



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

***Avaliação da atividade antiofídica do
composto p-cumarato de triacontila isolado
de *Bombacopsis glabra* e da toxicidade aguda do
extrato de *Schizolobium parahyba****

Mirian Machado Mendes

Uberlândia–MG
Dezembro—2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

***Avaliação da atividade antiofídica do
composto p-cumarato de triacontila isolado
de *Bombacopsis glabra* e da toxicidade aguda do
extrato de *Schizolobium parahyba****

Mirian Machado Mendes

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia–MG
Dezembro—2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- M538a Mendes, Mirian Machado, 1981-
Avaliação da atividade antiofídica do composto *p*-cumarato de triacontila isolado de *Bombacopsis glabra* e da toxicidade aguda extrato de *Schizolobium parahyba* / Mirian Machado Mendes. – 2011.
135 f. : il.
- Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses.
3. Plantas medicinais - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MIRIAN MACHADO MENDES

Avaliação da atividade antiofídica do composto p-cumarato de triacontila isolado de *Bombacopsis glabra* e da toxicidade aguda do extrato de *Schizolobium parahyba*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Dra.: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Dr. Fábio de Oliveira

Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro

Dra. Márcia Helena Borges

Dr. Marcos Roberto de Matos Fontes

Data da Defesa: 22/07/2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

*“Pesquisa é ver o que todos os outros veem;
e pensar o que ninguém pensou”*

Albert Szent-Gyorgyi

Dedicatória

A DEUS

Que me conhece antes da minha formação

Que me dá ânimo para enfrentar todas as lutas

Que me dá força para levantar mesmo depois das derrotas

Que misericordiosamente me concedeu e tem concedido muito mais vitórias.

*“E eu desistiria da eternidade para tocar você
Pois eu sei que de algum modo, você me sente
Você é o mais próximo do céu que eu já estive”*

Íris – Goo Goo Dolls

*Ao Ricardo, meu querido e amado namorado, cúmplice e amigo em quem encontro
qualidades e princípios raros. Tenho muito a agradecer pelo amor, paciência e carinho a
mim dedicados.*

Aos meus pais: Mãe você faz parte dessa conquista e as palavras são poucas para expressar minha gratidão. Pai se você estivesse aqui sei que estaria muito orgulhoso e pensando o quanto me pareço com você, e teria razão. Obrigada, vocês sempre permanecerão sendo meu referencial.

Agradecimentos

“Não sou para todos. Gosto muito do meu mundinho. Ele é cheio de surpresas, palavras soltas e cores misturadas. Às vezes tem um céu azul, outras tempestade. Lá dentro cabem sonhos de todos os tamanhos. Mas não cabe muita gente. Todas as pessoas que estão dentro dele não estão por acaso.”

Caio Fernando Abreu

- ☛ À Dra. Veridiana de Melo Rodrigues pela orientação, pela disponibilidade e pelas sugestões e questionamentos valiosos.
- ☛ À Dra. Amélia Hamaguchi, uma grande pessoa. Obrigada por me dar tantos exemplos de profissionalismo, por dizer sempre a opinião certa na hora certa. Você é um exemplo não só profissional para mim.
- ☛ À professora Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo pela oportunidade de começar a trabalhar com Bioquímica. Por me ensinar tanto e sempre ter palavras para nos animar a buscar novos resultados. Tenho muito a agradecer pela confiança e pela oportunidade de conhecer “a pesquisa científica”.
- ☛ À Dra. Vandelúcia Fonseca pela doação do composto *p*-cumarato de triacontila e pela colaboração valiosa.
- ☛ À Dra. Tânia Machado de Alcântara pelo valioso auxílio com as análises histológicas, pela simpatia e disponibilidade.
- ☛ À Dra. Ana Moura pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no Instituto Butantã.
- ☛ Ao Dr. Marcos Fontes, por nos ajudar a fazer esse trabalho ainda mais bonito com os estudos de modelagem molecular
- ☛ À Dra. Cristiani Baldo pela ajuda, simpatia e pelos miligramas de jararagina.

- ☺ À Tiana, minha mãezona no Laboratório, uma grande pessoa que é sábia como poucas, dona de uma alegria autêntica. Sua simplicidade e bondade são cativantes.
- ☺ À Sâmela minha querida amiga e minha filha baiana. Sempre me lembro de quanto a gente trabalhou e de quanto a gente se divertia todos os dias. Você disse que acha que foi Deus que nos aproximou, eu tenho certeza!
- ☺ Ao Lamartine, meu fiel co-piloto e filho adotivo. Querido, obrigada por “tantas ajudas” e risadas. Você tem um lugar especial no rol de amigos.
- ☺ À Lívia, minha filha caçula. Você sabe como nossa amizade é importante para mim. Obrigada por tudo.
- ☺ Ao Professor Luiz Fernando com quem pude estabelecer colaborações científicas recompensadoras. Ao meu amigo Luiz, que me ensinou muito sobre amizade e que apesar das “pedras no caminho” continuamos na mesma estrada.
- ☺ À amiga Leijiane Figueira que tanto me auxiliou no Instituto Butantã.
- ☺ À Marina que apesar de pouco tempo no laboratório está sempre disposta a ajudar. É muito bom ter você conosco.
- ☺ À Suelen e ao Thales pelo carinho e amizade.
- ☺ Ao David, Francis e Lino pela agradável convivência.
- ☺ Aos funcionários do Instituto: Cleuber, Madson, Gerson e Dona Nenzinha.
- ☺ À Biotécnica Ltda pelos kits gentilmente doados para a realização deste trabalho.
- ☺ À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação) e á Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio financeiro.

“Se por um instante Deus se esquecesse de que sou uma marioneta de trapos e me presenteasse com mais um pedaço de vida, eu aproveitaria esse tempo o mais que pudesse... Possivelmente não diria tudo o que penso, mas definitivamente pensaria tudo o que digo. Daria valor às coisas, não por aquilo que valem, mas pelo que significam. Dormiria pouco, sonharia mais, porque entendo que por cada minuto que fechamos os olhos, perdemos sessenta segundos de luz. Andaria quando os demais se detivessem, acordaria quando os demais dormissem. Se Deus me presenteasse com um pedaço de vida, deitava-me ao sol, deixando a descoberto, não somente o meu corpo, como também a minha alma. Aos homens, eu provaria quão equivocados estão ao pensar que deixam de se enamorar quando envelhecem, sem saberem que envelhecem quando deixam de se enamorar... A um menino eu daria-lhe asas, apenas lhe pediria que aprendesse a voar. Aos velhos ensinaria que a morte não chega com o fim da vida, mas sim com o esquecimento. Tantas coisas aprendi com Vós homens... Aprendi que todo o mundo quer viver no cimo da montanha, sem saber que a verdadeira felicidade está na forma de subir a escarpa. Aprendi que quando um recém nascido aperta com a sua pequena mão, pela primeira vez, o dedo do seu pai, agarrou-o para sempre. Aprendi que um homem só tem direito a olhar o outro de cima para baixo, quando está a ajudá-lo a levantar-se. São tantas as coisas que pude aprender com Vocês, mas agora, realmente de pouco me irão servir, porque quando me guardarem dentro dessa caixa, infelizmente estarei morrendo. Sempre diz o que sentes e faz o que pensas. Supondo que hoje seria a última vez que te vou ver dormir, te abraçaria fortemente e rezaria ao Senhor para poder ser o guardião da tua alma. Supondo que estes são os últimos minutos que te vejo, diria-te “Amo-te” e não assumiria, loucamente, que já o sabes. Sempre existe um amanhã em que a vida nos dá outra oportunidade para fazermos as coisas bem, mas pensando que hoje é tudo o que nos resta, gostaria de dizer-te o quanto te quero, que nunca te esquecerei. O amanhã não está assegurado a ninguém, jovens ou velhos. Hoje pode ser a última vez que vejas aqueles que amas. Por isso, não esperes mais, fá-lo hoje, porque o amanhã pode nunca chegar. Senão, lamentarás o dia em que não tiveste tempo para um sorriso, um abraço, um beijo e o teres estado muito ocupado para atenderes esse último desejo. Mantém os que amas junto de ti, diz-lhes ao ouvido o muito que precisas deles, o quanto lhes queres e trata-os bem, aproveita para lhes dizer, “perdoa-me”, “por favor”, “obrigado” e todas as palavras de amor que conheces. Não serás recordado pelos teus pensamentos secretos. Pedê ao Senhor a força e a sabedoria para os expressar. Demonstra aos teus amigos e seres queridos o quanto são importantes para ti”.

Gabriel Garcia Marques

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1: Fundamentação teórica – Peçonhas botrópicas e botropóicas, suas toxinas e ações	4
1.1 Histórico	5
1.2 Epidemiologia, classificação e importância médica	6
1.3 A peçonha	7
1.4 Aspectos estruturais e funcionais das principais toxinas presentes nas peçonhas de serpentes	11
1.4.1 PLA ₂	11
1.4.2 Serinoproteases	15
1.4.3 Metaloproteases	17
1.5 Necrose local após o envenenamento ofídico	26
1.6 A terapia	28
1.7 Referências	32
Capítulo 2: O metabolismo secundário vegetal e plantas antiofídicas	41
2.1 Os Extratos Vegetais	42
2.2 Metabolismo secundário	43
2.3 Os terpenos	44
2.4 Os compostos nitrogenados	46

2.5	Os compostos fenólicos	47
2.6	O estudo de plantas medicinais e sua toxicidade	47
2.7	Plantas com potencial antiofídico	50
2.8	Referências	57

Capitulo 3: Triacontil <i>p</i>-Coumarate isolated from <i>Bombacopsis glabra</i> vegetal extract: A novel inhibitor of Snake Venoms Metalloproteinases		63
3.1	Introduction	66
3.2	Material and methods	69
3.2.1	Animals	69
3.2.2	Ethical aspects	69
3.2.3	Snake venom and toxins	69
3.2.4	<i>Bombacopsis glabra</i> vegetal extract and Triacontil <i>p</i> -Coumarate	70
3.2.5	Inhibition of "in vitro"and "in vivo"assays	70
3.3	"In vitro"activities	70
3.3.1	Coagulant activity	70
3.3.2	PLA ₂ activity	71
3.3.3	Fibrinogenolytic activity	71
3.4	"In vivo"activities	71
3.4.1	Plasma fibrinogen determination	71
3.4.2	Hemorrhagic activity	72
3.4.3	Myotoxic activity	72
3.4.4	Histopathological alterations	72
3.5	Molecular Docking Studies	73
3.5.1	Metalloproteinase Neuwiedase modeling	73

3.5.2	Triacontil <i>p</i> -coumarate (PCT) in silico design and docking simulations	73
3.5.3	Molecular dynamics simulations	74
3.5.4	Evaluation of the theoretical structural models	75
3.6	Statistical analysis	75
3.7	Results and Discussion	75
3.8	Concluding Remarks	82
3.9	Acknowledgements	82
3.10	Referências	89

Capitulo 4: Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice100

4.1	Introduction	102
4.2	Material and Methods	102
4.2.1	Plant extract	102
4.2.2	Animals	103
4.2.3	Acute toxicity assays	103
4.2.4	Biochemical and hematological parameters	103
4.2.5	Histopathological analysis	104
4.2.6	Statistical analysis	104
4.3	Results and Discussion	104
4.4	Acknowledgements	107
4.5	Referências	109

Anexos **113**

Lista de Figuras

1	Desenho da glândula de peçonha	8
2	Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando a presa inoculadora de peçonha	8
3	A composição das peçonhas ofídicas	10
4	PLA ₂ de <i>Bothrops jararacussu</i>	12
5	Ação da fosfolipase A ₂ sobre fosfolípido de membrana	13
6	Estrutura representativa do fibrinogênio	16
7	Família das Zinco-peptidases	18
8	Diagrama esquemático da divisão das metaloproteases das peçonhas de serpentes	20
9	Classificação das SVMs	21
10	Mecanismo Cisteína Switch ou mecanismo de velcro	22
11	Mecanismo de catálise das SVMs	23
12	Características morfológicas da apoptose e da necrose	26
13	Representação da molécula de Imunoglobulina e seus fragmentos	30
14	Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários	45
15	Rota do ácido chiquímico	48
16	<i>Schizolobium parahyba</i>	51
17	Flavonois e catecois isolados do extrato aquoso de folhas de <i>Schizolobium parahyba</i>	52

18	Inibição de 2 Doses Mínimas Hemorrágicas da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>	53
19	Modelagem molecular da galocatequina e da toxina BnSP-6	53
20	<i>Bombacopsis glabra</i>	54
21	<i>p</i> -cumarato de triacontila.	54
22	<i>Bombacopsis glabra</i> and Triacontil <i>p</i> -Coumarate structure	76
23	Inhibition of the fibrinolytic activity of <i>Bothropoides pauloensis</i> . . .	83
24	Inhibition of myotoxic activity induced by <i>Bothropoides pauloensis</i> . . .	84
25	Inhibition of hemorrhagic activity induced by 3 MDH (minimum hemorrhagic doses) of <i>Bothropoides pauloensis</i> venom or Jararhagin	85
26	Histopathological analysis of sections of gastronimus mice muscle inoculated with Jarharagin	86
27	C ^α atom root mean square deviation (r.m.s.d.) of the docking solution .	87
28	PCT docking solutions obtained after the simulations	88
29	Histopathological analysis of liver of male Swiss mice	108

Lista de Tabelas

1	Biochemical profile and hematological parameters of mice treated with <i>Schilozobium parahyba</i> aqueous extract by <i>i.p.</i> route.	106
---	--	-----

Lista de Abreviaturas

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransaminase
Bg	<i>Bombacopsis glabra</i>
Bp	<i>Bothrops pauloensis</i>
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
DMH	dose minima hemorrágica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico
jar	jararagina
new	Newviedase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato salina
PCT	<i>p</i> -cumarato de triacontila
PLA ₂	fosfolipase A ₂ (E.C.3.1.1.4)
RBC	eritrócitos (Red Blood Cell)
Sp	<i>Schizolobium parahyba</i>
SVMP	'snake venom metalloproteinases'
SVSP	'snake venom serino proteinase'
TP	tempo de protrombina
WBC	leucócitos (White Blood Cell)

Apresentação

As plantas medicinais constituem um reservatório de princípios ativos que podem ser usados como remédios para uma infinidade de patologias. A busca de plantas úteis para a saúde humana nos conhecimentos populares é de grande importância para a ciência, uma vez que essas informações podem indicar quais as plantas que podem atuar sobre determinadas doenças. A comunidade científica mundial e do Brasil nos últimos anos têm reconhecido a magnitude da importância do estudo das plantas de nossa flora.

Os envenenamentos ofídicos constituem um problema de saúde pública, sendo reconhecida como uma doença negligenciada no mundo. Devido à grande incidência de acidentes e a gravidade dos efeitos, as vítimas de envenenamentos ofídicos podem chegar ao óbito ou muitas vezes sofrem perdas de tecido ou mesmo a amputação de membros atingidos, principalmente em acidentes com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides*.

A única terapia disponível para tratar as vítimas é a soroterapia, que infelizmente não consegue reverter os efeitos locais principalmente de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides*, devido à dificuldade de difusão do soro até os tecidos, a rápida difusão das toxinas ao redor do local da picada e a baixa concentração de anticorpos presentes no local da picada.

Outro problema enfrentado em relação ao uso do soro é que muitas vezes sua disponibilidade está relacionada a existência de serviços formais de saúde e não está disponível para populações de regiões mais distantes e carentes, restando a essas pessoas tratamentos alternativos, como o uso de plantas que podem ou não exibir o efeito esperado.

Muitas plantas já foram estudadas quanto ao seu potencial antiofídico e muitas apresentam grande potencial neutralizante sobre as principais atividades lesivas causadas pelas toxinas de peçonhas ofídicas. Este trabalho possui dois objetivos gerais. O primeiro objetivo foi avaliar a capacidade do extrato de *Bombacopsis glabra* e seu composto isolado, o *p*-cumarato de triacontila em inibir os principais efeitos enzimáticos e biológicos da peçonha de *Bothrops pauloensis*, bem como a atividade de algumas toxinas isoladas. O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda do extrato de *Schizolobium parahyba* por meio de dosagens bioquímicas e análises

histopatológicas.

