málaque, 2009; Gutiérrez et al., 2009; Hernández et al., 2011). Além disso, manifestam-se reações sistêmicas, que incluem alterações cardiovasculares (Rosenfeld, 1971; França & Málaque, 2009), distúrbios da coagulação sangüínea (Rosenfeld, 1971; Bolaños, 1984; Milani-Júnior et al., 1997; Brasil, 2001, França & Málaque, 2009) e insuficiência renal (Amaral et al., 1985; França & Málaque, 2009).



A soroterapia, fundamentada nos estudos de Albert Calmette (Calmette, 1894) e Vital Brazil (Brazil, 1903), ainda permanece como o método mais eficiente na terapêutica dos envenenamentos ofídicos. Os soros antiofídicos são concentrados de imunoglobulinas obtidos por hiperimunização de diversos animais, sendo mais utilizados os de origem equina (Brasil, 2001). Estes soros têm ação restrita aos acidentes causados pelas espécies de serpentes cujos venenos foram utilizados no processo de hiperimunização (Brasil, 2001). Além disso, esse tratamento não é eficiente contra as manifestações locais, como a lesão muscular (Dias da Silva et al., 1989; Moura da Silva et al., 1990). Desta forma, a mionecrose apresenta-se como um efeito local grave nos envenenamentos botrópicos (Milani-Júnior et al., 1997; Jorge et al., 1999; da Silva et al., 2003), com a possibilidade de levar à perda permanente de massa muscular ou à amputação, incapacitando a vítima (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Otero et al., 2002). 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.

A patogênese da mionecrose envolve, primariamente, a combinação das ações dos diferentes componentes do veneno na musculatura afetada, como fosfolipases  $A_2$  miotóxicas e metaloproteases (Rosenberg, 1990; Ownby et al., 1999; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez, 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003) e, secundariamente, a liberação de mediadores da resposta inflamatória, como histamina, bradicinina e prostaglandinas (Rothschild & Rothschild, 1979; Selistre et al., 1990; Brasil, 2001).

As fosfolipases  $A_2$  ( $PLA_2$ s) são enzimas que catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição *sn*-2, convertendo-os em ácidos graxos e lisofosfolipídios (van Deenen & de Haas, 1963; Burke & Dennis, 2009). Os ácidos graxos liberados pelas  $PLA_2$ s (ácidos aracdônico e oléico) são precursores de

eicosanóides, ou seja, mediadores do processo inflamatório (Waite, 1987; Calder, 2003; Rocha et al., 2003; Kalyvas et al., 2009). Ao passo que os lisofosfolipídios liberados pela catálise são importantes na perturbação das membranas, uma vez que ativam canais de  $\text{Cl}^-$ , ocorrendo o efluxo desse íon, com conseqüente despolarização dessas membranas (Postma et al., 1996; Moolenaar et al., 1997).

Além de apresentar um amplo espectro de efeitos biológicos, as  $\text{PLA}_2\text{s}$  podem ser encontradas em diversos compartimentos, tanto no meio intracelular quanto extracelular (Rosenberg, 1990; Kini, 2003, Lomonte et al., 2003). Essas últimas são abundantes em venenos de serpentes, lagartos e abelhas (Waite, 1987; Rosenberg, 1990; Arni & Ward, 1996). Essas proteínas constituem uma superfamília, divididas em 15 grupos conforme similaridade seqüencial e estrutural, posição e número de pontes de dissulfeto, entre outras diversas características (Schasloke & Dennis, 2006; Burke & Dennis, 2009; Lei et al., 2010). Os grupos I e II desta classificação englobam as  $\text{PLA}_2\text{s}$  dos venenos ofídicos e, em particular, no grupo IIA (grupo II, subgrupo A) encontram-se as  $\text{PLA}_2\text{s}$  dos venenos botrópicos (Rosenberg, 1990; Six & Dennis, 2000).

No grupo IIA, as  $\text{PLA}_2\text{s}$  possuem baixo peso molecular (14 a 18 kDa), elevada semelhança estrutural e necessidade do íon  $\text{Ca}^{2+}$  para apresentarem atividade catalítica. Inicialmente, de acordo com essa atividade, esse grupo foi subdividido em  $\text{PLA}_2\text{s}$  clássicas (cataliticamente ativas) e homólogas/variantes (cataliticamente inativas). As  $\text{PLA}_2\text{s}$  clássicas foram basicamente caracterizadas pelo resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49, denominando-as como Asp49- $\text{PLA}_2\text{s}$  (Kaiser et al., 1990). Ao passo que as  $\text{PLA}_2\text{s}$  homólogas distinguem-se das clássicas pela substituição do resíduo de ácido aspártico por lisina, sendo conhecidas, portanto, como Lys49- $\text{PLA}_2\text{s}$  (Scott et al., 1992; Ownby et al., 1999; Lomonte et al., 2003). Recentemente, estudos indicaram a existência de  $\text{PLA}_2\text{s}$  cataliticamente inativas com diferentes substituições na

posição 49, tais como Arg49-, Asn49-, Gln49- e Ser49-PLA<sub>2</sub>s (dos Santos et al., 2011). Ainda, apesar da conservação do ácido aspártico, algumas Asp49-PLA<sub>2</sub>s (BthTX-II e PrTX-III) possuem atividade enzimática muito reduzida ou inexistente, sendo consideradas cataliticamente inativas (dos Santos et al., 2011).

Apesar da ampla diversidade de venenos ofídicos, suas PLA<sub>2</sub>s apresentam um alto grau de semelhança na seqüência de aminoácidos, contribuindo para a formação de elementos de estruturas secundárias/terciárias altamente conservados como a hélice N-terminal, os sítios ativo e de ligação do Ca<sup>2+</sup> e o canal hidrofóbico (Arni & Ward, 1996). O sítio ativo interage com a região (ou *loop*) de ligação do Ca<sup>2+</sup> através do resíduo Asp49 (Ward et al., 1998). A região catalítica também envolve os resíduos His48, Tyr52 e Asp99, uma vez que são diretamente relacionados à estrutura intermediária tetraédrica das PLA<sub>2</sub>s com os lipídios de membrana (Scott et al., 1990; Ward et al., 1998; dos Santos et al., 2011). Este complexo intermediário no processo catalítico é estabilizado pelo Ca<sup>2+</sup> (Scott et al., 1990; Ward et al., 1998) e a coordenação deste íon às PLA<sub>2</sub>s é possível pela manutenção dos resíduos Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49 (Scott et al., 1990; White et al., 1990; dos Santos et al., 2011). Assim, a substituição de alguns desses resíduos acarreta a perda da atividade catalítica (Maraganore et al., 1984; Krizaj et al., 1991; Liu et al., 1991; Tsai et al., 2004; Mebs et al., 2006). Em particular, quando ocorre a substituição de Asp49 para Lys49, o Nζ da cadeia lateral do resíduo de lisina ocupa a posição do Ca<sup>2+</sup>, impedindo a sua coordenação (Holland et al., 1990; Scott et al., 1992; Arni et al., 1995). Deste modo, as Lys49-PLA<sub>2</sub>s atuam por um mecanismo Ca<sup>2+</sup>-independente (Ownby et al., 1999; Ward et al., 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003).

Diversas atividades foram descritas para as Lys49-PLA<sub>2</sub>s, sendo a capacidade de induzir lesão muscular *in vivo* e *in vitro* (Gutiérrez et al., 1986, 1989; Homs-

Brandeburgo et al., 1988; Lomonte et al. 1994<sup>b</sup>; Melo & Ownby, 1999) uma das mais proeminentes. Embora tais PLA<sub>2</sub>s sejam destituídas de neurotoxicidade *in vivo* (Lomonte et al., 2003), estudos demonstram que várias Lys49-PLA<sub>2</sub>s de venenos botrópicos promovem paralisia muscular *in vitro* em preparações neuromusculares de diferentes espécies (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Heluany et al., 1992, Gallacci et al., 2006; Cavalcante et al., 2007). Uma recente revisão das evidências experimentais disponíveis levou à hipótese de que os efeitos paralisante *in vitro* e miotóxico sejam consequência da desestabilização das membranas das fibras musculares promovida pelas Lys49-PLA<sub>2</sub>s (Gallacci & Cavalcante, 2010). Sendo assim, a avaliação dos efeitos da Lys49-PLA<sub>2</sub>s sobre o processo de transmissão neuromuscular em preparações isoladas seria uma abordagem útil para o avanço no conhecimento da atividade desestabilizadora de membranas destas proteínas.

Tendo em vista o papel-chave das Lys49-PLA<sub>2</sub>s na patogênese da mionecrose, a elucidação do mecanismo de ação destas proteínas, bem como dos determinantes estruturais envolvidos, é fundamental para o aperfeiçoamento do tratamento dos acidentes promovidos por serpentes viperídeas. Para tanto, podem ser utilizados uma série de técnicas tais como modificação da estrutura química dessas PLA<sub>2</sub>s, análise comparativa da sequência de aminoácidos, estudo com peptídeos sintéticos, mutagênese sítio-dirigida e interação com moléculas neutralizadoras (Ownby et al., 1999; Murakami et al., 2005, 2007). Particularmente, essa última técnica é uma abordagem interessante, pois além de auxiliar no esclarecimento da atividade das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, indica potenciais moléculas inibidoras a serem avaliadas em estudos posteriores.

Ao longo dos anos demonstrou-se que as substâncias polianiônicas, como suramina e heparina, são excelentes moléculas para se utilizar na interação com Lys49-PLA<sub>2</sub>s, pois são capazes de neutralizar diversos efeitos dessas toxinas, incluindo a

paralisia muscular *in vitro* e a miotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (de Oliveira et al., 2003; Murakami et al., 2005, 2007; Gallacci et al., 2006). Os extratos vegetais também são instrumentos interessantes no estudo da atividade das PLA<sub>2</sub>s, uma vez que constituem uma série de substâncias com atividades biológicas diversificadas, inclusive antiofídica (Borges et al., 2000, 2001, Oliveira et al., 2005; Cavalcante et al., 2007). Sabe-se que a utilização de alguns desses extratos contra os envenenamentos ofídicos é uma prática comum adotada por comunidades sem acesso à soroterapia (Borges et al., 2001). Nesse contexto, o emprego popular de extratos de *Cordia verbenacea* (*Boraginaceae*), *Taraxacum officinale* (*Asteraceae*) e *Aristolochia* sp. (*Aristolochiaceae*) como paliativos aos efeitos dos envenenamentos (Tsai et al., 1975; Sertié et al., 1988; Mors et al., 2000) instigou ao estudo de suas atividades antiofídicas, as quais foram conferidas por seus princípios ativos, ou seja, o ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido aristolóquico (Tsai et al., 1980; Ticli et al., 2005; Aung et al., 2010, 2011).

No sentido de se obter algum progresso no conhecimento do mecanismo de ação e da relação estrutura/atividade das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, no presente estudo avaliou-se a capacidade do ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido aristolóquico em neutralizar os efeitos miotóxico e paralisante da piratoxina-I (PrTX-I), uma Lys49-PLA<sub>2</sub> da *Bothrops pirajai* (Mancuso et al., 1995), em preparação neuromuscular isolada de camundongos. Este trabalho foi complementado por estudos de co-cristalização da PrTX-I com os compostos vegetais, realizado pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes.

Objetivos

Em busca de novas alternativas para o tratamento dos acidentes ofídicos, este estudo teve por objetivo avançar no conhecimento dos mecanismos dos efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, bem como dos componentes estruturais destas toxinas envolvidos em tais efeitos. Neste intuito, pôs-se à prova a capacidade de compostos vegetais em inibir os efeitos miotóxico e paralisante promovidos pela PrTX-I em preparação neuromuscular de camundongos, além de avaliar as regiões de interação entre tais compostos e a PrTX-I.

# Material e Métodos



## 1. Material

### 1.1. Toxina

Utilizou-se a piratoxina-I (PrTX-I), sob a forma purificada e liofilizada, isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. A toxina foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

### 1.2. Drogas e reagentes

Drogas:

- Ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich).
- Ácido caféico (Sigma-Aldrich).
- Ácido aristolóquico (Sigma-Aldrich).
- Brometo de Pancurônio (Pancuron<sup>®</sup>, Cristália).

Reagentes:

- Cloreto de sódio (Chemco).
- Bicarbonato de sódio (Synth).
- Cloreto de potássio (Chemco).
- Cloreto de magnésio (Synth).
- Fosfato de sódio bibásico (Synth).
- Cloreto de cálcio (Synth).
- Bicarbonato de sódio (Synth).
- Dextrose anidra (Dinâmica).

### 1.3. Soluções

Solução nutriente de Ringer:

- 135 mM de cloreto de sódio (NaCl).
- 15 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>).
- 5 mM de cloreto de potássio (KCl).
- 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).
- 1 mM de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O).
- 2 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O).
- 11 mM de dextrose anidra (glicose).

Solução de Bouin:

- 7,5 mL de solução saturada de ácido pícrico.
- 2,5 mL de formaldeído 40%.
- 500 µL de ácido acético glacial.

Solução de Karnovsky:

- Glutaraldeído 2,5%.
- Folmaldeído 2%.
- PBS 0,1 M (pH 7,4).

## 2. 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, abastecidas com água e ração *ad*

*libitum*, em ambiente com temperatura controlada ( $24 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro (12-12 h).

### 3. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente separados nos seguintes grupos:

- Controle.
- PrTX-I (1  $\mu$ M).
- Ácido Rosmarínico (13,7  $\mu$ g/mL).
- PrTX-I + Ácido Rosmarínico (1:1, peso/peso).
- Ácido Caféico (6,85  $\mu$ g/mL).
- Ácido Caféico (13,7  $\mu$ g/mL).
- Ácido Caféico (68,5  $\mu$ g/mL).
- PrTX-I + Ácido Caféico (1:½ , peso/peso).
- PrTX-I + Ácido Caféico (1:1, peso/peso).
- PrTX-I + Ácido Caféico (1:5, peso/peso).
- Ácido Aristolóquico (13,7  $\mu$ g/mL).
- Ácido Aristolóquico (68,5  $\mu$ g/mL).
- PrTX-I + Ácido Aristolóquico (1:1, peso/peso).
- PrTX-I + Ácido Aristolóquico (1:5, peso/peso).

### 4. Estudo Funcional

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo 033/05).

### **4.1. Preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo**

O camundongo foi sacrificado por deslocamento cervical e exangüinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-músculo diafragma foi removida (Bülbring, 1997). Durante este período a preparação foi perfundida intermitentemente com solução nutriente de Ringer. 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<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) 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). Os sinais foram registrados em um computador através de um sistema de aquisição de dados Summit ACQuire (Gould Systems) e posteriormente submetidos à análise utilizando o programa Summit DataViewer (Gould Systems).

### **4.2. Registro das contrações musculares evocadas diretamente**

Os estímulos elétricos foram aplicados diretamente no músculo através de um eletrodo bipolar de platina acoplado a um estimulador elétrico (Grass Telefactor, Modelo S88). A tensão de base de cada uma das preparações foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima em resposta à aplicação de pulsos elétricos retangulares com duração de 5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. Para evitar alguma contribuição da contração indireta, pancurônio (2 µM) foi adicionado à solução nutriente.

### **4.3. Registro das contrações musculares 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.

### **4.4. Protocolo experimental**

As preparações foram mantidas a 35 °C ( $\pm 2$  °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. Subseqüentemente, a PrTX-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 diretas e indiretas foram registradas por um período de 90 minutos.

## **5. Estudo Morfológico**

Após a realização do estudo funcional, fragmentos do músculo diafragma foram tratados com solução de Bouin e fixados em historresina. Subseqüentemente, cortes transversais de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos a

coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares.

Amostras também foram fixadas em solução de Karnovsky por 4 horas, e lavadas em tetróxido de ósmio 1%. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em resina Epon. Cortes de 1,5  $\mu\text{m}$  foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscopia eletrônica.

As preparações histológicas coradas com HE foram submetidas à análise semiquantitativa. Em cada músculo foram analisados três campos microscópicos diferentes. O número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normais + lesadas) em cada campo. Este estudo foi realizado utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (Leica Germany, Qwin).

### **6. Estudo Cristalográfico**

O estudo cristalográfico foi realizado em projeto de colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural do Departamento de Física/Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes e executado pelos seus alunos: Carlos Alexandre Henrique Fernandes, Juliana Izabel dos Santos e Patrícia da Silva Shimabuku. A seguir, estão descritas resumidamente as técnicas utilizadas neste estudo.

#### **6.1. Co-cristalização da PrTX-I com os compostos vegetais**

A co-cristalização da PrTX-I com o ácido rosmarínico, caféico ou aristolóquico foi realizada utilizando a técnica de difusão de vapor *hanging drop* (MacPherson, 1982).

- O complexo PrTX-I/ácido rosmarínico foi co-cristalizado a 298 K utilizando como solução de cristalização 30% de PEG 4000, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 200 mM de sulfato de lítio, com uma proporção toxina/ligante de 1:8.
- O complexo PrTX-I/ácido caféico foi co-cristalizado a 291 K utilizando como solução de cristalização 30% de PEG 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8,1 e 200 mM de sulfato de lítio, com uma proporção toxina/ligante de 1:8.
- O complexo PrTX-I/ácido aristolóquico foi co-cristalizado a 291 K utilizando como solução de cristalização 26% de PEG 4000, 120 mM citrato de sódio pH 5,6 e 18% de isopropanol, com uma proporção toxina/ligante de 1:8.

Os cristais obtidos foram submetidos à coleta de dados por difração de raios X no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS – Campinas – Brasil). As densidades eletrônicas correspondentes a cada molécula de composto vegetal foram obtidas após o processamento dos dados de difração de raios X (Otwinowski & Minor, 1997) e a realização das técnicas de substituição molecular (Navaza, 1994) e de refinamento manual (Jones et al., 1990; Brünger et al., 1998).

### **7. Análise Estatística**

Os resultados experimentais foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos resultados foi realizada através do Teste t de Student (ao comparar duas amostras) ou da Análise de Variância (ao comparar mais de duas amostras). Neste último modo, a análise foi complementada pelo Teste de Tukey-Kramer (Snedecor & Cochran, 1989). Foi estabelecido o nível de significância de 5%.

Resultados

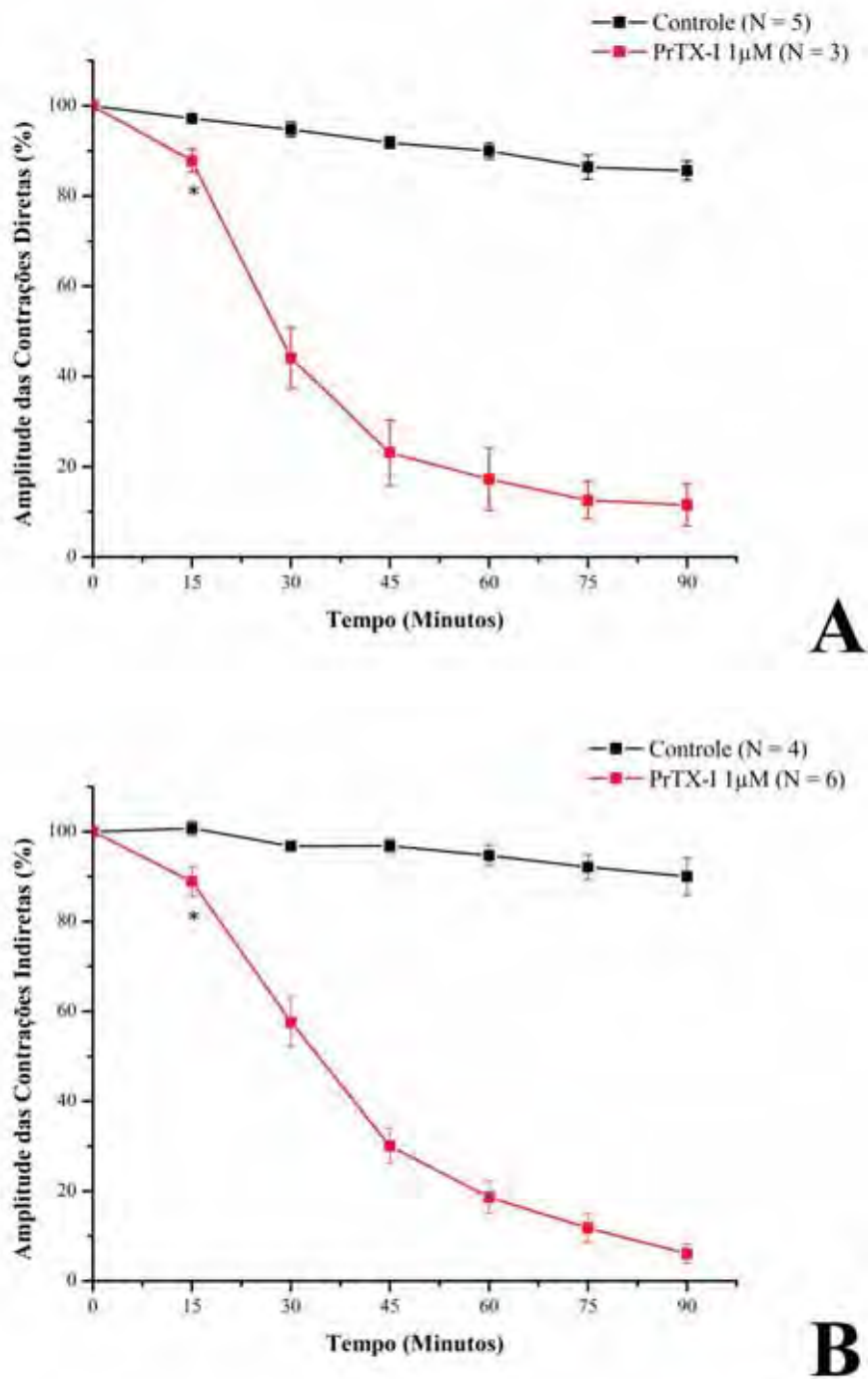


## **1. Estudo Funcional**

### **1.1. Efeito da PrTX-I sobre as contrações musculares diretas e indiretas em preparações frênico-diafragma de camundongo**

A PrTX-I (1  $\mu$ M, isto é 13,7  $\mu$ g/mL) promoveu bloqueio irreversível e tempo-dependente das contrações musculares evocadas diretamente e indiretamente nas preparações frênico-diafragma de camundongo (Fig. 1). Ao final do protocolo experimental, o bloqueio das contrações musculares diretas e indiretas foi, respectivamente, de 82,6% e 89,4% em relação aos seus grupos Controles.

O tempo médio para a PrTX-I reduzir a amplitude das contrações musculares diretas em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $28,6 \pm 2,2$  minutos (N = 3) e de  $34,0 \pm 2,4$  minutos (N = 6) para as contrações indiretas, não havendo diferença significativa entre ambos ( $P > 0,05$ ).

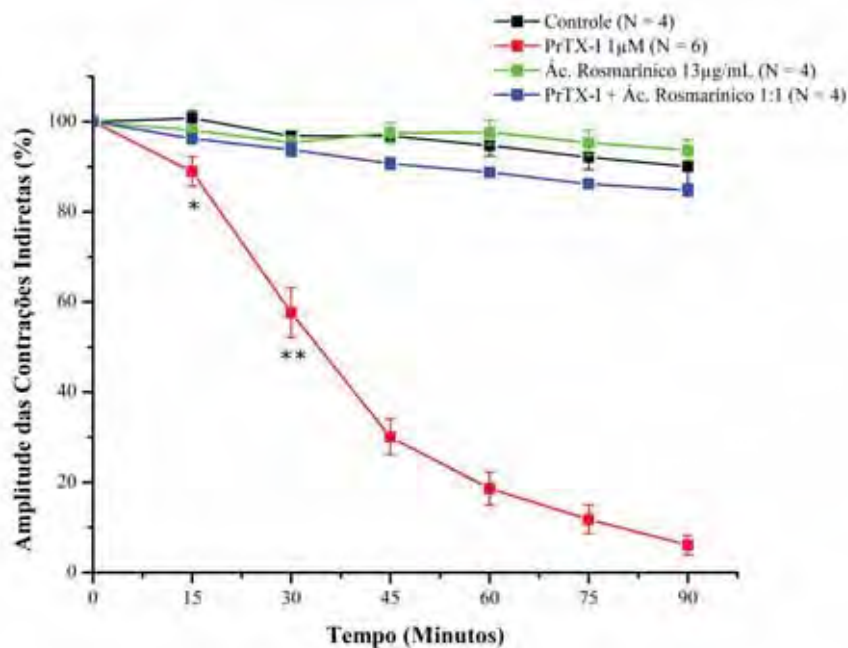


**Fig. 1** - Efeito da PrTX-I sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas diretamente (A) e indiretamente (B) em preparações frênico-diafragma de camundongos. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle ( $P < 0,05$ ).

## 1.2. Influência do ácido rosmarínico sobre o efeito da PrTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido rosmarínico na proporção 1:1 (peso/peso) não promoveu paralisia significativa das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 2). Deste modo, a proteção conferida pelo ácido rosmarínico ao efeito paralisante da PrTX-I foi de 93,8%.

O ácido rosmarínico, administrado isoladamente na concentração de 13,7  $\mu\text{g/mL}$ , não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 2).

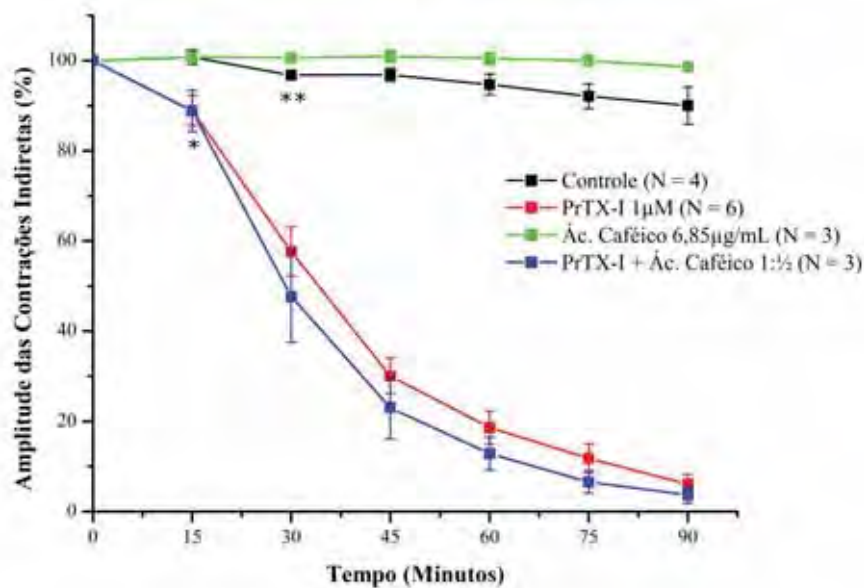


**Fig. 2** - Efeito da PrTX-I, do ácido rosmarínico e do produto de interação entre ambos sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle ( $P < 0,05$ ). \*\* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e PrTX-I + Ác. Rosmarínico 1:1 ( $P < 0,001$ ).

### 1.3. Influência do ácido caféico sobre o efeito da PrTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido caféico na proporção 1:½ (peso/peso) promoveu paralisia das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 3). O tempo médio para este produto reduzir a amplitude das contrações em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $30,6 \pm 3,7$  minutos ( $N = 3$ ), não havendo diferença significativa entre este tempo e aquele observado para a PrTX-I isoladamente ( $34,0 \pm 2,4$  minutos,  $N = 6$ ,  $P > 0,05$ ).

O ácido caféico, administrado isoladamente na concentração de  $6,85 \mu\text{g/mL}$ , não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 3).

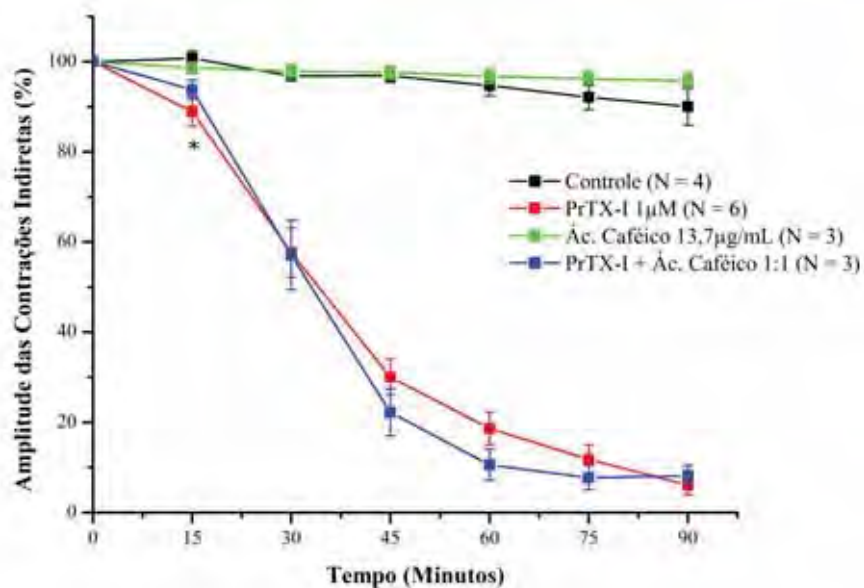


**Fig. 3** - Efeito da PrTX-I, do ácido caféico e do produto de interação entre ambos (1:½, peso/peso) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle e entre os grupos PrTX-I + Ác. Caféico 1:½ e Controle ( $P < 0,05$ ).

\*\* Único momento no qual ocorreu diferença significativa entre os grupos Ác. Caféico  $6,85 \mu\text{g/mL}$  e Controle.

O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido caféico na proporção 1:1 (peso/peso) promoveu a paralisia das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 4). O tempo médio para este produto reduzir a amplitude das contrações em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $33,1 \pm 2,8$  minutos ( $N = 3$ ), não havendo diferença significativa em relação ao grupo PrTX-I ( $34,0 \pm 2,4$  minutos,  $N = 6$ ,  $P > 0,05$ ).

O ácido caféico, administrado isoladamente na concentração de  $13,7 \mu\text{g/mL}$ , não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 4).

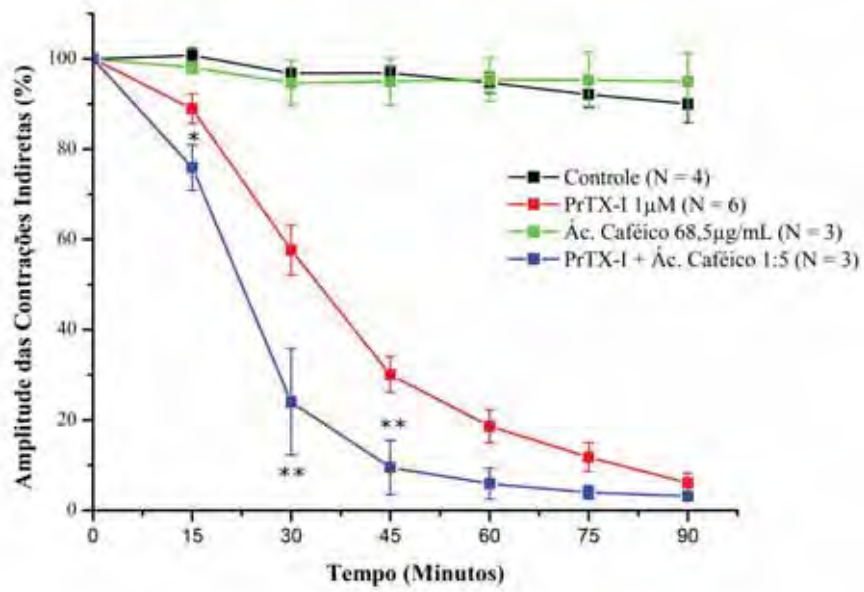


**Fig. 4** - Efeito da PrTX-I, do ácido caféico e do produto de interação entre ambos (1:1, peso/peso) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle e entre os grupos PrTX-I + Ác. Caféico 1:1 e Controle ( $P < 0,05$ ).

O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido caféico na proporção 1:5 (peso/peso) promoveu paralisia das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 5). A paralisia muscular induzida por este produto também foi diferente em relação a do grupo PrTX-I, nos momentos 30 e 45 minutos (Fig. 5). Tal achado sugere que, nesta proporção, a interação com o ácido caféico acelerou a paralisia induzida pela PrTX-I.