Casos de intoxicações com plantas são bastante comuns, já que no imaginário popular as plantas medicinais atuam praticamente de forma mágica não exibindo teoricamente nenhum efeito colateral ou prejudicial á saúde de quem as consome. Entretanto, isso não corresponde á verdade. As plantas, como todo produto estranho ao organismo, provocam respostas que podem ser benéficas ou não. Assim, o estudo da toxicidade de plantas usadas como remédios deve ser realizado a fim de conhecer se os efeitos benéficos induzidos pela planta e seus princípios ativos compensam realmente seu uso.

Schizolobium parahyba é uma espécie que ocorre em regiões de Mata Atlântica, conhecida popularmente por guapuruvú ou umbela. As folhas e sementes de *S. parahyba* são utilizadas na região do Triângulo Mineiro (Minas Gerais) contra o ofidismo na forma de chás e infusões e recentemente nosso grupo de pesquisa validou cientificamente o potencial antiofídico do extrato dessa planta.

A apresentação desse trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (anexos, página 114). A tese foi dividida em: **Capítulo 1** e **Capítulo 2** que são revisões de literatura sobre as peçonhas ofídicas e metabolismo secundário vegetal, respectivamente. O **Capítulo 3** consiste em um artigo de título “**Triacontil *p*-Coumarate isolated from *Bombacopsis glabra* vegetal extract: A novel inhibitor of Snake Venoms Metalloproteinases**” a ser submetido para publicação após a defesa de doutorado. O **Capítulo 4**, intitulado “**Estudo da toxicidade aguda do extrato de *Schizolobium parahyba***” foi publicado no ano de 2010 na revista *Phytotherapy research*.

Capítulo 1

Fundamentação teórica – Peçonhas botrópicas e botropóicas, suas toxinas e ações

1.1 Histórico

As serpentes, desde muitos séculos, despertam o interesse do homem. Entretanto, os primeiros relatos sobre a história natural desses animais são carregados de fantasia. Os primeiros relatos que fazem menção a serpentes estão nos escritos de Aristóteles (384–322 a.C), reunidos em nove volumes em “*Historia Animalium*”^[1].

As primeiras informações da literatura sobre experimentos com peçonhas de serpentes foram publicadas em 1664 pelo italiano Francesco Reidi (1626–1696). Nesses relatos ele descreveu a cor amarelada e a consistência das peçonhas de serpentes, bem como a morfologia dos dentes, narrando de forma minuciosa suas observações. Foi Reidi também que fez as primeiras observações que alguns animais sobreviviam ao envenenamento. Além disso, fez também diferenciações das serpentes em peçonhentas e não peçonhentas, usando como caráter definidor a dentição^[1].

Um século depois, Abbé Felice Fontana por meio de observações, estudos anatômicos e experimentos com a peçonha da serpente *Vipera berus* ou *Vipera aspis* escreveu o primeiro texto moderno de Toxinologia, o clássico “*Traité sur Le Vénin de La Vipère*” em 1781. Nestes estudos ele descreveu a glândula venenífera, os ductos que levavam a peçonha aos dentes caniculados e a descrição do mecanismo pelo qual os dentes se articulam para inocular a peçonha. Além dos estudos morfológicos, ensaiou experimentos com animais e relatou as ações miotóxica, hemorrágica, bem como a capacidade dessa peçonha de promover a coagulação do sangue ou aumentar sua fluidez^[1, 2]. Por isso Abbé Felice Fontana é considerado o fundador da Toxinologia moderna.

No Brasil, durante o período de colonização os portugueses inicialmente idealizavam o paraíso devido à exuberância da paisagem, após meio século da descoberta os relatos enviados a metrópole sofrem modificações, pois eram permeados de apreensão devido à presença de muitos animais estranhos aos olhos dos europeus e entre os animais citados estão as serpentes como mostra a carta de José de Anchieta em 31 de maio de 1560^[3].

“[...] há os que são desconhecidos nessa parte do mundo. Primeiramente direi das diversas espécies de cobras venenosas. Umas chamam se jararacas, muitíssimo

frequentes nos campos e nos matos e até nas próprias casas onde muitas vezes encontramos; cuja mordedura mata no espaço de 24 horas [...]”

Hoje, as serpentes ainda despertam o fascínio tanto pelo risco que oferecem e pela letalidade das peçonhas, quanto pela beleza e comportamento. Entretanto as serpentes podem ser admiradas também pela infinidade de compostos farmacologicamente ativos que têm sido descobertos em suas peçonhas, sendo que muitos destes com aplicações na saúde humana.

1.2 Epidemiologia, classificação e importância médica

Há atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil estão representadas 10 famílias, 70 gêneros e 371 espécies correspondendo cerca de 10% do total de espécies conhecidas (SBH, 2010). Duas das 10 famílias existentes no Brasil apresentam serpentes peçonhentas, a família Elapidae e Viperidae. Na família Viperidae estão presentes os gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Caudisona*, *Rhinocerophis* e *Lachesis*^[4].

Em 2009 o gênero *Bothrops* foi reclassificado de acordo com características morfológicas e moleculares, como análise do DNA mitocondrial. A revisão classificou algumas serpentes antes botrópicas como pertencendo a um novo gênero, o gênero *Bothropoides* com 11 espécies (*B. alcatraz*, *B. diporus*, *B. erythronelas*, *B. insularis*, *B. lutzii*, *B. matogrossensis*, *B. pubescebs*, *B. pauloensis*, *B. neuwiedi*, *B. marmoratus* e *B. jararaca*), e o gênero *Bothrops* agora composto de 17 espécies (*B. andianus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. brasiliis*, *B. caribbaeus*, *B. isabelae*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. muriciensis*, *B. osbornei*, *B. pirajai*, *B. punctatus*, *B. sanctaecrucis*, e *B. venezuelensis*)^[4].

A espécie atualmente denominada *Bothropoides pauloensis* era descrita como *Bothrops neuwiedi pauloensis*^[5], uma das doze subespécies do complexo *Bothrops neuwiedi* (*B. n. bolivianus*, *B. n. diporus*, *B. n. goyazensis*, *B.n. lutzii*, *B. n. matogrossensi*, *B. n. meridionalis*, *B n. neuwied*, *B. n. paranaensis*, *B. n. pauloensis*, *B. n. piauhyensis*, *B. n. pubescens* e *B n. urutu*). No ano de 2000 após uma revisão

sistemática, as 12 subespécies foram elevadas a sete espécies distintas, dentre elas a espécie *Bothrops pauloensis*^[6]. Essa classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia-SBH (2005) e hoje após a última revisão *Bothrops pauloensis* se tornou *Bothropoides pauloensis*^[4, 7].

Os gêneros *Bothrops* e *Bothropoides* estão distribuídos do sul do México até a Argentina e em algumas ilhas do Caribe^[8]. As principais espécies responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil são *Bothrops alternatus*(*Rinocerocephis alternatus*), *Bothrops atrox*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi*^[3].

Estima-se que acidentes ofídicos afetem mais que 2,5 milhões de pessoas anualmente no mundo, ou seja, mais que 100 mil pessoas diariamente são picadas por serpentes^[9]. No Brasil a epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos. A maioria desses acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops* e *Bothropoides* (90,5%), seguido dos gêneros *Crotalus* (*Crotalus*) (7,7%), *Lachesis*(1,4%) e *Micrurus* (0,4%)^[10]. No Triângulo Mineiro, os acidentes ofídicos confirmados foram causados principalmente por serpentes das espécies: *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi*^[11, 12].

O envenenamento ofídico é um problema de saúde pública sendo considerado como uma das doenças negligenciadas^[13]. Tais doenças tendem a ser endêmicas em populações de baixa renda, representando, portanto, um problema latente na África, Ásia e nas Américas. A adoção do adjetivo “negligenciada” tomou como base o fato de que tais enfermidades não despertam o interesse das grandes empresas farmacêuticas para a produção de medicamentos e vacinas. Além disso, a pesquisa neste setor não conta com recursos suficientes, o que gera a escassez dos métodos de profilaxia disponíveis em todo o mundo.

1.3 A peçonha

As peçonhas de serpentes são representadas por misturas complexas constituídas principalmente por proteínas com atividade enzimática ou não. As enzimas atuam nas

peçonhas em concentrações variáveis, com a função de promover a penetração da peçonha no organismo causando lise celular, quer de forma direta ou indireta, visando a paralisia e digestão da presa^[3].

As peçonhas ofídicas são produzidas nas glândulas veneníferas que são um tipo de especialização de glândulas salivares^[15].

A glândula venenífera (Figura 1) é diretamente conectada por ductos aos dentes inoculadores de peçonha. As serpentes da família Viperidae são solenóglifas, ou seja, apresentam um dente funcional bastante especializado, agudo, capaz de se mover 90° no momento do ataque. Esse dente é percorrido em toda sua extensão por um canalículo por onde a peçonha é conduzida durante a inoculação na presa como mostra a Figura 2^[3].

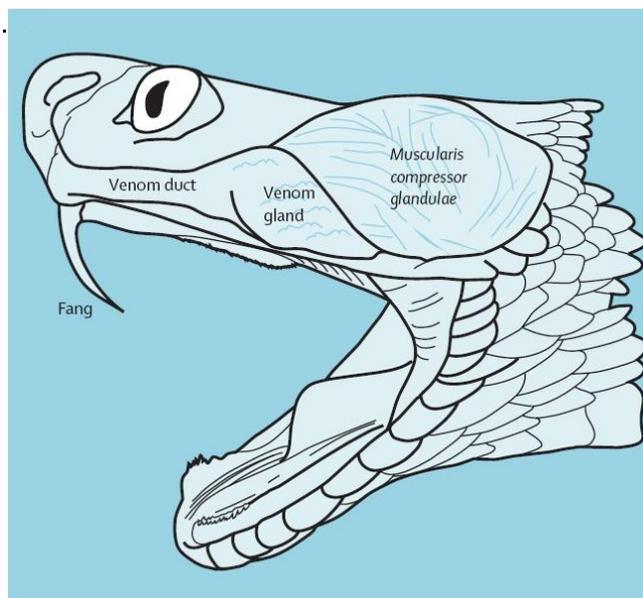


Figura 1: Desenho da glândula de peçonha.

Fonte: Warrell (2010)^[14]

As proteínas que compõe as peçonhas de serpentes são sintetizadas no citoplasma das células secretoras presentes nas glândulas veneníferas. Enquanto essas proteínas ainda estão sendo formadas pela adição de aminoácidos a cadeia polipeptídica, mesmo estando aderidas aos ribossomos, são direcionadas para o retículo endoplasmático, onde serão liberadas para o lúmen dessa organela^[16].

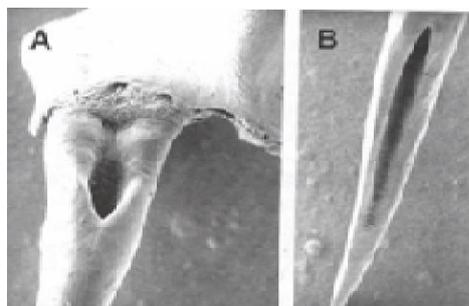


Figura 2: Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando a presa inoculadora de peçonha. (A) Orifício completamente fechado por onde a peçonha entra ao sair da glândula. (B) Extremidade apical da presa, com abertura longa em forma de bisel. Fonte: Cardoso (2003)^[3].

De modo geral, todas as proteínas secretórias de animais são endereçadas ao retículo endoplasmático através de uma pequena sequência peptídica (peptídeo sinal) que possui entre 16 e 30 aminoácidos. Tipicamente a sequência está na região N terminal da proteína e contém 1 ou 2 resíduos carregados, seguidos de 6 a 12 resíduos hidrofóbicos. Essa sequência forma um sítio de ligação que é crítico para a interação da estrutura protéica e os receptores da membrana do retículo. Essa sequência é clivada da proteína após esta ser capturada pelo receptor de membrana e entrar parcialmente no retículo endoplasmático; embora ela ainda permaneça aderida ao ribossomo sofrendo o processo de acréscimo de resíduos de aminoácidos. As proteínas nascentes em seguida chegam ao lúmen do retículo onde finalizam seu “folding” tridimensional muitas vezes auxiliadas por complexos protéicos, como as chaperonas. Dentro do retículo, as proteínas também terão as condições para a formação das pontes dissulfeto, bem como a glicosilação e a multimerização^[17].

Depois de sintetizadas e enoveladas, as proteínas partem do retículo endoplasmático em direção ao complexo de Golgi dentro de pequenas vesículas transportadoras resultado de exocitoses do retículo. Essas vesículas se ligam à face “cis” do complexo de Golgi e dentro deste ocorre o processamento proteolítico das proteínas. As proteínas então deixam as cisternas de Golgi e são levadas e liberadas por vesículas até o lúmen da glândula^[17].

As glândulas de serpentes peçonhentas produzem uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que 90 a 95% de seus constituintes são proteínas compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas, as quais podem exercer diferentes atividades biológicas e farmacológicas^[18]. Além das proteínas nas peçonhas é possível encontrar também em pequena quantidade compostos inorgânicos como íons cálcio, ferro potássio, magnésio sódio e zinco, além de compostos orgânicos de baixa massa molecular como carboidratos, aminas e aminoácidos^[19].

De acordo com as características funcionais e estruturais, as proteínas e peptídeos existentes nas peçonhas de serpentes podem ser divididos em diferentes classes como fosfolipases A₂, miotoxinas, metaloproteases, serinoproteases, L-amino oxidases, desintegrinas, peptídeos potencializadores de bradicinina, fosfodiesterases, colineste-

rases, hialuronidases, dentre outras (Figura 3)^[19].

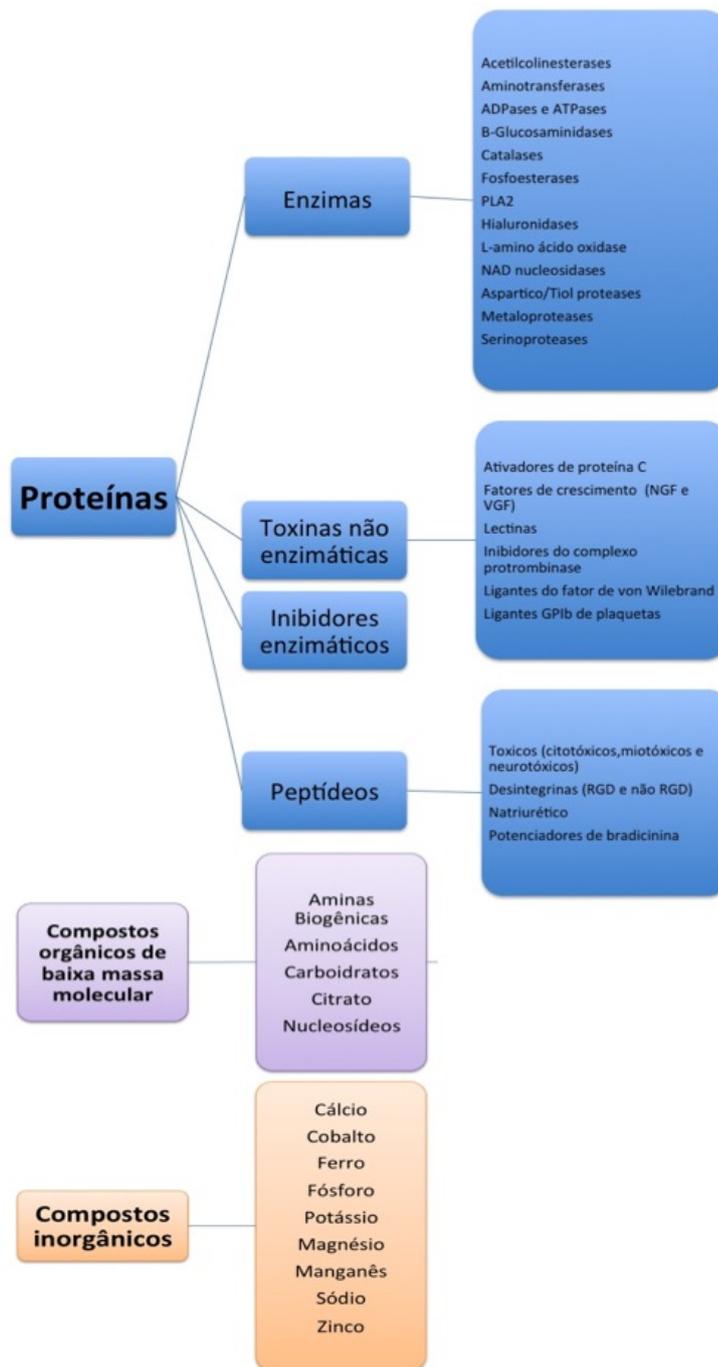


Figura 3: A composição das peçonhas ofídicas. Fonte: Adaptado de Ramos & Araujo (2006)^[19].