O tempo médio para o produto da incubação entre PrTX-I e ácido caféico (1:5) reduzir a amplitude das contrações em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $23,3 \pm 2,9$  minutos ( $N = 3$ ), havendo diferença significativa com o grupo PrTX-I ( $34,0 \pm 2,4$  minutos,  $N = 6$ ,  $P < 0,05$ ).

O ácido caféico, administrado isoladamente na concentração de  $68,5 \mu\text{g/mL}$ , não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 5).



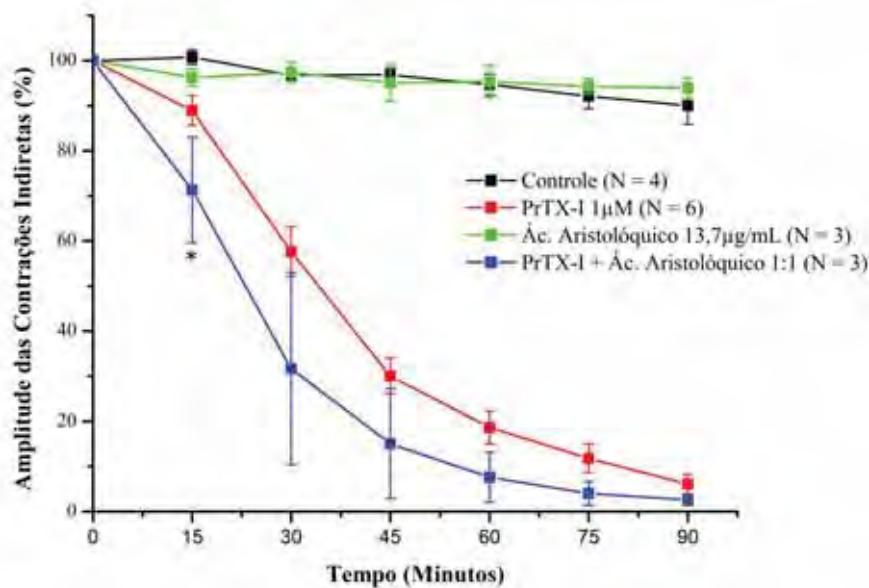
**Fig. 5** - Efeito da PrTX-I, do ácido cafêico e do produto de interação entre ambos (1:5, peso/peso) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle e entre os grupos PrTX-I + Ác. Cafêico 1:5 e Controle ( $P < 0,05$ ).

\*\* Momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os grupos PrTX-I e PrTX-I + Ác. Cafêico 1:5 ( $P < 0,05$ ).

#### 1.4. Influência do ácido aristolóquico sobre o efeito da PrTX-I em preparações frênico-diafragma de camundongo

O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido aristolóquico na proporção 1:1 (peso/peso) promoveu a paralisia das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 6). O tempo médio para este produto reduzir a amplitude das contrações em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $25,5 \pm 7,5$  minutos ( $N = 3$ ), não havendo diferença significativa em relação ao grupo PrTX-I ( $34,0 \pm 2,4$  minutos,  $N = 6$ ,  $P > 0,05$ ).

O ácido aristolóquico, administrado isoladamente na concentração de  $13,7 \mu\text{g/mL}$ , não alterou a amplitude das contrações evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 6).



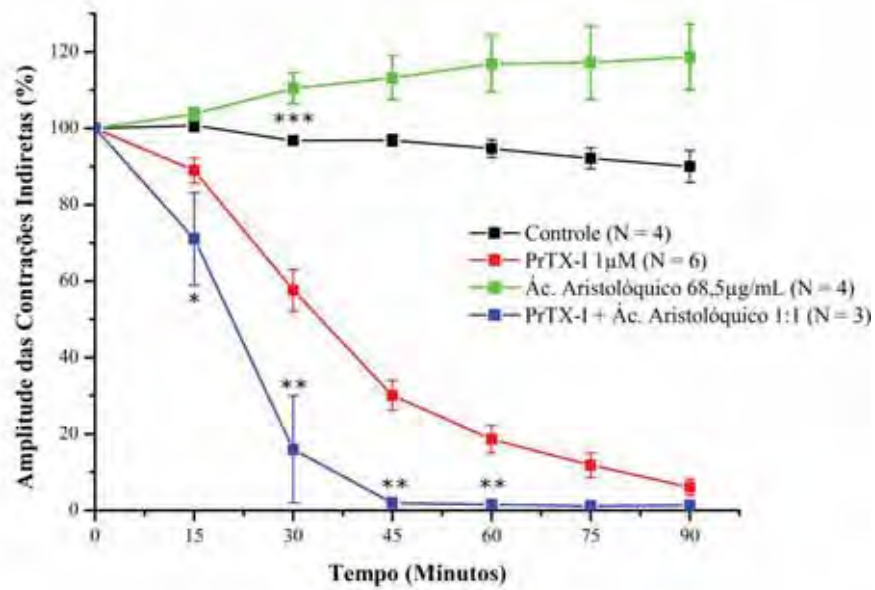
**Fig. 6** - Efeito da PrTX-I, do ácido aristolóquico e do produto de interação entre ambos (1:1, peso/peso) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle e entre os grupos PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:1 e Controle ( $P < 0,05$ ).



O produto de pré-incubação da PrTX-I com o ácido aristolóquico na proporção 1:5 (peso/peso) promoveu a paralisia das contrações musculares evocadas indiretamente em relação ao grupo Controle (Fig. 7). A paralisia muscular induzida por este produto também foi diferente em relação a do grupo PrTX-I entre 30 e 60 minutos (Fig. 7).

O tempo médio para o produto da incubação entre PrTX-I e ácido aristolóquico (1:5) reduzir a amplitude das contrações em 50% ( $T_{1/2}$ ) foi de  $20,9 \pm 3,9$  minutos ( $N = 3$ ), havendo diferença significativa com o grupo PrTX-I ( $34,0 \pm 2,4$  minutos,  $N = 6$ ,  $P < 0,05$ ).

O ácido aristolóquico, administrado isoladamente na concentração de  $68,5 \mu\text{g/mL}$ , proporcionou um efeito facilitador das contrações que se tornou significativo em relação ao grupo Controle a partir dos 30 minutos (Fig. 7). Considerando o desgaste natural da preparação frênico-diafragma ao final do protocolo experimental, o ácido aristolóquico promoveu facilitação de 31,9%.



**Fig. 7** - Efeito da PrTX-I, do ácido aristolóquico e do produto de interação entre ambos (1:5, peso/peso) sobre o decurso temporal da amplitude das contrações musculares evocadas indiretamente. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle e entre os grupos PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:5 e Controle ( $P < 0,05$ ). \*\* Momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os grupos PrTX-I e PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:5 ( $P < 0,01$ ). \*\*\* Momento a partir do qual ocorreu diferença significativa entre os grupos Controle e Ác. Aristolóquico 68,5  $\mu$ g/mL ( $P < 0,05$ ).

## 2. Estudos Morfológico e Morfométrico

### 2.1. Microscopia óptica

As Figuras 8, 9 e 10 expõem imagens dos músculos diafragma de camundongos obtidas por microscopia óptica. Observa-se que os grupos Controle, Ác. Rosmarínico e PrTX-I + Ác. Rosmarínico 1:1 (Fig. 8A, 8C e 8D) apresentaram a maioria das fibras com aspecto normal (fibras poligonais), sarcoplasma acidófilo e núcleo periférico. As fibras musculares estavam delimitadas por uma delicada camada de tecido conjuntivo (endomísio). O grupo PrTX-I (Fig. 8B) apresentou alterações como fibras arredondadas, edema entre as fibras, áreas do sarcoplasma desprovidas de miofibrilas e núcleo central. Foi observado que as fibras dos grupos Ác. Caféico 6,85 µg/mL, 13,7 µg/mL e 68,5 µg/mL (Fig. 9C, 9E e 9G) apresentaram características semelhantes às do grupo Controle (Fig. 9A). Contudo, os grupos PrTX-I + Ác. Caféico 1:½, 1:1 e 1:5 (Fig. 9D, 9F e 9H) apresentaram determinadas regiões com lesões nas fibras, cujos aspectos foram similares aos observados no grupo PrTX-I (Fig. 9B). A grande maioria das fibras musculares dos grupos Ác. Aristolóquico 13,7 µg/mL e 68,5 µg/mL (Fig. 10C e 10E) apresentou características semelhantes às do grupo Controle (Fig. 10A), embora algumas lesões pudessem ser observadas. Por outro lado, os grupos PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:1 e 1:5 (Fig. 10D e 10F) apresentaram lesões nas fibras, assemelhando-se ao aspecto observado no grupo PrTX-I (Fig. 10B).

**Fig. 8** - Microscopia óptica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Grupos:

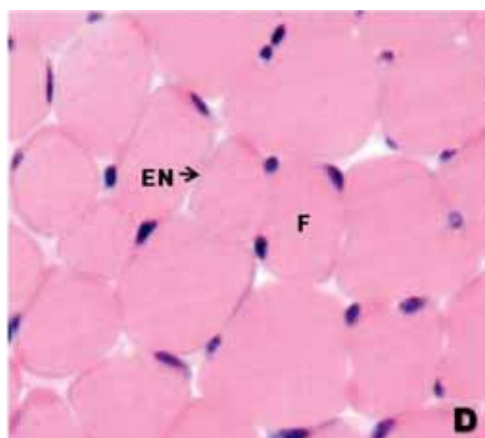
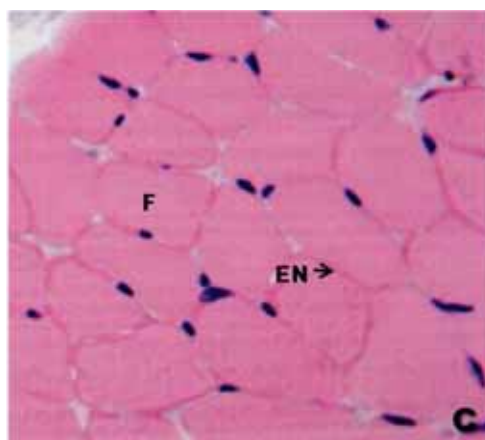
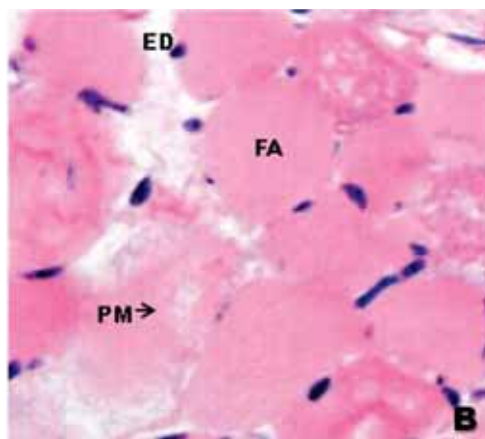
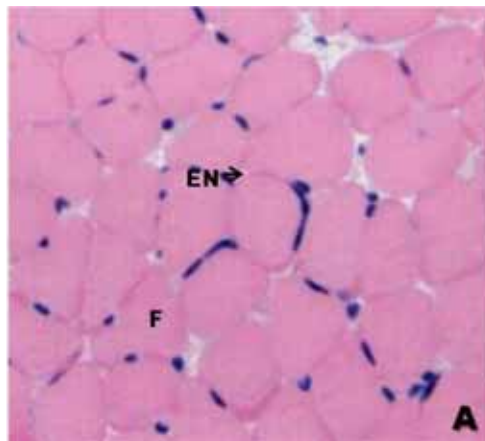
Controle (A), PrTX-I (B), Ác. Rosmarínico (C) e PrTX-I + Ác. Rosmarínico 1:1 (D).

Marcações:

Fibras poligonais (F), endomísio (EN), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (ED).

Escala:

1 cm = 10  $\mu$ m



**Fig. 9** - Microscopia óptica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Grupos:

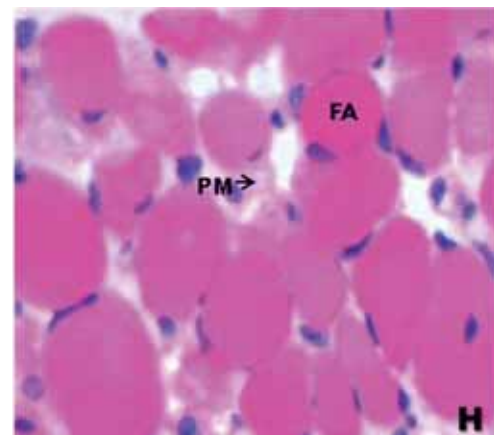
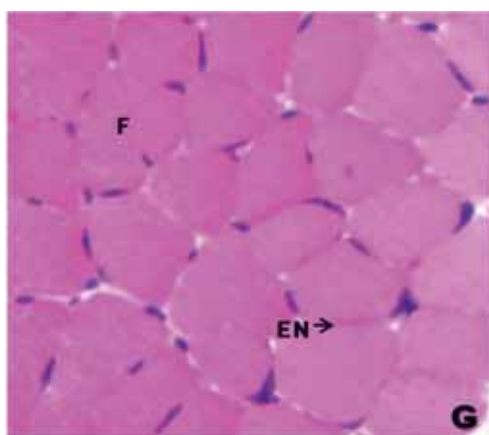
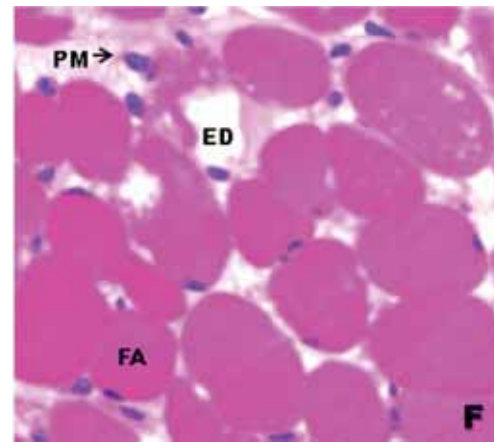
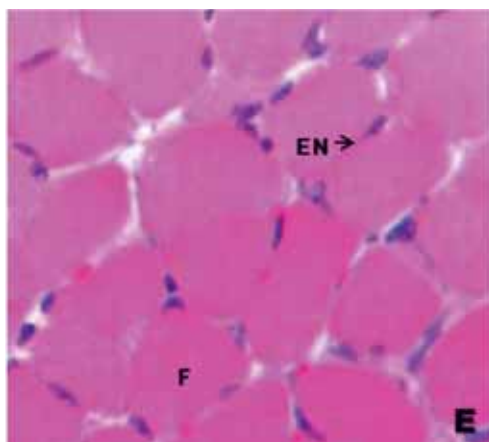
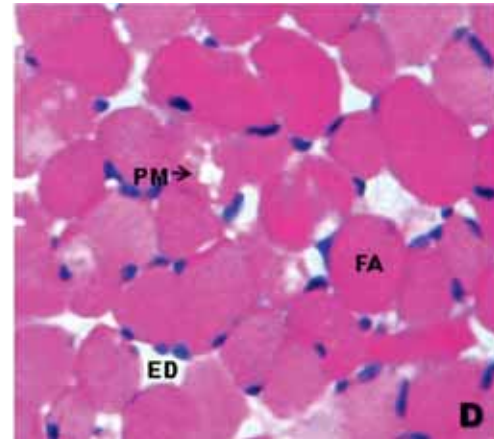
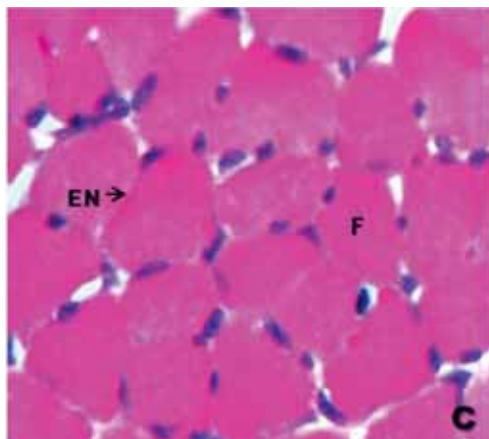
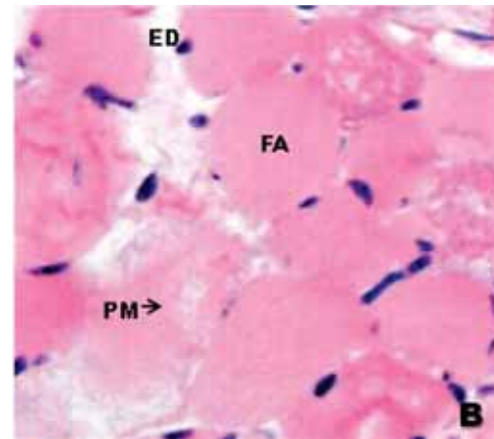
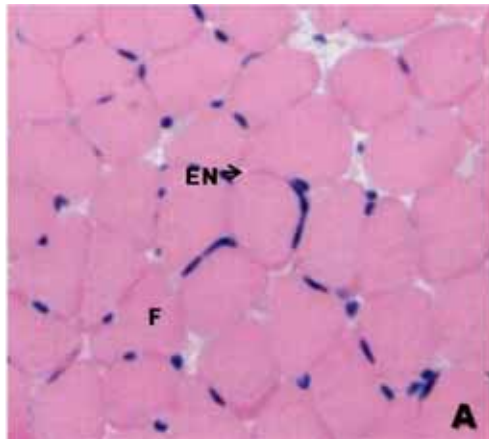
Controle (A), PrTX-I (B), Ác. Caféico 6,85 µg/mL, 13,7 µg/mL e 68,5 µg/mL (C, E e G) e PrTX-I + Ác. Caféico 1:½, 1:1 e 1:5 (D, F e H).