Nas peçonhas botrópicas e botropóicas, essas proteínas são responsáveis principalmente por danos teciduais no local de inoculação da peçonha e distúrbios sistêmicos. No local da picada um intenso e característico quadro de dano tecidual se instala

devido ao surgimento de edema acentuado e progressivo além de dor intensa e manifestações hemorrágicas percebidas com sangramento no local da picada, sendo que o quadro pode evoluir para necrose severa^[10, 20, 21, 22]. Os efeitos locais são provocados por ação direta e indireta das toxinas e enzimas dessas peçonhas.

Os distúrbios sistêmicos resultam de severas alterações na hemostasia levando as vítimas de envenenamentos mais graves a apresentarem prolongamento do tempo de coagulação e sangramentos em locais distantes da picada, causando gengivorragia, hematêmese e hematúria^[3]. Casos de gengivorragia, petéquias, hematúria são observados em casos graves de envenenamento, quando grande quantidade de peçonha foi inoculada. Mais tardiamente se observa a incoagulabilidade sanguínea^[10].

1.4 Aspectos estruturais e funcionais das principais toxinas presentes nas peçonhas de serpentes

1.4.1 PLA₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂), presentes nas peçonhas de serpentes podem representar entre 29 a 45% da peçonha botrópica e botropóica^[23]. Podem ser encontradas também em peçonhas de artrópodes e no suco pancreático^[24]. Estas enzimas apresentam importante papel no catabolismo dos lipídios da dieta e no metabolismo geral de lipídios estruturais de membrana.

As PLA₂ são encontradas em diferentes organismos vivos e estas são classificadas em 15 grupos diferentes que incluem cinco tipos diferentes de proteínas; PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ cálcio independentes (iPLA₂), PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ lisossomais (PLA_{2s}), PLA₂ tipo acetilhidrolases de fatores ativadoras de plaquetas (PAF-AH)^[25].

As PLA₂ citosólicas (cPLA₂) são proteínas com massa entre 61 e 114 kDa, possuem um resíduo de Serina essencial para catálise. As PLA₂ cálcio independentes (iPLA₂) e as PLA₂ tipo acetilhidrolases de fatores ativadoras de plaquetas (PAF-AH) também apresentam o resíduo de serina catalítico. As PLA₂ lisossomais (PLA_{2s})

apresentam uma tríade catalítica Serina-Histidina-Asparagina^[25].

PLA₂ de serpentes secretadas (sPLA₂) são monômeros de 14 a 18 kDa ou como homodímeros de aproximadamente 28 kDa. Todas PLA₂ são enzimas com estrutura terciária rígida devido a presença de 5 a 8 pontes dissulfeto^[26], conferindo a estas enzimas grande estabilidade. As PLA₂ presentes nas peçonhas de serpentes são classificadas em dois grupos I e II, sendo que as toxinas representantes do grupo I são isoladas de peçonhas elapídicas, enquanto as PLA₂ do grupo II são encontradas nas peçonhas de serpentes da família Viperidae^[25, 27].

Essas enzimas necessitam de íons cálcio como cofator para estarem ativas cataliticamente^[25]. O íon cálcio fica coordenado por meio de interações fracas dentro de um arcabouço formado por uma díade catalítica formada pelos aminoácidos His48 e Asp49, altamente conservados nas PLA₂ (Figura 4). As sPLA₂ possuem duas grandes α -hélices (α -hélice 2 e α -hélice 3) ligadas por pontes dissulfeto e apresentam uma região hidrofóbica na superfície da enzima formada pelos resíduos de aminoácidos His48, Asp49,99, Tyr52 formando um “loop” de ligação do cálcio que compreende a região catalítica da molécula^[25, 28]

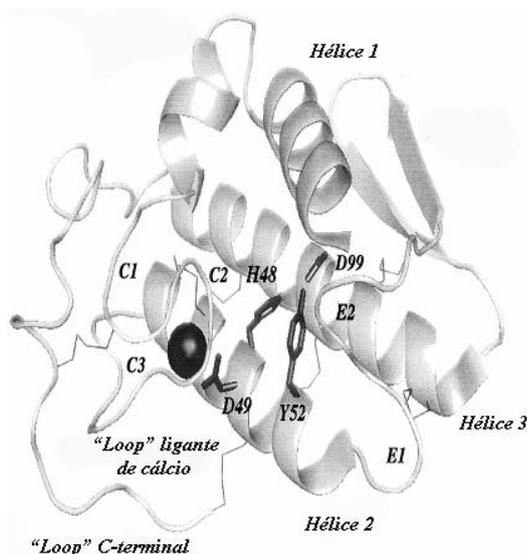


Figura 4: PLA₂ de *Bothrops jararacussu*. Os aminoácidos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99. A esfera representa o íon cálcio, as linhas finas representam as pontes dissulfeto. Fonte: Murakami & Arni (2003)^[28].

PLA₂ são enzimas hidrolíticas que clivam fosfolipídios, hidrolisando a ligação acil

na posição sn-2 do fosfoglicerídio (Figura 5). A hidrólise envolve os resíduos de His48 e Asp49 que ativam uma molécula de água estruturalmente conservada e desse modo se inicia um ataque nucleofílico na posição sn-2 do fosfolípido. Nesse instante, é formado um intermediário tetraédrico no sítio ativo que é estabilizado pelo cálcio ligado ao resíduo de Asp49^[27, 29]. O produto liberado dessa reação é o ácido araquidônico, o qual pode originar os eicosanóides como prostaglandinas, tromboxano A₂ e leucotrienos^[30].

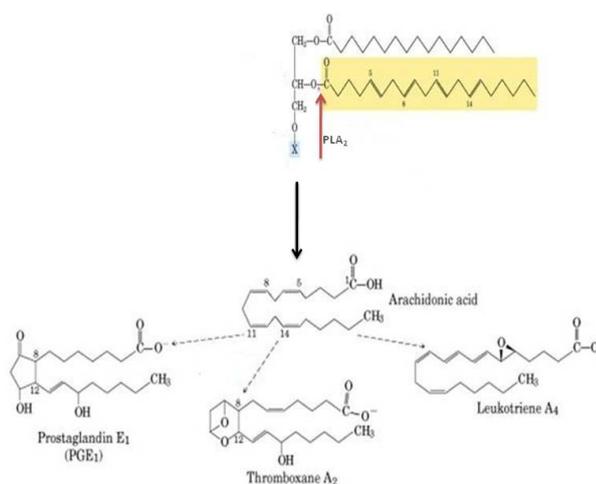


Figura 5: Ação da fosfolipase A₂ sobre fosfolípido de membrana. Fonte: Nelson & Cox (2002)^[31].

A formação das prostaglandinas e tromboxanos é catalisada pelas Ciclooxygenases (Cox) e a produção dos leucotrienos é mediada pela ação das Lipoxigenases (Lox)^[32]. Esses eicosanóides são importantes mediadores pró-inflamatórios, sendo também causadores da resposta inflamatória causada pelos envenenamentos ofídicos^[33].

A substituição do resíduo de Asp49 da cadeia polipeptídica da PLA₂ pode significar a perda da interação com o cálcio e a consequente perda de atividade catalítica da enzima. Essas enzimas podem ser classificadas como Asp49 ou Lys49 dependendo do resíduo de aminoácidos na posição 49. Enquanto as Lys49 possuem pouca ou nenhuma atividade catalítica, as PLA₂ Asp49 são enzimaticamente ativas^[34]. A carga negativa do resíduo aspartato possibilita que íons cálcio se liguem as PLA₂, atuando como um cofator que estabiliza um intermediário tetraédrico durante a reação

catalítica^[35] propiciando a catálise.

Além da substituição do resíduo de Asp49 por Lys49 comumente encontrado em fosfolipases A₂ foram isoladas toxinas dessa classe com substituição do resíduo da posição 49 por resíduos de Serina como na toxina Escaforin S isolada de *Echis carinatus sochureki*^[36] e Ammodytin L, isolada de *Vipera ammodytes ammodyte*^[37]. Ainda foram descobertas PLA₂ Asn49, tais como TsR6 e cTs-R6 purificadas da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* e TM-N49 isolada de *Protobothrops mucrosquamatus*^[38] e a única PLA₂ Arg49, a Zhaoermiatoxin isolada da peçonha de *Zhaoermia mangshanensis*^[39].

As fosfolipases A₂ além da atividade enzimática são capazes de induzir um largo espectro de efeitos farmacológicos como, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise, edema, ação anticoagulante e mionecrose^[40, 41].

A mionecrose ou necrose muscular é uma característica comum de envenenamento por espécies botrópicas e botropóicas. Segundo MEBS & OWNBY (1990)^[42], miotoxicidade pode ser definida como uma ação específica de PLA₂ no músculo esquelético, afetando somente fibras musculares, sendo que outros tecidos como tecido conjuntivo, nervos e vasos permanecem essencialmente intactos.

O mecanismo molecular pelo qual as PLA₂ induzem a necrose muscular foi proposto inicialmente por GUTIÉRREZ et al. (1995)^[43]. Os autores propuseram que as miotoxinas Lys-49 se ligam a sítios não identificados na membrana sarcoplasmática, provocando interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina com grupos carregados negativamente na membrana. Em seguida, a miotoxina penetraria na bicamada por meio de interações hidrofóbicas fazendo com que a região citotóxica da molécula cause a desorganização e conseqüente rompimento da membrana plasmática. O rompimento da membrana levaria a perda da permeabilidade seletiva, causando um grande influxo de íons cálcio na célula, o que provoca uma série de processos degenerativos, que levam a um rápido efluxo de moléculas citosólicas como: creatina kinase, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, mioglobina e creatinina^[44, 45].

Para explicar a grande diversidade de efeitos farmacológicos induzidos pelas PLA₂ foi proposto que estas moléculas teriam sítios ou moléculas alvo^[40, 46], ou seja, cada tecido em particular apresentaria sítios alvos específicos na superfície celular onde as

PLA₂ poderiam se ancorar e desenvolver sua atividade. Esses sítios de reconhecimento definem o local onde a região C-terminal da toxina se ancoraria na membrana plasmática. Essa teoria se baseia no estabelecimento de interações eletrostáticas em decorrência das cargas negativas dos fosfolipídeos de membrana e essas cargas seriam capazes de provocar um rearranjo da região C terminal de forma a possibilitar a penetração da toxina na bicamada lipídica^[47, 29].

1.4.2 Serinoproteases

As peçonhas botropóicas e botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas, tais como serinoproteases e metaloproteases. As serinoproteases (Snake Venom Serino-Proteases – SVSP) são enzimas que afetam o sistema hemostático das vítimas de acidentes ofídicos, podendo alterar a agregação plaquetária, a coagulação sanguínea, a pressão sanguínea e a fibrinólise^[48].

Essas enzimas podem representar até 20% do conteúdo proteico total de algumas peçonhas da família Viperidae^[49]. Geralmente contêm aproximadamente 230 resíduos de aminoácidos dos quais 12 resíduos são de cisteína, sendo que 10 formam pontes dissulfeto. Possuem entre 50 e 80% de identidade estrutural^[50]. São sintetizadas na forma de zimogênios, com um peptídeo sinal de 18 aminoácidos e um peptídeo de inativação com 6 resíduos (Gln-Lys-Ser-Ser-Glu-Leu)^[51].

As serinoproteases têm um mecanismo catalítico comum que usa um resíduo de serina altamente conservado e reativo que desempenha um papel chave na formação de um grupo acil transiente que é estabilizado na presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio catalítico^[51].

As serinoproteases de peçonhas ofídicas podem promover diversas alterações na coagulação sanguínea e no sistema fibrinolítico. Atuam como ativadoras dos fatores da coagulação sanguínea, tais como protrombina, fator X, VII, V. Podem também ativar o plaminogênio promovendo a formação de plasmina, uma enzima chave no processo da fibrinólise^[50, 52].

Algumas serinoproteases são inativadoras de inibidores de serinoproteases en-

dógenos que são responsáveis por regular o processo de coagulação e fibrinólise^[50]. Uma das funções mais bem descritas para algumas das serinoproteases é sua capacidade de exercer ação semelhante a da trombina, ou seja, promover a quebra do fibrinogênio em fibrina (Figura 6). Estas serinoproteases são chamadas de 'thrombin-like' (SVSP-TL) Apesar da ação semelhante a da trombina essas toxinas compartilham apenas 33% de identidade estrutural^[50, 53]. e são capazes de clivar apenas uma das cadeias do fibrinogênio.

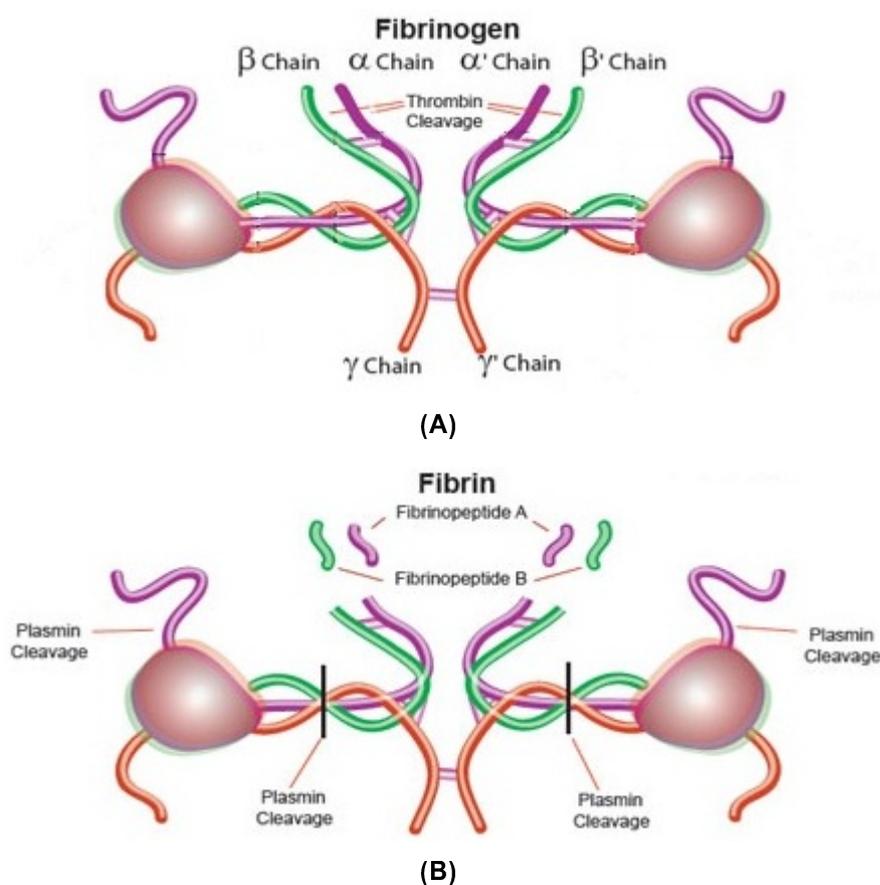


Figura 6: Estrutura representativa do fibrinogênio e fibrina. **(A)** Estrutura das cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ do fibrinogênio. **(B)** molécula de fibrina e os fibrinopeptídeos liberados e os sítios de clivagem da plasmina. Fonte: www.cironline.ru/guzov/pic/SFMC/fibrinogeneave, acesso em 28/03/2011.

A clivagem do fibrinogênio pela trombina acontece entre os resíduos de Arg16 e Glu17 liberando 2 fibrinopeptídeos e uma molécula de fibrina^[51]. Em decorrência das SVSPs 'thrombin-like' não promoverem a dupla clivagem dos fibrinopeptídeos (em sua maioria) e não ativarem o fator XIII da cascata de coagulação o coágulo formado pela ação destas enzimas é um coágulo com aparência frouxa, diferente do coágulo

formado pela ação da trombina [51, 54].