Marcações:

Fibras poligonais (F), endomísio (EN), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (ED).

Escala:

1 cm = 10 µm



**Fig. 10** - Microscopia óptica de músculo diafragma de camundongo submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Grupos:

Controle (A), PrTX-I (B), Ác. Aristolóquico 13,7 µg/mL e 68,5 µg/mL (C e E) e PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:1 e 1:5 (D e F).

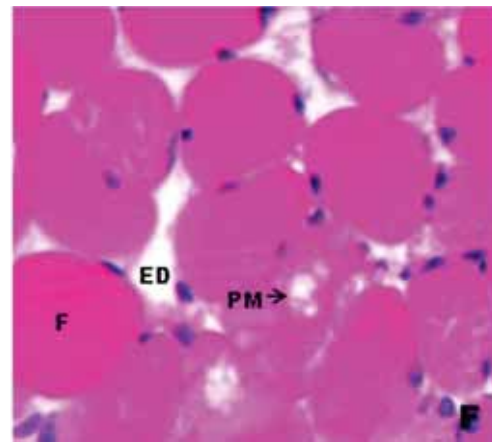
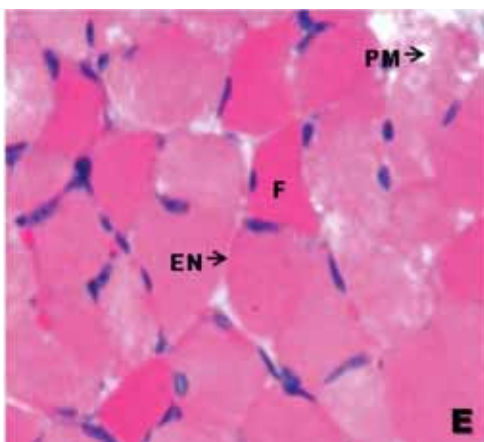
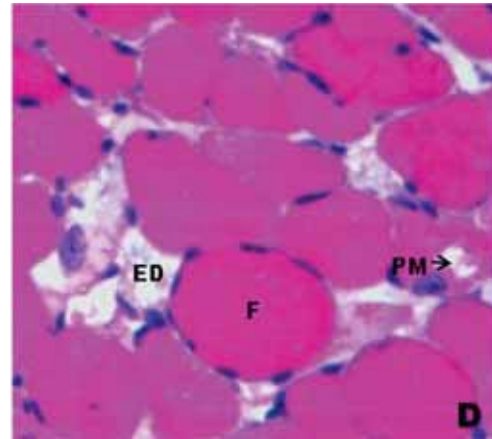
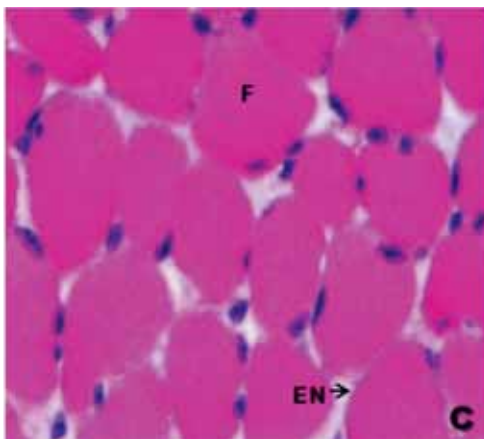
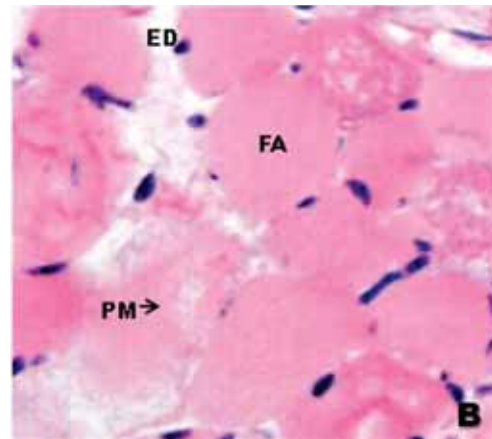
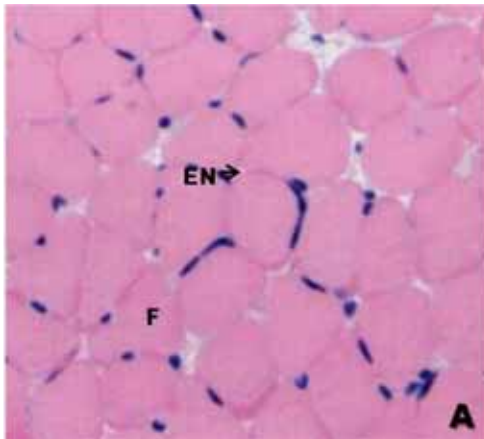
Marcações:

Fibras poligonais (F), endomísio (EN), fibras arredondadas (FA), perda de miofilamentos (PM) e edema (ED).

Escala:

1 cm = 10 µm

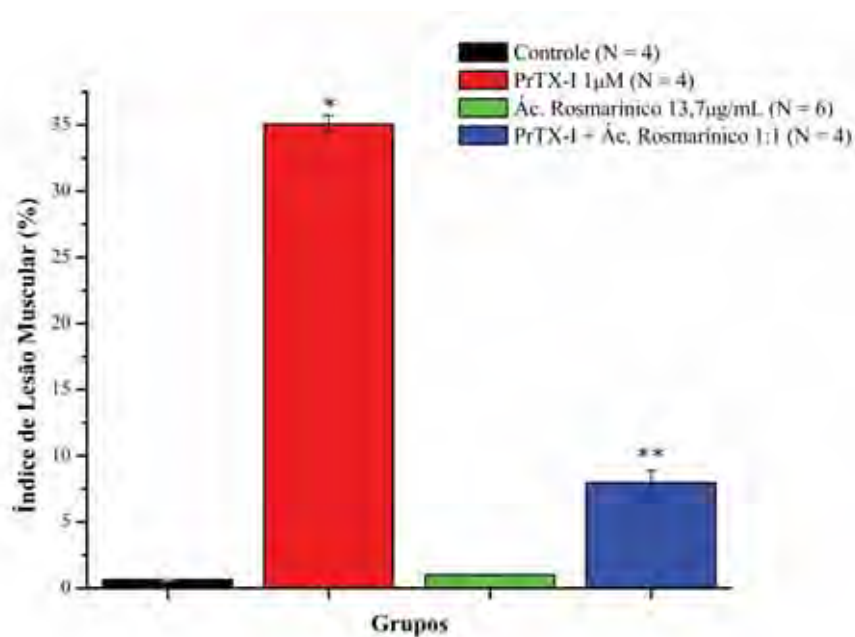




## 2.2. Índice de lesão muscular

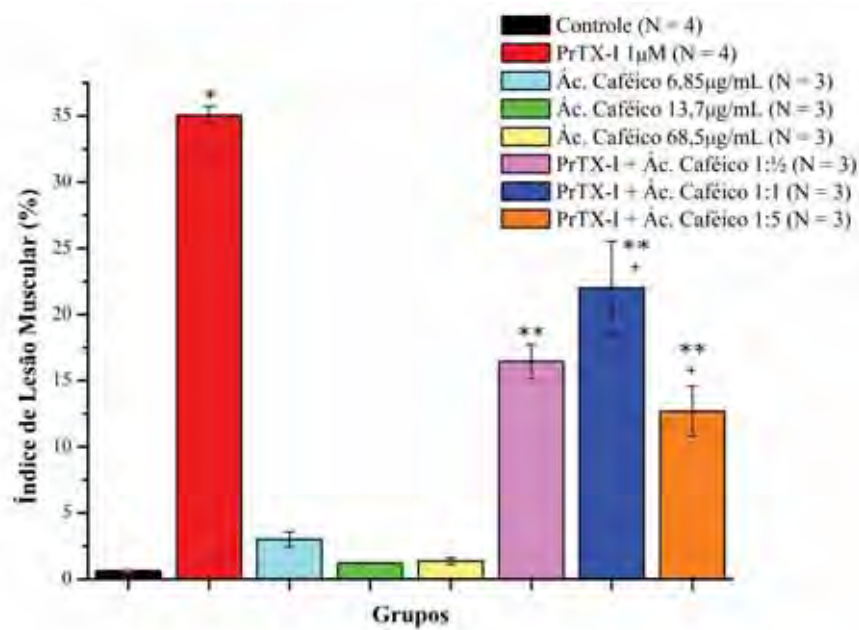
As Figuras 11, 12 e 13 apresentam o Índice de lesão muscular, calculado a partir das imagens obtidas por microscopia óptica. Nessas imagens, podemos observar que o grupo PrTX-I apresentou índice de lesão muscular significativamente maior em relação ao grupo Controle e aos grupos dos compostos vegetais administrados isoladamente ( $P < 0,001$ ).

Na Figura 11, foi observado que os grupos Controle e Ác. Rosmarínico 13,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram baixo índice de lesão muscular (cerca de 1%), não havendo diferença significativa entre ambos. A pré-incubação com o ácido rosmarínico reduziu de forma significativa a miotoxicidade da PrTX-I ( $P < 0,001$ ). Desse modo, a proteção conferida pelo ácido rosmarínico ao efeito miotóxico da PrTX-I foi de 78,7%.



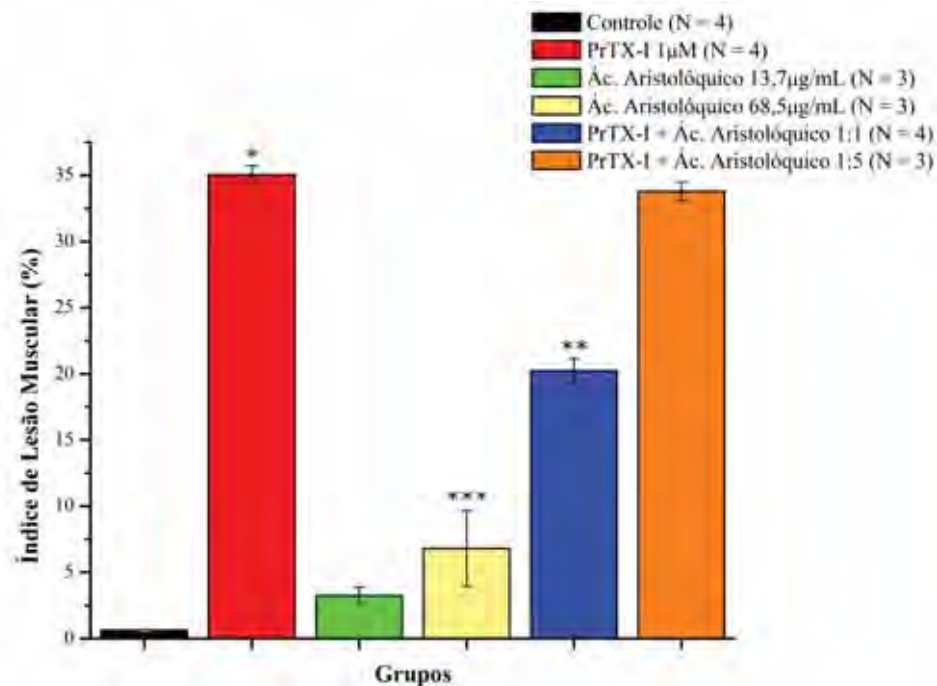
**Fig. 11** - Efeito do ácido rosmarínico sobre o Índice de lesão muscular induzido pela PrTX-I. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle ( $P < 0,001$ ). \*\* Diferença significativa entre os grupos PrTX-I e PrTX-I + Ác. Rosmarínico 1:1 ( $P < 0,001$ ).

Observa-se na Figura 12 que os grupos Ác. Caféico 6,85  $\mu\text{g/mL}$ , 13,7  $\mu\text{g/mL}$  e 68,5  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram baixos índices de lesão muscular, que não foram significativos em relação ao do grupo Controle. Os produtos de incubação entre PrTX-I e ácido caféico (1:½, 1:1 e 1:5) reduziram de forma significativa o índice de lesão da PrTX-I. Desse modo, o ácido caféico promoveu, respectivamente, proteção de 54,1%, 38,0% e 65,0% ao efeito da toxina.



**Fig. 12** - Efeito do ácido caféico sobre o Índice de lesão muscular induzido pela PrTX-I. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle ( $P < 0,001$ ). \*\* Diferença significativa do grupo PrTX-I com os grupos PrTX-I + Ác. Caféico 1:½ ( $P < 0,001$ ), 1:1 ( $P < 0,01$ ) e 1:5 ( $P < 0,001$ ). + Diferença significativa entre os grupos PrTX-I + Ác. Caféico 1:1 e 1:5 ( $P < 0,05$ ).

Como ilustrado na Figura 13, a pré-incubação com ácido aristolóquico na proporção de 1:1 reduziu significativamente o dano muscular promovido pela PrTX-I e, isoladamente, este composto (13,7 µg/mL) não apresentou índice de lesão muscular significativo em relação ao do grupo Controle. Assim, nesta proporção, o ácido aristolóquico protegeu em 43% o efeito miotóxico da PrTX-I. Entretanto, a pré-incubação da toxina com este ácido na proporção de 1:5 não resultou em alteração significativa do índice de lesão em relação ao grupo PrTX-I. Observou-se também que, isoladamente, o ácido aristolóquico (68,5 µg/mL) induziu lesão muscular significativa em relação ao grupo Controle.



**Fig. 13** - Efeito do ácido aristolóquico sobre o Índice de lesão muscular induzido pela PrTX-I. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa entre os grupos PrTX-I e Controle ( $P < 0,001$ ). \*\* Diferença significativa entre os grupos PrTX-I e PrTX-I + Ác. Aristolóquico 1:1 ( $P < 0,001$ ). \*\*\* Diferença significativa entre os grupos Ác. Rosmarínico 68,5 µg/mL e Controle ( $P < 0,05$ ).

### 2.3. Microscopia eletrônica

A análise ultraestrutural dos músculos do grupo Controle revelou a presença de fibras com aspecto normal, com miofibrilas organizadas em sarcômeros, preenchendo o sarcoplasma, e mitocôndrias com cristas lamelares, localizadas nas regiões subsarcolemal e intermiofibrilar (Fig. 14A-B). Os músculos submetidos à ação do ácido rosmarínico apresentaram a maioria das fibras com padrão semelhante ao do grupo Controle. Após a incubação dos músculos com a PrTX-I, as alterações nas fibras musculares foram evidentes (Fig. 14C-D). Observou-se miofibrilas desorganizadas, além da presença de inúmeras áreas sem miofilamentos, principalmente na região periférica. As mitocôndrias mostraram-se edemaciadas, com dilatação, ruptura ou aumento na eletrondensidade das cristas. Foram observadas a presença de fibras sem miofibrilas, envoltas pela lâmina basal. Nos músculos submetidos à ação do produto da pré-incubação da PrTX-I com o ácido rosmarínico, a análise ultraestrutural mostrou a maioria das fibras com sarcolema, miofibrilas e organelas preservadas (Fig. 14E-F).