As SVSP são as principais responsáveis pelas drásticas interferências na cascata de coagulação sanguínea estando diretamente relacionadas ao quadro de coagulopatia bastante comum dos envenenamentos ofídicos mais severos [50, 55, 56].

A coagulopatia é uma das maiores complicações dos acidentes com serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae que resulta principalmente do sinergismo das enzimas 'thrombin-like' e procoagulantes [9, 48, 55]. Como essas enzimas provocam o consumo de fibrinogênio, o resultado é que frequentemente as vítimas de envenenamento apresentam o sangue incoagulável [55, 57]. Quando administradas "in vivo" causam efeito desfibrinogenante, tornando o sangue incoagulável por diminuírem o estoque de fibrinogênio plasmático, sendo utilizadas na medicina como agente antitrombótico. Quando ensaiadas "in vitro" apresentam ação procoagulante [48].

Estes efeitos permitiram a utilização das proteínas das peçonhas para a aplicação terapêutica como é o caso do medicamento Reptilase[®] que foi desenvolvido a partir de uma toxina isolada da peçonha de *B. atrox*. Reptilase é usado como agente desfibrinogenante em pacientes vítimas de trombose [58]. Serinoproteases são usadas também na produção de cola de fibrina usada em cirurgias onde não é possível se realizar suturas [59].

Os distúrbios no sistema hemostático já haviam sido observados por Fontana em 1700 [1]. Hoje, por meio de ensaios simples como determinação do tempo de coagulação do sangue ou plasma é possível detectar essa ação. A quantificação de fibrinogênio plasmático é outra maneira de se avaliar os efeitos de serinoproteases, bem como outras toxinas capazes de causar a hidrólise do fibrinogênio, direta ou indiretamente. Também é possível avaliar a ação das SVSPs na cascata de coagulação, verificando se essas alterações acontecem no nível da via extrínseca ou intrínseca por meio da avaliação do tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada, respectivamente [60].

1.4.3 Metaloproteases

As metaloproteases constituem outra importante classe de enzimas proteolíticas representando até 32% do proteoma de peçonhas viperídeas^[16]. Fazem parte da superfamília de Zinco Peptidases denominadas Zincinas (Figura 7). Essa superfamília foi dividida em 5 famílias diferentes denominadas de: Gluzincinas, Inverszincinas, Carboxipeptidases, DD-Carboxipeptidases e Metzincinas^[19].

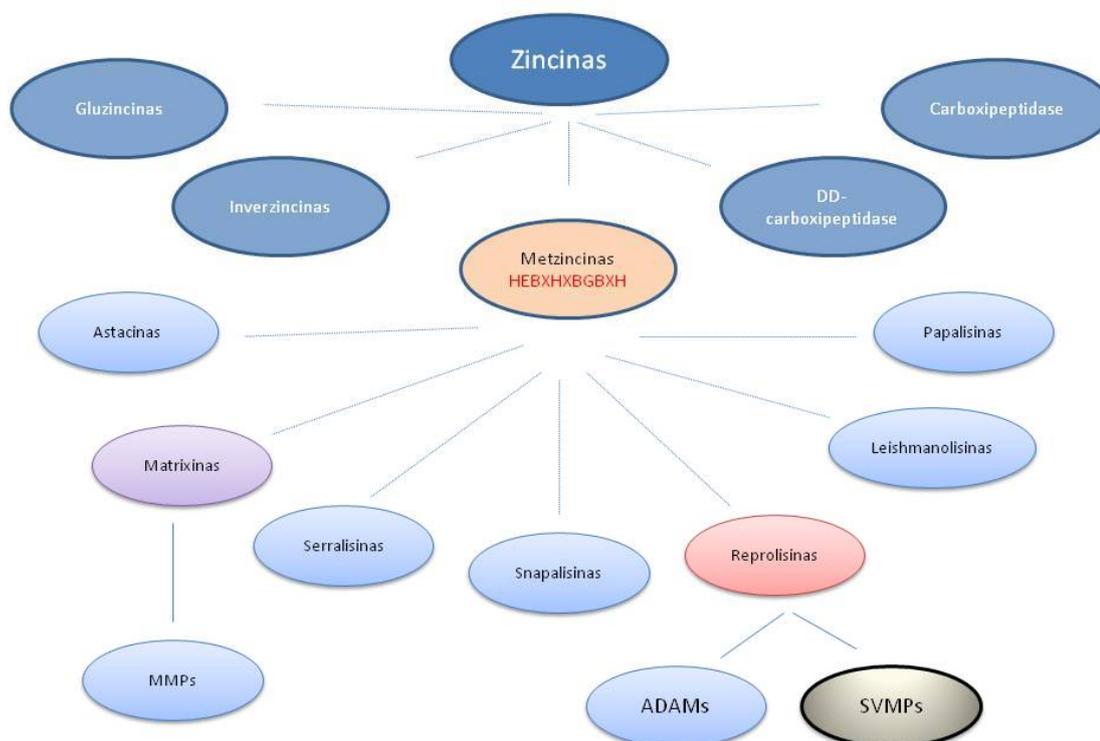


Figura 7: Família das Zinco-peptidases. Fonte: adaptado de Ramos & Araujo (2006)^[19] e Gomis-Rüth et al. (2011)^[61].

As Metzincinas possuem um sítio ligante de zinco altamente conservado na sequência HEBxHxBGBxH presente no domínio catalítico, onde H é a histidina, E é o ácido glutâmico, G é a glicina, B é qualquer resíduo hidrofóbico e X qualquer aminoácido. Além dessa semelhança possuem uma volta da cadeia peptídica abaixo do sítio ativo que apresenta um resíduo de metionina altamente conservado. Esse arranjo estrutural promove a criação de um arcabouço hidrofóbico que parece ser essencial para a interação com o substrato^[19, 62].

A família das Metzincinas é dividida em 7 subfamílias, incluindo as Astacinas, Reprolisinas, Serralisinas, Matrixinas, Snapalisinas, Leishmanolisinas e Pappalisinas^[61]. As peptidases Matrixinas são representadas pelas metaloproteases de Matriz Extracelular (MMPs) e as Reprolisinas são representadas pelas metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) e ADAMs (proteínas de mamíferos com domínios desintegrina e metaloprotease)^[19].

As SVMPs são enzimas extremamente versáteis, exibindo grande diversidade estrutural e funcional^[20]. Classicamente conhecidas por toxinas hemorrágicas, nem sempre provocam hemorragia. São sintetizadas nas glândulas de peçonha em forma de zimogênios que contém uma sequência que é perdida após um processamento proteolítico, resultando na sua ativação^[63]. São enzimas zinco dependentes, ou seja, precisam deste íon como cofator. A massa molecular dessas toxinas pode variar de 20 a 100 kDa^[16, 64, 65, 66].

As SVMPs foram inicialmente classificadas em 1983 por Bjarnason & Fox (1983)^[67] em duas classes de acordo com a massa molecular que apresentavam. Posteriormente em 1994 essas proteases foram novamente divididas em diferentes classes de proteínas, com base também em suas massas moleculares. A classe PI incluía proteínas de 20 a 30 kDa com baixa ou nenhuma atividade hemorrágica e três domínios estruturais (pré-pro-metaloprotease). As metaloproteases de classe PII incluíam proteínas com massa de 30 a 60 kDa, possuindo os domínios das metaloproteases de classe PI e mais um domínio desintegrina. A classe PIII compreendia proteínas altamente hemorrágicas que apresentavam massa entre 60 e 80 kDa com um domínio semelhante à desintegrina e um domínio rico em cisteína e por fim as SVMP de classe PIV que apresentavam massa entre 80 e 100 kDa e possuíam além dos demais domínios um domínio ligante de lectina (Figura 8)^[66].

A classificação de BJARNASON & FOX (1994)^[66] foi revista e atualizada no ano de 2005 com base em seqüências de cDNA^[68]. A reclassificação aconteceu depois que a hipótese de que as desintegrinas livres derivavam de precursores contendo domínio metaloprotease foi contrariada por descobertas que sugerem que poderia haver uma origem alternativa para as moléculas de desintegrinas. OKUDA et al. (2002)^[69] e posteriormente, FRANCISCHETTI et al. (2004)^[70] relataram a síntese de precursores

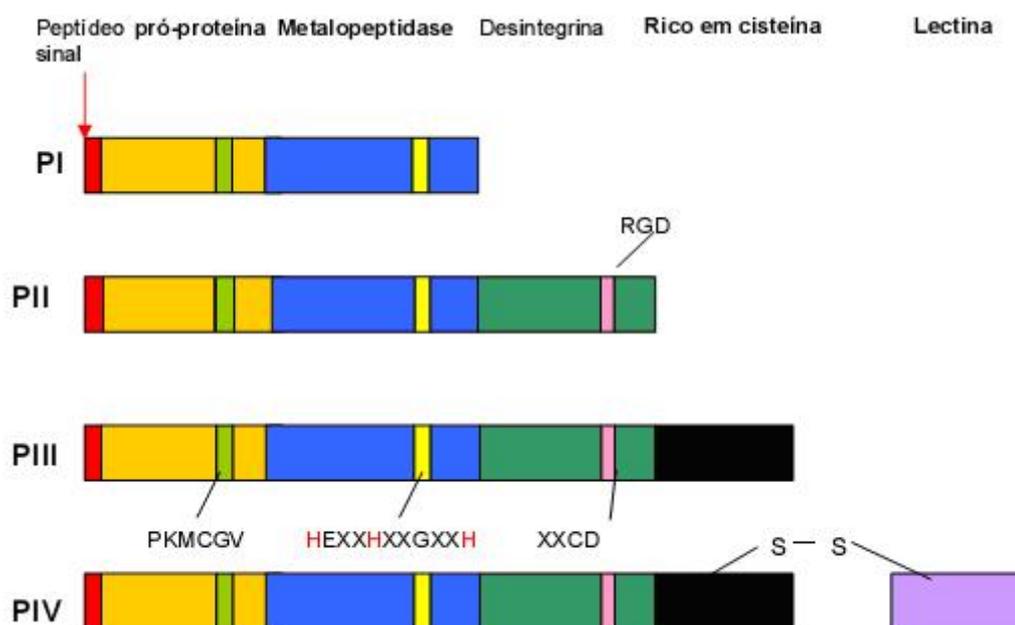


Figura 8: Diagrama esquemático da divisão das metaloproteases das peçonhas de serpentes, conforme a composição estrutural das enzimas. Fonte: BJARNASON & FOX (1994)^[66].

sem o domínio metaloprotease, possuindo apenas um peptídeo sinal, pró-domínio e domínio desintegrina.

Estudos proteômicos e transcriptômicos têm revelado formas diversas de processamento proteolítico dessas toxinas, os quais permitiram uma nova classificação proposta por Fox & Serrano (2008)^[16] (Figura 9). Nesta figura a coluna da esquerda representa esquematicamente as proteínas nascentes e na coluna da direita as classes de SVMPs após o processamento proteolítico.

O grupo PI depois do processamento proteolítico apresenta apenas o domínio metaloprotease, já o grupo PIIa e PIIb apresentam na estrutura nascente o domínio desintegrina que pode ser perdido ou não após o processamento proteolítico, respectivamente. A classe PIII é um dímero composto de duas moléculas que contém domínio metaloprotease e domínio desintegrina. A classe PIIId é sintetizada como as demais moléculas da classe PIII, porém perde seu domínio metaloprotease e resulta em desintegrinas homodiméricas. As toxinas da classe PIIe resultam da formação de desintegrinas heterodiméricas por multimerização de desintegrinas liberadas por

toxinas nascentes da própria classe P-IIe e classe D-I.

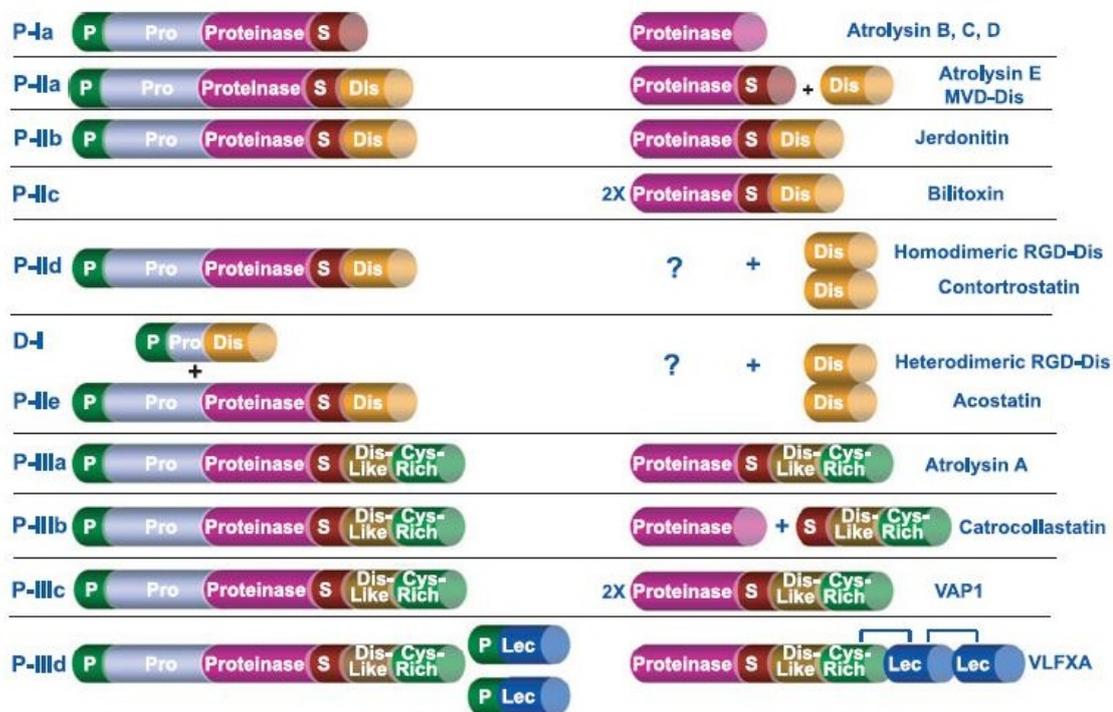


Figura 9: Classificação das SVMPs de acordo com Fox & Serrano (2008)^[16].

A classe PIII, subdividida em PIII-a até P-IIId, encontram-se as SVMPs fortemente hemorrágicas. Nas formas nascentes, como mostra a Figura 9 as SVMPs são compostas de domínio pré, pró, metaloprotease, desintegrina-like, rico em cisteína e a classe PIIId ainda possui o domínio lectina. Após o processamento, as toxinas da classe PIIIa apresentam a sua estrutura formada por domínio metaloprotease, desintegrina-like, rico em cisteína. A classe PIIIb depois de processada resulta em uma molécula composta apenas de domínio metaloprotease livre mais um domínio desintegrina-like ligado a um domínio rico em cisteína. A classe PIIIc é um dímero resultante da união de duas cadeias formadas por domínio metaloprotease, domínio desintegrina-like e domínio rico em cisteína. Por fim o domínio PIIId, anteriormente classificado como PIV, apresenta além dos domínios da classe PIII os domínios Lectina like ligados ao domínio rico em cisteína por meio de pontes dissulfeto^[16].

As SVMPs podem apresentar portanto domínios pré, pró, metaloprotease, espaçador e dependendo da classe podem conter também domínios desintegrina ou desintegrina-like, rico em cisteína e domínio lectina.

O peptídeo sinal como já dito anteriormente é um endereçador para as toxinas nascentes no citoplasma das células secretoras das glândulas veneníferas, direcionando-as ao retículo endoplasmático. Possui aproximadamente 18 resíduos de aminoácidos.

O pró-domínio é o responsável por manter inativa a protease dentro das células secretoras. Esse domínio é composto de cerca de 200 resíduos de aminoácidos bastante conservados nas SVMPs, principalmente na região PKMCTGVT. Essa sequência interage com o sítio ativo do domínio metaloprotease, como mostra a Figura 10. O sítio ativo fica impedido de realizar interações com o substrato devido à interação do grupo tiol do resíduo de cisteína que age como um quarto ligante do zinco catalítico presente no sítio ativo, além de excluir a molécula de água da esfera de coordenação. Esse mecanismo é chamado de Cisteína Switch ou mecanismo de velcro^[19].

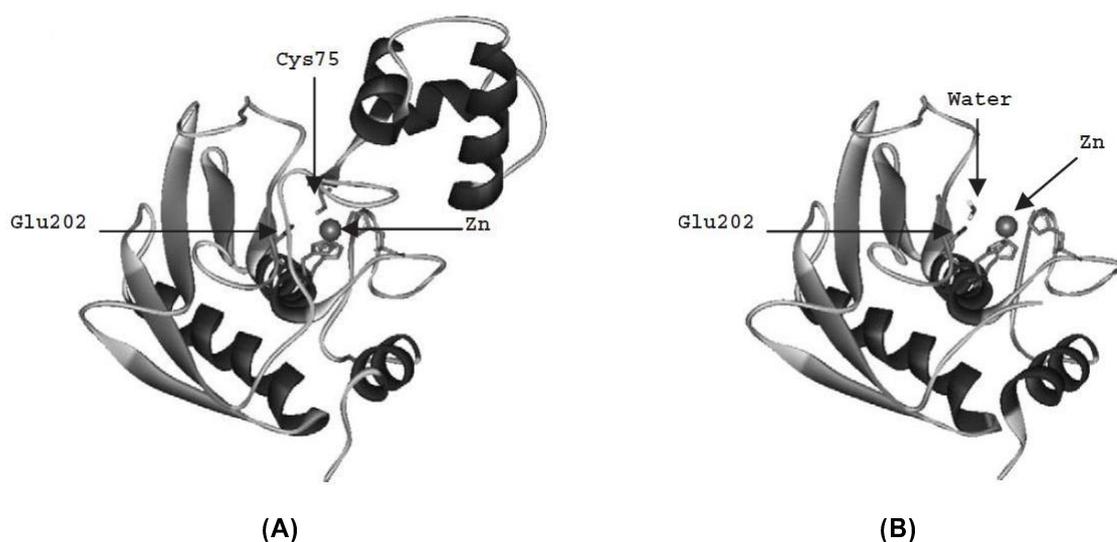


Figura 10: Mecanismo Cisteína Switch ou mecanismo de velcro. **(A)** Interação da cisteína 75 pertencente ao pró-domínio com o zinco e impedindo a interação com um possível substrato. **(B)** Metaloprotease livre do pró-domínio com zinco livre para interagir com a molécula de água. Fonte: Ramos & Araujo (2006)^[19].

O domínio metaloprotease é composto de 215 resíduos de aminoácidos que formam uma protease dependente de zinco, portanto sendo fortemente inibido por agentes quelantes como EDTA ou 1,10 fenantrolina. A retirada do zinco do sítio catalítico é capaz de induzir mudanças na estrutura secundária da molécula^[66]. Esse domínio apresenta uma sequência de aminoácidos bastante conservada, especialmente os três resíduos de histidina (His142, His146 e His152) responsáveis pela ligação e

estabilização do zinco no sítio ativo^[16].

A catálise enzimática realizada por essas enzimas acontece provavelmente pela presença de uma molécula de água localizada dentro do sítio ativo, do íon zinco e um resíduo de Glu335 (Figura 11(A)). A molécula de água na presença de um substrato provocaria um aumento na polarização dentro do sítio ativo, causando a transferência de um próton da molécula de água para o Glu335, que se tornaria um nucleófilo e atacaria o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato (Figura 11(B)). Todas essas alterações levariam o zinco a um estado penta coordenado e com a transferência do próton do resíduo de Glu para o átomo de nitrogênio da ligação peptídica do substrato então a ligação é clivada liberando os produtos da reação (Figura 11(C))^[19].

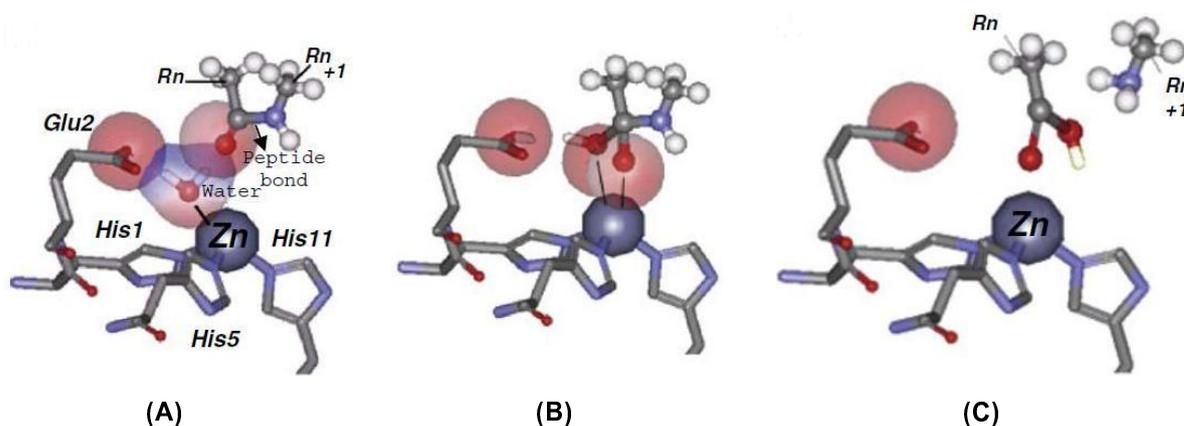


Figura 11: Mecanismo de catálise das SVMPs. (A) zinco coordenado pelas his334, his338 e his444 e a molécula de água polarizada dentro do sitio ativo e a molécula de substrato Rn. (B) O próton foi transferido para o Glu335 e o substrato recebeu a hidroxila e o zinco se torna um intermediário penta coordenado que transfere o próton do Glu335 para o substrato causando o rompimento da ligação peptídica (C). Fonte: Ramos & Araujo (2006)^[19].

O peptídeo espaçador é formado por 13 a 15 resíduos de aminoácidos e está posicionado entre o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina ou desintegrina-like. Esse domínio não apresenta toxicidade^[19].

O domínio desintegrina ou desintegrina-like pode ser formado por 41 a 100 resíduos de aminoácidos, formando até 8 pontes dissulfeto em sua estrutura. São capazes de se ligar à integrinas com elevada afinidade por possuírem na sua estrutura uma sequencia RGD (Arg-Gly-Asp) idêntica a sequencia encontrada no fibrinogênio. Dessa forma esse domínio é capaz de concorrer com o fibrinogênio pelo receptor α IIb β III de

plaquetas sendo capazes de inibir a agregação destas. São encontradas variações nessa sequência, como por exemplo, apresentar a sequência ECD (Glu-Cys-Asp) ou DCD (Asp-Cys-Asp) e os domínios que possuem essas alterações são chamados de desinterina like^[19, 62].

O domínio rico em cisteína é composto de 112 resíduos de aminoácidos e como o próprio nome diz possui grande quantidade de resíduos de cisteína. Esse domínio apresenta propriedades adesivas às proteínas da matriz extracelular e componentes plasmáticos^[19].

O domínio semelhante à lectina tipo-C. Sugere-se que este domínio seja originado a partir da expressão de RNAs independentes que codificam a proteína lectina tipo C like que são adicionadas às metaloproteases da classe III. Esses achados podem confirmar que a classe antes denominada PIV era uma modificação pos-traducional de SVMPs de classe PIII^[16, 19].

As SVMPs de classe PIII, na sua maioria, são responsáveis pelo quadro hemorrágico local após o envenenamento ofídico, enquanto as toxinas de classe PI geralmente não provocam hemorragia. Entretanto, algumas metaloproteases de classe PI, como BthMP isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* quando administradas em altas doses apresentam o efeito hemorrágico que se especula ser devido à polaridade apresentada na superfície da molécula^[62].

Estudos estruturais teóricos comparando estruturas de SVMPs de classe PI têm fundamentado a hipótese que as SVMPs dessa classe que são fracamente hemorrágicas apresentam uma maior flexibilidade estrutural na região da cadeia polipeptídica abaixo do sítio ativo entre os resíduos 156 e 163 logo antes do resíduo conservado de metionina, enquanto as SVMPs não hemorrágicas (PI) apresentariam maior flexibilidade na região que compreende os resíduos 166-175, ou seja, logo após o resíduo de metionina conservado^[62, 71]. Entretanto essa hipótese recentemente lançada precisa ser investigada profundamente usando um número maior de estruturas de SVMPs.

O efeito hemorrágico das SVMPs inicia-se pela ação proteolítica dessas toxinas sobre componentes da membrana basal dos vasos sanguíneos tais como, colágeno tipo IV, laminina, nidogênio, fibronectina e proteoglicanos, os quais são essenciais

para assegurar a integridade dos vasos sanguíneos. A ação proteolítica de SVMPs sobre esses componentes tem um papel fundamental para os eventos de instalação da hemorragia no tecido afetado^[65, 72].

Na tentativa de compreender como acontece a hemorragia induzida por metaloproteases hemorrágicas após a degradação da membrana basal, dois mecanismos foram propostos: a hemorragia *per rhexis* e hemorragia *per diapedesis*.

A hemorragia *per rhexis* é caracterizada pelo inchaço e rápido rompimento da membrana das células do endotélio. O endotélio rompido permite que o sangue passe para o tecido ao redor do vaso afetado^[65]. A hemorragia *per diapedesis* ocorre devido ao rompimento das junções entre as células vizinhas, não havendo alterações no espaço intracelular^[20, 65]. Juntamente com a proteólise da membrana basal pelas SVMPs, o rompimento dos vasos também é favorecido pela força impelida pela pressão hidrostática no lúmen, bem como o cisalhamento tangencial do fluxo sanguíneo nas paredes dos vasos que já se apresentam estruturalmente desestabilizados pela perda da membrana basal endotelial^[21, 73].

Muitas metaloproteases de peçonhas de serpentes já foram isoladas, com destaque pode se citar a Jararagina (52 kDa) que é um exemplo de SVMP altamente hemorrágica. Essa toxina foi isolada da peçonha de *B. jararaca*^[74] e vem sendo bastante estudada como um modelo para o entendimento da ação das SVMPs nos tecidos e sobre linhagens celulares^[72, 75, 76].

BALDO et al. (2010)^[72], usando as toxinas Jararagina (PIII) e BnPI (PI) demonstraram que a ação hemorrágica das SVMPs está associada a presença de domínios independentes do domínio metaloprotease da toxina. Os resultados mostram que ocorre acúmulo da jararagina próximo aos vasos sanguíneos alcançando concentrações suficientes para promover a rápida degradação da membrana basal, o que não é observado utilizando a SVMP de classe PI. Um dos sítios de ancoragem da jararagina é o colágeno tipo IV, presente em grande quantidade na membrana basal. Essa ancoragem é possível devido à interação dos domínios desintegrina e rico em cisteína desta toxina às moléculas de colágeno. A manutenção das toxinas num mesmo local possibilita que a atividade proteolítica seja concentrada numa região limitada e o dano nesse caso tende a ser maior, ocasionando o extravasamento do sangue para

os tecidos próximos.

O quadro hemorrágico local é um dos mais intensos danos causados pelos envenenamentos botrópicos e botropóicos, ocasionado por lesões severas na microvasculatura causando além do extravasamento de sangue, a necrose. A necrose causada pelas SVMPs está associada ao quadro de isquemia que acontece próximo ao local onde ocorre a hemorragia, sendo, portanto uma ação indireta dessas toxinas^[21, 62].

1.5 Necrose local após o envenenamento ofídico

Necrose é o estado de morte de um tecido ou parte dele em um organismo vivo caracterizado por ser sempre um processo patológico e desordenado. O processo de necrose é desencadeado quando as células ou o tecido sofre um insulto que resulta numa serie de alterações que culmina no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, seguido da perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular^[77].

Diferentemente da apoptose que é a “morte celular programada” que ocorre de forma não acidental que se inicia com a retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas e termina na produção de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório^[77] (figura 12).

A mionecrose é o evento de morte de células do tecido muscular chamadas de miócitos. Após o início do processo de mionecrose a área afetada perde seu aspecto habitual e transforma-se em uma massa finamente granular ou hialina, contendo fragmentos de miofibrilas degradadas. Ocorre também a perda das estriações transversais das fibras e ativação da resposta orgânica com a liberação de substâncias do interior das fibras e o afluxo de células inflamatórias^[78].

Após a destruição das miofibrilas o organismo promove a remoção dos restos celulares pela ação de macrófagos. Assim se inicia o processo de regeneração que é dependente da preservação das células satélites contidas na membrana basal. As células satélite são células progenitoras mononucleares capazes de se diferenciar e

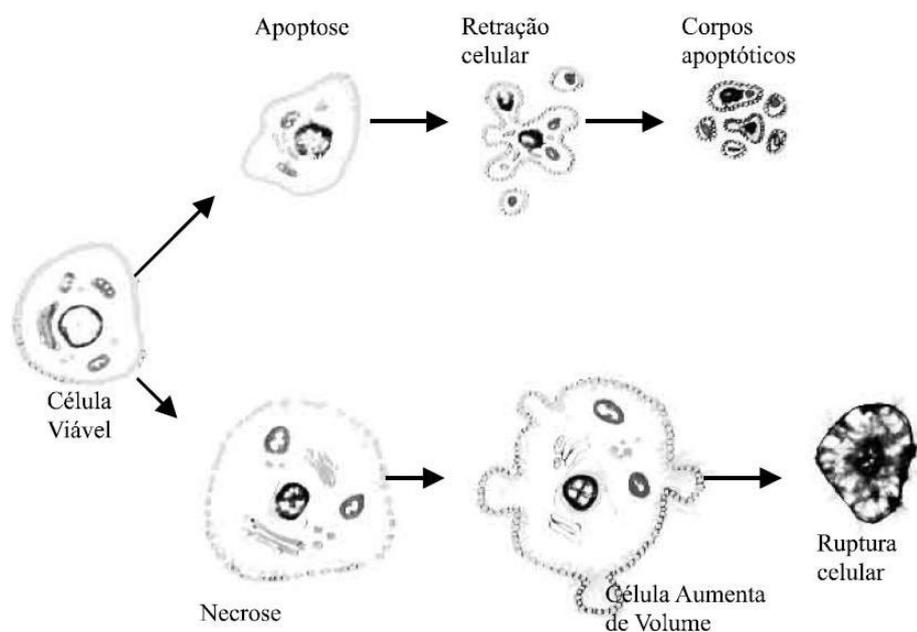


Figura 12: Características morfológicas da apoptose e da necrose. Fonte: Grivicich et al. (2007)^[77].

formar mioblastos e depois miócitos até que o segmento afetado seja reconstituído. As fibras musculares jovens em regeneração são menores e possuem núcleos centrais vesiculosos com nucléolos muitas vezes visíveis^[78].

As fosfolipases A_2 miotóxicas presentes na peçonha são grandes responsáveis pela miotoxicidade das peçonhas botrópicas e botropóicas. Essas toxinas causam necrose muscular por serem capazes de perturbar a integridade da membrana sarcoplasmática levando a uma desorganização dos lipídeos de membrana de forma a permitir a entrada de íons como cálcio. A partir disso inicia-se um processo de hipercontração e degeneração das miofibrilas seguido de um colapso que culmina no rompimento da membrana sarcoplasmática, levando o tecido muscular a necrose^[21, 79].

A mionecrose pode ser causada também pelas SVMPs que além do quadro de hemorragia local que provocam são capazes também de causar a necrose do tecido muscular. Gutiérrez et al. (2009)^[21] sugerem que o dano às células musculares ocorre secundariamente devido a isquemia causada pelo déficit de sangue ocasionado pela hemorragia nos tecidos próximos a picada. Essas toxinas são capazes de destruir a matriz extracelular e a membrana basal endotelial causando dano a microvasculatura e ao arranjo estrutural do tecido muscular o que compromete a irrigação do tecido^[21, 72].

A necrose provocada pela ação de SVMPs ou pela peçonha total é mais grave que as lesões necróticas provocadas por miotoxinas isoladas. Geralmente o tecido que foi inoculado com miotoxina depois de duas semanas substitui o tecido necrótico por tecido muscular. Já a regeneração do músculo inoculado com a peçonha bruta ou SVMPs isoladas não acontece e o tecido necrosado é substituído por tecido conjuntivo fibroso, não funcional. As metaloproteases ao causarem isquemia, a destruição da microvasculatura e da membrana basal onde estão as células satélites inviabilizam a regeneração da área afetada^[20, 21, 44, 72, 80].