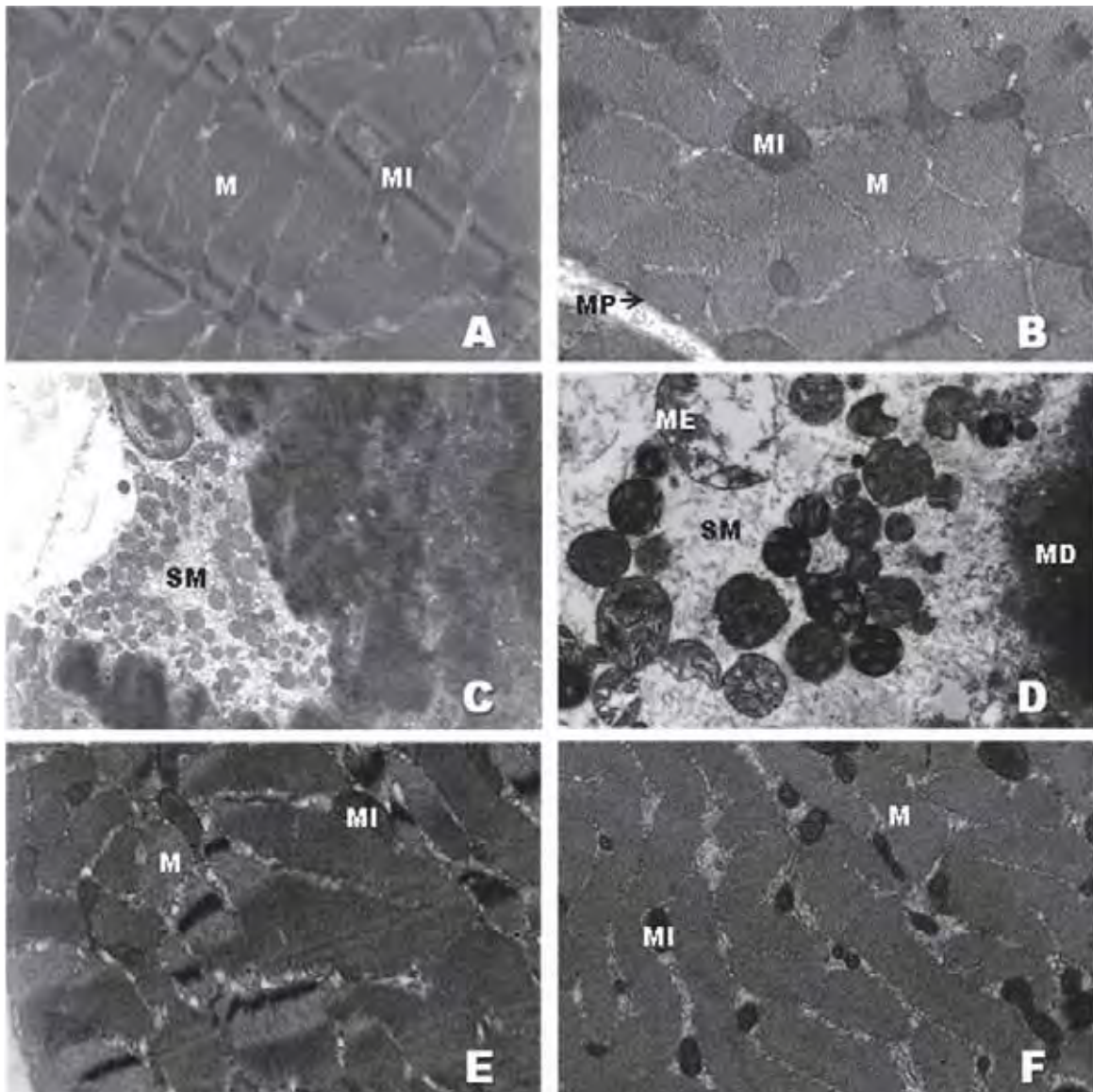
**Fig. 14** - Microscopia eletrônica do músculo diafragma de camundongo.

Grupos:

Controle (A e B), PrTX-I (C e D) e PrTX-I + Ác. Rosmarínico 1:1 (E e F).

Marcações:

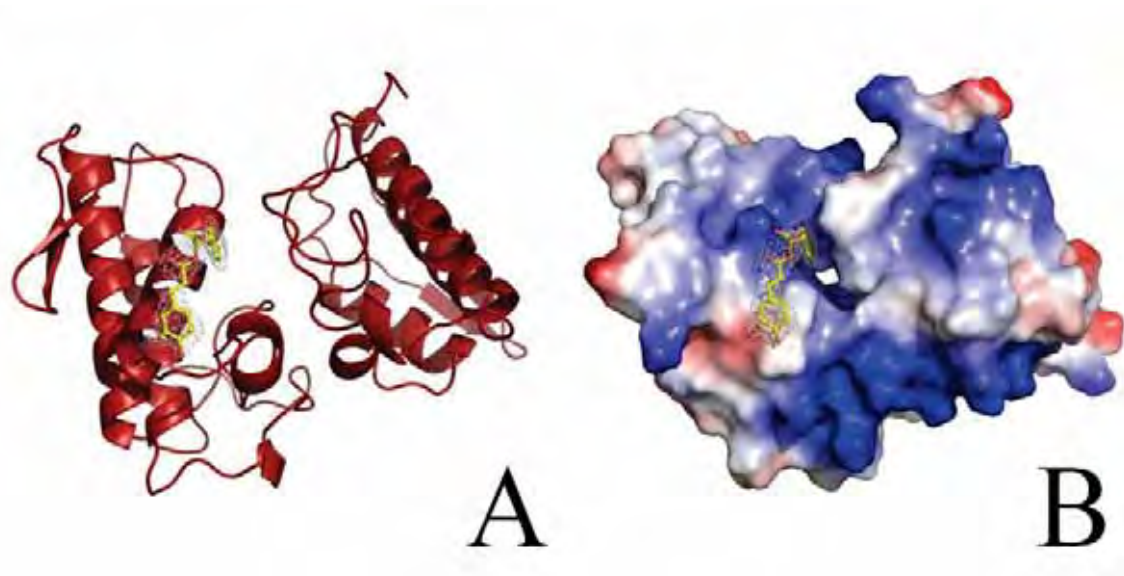
Membrana plasmática (MP), miofibrilas (MI), mitocôndrias (M), miofibrilas desorganizadas (MD), áreas sem miofibrilas (SM), mitocôndrias edemaciadas ou com ruptura das cristas (ME).



### 3. Estudo Cristalográfico

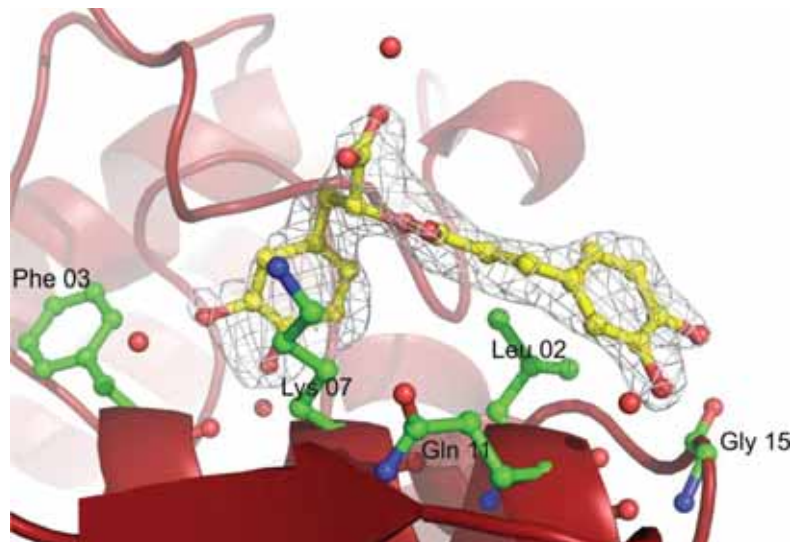
#### 3.1. Cristalização da PrTX-I com o ácido rosmarínico

A Figura 15 mostra uma densidade eletrônica correspondente ao ácido rosmarínico na entrada de um dos canais hidrofóbicos do complexo PrTX-I/Ácido rosmarínico. Em adição, nesse complexo há a interação de uma molécula de PEG 4000 e de oito moléculas de isopropanol (presentes na condição de cristalização do complexo) no outro monômero da toxina. O ácido rosmarínico estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos Phe3, Lys7, Leu10, Gln11 e Gly15 do monômero A (Fig. 16) e interage com os resíduos Leu2, Arg72 e Trp77 do mesmo monômero através de moléculas de água.



**Fig. 15** - Modelo cristalográfico para o complexo PrTX-I/Ácido rosmarínico. (A) Conformação dimérica do complexo. (B) Distribuição da carga de superfície para o modelo cristalográfico do complexo demonstrando o ácido rosmarínico obstruindo a entrada do canal hidrofóbico da PrTX-I.

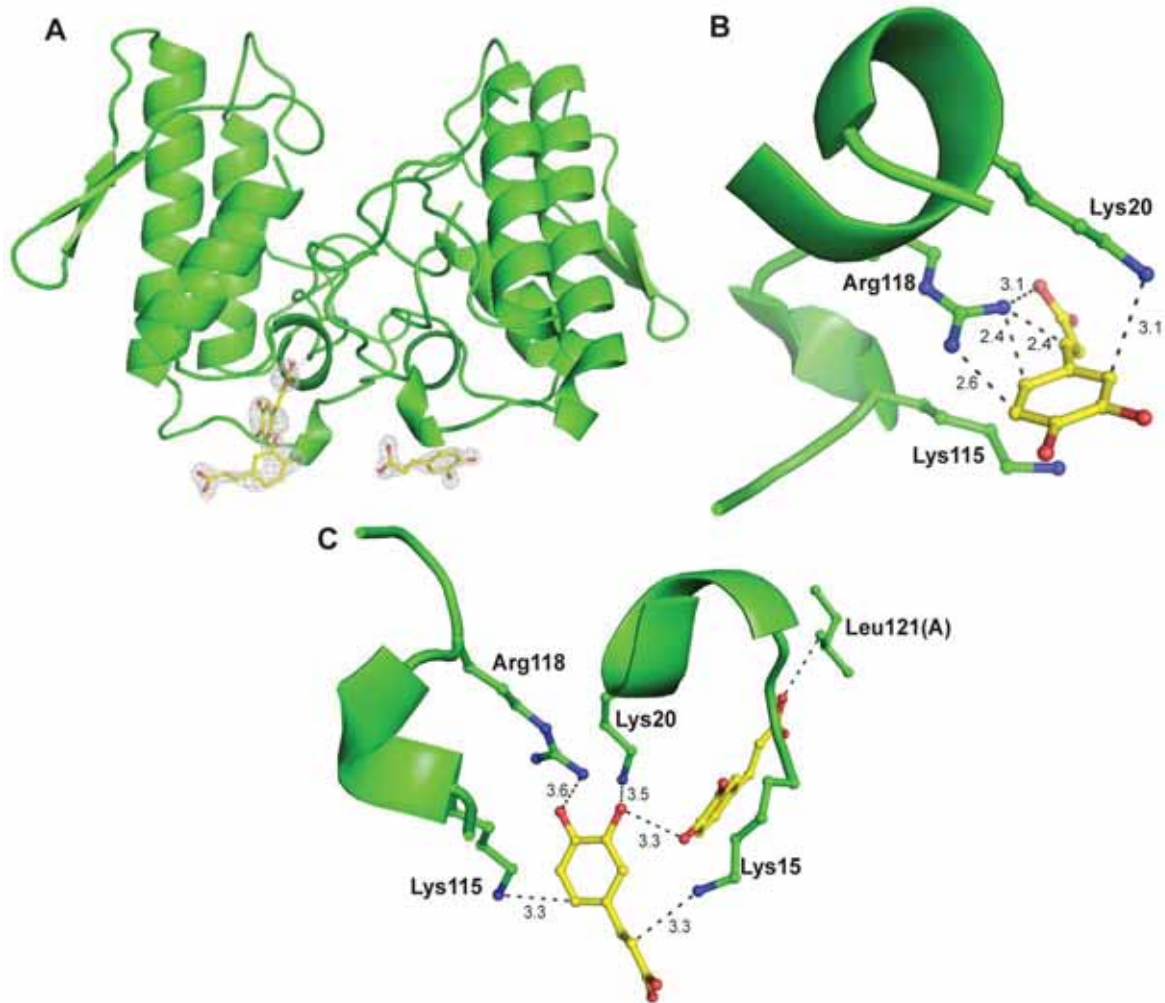




**Fig. 16** - Interações entre átomos do ácido rosmarínico e da PrTX-I. Resíduos cujos contatos são estabelecidos através de moléculas de água não são demonstrados.

### 3.2. Cristalização da PrTX-I com o ácido caféico

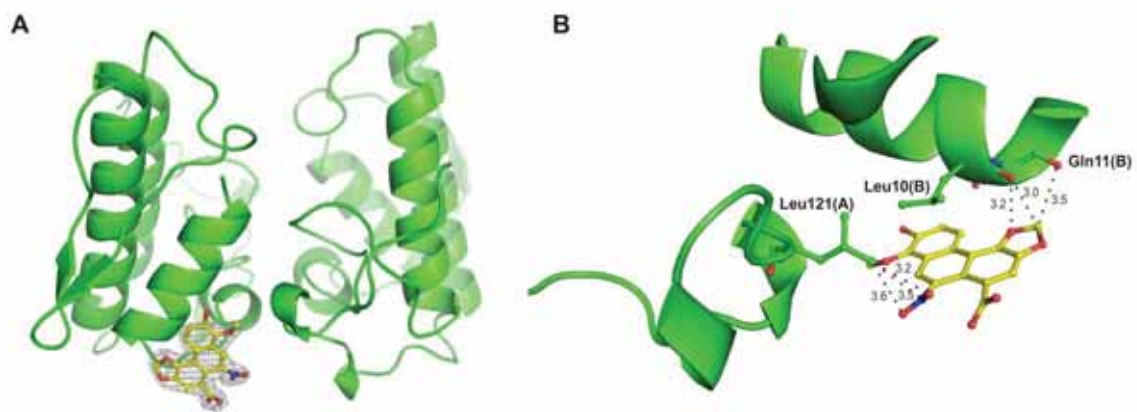
Nas regiões N-terminal e C-terminal do complexo PrTX-I/Ácido caféico foram observadas densidades eletrônicas correspondentes a três moléculas de ácido caféico (Fig. 17A). Em adição, nesse complexo há a interação de três moléculas de PEG 4000 com a toxina, uma em cada canal hidrofóbico e outra na região da Lys7. Uma molécula de ácido caféico estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos Lys20 e Arg118 do monômero A. Uma segunda molécula desse composto estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos de Lys15, Lys20, Lys115, Arg118 do monômero B. Uma terceira molécula de ácido caféico interage com o resíduo Leu121 do monômero A e com a outra molécula do composto que está interagindo com o monômero B (Fig. 17A).



**Fig. 17** - (A) Estrutura cristalográfica da PrTX-I (em verde) complexada com o ácido caféico (em amarelo, contornado por suas densidades eletrônicas). (B) Interação da molécula do ácido caféico com resíduos no monômero A da estrutura do complexo PrTX-I/Ácido caféico. (C) Interação das moléculas do ácido caféico com resíduos no monômero B da estrutura do complexo PrTX-I/Ácido caféico. Nota-se que as moléculas presentes na região C-terminal e N-terminal deste monômero também interagem com um resíduo do C-terminal do monômero A. Distância aferida apresentada em Å. Figura gerada pelo programa PyMOL (DeLano, 2002).