Em casos mais severos as vítimas de picadas de serpentes podem apresentar grandes perdas de tecido muscular em decorrência do processo necrótico levando algumas vezes a amputação do membro atingido^[3]. A terapia disponível para tratar envenenamentos ofídicos é a administração de soro antiofídico. Entretanto o soro mesmo que em grandes quantidades não é capaz de reverter os efeitos locais das picadas de serpente do gênero *Bothrops* e *Bothropoides*.

1.6 A terapia

O médico inglês Richard Mead (1673-1754) em 1743 classificou as peçonhas como substâncias ácidas, e por isso por algum tempo a amônia ou outros álcalis foram usados contra envenenamentos. Em 1878, Thomas Lauder Brunton (1844–1916) sugeriu que o uso do permanganato de potássio (1%) minimizava a letalidade provocada pela peçonha, mas não inibia completamente seus efeitos. Posteriormente o uso do permanganato de potássio foi abolido, pois não reduzia a letalidade nem os efeitos dos envenenamentos^[1].

Os primeiros estudos com antivenenos derivados do soro tiveram como base as pesquisas sobre microorganismos e métodos de imunização desenvolvidos na Europa entre 1880 e 1890. O Médico Edward Jenner (1749–1823) com pesquisas para o desenvolvimento da vacina anti-varíola e muitos cientistas do Instituto Pasteur, em Paris e algumas instituições alemãs contribuíram para a busca de desenvolver imunizações e tratamentos eficazes para doenças como tuberculose, cólera, difteria peste bubônica. Os resultados dessas pesquisas foram muito importantes, tais como o método

de imunização de cavalos que possibilitava a criação de antitoxinas que quando inoculadas em animais doentes era capaz de promover a cura. Nascia então a teoria de formação de anticorpos^[1]

A soroterapia é a única medida aceita como tratamento de envenenamentos. Os soros antiofídicos devem ser administrados preferencialmente diluídos em solução glicosada na razão de 1:10 (v/v) em infusão endovenosa^[3].

As doses de soro inoculadas nas vítimas são baseadas na estimativa da quantidade de peçonha que a serpente pode inocular durante a picada. A estimativa é feita com base na quantidade de peçonha obtida em uma extração. Para as serpentes *B. jararaca*, por exemplo, em média a quantidade que se obtêm de uma extração é de 160 mg da peçonha, que se inoculada em uma vítima levaria a um caso de envenenamento considerado como moderado e o tratamento é realizado utilizando-se de 4 a 8 ampolas de soro antiofídico^[10, 81].

Atualmente o soro antiofídico é obtido do plasma de cavalos imunizados contra a peçonha. É um processo lento que envolve várias etapas. As peçonhas são coletadas, liofilizadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O “pool” de peçonhas de diferentes espécies é feito e inoculado nos animais num esquema de nove injeções subcutâneas de 5 mg da peçonha em 10 mL a cada 7 dias. Na primeira inoculação é utilizado o adjuvante de Freund completo, a segunda com adjuvante de Freund incompleto e as outras sete podem ser realizadas com hidróxido de alumínio 2% ou diluído em solução salina (NaCl 0,9%)^[1].

Após a obtenção do plasma dos animais inoculados por meio de precipitações com sulfato de amônia é obtido um plasma enriquecido de anticorpos. Entretanto como são proteínas heterólogas derivadas de outro animal, podem muitas vezes ocasionar as reações de hipersensibilidade. Para minimizar essas reações os anticorpos podem ser digeridos com papaína ou pepsina como mostra a Figura 13.

A molécula de Imunoglobulina apresenta duas partes, a porção (Fab)₂ e a porção Fc. A porção Fab é responsável por se ligar ao antígeno, provocando a ação neutralizante esperada e a porção Fc é responsável pelas funções de imunogenicidade, altamente relacionada com as reações de hipersensibilidade. A digestão das

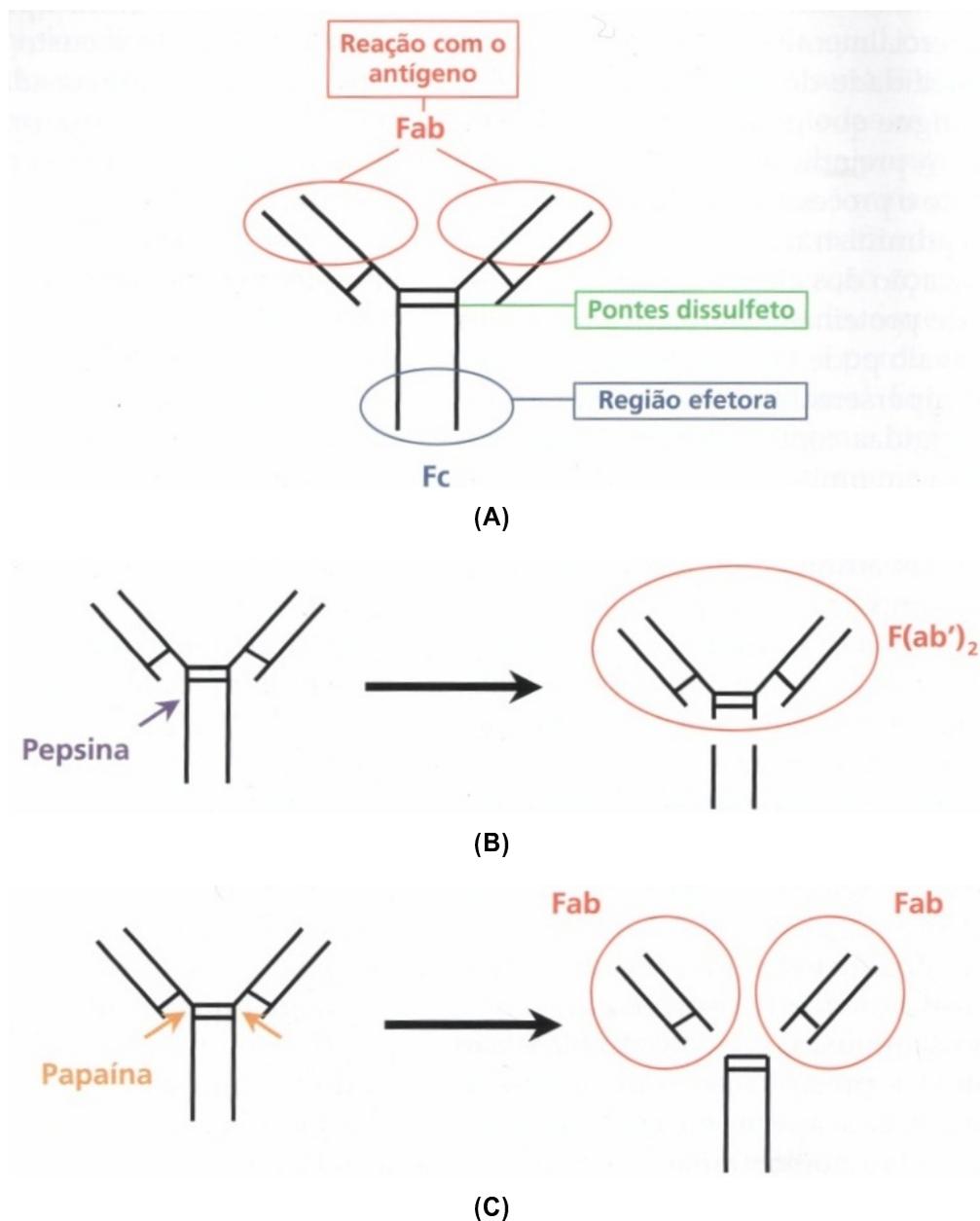


Figura 13: Representação da molécula de Imunoglobulina e seus fragmentos **(A)** após clivagem com pepsina **(B)** ou papaína **(C)**. Fonte: Cardoso (2003)^[3].

IgGs com a pepsina que provoca a liberação das unidades (Fab)₂ é vantajosa pois mantém inalterada a capacidade neutralizante dos anticorpos, e se elimina a possibilidade de reação de hipersensibilidade, porém, ainda é possível que hajam reações de hipersensibilidade do tipo III ou doença do soro^[3].

Como alternativa ao uso de (Fab)₂ é feita a clivagem das IgGs com papaína que resulta na liberação de fragmentos Fab, o que torna quase remota a possibilidade de reações indesejadas durante seu uso. A grande desvantagem desse tipo de soro é

a sua rápida eliminação dado ao tamanho reduzido das moléculas, sendo necessário maior número de aplicações^[3].

A eficiência da soroterapia está relacionada além de outros fatores, diretamente com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento e a quantidade de peçonha inoculada^[82]. Entretanto apesar do soro ser a única terapia aceita para os envenenamentos por picadas de serpentes sua ação no local da picada é fraca, não impedindo dano tecidual devido à rapidez com que a peçonha se difunde nos tecidos próximos ao local da picada e devido também à baixa concentração do soro nos tecidos^[55, 64, 83]. Todavia o uso dos soros está vinculado à existência de serviços formais de saúde, e seu emprego permanece restrito às regiões de maior desenvolvimento socioeconômico, onde existem sistemas de atenção médica estruturados. Assim as populações de localidades remotas se veem compelidas a buscar terapias alternativas.

Desenvolver terapias as quais utilizam princípios ativos isolados de extratos vegetais e que melhorem o quadro do envenenamento ofídico se torna relevante uma vez que, acidentes ofídicos afetam mais de 2,5 milhões de pessoas anualmente no mundo^[9] e o único tratamento disponível atualmente é a soroterapia. No caso dos envenenamentos botrópicos, o soro apresenta deficiências como fraca ação no local da picada, não impedindo o dano tecidual devido principalmente à baixa concentração do soro nos tecidos e também à rapidez com que a peçonha se difunde no local próximo da picada. Além disso, outras desvantagens inerentes, tais como, o alto custo e as reações de hipersensibilidade de pacientes que recebem a soroterapia, justificariam a busca por novas substâncias capazes de neutralizar os efeitos induzidos pelos envenenamentos ofídicos.

1.7 Referências

- 1 VILLAR, J. C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. **Biologia Geral e Experimental. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas**. [S.l.]: Universidade Federal de Sergipe, 2005.
- 2 HAWGOOD, B. J. Abbé Felice Fontana (1730–1805): founder of modern toxinology. **Toxicon**, v. 33, p. 591–601, 1995.
- 3 CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003.
- 4 FENWICK, A. M.; JR, R. L. G.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617–640, 2009.
- 5 AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pitvipers. **Contribution to Harvard Institute of Tropical Biology**, v. 2, p. 1–64, 1925.
- 6 SILVA, V. X. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2000.
- 7 SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45–90, 2008.
- 8 GREENE, H. W. Snakes: The evolution of mystery in nature. **Berkeley: University of California Press**, p. 351, 1997.
- 9 WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951–967, 2005.
- 10 Fundação Nacional de Saúde. **Sistema de informação de agravos e notificação**. 48. ed. Brasília-DF, 2001.
- 11 NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. Clinical and epidemiological study of cases of lance-headed vipers. **An Tropical Medicine Parasitology**, v. 86, p. 89–91, 1992.

- 12 SILVA, C. J. D.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 251–255, 2003.
- 13 GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **Microvascular Research**, v. 71, n. 1, p. 55–63, 2006.
- 14 WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, p. 77–88, 2010.
- 15 KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65–106, 1987.
- 16 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, Blackwell Publishing Ltd, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.
- 17 LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4th edition. ed. [S.l.]: Revinter, 2002.
- 18 DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; M., S. A.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno Botrópico. **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 21–30, 1992.
- 19 RAMOS, O.; ARAUJO, H. S. de. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 328–346, 2006.
- 20 GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.
- 21 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.
- 22 ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A. F. M.; TERRA, R. M. S.; GUTIE´RREZ, J. M.; FOX, J. W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 5120–5131, 2009.

- 23 ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009. ISSN 0041-0101.
- 24 SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, I. M.; TOYAMA, M.; LOMBARDI, F.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys₄₉. Myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503–514, 1998.
- 25 SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase a2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246–1259, 2006.
- 26 SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, p. 1541–1546, 1990.
- 27 ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996.
- 28 MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 903–913, 2003.
- 29 FERREIRA, T. L.; RULLER, R.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA₂ using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 90, n. 9, p. 1397–1406, 2008.
- 30 DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Jararaca chico) venom with novel Kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205–1215, 1997.
- 31 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger. Princípios de bioquímica**. [S.l.]: Sarvier, 2002.
- 32 BARREIRO, E. J. Eicosanóides (Parte I). **Caderno de Farmácia**, v. 3, p. 67–83, 1987.

- 33 COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; SOUZA, B. M. de; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008.
- 34 LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003.
- 35 KINI, R. M.; EVANS, H. J. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thromboses Haemostasis**, v. 6, p. 170–173, 1988.
- 36 POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S. from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Journal of Biochemistry**, v. 319, p. 961–968, 1996.
- 37 KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 1165–1168, 1991.
- 38 TSAI, I. H.; WANG, U. M.; CHEN, Y. H.; TSAI, T. S.; TU, M. C. Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Journal of Biochemistry**, v. 377, p. 215–223, 2004.
- 39 WEI, J.-F.; WEI, X.-L.; CHEN, Q.-Y.; HUANG, T.; QIAO, L.-Y.; WANG, W.-Y.; XIONG, Y.-L.; HE, S.-H. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 462–471, 2006.

- 40 KINI, R. M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism. In: KINI, R. M. (Ed.). **Phospholipase A₂– A complex multifunctional protein puzzle**. [S.l.]: Wiley, Chichester, 1997. p. 1–28.
- 41 KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1147–1161, 2005.
- 42 MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: Their biochemical and biological activities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223–236, 1990.
- 43 GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑES, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; MICHAELOVADIA. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 28–41, 1995.
- 44 GUTIÉRREZ, J. M.; NUÑES, J.; DÍAS, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol**, v. 55, p. 217–229, 1991.
- 45 GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, W. D.; HAWGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v. 22, p. 85–98, 1984.
- 46 KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827–840, 2003.
- 47 CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H. C. D.; 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 A₂. **Biochem Journal**, v. 15, p. 971–976, 2002.
- 48 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.
- 49 WISNER, A.; BRAUD, S.; BON, C. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. **Haemostasis**, v. 31, p. 133–140, 2001.

- 50 SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627–645, 2011.
- 51 SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115–1132, 2005.
- 52 OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 9, p. 945–966, 1992.
- 53 CASTRO, H.; ZINGALI, R.; ALBUQUERQUE, M.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser Basel, v. 61, p. 843–856, 2004.
- 54 STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, p. 265–273, 1982.
- 55 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.
- 56 YOU, W.-K.; CHOI, W.-S.; KOH, Y.-S.; SHIN, H.-C.; JANG, Y.; CHUNG, K.-H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1-3, p. 67–73, 2004.
- 57 PÉREZ, A. V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 1063–1069, 2007.
- 58 URANO, T.; IHARA, H.; TAKADA, Y.; FUIJE, M.; TAKADA, M. The cleavage and inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 and α 2-antiplasmin by reptilase, a thrombin-like venom enzyme. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 11, p. 145–153, 2000.

- 59 LEITE, C. V. S.; NARESE, L. E.; ARANTES, H. L.; NI, M. J. S.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIEIRA, B.; KOBAYASI, S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **Journal Venom Animal and toxins**, v. 6, p. 130–141, 2000.
- 60 MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltda, v. 22, n. 7, p. 859–866, 2008.
- 61 GOMIS-RÜTH, F. X.; BOTELHO, T. O.; BODE, W. A standard orientation for metalloproteinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, In Press, Corrected Proof, 2011.
- 62 ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, In Press, Corrected Proof, 2011.
- 63 GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Letters**, v. 335, n. 1, p. 76–80, 1993.
- 64 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.
- 65 HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake Venom Hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1–19, 1999.
- 66 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- 67 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin e, a zinc protease isolated from the venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochemistry**, v. 22, n. 16, p. 3770–3778, 1983.