### 3.3. Cristalização da PrTX-I com o ácido aristolóquico

A Figura 18A revela uma densidade eletrônica correspondente a molécula de ácido aristolóquico exposta ao solvente em uma região intermediária entre as cadeias N-terminal e C-terminal do complexo PrTX-I/Ácido aristolóquico. Em adição, nesse complexo há a interação de uma molécula de PEG 4000, 2 de propanol e 1 de sulfato (presentes na condição de cristalização do complexo) com a toxina. A molécula de ácido aristolóquico estabelece ligações de hidrogênio com o resíduo Leu121 do monômero A e com os resíduos Leu10 e Gln11 do monômero B (Fig. 18B).



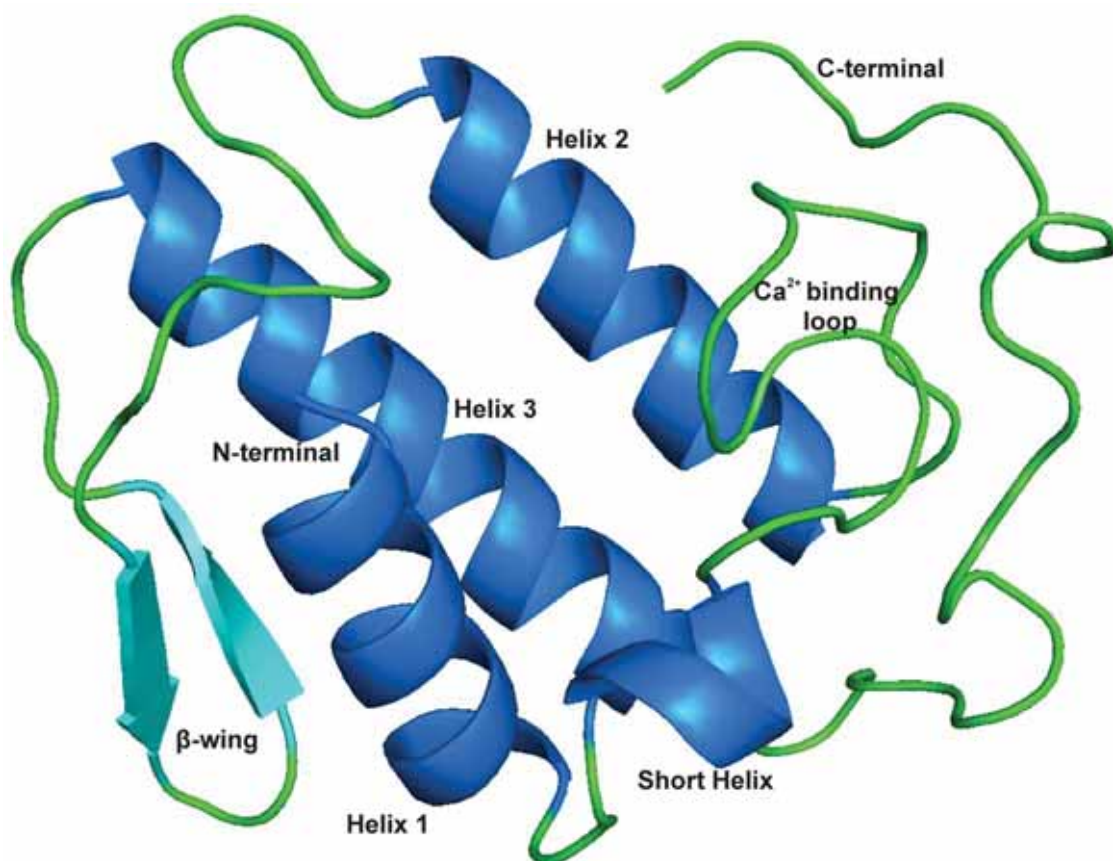
**Fig. 18** - (A) Estrutura cristalográfica da PrTX-I (em verde) complexada com ácido aristolóquico (em amarelo, contornado por sua densidade eletrônica). (B) Interação da molécula de ácido aristolóquico com resíduos da PrTX-I no complexo PrTX-I/Ácido aristolóquico. Distância aferida apresentada em Å. Figura gerada pelo programa PyMOL (DeLano, 2002).

Discussão

As PLA<sub>2</sub>s são os componentes mais abundantes dos venenos ofídicos e apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas (Rosenberg, 1990; Kini, 2003; Lomonte et al., 2003). Entre essas proteínas, destacam-se as Lys49-PLA<sub>2</sub>s homólogas dos venenos botrópicos que, apesar de serem destituídas de atividade enzimática, induzem um quadro severo de mionecrose local. Tal efeito não é neutralizado pela soroterapia e, nos acidentes mais graves, podem levar à amputação do membro afetado (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Soares & Giglio, 2003; Gutiérrez et al., 2008). Assim, um grande número de investigações vem sendo realizado na expectativa de esclarecer os mecanismos de ação e a relação estrutura/atividade das PLA<sub>2</sub> miotóxicas encontradas nos venenos ofídicos, visando o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento destes acidentes (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Heluany et al., 1992; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Rodrigues-Simioni et al., 1995; Ownby et al., 1999; Chioato et al., 2002; Ward et al., 2002). Neste sentido, no presente estudo, avaliou-se a influência de compostos de origem vegetal sobre os efeitos miotóxico e paralisante induzidos pela PrTX-I, uma Lys49-PLA<sub>2</sub> do veneno da *Bothrops pirajai*, em preparação neuromuscular de camundongos. Paralelamente, investigaram-se os sítios estruturais da toxina envolvidos na interação com esses compostos.

A PrTX-I é uma Lys49-PLA<sub>2</sub> básica (pI em torno de 8,3) com massa molecular de 13.825 Da (Toyama et al., 1998). Essa PLA<sub>2</sub> possui 121 resíduos de aminoácidos, cuja seqüência apresenta semelhança de aproximadamente 95% com as demais Lys49-PLA<sub>2</sub>s botrópicas (Toyama et al., 1998). A comparação dessa seqüência de resíduos é baseada no modelo de numeração de uma PLA<sub>2</sub> pancreática de bovinos (Duffon & Hider, 1983; Renetseder et al., 1985; Arni & Ward, 1996). A estrutura terciária dessas proteínas (Fig. 19) é caracterizada por uma região N-terminal, representada pela

primeira  $\alpha$ -hélice (H1), cujos resíduos formam o canal hidrofóbico da toxina. Posteriormente, há uma hélice curta (*short helix*) acompanhada de uma região conservada denominada *loop* de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ , embora tal ligação não ocorra nas Lys49-PLA<sub>2</sub>s. Em seguida, há a segunda  $\alpha$ -hélice (H2) vinculada a duas fitas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta$ -*sheet* ou  $\beta$ -*wing*). Estas fitas estão acopladas à terceira  $\alpha$ -hélice (H3), seguida finalmente pela região (*loop*) C-terminal (Arni & Ward, 1996; Ward et al., 1998). Além disso, do mesmo modo que outras Lys49-PLA<sub>2</sub>s botrópicas, a PrTX-I apresenta-se na forma dimérica (da Silva-Giotto et al., 1998; Arni et al., 1999; dos Santos et al., 2009), provavelmente em decorrência das interações entre os resíduos das regiões N-terminal e  $\beta$ -*wing* dos monômeros (Arni et al., 1995; Arni & Ward, 1996).



**Fig. 19** - Estrutura de um monômero de Lys49-PLA<sub>2</sub> e seus componentes. Figura desenvolvida por Carlos Alexandre Henrique Fernandes através do programa PyMOL (DeLano, 2002).

As Lys49-PLA<sub>2</sub>s possuem um amplo espectro de atividades biológicas, tais como miotóxica, edematogênica e bactericida (Toyama et al., 1998; Soares et al., 2001; Cavalcante et al., 2007). Embora sejam miotoxinas não-neurotóxicas (Lomonte et al., 2003, Montecucco et al., 2008), várias Lys49-PLA<sub>2</sub>s induzem bloqueio neuromuscular em preparações isoladas de diferentes espécies (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Heluany et al., 1992, Cavalcante et al., 2007; Gallacci et al., 2006). Em concordância com esses achados, observou-se, no presente estudo, que a PrTX-I induziu decréscimo da amplitude das contrações diretas ( $\cong$  83%) e indiretas ( $\cong$  89%) na preparação frênico-diafragma de camundongos. Tais efeitos foram acompanhados de lesões em aproximadamente 35% das fibras musculares. O paralelismo no estabelecimento dos efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* da PrTX-I, observado neste trabalho, foi previamente descrito para esta e outras Lys49-PLA<sub>2</sub>s (Soares et al., 2000<sup>a,b</sup>; de Oliveira et al., 2003; Gallacci et al., 2006; Stábile et al., 2006; Cavalcante et al., 2007; Randazzo-Moura et al., 2008).

Embora o mecanismo de ação das Lys49-PLA<sub>2</sub>s não esteja totalmente elucidado, sugere-se que os efeitos miotóxico e paralisante sejam decorrentes da capacidade dessas toxinas em desestabilizar membranas (Gallacci & Cavalcante, 2010). Diversos estudos apontam o sarcolema como o local inicial de ação das Lys49-PLA<sub>2</sub>s (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). De acordo com esta hipótese, ocorreria inicialmente uma interação eletrostática entre os sítios catiônicos das toxinas e regiões do sarcolema carregadas negativamente (Mebs & Ownby, 1990; Díaz et al., 1991; Rufini et al., 1992; Johnson & Ownby, 1993), com o envolvimento dos resíduos de aminoácidos básicos da região C-terminal (Lomonte et al., 1994<sup>a</sup>; Núñez et al., 2001; Chioato et al., 2002; Lomonte et al., 2003) e dos resíduos da  $\alpha$ -hélice da região N-terminal (Díaz et al., 1994; Kato et al., 1994). Em seguida, as Lys49-PLA<sub>2</sub>s penetrariam



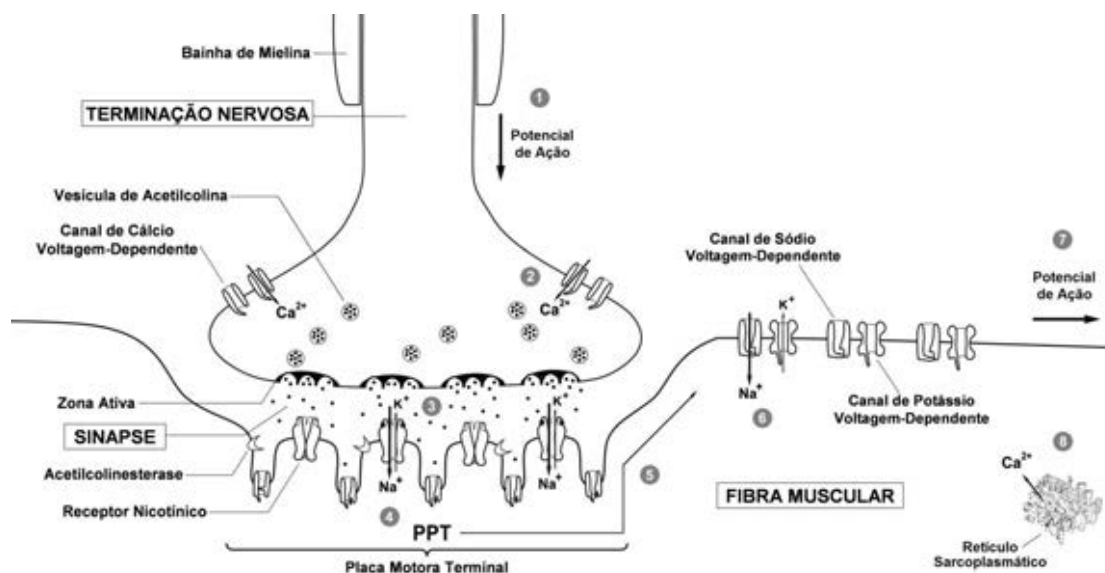
na bicamada lipídica do sarcolema por interação hidrofóbica, mediada por uma região citolítica da toxina (Lomonte et al., 1994<sup>a</sup>, 1999, 2003). Devido à grande flexibilidade entre seus monômeros, essas toxinas sofrem alterações conformacionais em sua estrutura quaternária (da Silva Giotto et al., 1998; Magro et al., 2003). Assim, após a interação entre a miotoxina e a fibra muscular, essas alterações conformacionais da toxina promoveriam a desorganização da bicamada lipídica do sarcolema, desestabilizando-a e induzindo seu rompimento.

A desestabilização da membrana celular resulta, inicialmente, na perda da regulação da permeabilidade a íons e macromoléculas (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). Desse modo, ocorre despolarização celular, provavelmente, em virtude do re-equilíbrio dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Montecucco et al., 2008; Gallacci & Cavalcante, 2010). A perturbação da membrana promove também o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o interior da fibra muscular (Gutiérrez & Ownby, 2003; Villalobos et al., 2007). Ainda, a despolarização, desencadeada pelo influxo de  $\text{Na}^+$ , pode influenciar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares (Johnson & Ownby, 1994). Assim, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmático gera uma série de eventos, tais como contratação muscular (Rodrigues-Simioni et al., 1983; Heluany et al., 1992), hipercontração de miofilamentos, danos mitocondriais e ativação de proteases e fosfolipases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999), que ampliam o processo de lesão muscular (Gutiérrez & Ownby, 2003; Montecucco et al., 2008). Recentemente, Cintra-Francischinelli e colaboradores (2010) demonstraram a participação do ATP na mionecrose induzida pelas Lys49-PLA<sub>2</sub>s. Assim, sugeriu-se que o ATP, liberado pelo sarcolema lesado, se difunde para locais distantes e ativa receptores purinérgicos  $\text{P}_{2\text{X}}$  na fibra muscular, aumentando a condutância para os íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Burnstock,

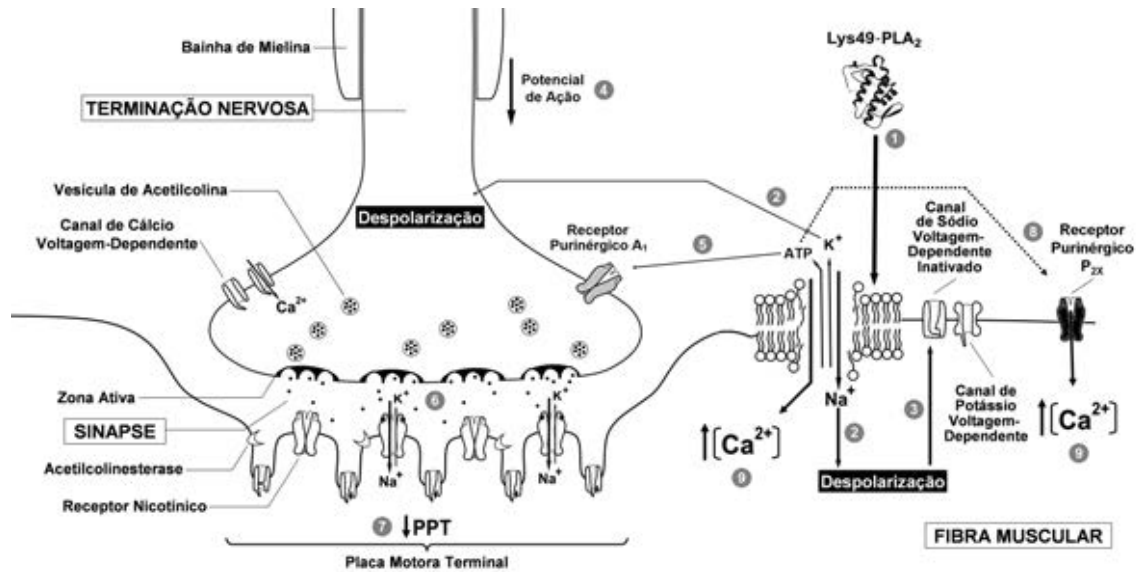
2007; Di Virgilio, 2007; Abbracchio et al., 2009; Cintra-Francischinelli et al., 2010). O fluxo destes íons, conforme discutido anteriormente, causa despolarização e amplifica o processo de lesão muscular em regiões afastadas do ponto de interação da toxina com o sarcolema.

A análise dos dados disponíveis na literatura levou à hipótese de que a desestabilização de membrana, promovida pelas Lys49-PLA<sub>2</sub>s, desempenharia também um papel crucial no estabelecimento da paralisia muscular *in vitro* (Gallacci & Cavalcante, 2010). Vale ressaltar que o processo de transmissão neuromuscular envolve uma série de eventos elétricos e químicos que resultam na contração muscular, como ilustrado na Figura 20. Brevemente, a despolarização da terminação nervosa motora, pelo potencial de ação, promove a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes e o influxo deste íon para o meio intracelular. A concentração elevada do Ca<sup>2+</sup> citoplasmático causa a liberação exocitótica de acetilcolina. Este mediador se difunde pela fenda sináptica, interagindo com receptores nicotínicos presentes na região da placa motora da fibra muscular. Como consequência, é gerada uma despolarização desta região, denominada potencial de placa terminal. Este potencial se difunde, de forma eletrotônica (passiva), para regiões adjacentes à placa motora (extra-juncional). A ativação de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes nestas regiões deflagra o potencial de ação muscular, que varre a fibra liberando íon Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático e, assim, inicia o processo de contração muscular. Como discutido anteriormente, o sarcolema é incapaz de realizar a regulação iônica normalmente na vigência das Lys49-PLA<sub>2</sub>s (Fig. 21). Deste modo, foi proposto que o influxo de Na<sup>+</sup> para o meio intracelular implicaria na despolarização persistente da fibra muscular e inativação dos canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes (Gallacci & Cavalcante, 2010). Conseqüentemente, seriam criadas áreas de inexcitabilidade no sarcolema, que se tornaria incapaz de gerar e

propagar os potenciais de ação necessários à contração da fibra (Gallacci & Cavalcante, 2010). O efluxo de  $K^+$  da fibra muscular poderia promover a despolarização persistente da terminação nervosa motora e, conseqüentemente, reduzir a liberação de acetilcolina, uma vez que os potenciais de ação gerados nestas condições são menores que o normal (Bowman & Rand, 1980; Gallacci & Cavalcante, 2010). Além disso, o ATP liberado pela fibra muscular lesada (Cintra-Francischinelli et al., 2010) poderia ativar receptores purinérgicos do tipo inibitório  $A_1$ , presentes na terminação nervosa (Correia de Sá et al., 1996) e, desta forma, contribuir para a redução da liberação de neurotransmissor. Portanto, é concebível que a desestabilização do sarcolema, promovida pelas Lys49-PLA<sub>2</sub>s, determine paralisia muscular *in vitro* por mecanismos pós- e/ou pré-sinápticos.



**Fig. 20** - Processo de transmissão neuromuscular (adaptado de Gallacci & Cavalcante, 2010). (1) Incidência do impulso nervoso na terminação nervosa. (2) Abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes e influxo do íon para o citoplasma. (3) Excitose da acetilcolina na fenda sináptica. (4) Interação da acetilcolina com o receptor nicotínico, fluxo iônico através do canal do receptor e geração do potencial de placa terminal (PPT). (5) Propagação passiva do PPT às regiões adjacentes. (6) Ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes. (7) Geração do potencial de ação no sarcolema. (8) Liberação de íon cálcio do retículo sarcoplasmático.



**Fig. 21** - Transmissão neuromuscular na vigência das Lys49-PLA<sub>2</sub>s (adaptado de Gallacci & Cavalcante, 2010). (1) Interação da toxina com a membrana e subsequente desestabilização estrutural. (2) Colapso dos gradientes iônicos e despolarização do sarcolema e da terminação nervosa, devido ao re-equilíbrio dos gradientes de sódio e potássio. (3) Inativação dos canais de sódio voltagem-dependentes e criação de áreas de inexcitabilidade elétrica. (4) Incidência do impulso nervoso na terminação despolarizada. (5) ATP liberado da fibra interage com os receptores inibitórios A<sub>1</sub>. (6) Eventos 4 e 5 levam à diminuição da liberação de acetilcolina. (7) Diminuição do potencial de placa (PPT). (8) ATP liberado da fibra interage com receptores P<sub>2X</sub>. (9) Aumento da concentração citoplasmática de cálcio pelo evento 8 e pelo influxo desse íon pelo sarcolema lesado, com conseqüente ampliação da lesão muscular.

Embora apresente efeito neurotóxico *in vitro*, as Lys49-PLA<sub>2</sub>s não manifestam tal efeito *in vivo* (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Além disso, essas toxinas promovem mionecrose local intensa, porém não são capazes de fazê-lo em níveis sistêmicos (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Isso pode decorrer da interação inespecífica das Lys49-PLA<sub>2</sub>s a diferentes tecidos (Bultrón et al., 1993; Lomonte et al., 1994<sup>c</sup>, 1999<sup>b</sup>), que impediriam o direcionamento dessas toxinas a outros sítios farmacológicos relevantes, tais como células musculares distantes ou terminações nervosas (Ponce-Soto et al., 2007). Assim, no presente estudo, foi possível observar neurotoxicidade, pois se

administrou a toxina diretamente na preparação neuromuscular de camundongos, prevenindo a orientação da mesma para outros sítios de ação.

No intuito de desafiar a possível relação entre os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, avaliou-se a interação de um exemplar dessas proteínas (PrTX-I) com potenciais antagonistas químicos, estratégia utilizada com êxito para investigar o mecanismo de ação e a relação estrutura/atividade dessas proteínas em diversos estudos (Melo & Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Lomonte et al., 1994<sup>a,b</sup>; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Melo & Ownby, 1999; Calil-Elias et al., 2002). Para tanto, testou-se a capacidade do ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido aristolóquico em neutralizar a paralisia muscular e a miotoxicidade, ambos *in vitro*.

O ácido rosmarínico é um composto polifenólico encontrado em várias espécies de plantas das famílias *Boraginaceae* e *Lamiaceae* (Petersen & Simmonds, 2003). Diversas propriedades biológicas têm sido descritas para este composto, inclusive a capacidade de neutralizar os efeitos inflamatório, miotóxico e hemorrágico de diferentes venenos ofídicos e de suas toxinas isoladas (Ticli et al., 2005; Aung et al., 2010, 2011).

Observou-se, no presente estudo, que o ácido rosmarínico reduziu em cerca de 94% o bloqueio das contrações indiretas promovido pela PrTX-I e inibiu em torno de 79% as lesões musculares causadas por essa toxina. Embora este composto apresente atividade anticolinesterásica (Orhan et al., 2008; Falé et al., 2009), a inibição da paralisia muscular provavelmente não está relacionada a esta ação, pois a concentração utilizada neste estudo é inferior às descritas na literatura para esta atividade (Orhan et al., 2008; Falé et al., 2009). O fato do ácido rosmarínico, administrado isoladamente, não proporcionar alterações significativas na amplitude das contrações musculares corrobora tal suposição. Em adição, estudos de eletroforese excluem a possibilidade de degradação proteolítica da toxina pelo composto (Ticli et al., 2005).

Em busca de um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na inibição da PrTX-I pelo ácido rosmarínico, foram realizados estudos de cristalografia em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural deste Instituto. Segundo dos Santos e colaboradores (2009), o mecanismo da atividade desestabilizadora de membranas promovida pelas Lys49-PLA<sub>2</sub>s, ou pelos seus complexos com inibidores, ocorre em duas etapas. Inicialmente, haveria a interação dos resíduos de Lys20, Lys115 e Arg118 da PLA<sub>2</sub> com as regiões polares dos fosfolipídios da membrana plasmática. Em seguida, ocorreria um rearranjo na forma quaternária da toxina permitindo que a cadeia longa dos fosfolipídios da membrana fosse inserida no canal hidrofóbico da PLA<sub>2</sub>. A estrutura cristalográfica do complexo PrTX-I/ácido rosmarínico mostra a toxina disposta na forma dimérica, com o ácido rosmarínico interagindo com a PrTX-I na entrada do canal hidrofóbico de um monômero e na região C-terminal do outro monômero. Tais observações sugerem uma relação estrita entre esses sítios das Lys49-PLA<sub>2</sub>s e, aliadas ao mecanismo proposto por dos Santos (2009), evidenciam como a disposição quaternária dos monômeros contribui para a atividade dessas toxinas. Em adição, os dados de cristalografia indicam que o bloqueio físico da entrada do canal hidrofóbico da PrTX-I, pelo ácido rosmarínico, também contribui na prevenção dos efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* desta toxina.

Do mesmo modo que o ácido rosmarínico, o ácido cafético é um composto derivado do ácido cinâmico (Mors et al., 2000) e é um dos dois fenilpropanóides constituintes do ácido rosmarínico (Aung et al., 2011). Diversas atividades biológicas foram descritas para o ácido cafético, como a capacidade em neutralizar a atividade hemorrágica (Aung et al., 2011) ou até mesmo como antídoto para venenos ofídicos (Agoro, 1978). Além disso, sabe-se que este composto pode apresentar ligações fortes com proteínas através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio com

subseqüente alteração conformacional das mesmas (Mors et al., 2000; Lans et al., 2001).

Apesar das evidências da ação antiofídica, o ácido caféico não se mostrou capaz de neutralizar o bloqueio neuromuscular promovido pela PrTX-I no presente estudo. No entanto, as lesões musculares induzidas pela PrTX-I foram parcialmente neutralizadas por este composto (em torno de 55%, 40% e 65%, respectivamente às proporções 1:½, 1:1 e 1:5, peso/peso). Shimabuku e colaboradores (2011) realizaram a co-cristalização da PrTX-I com o ácido caféico. A análise preliminar dessa estrutura mostrou que três moléculas de ácido caféico interagem com a PrTX-I, sendo que uma das moléculas estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos Lys20 e Arg118 do monômero A; uma segunda molécula estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos de Lys15, Lys20, Lys115 e Arg118 do monômero B; e uma terceira molécula interage com o resíduo Leu121 do monômero A e com a segunda molécula do ácido caféico que está interagindo com o monômero B (Fig. 17C). Como ilustrado nesta figura, os aminoácidos que interagem com as moléculas de ácido caféico encontram-se nas porções N-terminal e C-terminal da proteína, sobretudo com os aminoácidos Lys20, Lys115, Arg118 apontados como os constituintes de um sítio das Lys49-PLA<sub>2</sub>s de serpentes botrópicas, denominado “sítio miotóxico” por dos Santos e colaboradores (2009). No entanto, ressalva-se que este sítio está relacionado à atividade desestabilizadora de membrana destas proteínas e, conseqüentemente, a todos os efeitos decorrentes desta ação e não apenas ao efeito miotóxico. A análise da Figura 17 revela que em um dos monômeros (monômero B), há duas moléculas de ácido caféico e uma delas encontra-se no centro desse sítio, bloqueando o seu acesso. Além disso, as hidroxilas do grupo catecol do ácido caféico, região reativa desse composto (Scotti et al., 2007; Jardini et al., 2010), realiza interações com dois resíduos que compõem esse

sítio (Lys20, Arg118). Entretanto, no outro monômero (monômero A), há apenas uma molécula de ácido caféico que não interage com a Lys115, não bloqueando totalmente o acesso ao “sítio miotóxico”. Além disso, as hidroxilas do grupo catecol não interagem com nenhum aminoácido nesse monômero. A acessibilidade ao “sítio miotóxico” e a ausência de interações do grupo catecol do ácido caféico em um dos monômeros pode explicar a inibição apenas parcial da miotoxicidade e sua ineficiência em neutralizar a paralisia muscular. Por fim, a ausência de um agente bloqueador no canal hidrofóbico permitiria que uma cadeia longa de fosfolípidios de membrana entrasse no canal hidrofóbico, havendo um rearranjo de sua estrutura quaternária de modo a expor o “sítio miotóxico” à membrana do músculo.

Ao analisar em conjunto as considerações a respeito da influência do ácido rosmarínico e do ácido caféico sobre os efeitos da PrTX-I, bem como das estruturas desta proteína em interação com estes compostos, pode-se inferir que o efeito paralisante se mostrou mais susceptível à atividade desestabilizadora de membrana do que o efeito miotóxico. Em maior detalhamento, o ácido rosmarínico interagiu com dois sítios previamente descritos como inibidores da atividade das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, com conseqüente neutralização dos efeitos miotóxico e paralisante *in vitro*. Contudo, por interagir com apenas um desses sítios (e de forma incompleta), o ácido caféico não inibiu eficientemente a desestabilização de membrana. Deste modo, o ácido caféico neutralizou parcialmente as lesões musculares, sendo ineficaz à paralisia, evidenciando-a como mais susceptível à desestabilização de membrana promovida pela PrTX-I.

O ácido aristolóquico é um composto alcalóide encontrado nas raízes das plantas do gênero *Aristolochia* (Tsai et al., 1980; Martz, 1992; Mors et al., 2000). Foram descritas algumas propriedades biológicas para este composto, como a habilidade em neutralizar os efeitos hemolítico e edematogênico *in vitro* de venenos ofídicos e de suas



PLA<sub>2</sub>s (Tsai et al., 1975, 1980, Vishwanath et al., 1987<sup>a,b</sup>, 1988), com exceção de algumas PLA<sub>2</sub>s ácidas (Vishwanath et al., 1987<sup>b</sup>). Todavia, no presente trabalho, a análise da interação do ácido aristolóquico com a PrTX-I foi comprometida pela toxicidade deste composto sobre o músculo e a transmissão neuromuscular *in vitro*. Assim, quando pré-incubado com a toxina, na menor proporção (1:1, peso/peso), este composto não evitou a paralisia, porém inibiu parcialmente (em cerca de 40%) a lesão muscular. Isoladamente, em maior concentração (68,5 µg/mL), o ácido aristolóquico apresentou efeitos deletérios na preparação muscular e, paradoxalmente, promoveu facilitação das contrações musculares por um mecanismo desconhecido. A análise preliminar da estrutura cristalográfica da PrTX-I complexada com o ácido aristolóquico mostrou que uma molécula deste composto interage com a PrTX-I, através de ligações de hidrogênio com o resíduo Leu121 do monômero A e com os resíduos Leu10 e Gln11 do monômero B (Fig. 18B). Observa-se nesta figura que, apesar de interagir com um resíduo da porção C-terminal (Leu121), o ácido aristolóquico não interage com nenhum dos sítios de inibição de Lys49-PLA<sub>2</sub>s botrópicas previamente descritos (Marchi-Salvador et al., 2009): I) canal hidrofóbico (região do “sítio ativo”) e II) “sítio miotóxico”. O significado da interação do ácido aristolóquico com a PrTX-I fica na dependência de estudos funcionais, utilizando outras proporções deste composto, bem como de estudos de co-cristalização envolvendo outros ligantes capazes de interagir com a proteína em sítios estruturais semelhantes.

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo com a PrTX-I e os inibidores vegetais corroboram a hipótese de que os efeitos miotóxico e paralisante *in vitro* da Lys49-PLA<sub>2</sub>s sejam decorrentes da atividade desestabilizadora de membrana induzida por estas proteínas. Pode-se inferir também que resíduos de aminoácidos presentes no canal hidrofóbico e na região C-terminal das Lys49-PLA<sub>2</sub>s estão envolvidos nestes

efeitos. Ainda, a análise dos resultados sugere que o efeito paralisante *in vitro* é mais susceptível à despolarização celular, conseqüente à desestabilização de membrana, do que o efeito miotóxico. Sendo assim, a avaliação dos efeitos das Lys49-PLA<sub>2</sub>s sobre a transmissão neuromuscular *in vitro* é uma abordagem experimental útil para o estudo da atividade desestabilizadora de membrana destas proteínas.

Conclusões

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- O ácido rosmarínico é um potencial agente neutralizador das Lys49-PLA<sub>2</sub>.
- O ácido rosmarínico é uma importante ferramenta farmacológica para o estudo da relação estrutura/atividade das Lys49-PLA<sub>2</sub>s e, em união às informações obtidas através do ácido caféico, indicou o envolvimento do canal hidrofóbico e de uma porção da região C-terminal (“sítio miotóxico”) nas atividades miotóxica e bloqueadora da transmissão neuromuscular *in vitro* destas toxinas.
- O bloqueio da transmissão neuromuscular induzido pela PrTX-I decorre da despolarização da fibra muscular causada pela ação desestabilizadora de membrana desta toxina.
- O efeito paralisante muscular *in vitro*, em comparação ao efeito miotóxico, é mais susceptível à desestabilização de membranas promovida pela PrTX-I.

## Referências Bibliográficas

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: An overview. **Trends Neurosci.**, v.32, n.1, p.19-29, 2009.

AGORO, J.W. Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite. **US Patent. 4,124,724**, 1978.