- 68 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005.
- 69 OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, p. 14248–14254, 2002.
- 70 FRANCISCHETTI, I. M. B.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55–69, 2004.
- 71 WALLNOEFER, H. G.; LINGOTT, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; MERFORT, I.; LIEDL, K. R. Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: Specificity in snake venom metalloproteases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 30, p. 10330–10337, 2010.
- 72 BALDO, C.; FERREIRA, M. J.; LOPES, D. S.; IZIDORO, L. F. M.; O, G. A.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; BRANDEBURGO, M. I. H.; RODRIGUES, V. M. Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, p. 462–469, 2010.
- 73 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 2005.
- 74 PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 22869–22876, 1992.
- 75 SILVA, A. M. M. da; RAMOS, O.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M.; TANJONI, I.; CLISSA, P.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.; EBLE, J. Collagen binding is a key factor

- for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 484–492, 2008.
- 76 TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M. S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G. S.; BALDO, C.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; SILVA, A. M. M. da. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1093–1099, 2010.
- 77 GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335–343, 2007.
- 78 FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. [S.l.: s.n.], 2006.
- 79 HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 933–945, 2003.
- 80 LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. de F.; ALCÂNTARA, T. M. de; OLIVEIRA, J. D. D.; GOURLART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SILVA, A. M. M. da; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. de M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 42–49, 2009.
- 81 JORGE, M.; RIBEIRO, L. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. **Revista da Associação Médica Brasileira**, scielo, v. 43, p. 74–76, 03 1997.
- 82 FRANÇA, F. O. S. Associação da venenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantã, de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. **Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 3, p. 187–190, 1998.
- 83 GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; ROJA, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1998.

Capítulo 2

O metabolismo secundário vegetal e plantas antiofídicas

2.1 Os Extratos Vegetais

A humanidade tem usado os metabólitos secundários de plantas há vários séculos com múltiplos propósitos, como por exemplo, para obter tinturas e pigmentos, fragrâncias, flavorizantes, estimulantes, alucinógenos, inseticidas e repelentes, venenos, e principalmente agentes terapêuticos^[1]. Os primeiros registros escritos do uso de plantas medicinais datam de no mínimo 5.000 anos atrás, com os Sumérios^[2].

Até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente de plantas e extratos vegetais. Em 1970, 25% das drogas disponíveis nos Estados Unidos continham compostos derivados de plantas^[3]. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 11% das 252 drogas consideradas como básicas para saúde humana foram descobertas de plantas^[4].

Um exemplo do uso de princípios ativos de plantas como modelo para desenvolver drogas sintéticas foi em 1897, quando Friedrich Bayer introduziu o ácido acetil salicílico (Aspirina) no mundo. A aspirina é um sintético análogo ao ácido salicílico, que é um composto ativo da casca do salgueiro, que era usado como remédio para dores e febre^[5]. Na atualidade, a descoberta de maior importância sobre o uso de princípios ativos de plantas para a síntese de substâncias foi o Taxol[®] ou Paclitaxel[®], identificado em *Taxus brevifolia*, comercializado para o uso terapêutico contra o câncer, sendo considerado como o antitumoral mais promissor dos últimos 20 anos^[6].

No Brasil, o estudo da erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) culminou no desenvolvimento do Acheflan[®] que tem como princípio ativo o composto alfa-humuleno descoberto em 2001 por pesquisadores da UNICAMP. O fármaco é eficaz para casos de dores musculares e no tratamento de tendinite crônica, possuindo em sua composição apenas substâncias ativas extraídas de plantas, sem a mistura de princípios ativos sintéticos^[7].

O interesse no estudo das plantas em terapias alternativas com produtos naturais tem crescido muito nos últimos anos. Este interesse ocorreu devido a diversas razões como ausência do efeito esperado com medicamentos da medicina convencional, o uso abusivo ou incorreto de drogas sintéticas resultam em efeitos colaterais e outros problemas e principalmente, uma grande porcentagem da população mundial não tem

acesso a tratamentos com drogas sintéticas^[4].

O total estimado de espécies de plantas no planeta é 350 a 500 mil, aproximadamente dois terços dessas espécies devem estar em regiões tropicais. No Brasil a diversidade de plantas compreende 55 mil espécies identificadas, sendo que 75% dessas espécies estão na Floresta Amazônica ou na Mata Atlântica^[8, 9]. Obviamente o Brasil se apresenta numa posição privilegiada com teoricamente mais oportunidades de descobrir compostos de interesse econômico e social dada à grande diversidade vegetal que apresenta.

Por estarem presentes na natureza em abundância o estudo de extratos vegetais tem se difundido cada vez mais, buscando investigar a sua eficiência e constância de atividade, bem como identificação e isolamento do princípio ativo, determinação de sua estrutura, a possibilidade de síntese e modificação desse princípio.

2.2 Metabolismo secundário

O metabolismo das plantas pode ser dividido didaticamente em primário e secundário. No metabolismo primário são produzidas substâncias indispensáveis a qualquer ser vivo como lipídios, proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento do vegetal^[10].

Além das moléculas do metabolismo primário, as plantas sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses metabólitos têm um papel fundamental para a manutenção da vida da planta, mesmo em condições desfavoráveis, possibilitando que o vegetal suporte as pressões ambientais como, o ataque por fungos, bactérias e herbívoros, ainda se proteja da radiação UV, atraia polinizadores e frugívoros dispersores produzindo cores e perfumes^[1].

Os metabólitos secundários ou princípios ativos foram considerados até meados do século XIX como resíduos do metabolismo primário de plantas. Entretanto com resultados de estudos no final do século XIX e início do século XX se descobriu que no metabolismo secundário são produzidas substâncias ou compostos que permitem aos vegetais vantagens adaptativas ou mesmo funcionam como resposta ao estresse

ambiental a que um vegetal é submetido^[11]. Estima-se que as plantas podem produzir mais de 500 mil dessas substâncias conhecidas como princípios ativos^[12], entretanto até agora foram descobertas próximo a 200 mil estruturas de princípios ativos diferentes^[1], o que pode significar que um número ainda maior que 500 mil compostos possam existir na natureza.

Os princípios ativos podem ser divididos em três grandes grupos de moléculas: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos, como mostra a Figura 14. Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de intermediários do metabolismo primário como, piruvato, eritrose-4- fosfato, por quatro vias metabólicas ou rotas bioquímicas. Na rota do ácido chiquímico são produzidos compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos podem ser sintetizados também na rota do ácido malônico. Os terpenos São sintetizados por duas rotas distintas, a rota do ácido mevalônico e rota do Metileritritol fosfato^[13].

2.3 Os terpenos

Os terpenos são formados por unidades pentacarbonadas e podem ser sintetizados a partir de três moléculas de acetil-CoA na rota do ácido mevalônico como mostra a Figura 14. Essas unidades de cinco carbonos podem se unir dando origem a terpenos mais complexos e maiores como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. A grande maioria dos terpenos produzidos em plantas está relacionada à defesa do vegetal.

Uma das classes mais conhecidas de terpenos são os triterpenos piretrinas que atuam como inseticidas naturais, pois apresentam elevada toxicidade para insetos por serem capazes de bloquear canais de sódio em células nervosas de insetos causando paralisia e conseqüente morte^[11].

Além dos triterpenos como as piretrinas existem os terpenos cardenolídeos e as saponinas. Os cardenolidesos são glicosídeos, ou seja, possuem um açúcar em sua estrutura sendo extremamente tóxicos para animais superiores em doses elevadas. Apesar de sua toxicidade em doses controladas alguns desses princípios ativos podem ser usados como medicamentos. Da planta *Digitalis sp* foi isolado a digoxina um

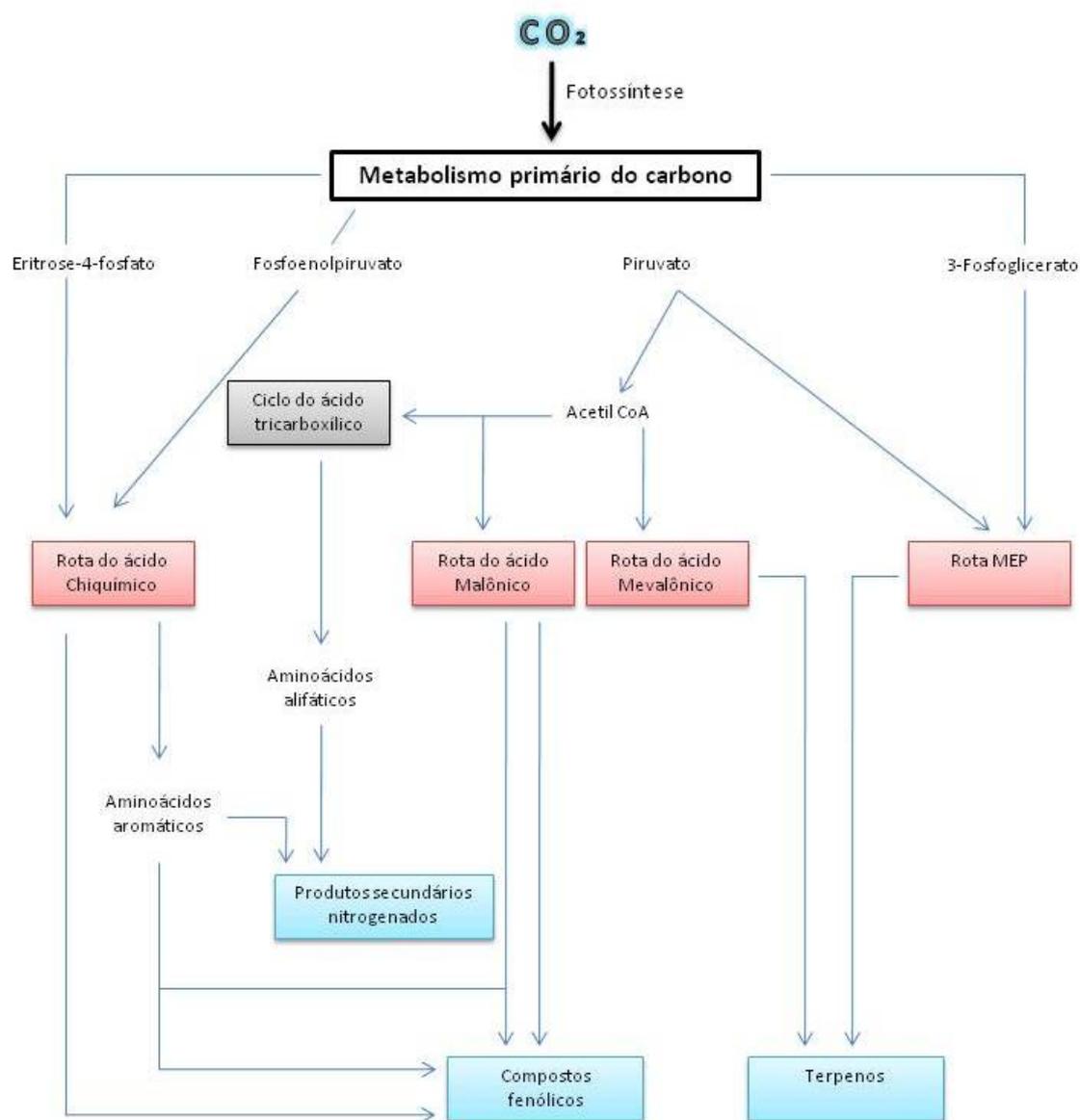


Figura 14: Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários a partir do metabolismo primário. (MEP - Metileritritol fosfato) (Fonte: adaptado de SIMÕES (2003)^[13])

composto que apresenta efeito inotrópico positivo, ou seja, aumenta a intensidade da contração do músculo cardíaco^[11, 13].

As saponinas são esteróides e triterpenos glicosilados com a capacidade de emulsificar gorduras, podendo alterar sua absorção no trato digestivo de animais. São também capazes de desorganizar membranas celulares por se ligarem a moléculas de lipídeos e esteróis da membrana plasmática^[11].

2.4 Os compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados como o próprio nome diz possuem em sua estrutura nitrogênio e são quase que em sua totalidade, responsáveis pela proteção dos vegetais. Alguns desses compostos são bastante tóxicos para animais e alguns apresentam aplicações terapêuticas. Como exemplo dos compostos nitrogenados pode se citar os alcalóides.

Os alcalóides são encontrados em 20% das espécies de plantas vasculares sendo sintetizados principalmente a partir de três aminoácidos, lisina, tirosina e triptofano. Quando foram descobertos os compostos nitrogenados, foram considerados produtos de excreção de plantas. Entretanto, hoje se acredita que atuem realmente na defesa dos vegetais, participando principalmente na defesa das plantas contra mamíferos, pois esses compostos apresentam elevada toxicidade para animais dessa classe quando ingeridos^[13].

Praticamente todos os alcalóides são tóxicos para animais dependendo apenas da dosagem. Geralmente doses muito pequenas são capazes de provocar efeitos intensos como é o caso da estricnina e da coniína isoladas da *Strychnos nux-vomica* e da *Conium maculatum* (cicuta), respectivamente. Quando usados em doses controladas os alcalóides podem ter aplicação terapêutica como a morfina e codeína dois potentes anestésicos e a escopolamina um alcalóide com ação anti-espasmódica vendido comercialmente como Buscopan^[13, 14]. Alcalóides podem ser utilizados também como estimulantes como a cocaína, a cafeína e a nicotina^[11].

Os glicosídeos cianogênicos não são tóxicos na forma que são produzidos nas plantas. Quando a planta tem seus tecidos rompidos por alguma agressão ambiental esses compostos se decompõem por ação de uma glicosidase que produz um composto volátil que libera de sua quebra espontânea o ácido cianídrico, que altamente tóxico^[13].

2.5 Os compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem grande diversidade podendo ser considerado um grupo quimicamente heterogêneo possuindo uma única semelhança: o anel aromático ligado a uma hidroxila, ou seja, a presença de um fenol em suas estruturas.

Esses compostos estão associados à defesa contra herbívoros e patógenos, tem função de suporte mecânico, podem atuar como atrativos para polinizadores e podem ser fotoprotetores contra radiação UV^[11].

Os compostos fenólicos são produzidos por duas vias distintas no metabolismo de plantas. A via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. A rota do ácido chiquímico é a principal via de síntese e usa como precursores os derivados da glicólise e da via das pentoses fosfato (Figura 15), convertendo esses carboidratos em aminoácidos aromáticos.

O aminoácido mais utilizado para a síntese dos compostos fenólicos é a fenilalanina que é quebrada pela enzima fenilalanina amônia liase formando o ácido cinâmico. O ácido cinâmico é o precursor de vários compostos fenólicos como cumarinas, flavonóides e taninos condensados como mostra a Figura 15.

2.6 O estudo de plantas medicinais e sua toxicidade

O estudo de plantas com potencial medicinal envolve a identificação da planta, o isolamento de seus componentes ativos, a caracterização estrutural e farmacológica, bem como a avaliação da toxicidade, tanto do extrato bruto como do princípio ativo isolado.