AMARAL, C.F.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v.23, n.6, p.877-885, 1985.

ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; TULINSKY, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v.51, n.3, p.311-317, 1995.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub> - a structural review. **Toxicon**, v.34, n.8, p.827-841, 1996.

ARNI, R.K.; FONTES, M.R.M.; BARBERATO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; DÍAZ, C.; WARD, R.J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, **Arch. Biochem. Biophys.**, v.366, n.2, p.177-182, 1999.

AUNG, H.T.; NIKAI, T.; NIWA, M.; TAKAYA, Y. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **J. Nat. Med.**, v.64, n.4, p.482-486, 2010.

AUNG, H.T.; FURUKAWA, T.; NIKAI, T.; NIWA, M.; TAKAYA, Y. Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage. **Bioorg. Med. Chem.**, v.19, n.7, p.2392-2396, 2010.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v.7, p.121-209, 1989.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v.62, n.3, p.325-372, 1994.

BOLAÑOS, R. **Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica**. São José: Editorial Universidad de Costa Rica, 1ª Ed., 1984.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v.127, n.1, p.21-30, 2000.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*). **Toxicon**, v.39, n.12, p.1863-1869, 2001.

BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. Striated muscle and neuromuscular transmission. **Textbook of pharmacology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980.

BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), 2ª Ed., 2001.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 8ª Ed., 2010.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico: tratamento de mordeduras das cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v.13, p.265-278, 1903.

BRÜNGER, A.T.; ADAMS, P.D.; CLORE, G.M.; DELANO, W.L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; JIANG, J.S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU,

N.S.; READ, R.J.; RICE, L.M.; SIMONSON, T.; WARREN, G.L. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v.54, n.5, p.905-921, 1998.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. 1946. **Br. J. Pharmacol.**, v.120, s.4, p.3-26, 1997.

BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J.M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A<sub>2</sub>, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**, v.31, n.2, p.217-222, 1993.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v.50, p.S237-S242, 2009.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v.87, n.2, p.659-797, 2007.

CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P.A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. **Histol. Histopathol.**, v.17, n.2, p.463-470, 2002.

CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur**, v.8, p.275-291, 1894.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **Venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Comstock/Cornell Press, 1989.

CAVALCANTE, W.L.; CAMPOS, T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, n.3, p.490-497, 2007.



CHENG, A.C.; CURRIE, B.J. Venomous snakebites worldwide with a focus on the Australia-Pacific region: current management and controversies. **J. Intensive Care Med.**, v.19, n.5, p.259-269, 2004.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; SÁ, J.M.; WARD, R.J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochem. J.**, v.366, n.3, p.971-976, 2002.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. World Health Organ.**, v.76, n.5, p.515-524, 1998.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MONTECUCCO, C. *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.107 n.32, p.14140-14145, 2010.

CORREIA DE SÁ, P.; TIMÓTEO, M.A.; RIBEIRO, P.A.; Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. **J. Neurophysiol.**, v.76, n.6, p.3910-3919, 1996.

DA SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v.41, n.2, p.251-255, 2003.

DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.; DE AZEVEDO JÚNIOR, W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue. **Proteins**, v.30, n.4, p.442-454, 1998.

DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, 2002.

DE OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W.L.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; DAL-PAI SILVA, M.; GALLACCI, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v.42, n.4, p.373-379, 2003.

DE OLIVEIRA, R.C.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.6-21, 2009.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOOFEN, V. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971.

DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, L.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, p.153-168, 1989.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A<sub>2</sub>, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1070, n.2, p.455-460, 1991.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> reduces its membrane-destabilizing effect. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.312, n.2, p.336-339, 1994.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X<sub>7</sub> and the inflammasome. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.28, n.9, p.465-472, 2007.

DOS SANTOS J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol.**, v.167, n.2, p.106-116, 2009.

DOS SANTOS, J.I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R.J.; FERNANDES, C.A.; PIZZO, P.; CINTRA, A.C.; BRAZ, A.S.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A<sub>2</sub> class. **Proteins**, v.79, n.1, p.61-78, 2011.

DUFTON, M.J.; HIDER, R.C. Classification of phospholipases A<sub>2</sub> according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. **Eur. J. Biochem.**, v.137, n.3, p.545-551, 1983.

FALÉ, P.L.; BORGES, C.; MADEIRA, P.J.A.; ASCENSÃO, L.; ARAÚJO, M.E.M.; FLORÊNCIO, M.H.; SERRALHEIRO, M.L.M. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). **Food Chem.**, v.144, n.3, p.798-805, 2009.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.81-95, 2009.

GALLACCI, M.; OLIVEIRA, M.; DAL PAI-SILVA, M.; CAVALCANTE, W.L.; SPENCER, P.J. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.57, n.3, p.239-245, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.84, n.1, p.159-164, 1986.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; GENÉ, J.A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z.; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, n.7, p.735-745, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1405-1424, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 Years of research in Latin America. **Rev. Biol. Trop.**, v.50, n.2, p.377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v.42, n.8, p.915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.; WARREL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.**, v.3, n.6, p.e150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A., MARANGONI, S., LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, v.51, n.1, p.80-92, 2008.

HANSDAK, S.G.; LALLAR, K.S.; POKHAREL, P.; SHYANGWA, P.; KARKI, P.; KOIRALA, S. A clinico-epidemiological study of snake bite in Nepal. **Trop. Doct.**, v.28, n.4, p.233-226, 1998.

HELUANY, N.F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a

component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v.30, n.10, p.1203-1210, 1992.

HOLLAND, D.R.; CLANCY, L.L.; MUCHMORE, S.W.; RYDEL, T.J.; EINSPAHR, H.M.; FINZEL, B.C.; HEINRICKSON, R.L.; WATENPAUGH, K.D. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Å, resolution. **J. Biol. Chem.**, v.265, n.29, p.17649-17656, 1990.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, n.7, p.615-627, 1988.

JARDINI, F.A.; DE LIMA, A.; MENDONÇA, R.M.Z.; PINTO, R.J.; MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO, J. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.): atividade antioxidante e redutora das células MDCK. **Alim. Nutr.**, v.10, n.4, p.509-517, 2010.

JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. **Toxicon**, v.2, n.3, p.155-166, 1964.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon**, v.31, n.3, p.243-255, 1993.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. 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.**, v.107, n.3, p.359-366, 1994.

JONES, T.A.; BERGDOLL, M.; KJELDGAARD, M. O: a macromolecule modeling environment. In: EALICK, S.; BUGG, C.E. (Eds.). **Crystallographic and modeling methods in molecular design**. New York: Springer-Verlag, p.189-195, 1990.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A.; O'CONNELL, J.L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (*Viperidae*). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.93, n.4, p.401-408, 1999.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.278, n.2, p.319-325, 1990.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, v.5, n.11, p.e218, 2008.

KATO, T.; LEE, S.; OISHI, O.; AOYAGI, H.; OHNO, M. Interactions of N-terminal fragments of groups I and II phospholipases A<sub>2</sub> with phospholipid bilayers and their surface recognition properties. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1211, n.2, p.215-220, 1994.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v.42, n.8, p.827-840, 2003.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A.L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v.202, n.3, p.1165-1168, 1991.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.1, p.10, 2001.

LIU, C.S.; CHEN, J.M.; CHANG, C.H.; CHEN, S.W.; TENG, C.M.; Tsai, I.H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1071, n.3, p.362-370, 1991.

LEI, X.; BARBOUR, S.E.; RAMANADHAM, S. Group VIA  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase  $A_2$  (iPLA $_2\beta$ ) and its role in  $\beta$ -cell programmed cell death. **Biochimie**, v.92, n.6, p.627-637, 2010.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MACCARANA, M. 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.**, v.269, n.47, p.29867-29873, 1994<sup>a</sup>.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L.A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases  $A_2$  from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v.47, n.9, p.1509-1518, 1994<sup>b</sup>.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase  $A_2$  of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.32, n.11, p.1359-1369, 1994<sup>c</sup>.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ANGULO, Y.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase  $A_2$  expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vivo* myotoxic effect. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1461, n.1, p.19-26, 1999.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J.J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases  $A_2$  on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, v.37, n.1, p.145-158, 1999<sup>b</sup>.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase  $A_2$  myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, n.8, p.885-901, 2003.

MACPHERSON, A. **Preparation and analysis of proteins crystals**. New York: Wiley, 1982.

MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, n.3, p.713-720, 2003.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LCHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n.5, p.615-626, 1995.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F.J.; HEINRICKSON, R.L. A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. **J. Biol. Chem.**, v.259, n.22, p.13839-13843, 1984.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.H.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of a phospholipase A<sub>2</sub> homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1794, n.11, p.1583-1590, 2009.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, n.10, p.1131-1142, 1992.

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

MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F.I.; BATISTA, C.V.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L.D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaovermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. **Toxicon**, v.47, n.7, p.797-811, 2006.



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

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

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. **Toxicon**, v.37, n.1, p.199-215, 1999.

MILANI-JÚNIOR, R.; JORGE, M.T.; CAMPOS, F.P.F.; MARTINS, F.P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J.L.C.; RIBEIRO, L.A.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; SANO-MARTINS, I.S.; CARDOSO, D.; FERNANDEZ, I.C.O.F.; FERNANDES, J.C.; ALFRED, V.L.; SANDOVAL, M.P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, v.90, n.5, p.323-334, 1997.

MOOLENAAR, W.H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F.R.; ZONDAG, G.C. Lysophosphatidic acid: G-protein signaling and cellular responses. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.9, n.2, p.168-173, 1997.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.65, n.18, p.2897-2912, 2008.

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

MOURA DA SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v.28, n.11, p.1293-1301, 1990.

MURIKAMI, M.T.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; MARTINEZ, A.B.; CALIL-ELIAS, S.; TOMAZ, M.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J. Mol. Biol.**, v.350, n.3, 416-426, 2005.

MURIKAMI, M.T.; VIÇOTI, M.M.; ABREGO, J.R.B.; LOURENZONI, M.R.; CINTRA, A.C.O.; ARRUDA, E.Z.; TOMAZ, M.A.; MELO, P.A.; ARNI, R.K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues. **Toxicon**, v.49, n.3, 378-387, 2007.

NAVAZA, J. AMoRe: an automed package for molecular replacement. **Acta Crystallogr. A**, v.50, p.157-163, 1994.

NÚÑEZ, C.E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v.39, n.10, p.1587-1594, 2001.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **J. Ethnopharmacol.**, v.98, n.1-2, p.213-216, 2005.

ORHAN, I.; ASLAN, S.; KARTAL, M.; ŞENER, B.; BAŞER, K.H.C. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. **Food Chem.**, v.108, n.2, p.663-668, 2008

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, F.L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1107-1114, 2002.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In **Methods in Enzymology**, v.276, p.307-326, 1997.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v.37, n.3, p.411-445, 1999.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v.62, n.2, p.121-125, 2003.

PINHO, F.M.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.47, n.1, p.24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C, MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1770, n.4, p.585-593, 2007.

POSTM, F.R.; JALINK, K.; HENGELVED, T.; BOT, A.G.; ALBLAS, J.; DE JONGE, H.R.; MOOLENAAR, W.H. Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. **EMBO J.**, v.15, n.1, p.63-72, 1996.

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein J.**, v.27, n.6, p.355-362, 2008.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, n.1, p.11627-11636, 1985.

RESENDE, C.C.; ARAÚJO, F.A.A.; SALLE-NAVE, R.N.U.R. **Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos**. Brasília, Ministério da Saúde (MS), Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde (SNABS), 1989.

RIBEIRO, L.A.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; ALBUQUERQUE, M.J.; TAKAOKA, N.Y. Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.39, p.4-7, 1993.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T.; IVERSSON, L.B. Epidemiology of poisonons snake-bites: a study of cases assisted in 1988. **Rev. Saúde Pública**, v.29, n.5, p.380-388, 1995.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v.10, n.2, p.475-489, 1983.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA A.C.; GIGLIO, J.R.; JIANG, M.S.; FLETCHER, J.E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1479-1489, 1995.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEN, V. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, v.2, 1971.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1990.

ROTHSCHILD, A.M.; ROTHSCCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snake Venoms**. New York: Springer-Verlag, 1979.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J.Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v.31, n.49, p.12424-12430, 1992.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS E.A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1761, n.11, p.1246–1259, 2006.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. **Science**, v.250, n.4987, p.1541-1546, 1990.

SCOTT, D.L.; ACHARI, A.; VIDAL, J.C.; SIGLER, P.B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistridon piscivorus piscivorus*. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.31, p.22645-22657, 1992.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.D.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.D.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling applied to the development of molecules with antioxidant activity for cosmetic use. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.43, n.2, 2007.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.; DE SOUZA, G.E.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28, n.3, p.261-273, 1990.

SERTIÉ, J.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATILDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Med.**, v.54, n.1, p.7-10, 1988.

SHIMABUKU, P.S.; FERNANDES, C.A.H.; MAGRO, A.J.; COSTA, T.R; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase  $A_2$  complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v.67, n.2, p.249-252, 2011.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase  $A_2$  enzymes: classification and characterization. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1488, n.1-2, p.1-19, 2000.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**, 8<sup>a</sup> Ed. Iowa, Iowa State University Press, 1989.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase  $A_2$  homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, n.1, p.7-15, 2000<sup>a</sup>.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase  $A_2$  homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, n.2, p.201-209, 2000<sup>b</sup>.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases  $A_2$  from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.387, n.2, p.188-196, 2001.

SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. Chemical modifications of phospholipases  $A_2$  from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v.42, n.8, p.855-868, 2003.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.142, n.3-4, p.371-381, 2006.

SWAROOP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bull. World Health Organ.**, v.10, n.1, p.35-76, 1954

THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Crisis in snake antivenom supply for Africa. **Lancet**, v.356, n.9247, p.2104, 2000.

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v.46, n.3, p.318-327, 2005.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.**, v.17, n.7, p.713-8, 1998.

TSAI, L.H.; LIU, H.J.; YANG, C.P.; CHANG, C. Inactivation of Formosan snake venoms *in vitro* by crude extract of *Aristolochia radix*. **J. Formosan Med. Assoc.**, v.74, p.352-360, 1975.

TSAI, L.H.; YANG, L.L.; CHEN, C. Inactivation of Formosan snake venoms *in vivo* by aristolochic acid. **Formosan Sci.**, v.34, p.40-44, 1980.

TSAI, I.H.; WANG, Y.M.; CHEN, Y.H.; TSAI, T.S.; TU, M.C. Venom phospholipases A<sub>2</sub> of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic

variations and evidence of multiple ancestries. **Biochem. J.**, v.377, n.1, p.215-223, 2004.

VAN DEENEN, L.L.M.; DE HAAS, G.H. The substrate specificity of phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochim. Biophys. Acta**, v.70, p.538-553, 1963.

VILLALOBOS, J.C.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> 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**, v.21, n.8, p.1382-1389, 2007.

VISHWANATH, B.S.; APPU RAO, A.G.; GOWDA, T.V. Interaction of phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera russelli* venom with aristolochic acid: a circular dichroism study. **Toxicon**, v.25, n.9, p.939-946, 1987<sup>a</sup>.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from habu (*Trimeresurus flavoridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, v.25, n.5, p.501-515, 1987<sup>b</sup>.

VISHWANATH, B.S.; FAWZY, A.A.; FRANSON, R.C. Edema-inducing activity of phospholipase A<sub>2</sub> purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**, v.12, n.6, p.549-561, 1988.

WAITE, M. The phospholipases. In: WAITE, M. (Ed.). **Handbook of lipid research**. New York: Plenum Press, 1987.

WARD, R.J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v.362, n.1, p.89-96, 2002.

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: BON, C.; GOYFFON, M. (Eds.). **Envenomings and their treatments**. Lyon: Fondation Marcel Mérieux, 1996.



WHITE, J. Bites and stings from venomous animals: a global overview. **Ther. Drug Monit.**, v.22, n.1, p.65-68, 2000.

WHITE, S.P.; SCOTT, D.L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Crystal structure of cobra-venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v.250, n.4987, p.1560-1563, 1990.

WHO, 2011. **Snakebite**. Geneva, World Health Organization (WHO), Neglected Diseases, Diseases covered by NTD Department. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html).