A descoberta de um novo fármaco a partir de uma planta pode começar com uma indicação do uso popular do vegetal para tratar alguma patologia. O primeiro passo após a coleta do vegetal é proceder sua identificação, enquanto espécie por um botânico ou ecologista. Com o material coletado, então se prepara o extrato bruto e é feito o “screening” das atividades farmacológicas. Caso os resultados sejam satisfatórios, são realizados procedimentos de fracionamento e purificação dos princípios ativos de

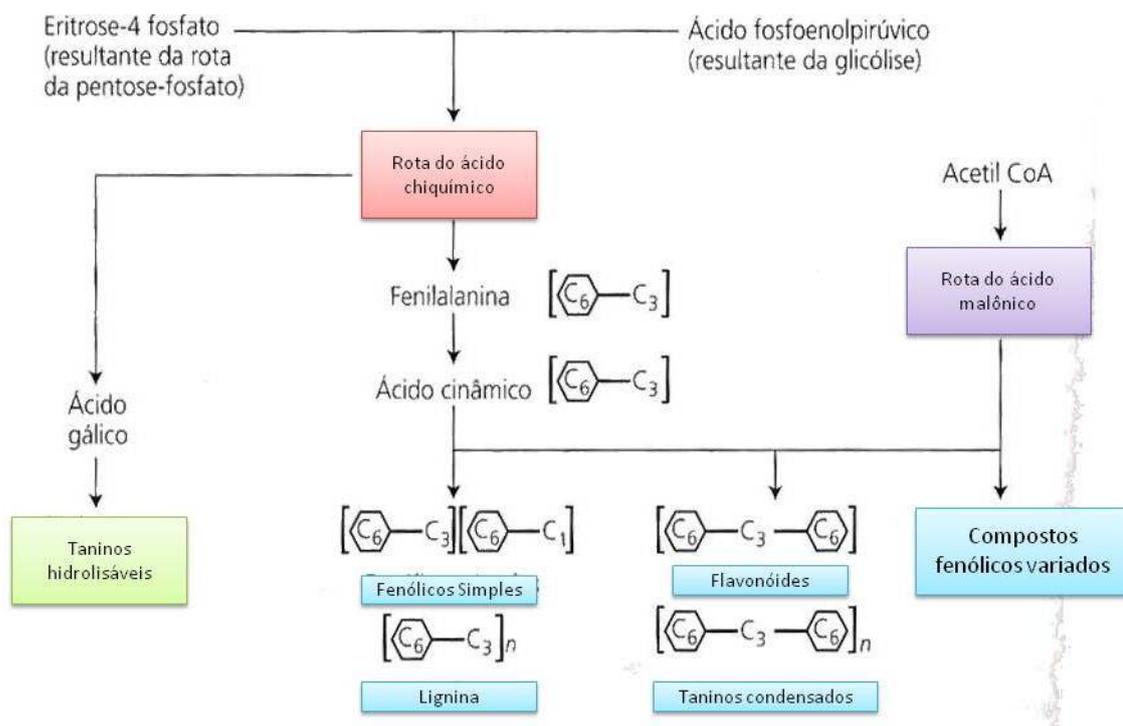


Figura 15: Rota do ácido chiquímico e produção de compostos fenólicos a partir da fenilalanina. (Fonte: TAIZ & ZEIGER (2007)^[11])

interesse, que são rastreados durante a purificação, realizando se novamente quantas vezes forem necessárias os ensaios de avaliação das atividades farmacológicas.

A Farmacologia possui um ramo que é a Farmacognosia que tem como alvo os princípios ativos naturais, sejam animais ou vegetais, ou seja, compreende o estudo desses produtos com intuito de utilizá-los como agentes terapêuticos, avaliando os efeitos farmacológicos e biológicos e ao mesmo tempo descobrir novas estruturas que sirvam de base ao desenvolvimento de medicamentos, bem como a possibilidade de síntese e modificação desses compostos^[13].

Com o advento de técnicas modernas, a farmacognosia combina as técnicas de isolamento e caracterização estrutural com estudos teóricos, como a modelagem molecular, bem como a comparação de princípios ativos recém descobertos com princípios já estudados e com estruturas depositadas em bancos de dados de metabólitos secundários^[15].

As plantas não se diferenciam de nenhum xenobiótico sintético e sua utilização deve ser baseada em estudos experimentais que comprovem que os benefícios de-

correntes de sua utilização compensem seus possíveis efeitos adversos^[16].

Do ponto de visto toxicológico deve se considerar que uma planta medicinal não induz somente o efeito terapêutico esperado. Como todo composto estranho ao organismo, os princípios ativos de plantas sofrem biotransformação e seus produtos podem ser tóxicos a ponto de causar danos á saúde^[13]. Os princípios ativos de plantas não apresentam apenas efeitos imediatos e benéficos, mas podem provocar efeitos assintomáticos e por isso existe a necessidade de avaliações criteriosas para garantir segurança no uso de uma espécie vegetal ou princípios ativos como qualquer outro medicamento.

O estudo de uma nova droga com efeitos terapêuticos passa por várias etapas das quais podem se destacar quatro principais. A primeira é a etapa botânica que consiste na identificação correta da planta. A segunda é etapa farmacêutica que esta relacionada à forma de preparo, padronização e administração, buscando a uniformidade das amostras testadas. Os ensaios biológicos pré-clínicos compreendem a terceira etapa, que têm por objetivo comprovar o efeito que motivou o estudo da espécie e sua segurança quanto à toxicidade e por fim a etapa clínica, realizada em humanos visando determinar experimentalmente o grau de segurança^[13].

No estudo de toxicidade aguda, os animais são tratados uma única vez com o produto em teste por um período aproximado de 24 horas^[13]. As análises dos resultados de testes após este período podem fornecer a dose capaz de induzir a letalidade, a forma da morte, os órgãos afetados e possíveis alterações no comportamento e sinais que precedem a morte, bem como alterações hematológicas, bioquímicas plasmáticas e urinárias. A análise histopatológica é usada para confirmar se houve ou não lesão nos órgãos examinados e para comprovar resultados quantitativos como dosagens de enzimas do plasma.

A manutenção de alguns dos animais tratados por um período superior a 24 horas é bastante interessante, pois permite verificar efeitos tardios que possam ocorrer após 24 horas após a administração da droga^[13].

2.7 Plantas com potencial antiofídico

O potencial antiofídico de espécies vegetais vem sendo demonstrado na literatura científica há mais de três décadas. Um dos primeiros estudos avaliando essa ação foi realizado com a espécie *Curcuma longa* (açafraão) que foi capaz de neutralizar uma neurotoxina purificada da peçonha de *Naja naja siamesis*^[17]. Posteriormente, esse potencial foi descoberto em novas espécies, em destaque *Eclipta prostrata* (erva botão), a qual apresentou proteção contra quatro doses letais da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*^[18, 19]; *Hibiscus esculentus* (quiabo), que apresentou eficácia do extrato aquoso obtido das sementes frescas ou secas do quiabo na inibição da peçonha de *Bothrops jararaca*^[20] e o óleo essencial de *Casearia sylvestris* (guaçatonga), que inibiu significativamente o edema e a permeabilidade vascular induzidos pela peçonha de *Bothrops alternatus*^[21].

BORGES et al. (2000)^[22] utilizando o extrato aquoso de folhas de *Casearia sylvestris* ratificaram o potencial antiofídico quanto à inibição de peçonhas brutas e miotoxinas de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacuçu*. IZIDORO et al. (2003)^[23] conseguiram neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi* e uma de suas metaloproteases isoladas, a neuwiedase, pelo extrato aquoso de *Casearia mariquitensis*.

Muitos outros trabalhos foram publicados tratando do estudo de extratos vegetais com efeitos antiofídicos usando plantas como *Musa paradisiaca*^[24], *Bauhinia forficata*^[25], *Annoma senegallensis*^[26], *Mikania glomerata*^[27], *Piper umbellatum* e *Piper peltatum*^[28], *Cordia verbenácea*^[29], *Penttaclerthra macroloba*^[30], *Casearia sylvestris*^[31], *Azadirachta indica*^[32], *Areca catechu* and *Quercus infectoria*^[33], *Magifera indica*^[34], *Camellia sianesis*^[35], *Hibiscus aethiopicus*^[36], *Schizolobium parahyba*^[37, 38, 39] e *Bombacopsis glabra* (presente trabalho).

A espécie *Scizolobium parahyba* (Figura 16) é uma árvore da Mata Atlântica, conhecida popularmente por faveira, guapuruvú ou umbela, pertence à família das Leguminosas (Caesalpinoideae), sendo uma árvore de 10 a 30 metros de altura.

As folhas e raízes da planta *Schizolobium parahyba* são utilizadas em Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro, no tratamento de acidentes por serpentes peçonhentas, sendo que o seu potencial antiofídico foi avaliado e comprovado por nosso grupo de



Figura 16: *Schizolobium parahyba* (Fonte: Mirian Machado Mendes)

pesquisas^[37, 38, 39].

O extrato aquoso de *S. parahyba* e compostos isolados foram capazes de neutralizar diferentes atividades enzimáticas e biológicas de peçonhas de serpentes botrópicas e crotálicas. Mendes et al. (2008)^[38] demonstraram que o extrato bruto de *S. parahyba* foi eficiente em inibir as atividades fosfolipásica A_2 (PLA₂), coagulante, fibrinogenolítica e miotóxica induzidas pelas peçonhas das serpentes *Bothrops pauloensis* e *Crotalus durissus terrificus*. O extrato aquoso de *S. parahyba* também foi eficiente em inibir a hemorragia local, bem como a redução dos níveis plasmáticos de fibrinogênio e plaquetas induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis* quando administrado após 15 minutos da inoculação da peçonha. Esses resultados demonstraram que o extrato aquoso de *S. parahyba* possui componentes capazes de inibir eficientemente os danos locais e sistêmicos induzidos por essa peçonha.

Posteriormente, VALE et al. (2011)^[39] (in press) isolaram quatro flavonóides do extrato aquoso de *S. parahyba* utilizando cromatografia em Sephadex LH20 e HPLC-RP sendo identificados por Ressonância Magnética Nuclear como isoquercitina, miricetina-3-O-glicosídeo, catequina e galocatequina (Figura 17).

Os quatro compostos isolados foram testados quanto a sua capacidade de inibir as principais ações tóxicas de peçonhas brutas e toxinas isoladas. Dentre eles, destaca-

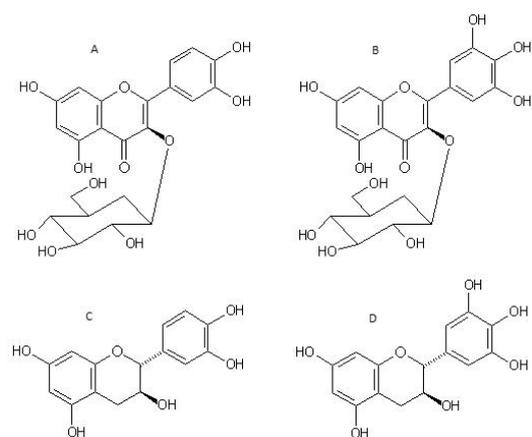


Figura 17: Flavonóis e catecois isolados do extrato aquoso de folhas de *Schizolobium parahyba*. (A) isoquercitrina; (B) miricetina-3-O-glucosídeo; (C) catequina e (D) galocatequina. Fonte: VALE et al. (2011)^[39] (in press)

se a galocatequina que foi bastante eficiente em inibir a atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops alternatus* (Figura 18).

O composto galocatequina isolado de *S. parahyba* foi também capaz de inibir a atividade miotóxica causada pela peçonha de *B. alternatus* e de uma PLA₂ denominada de BnSP-6 isolada da peçonha de *B. neuwiedi pauloenis* por RODRIGUES et al. (1998)^[40]. Estudos de simulação molecular (docking) realizados com a galocatequina e a PLA₂ BnSP-6 demonstraram que o modelo de ligação desse inibidor se dá pela interação do grupo hidroxil de seu anel A com os resíduos de aminoácidos histidina 48 e lisina 49 da toxina, que são cruciais para as suas atividades biológicas (Figura 19).

Os mecanismos inibitórios dos flavonoides isolados de *S. parahyba* sobre as toxinas isoladas de peçonhas de serpentes não foram ainda elucidados, mas podem, em grande parte serem atribuídos ao bloqueio dos substratos aos sítios catalíticos e ou efeitos sobre a quelação de íons metálicos que são essenciais para a catálise de muitas enzimas presentes nas peçonhas de serpentes^[39]. A espécie *Bombacopsis glabra* (Figura 20), sinônimo *Pachira oleaginea*, pertence à família Malvaceae e possui ação antiofídica (presente trabalho). É conhecida popularmente como castanha-do-maranhão, mamorana, castanha-da-praia, cacau-do-maranhão e cacau-selvagem. Ocorre em regiões tropicais e subtropicais da América, sendo nativa na floresta pluvial atlântica, de Pernambuco ao Rio de Janeiro, mas também ocorre na Amazônia nas beiras dos rios, igarapés e estuário do Amazonas^[41]. Esta espécie produz uma amêndoa

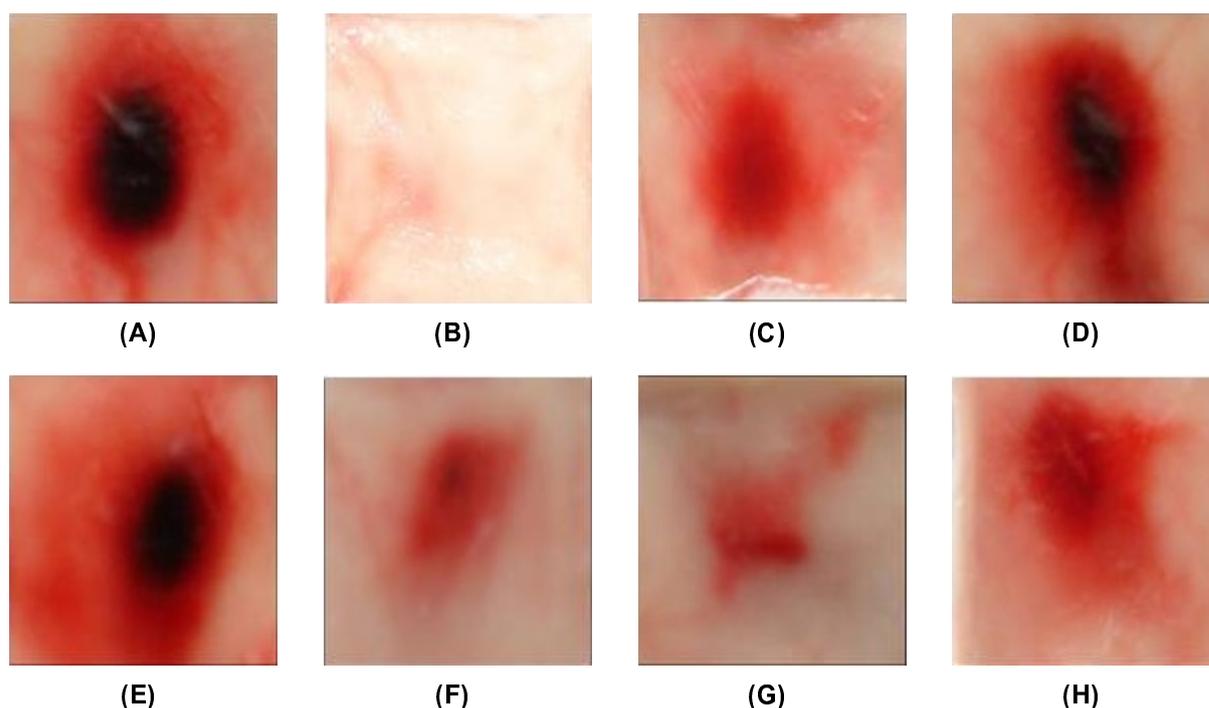


Figura 18: Inibição de 2 Doses Mínimas Hemorrágicas da peçonha de *Bothrops alternatus* por compostos ativos isolados do extrato bruto de *S. parahyba* incubados por 30 minutos a 37 °C na razão de 1:30 (m/m). (A) peçonha de *B. alternatus* (14,8 µg), (B) PBS; (C) *B. alternatus* + isoquercitina; (D) *B. alternatus* + miricetina-3-O-glucosídeo; (E) *B. alternatus* + catequina; (F) *B. alternatus* + galocatequina; (G) galocatequina aplicada 30 minutos da aplicação da peçonha de *B. alternatus*. Fonte: Vale et al. 2011.(in press).

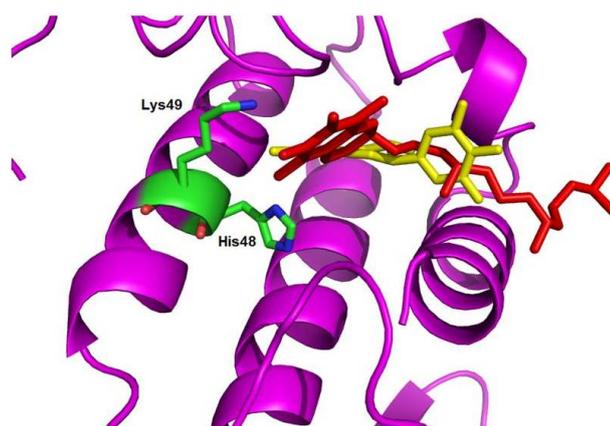


Figura 19: Modelagem molecular da galocatequina e da toxina BnSP-6. Os resíduos Lys49 e His48 são mostrados. Fonte: VALE et al. (2011)^[39]

rica em óleo, de sabor agradável, consumida pelo homem e animais silvestres e pouco estudada visando o seu aproveitamento econômico, mas que vem sendo estudada quanto ao seu potencial uso na produção de biodiesel a partir de suas castanhas^[42].



Figura 20: *Bombacopsis glabra*

Além dos estudos com óleo da amêndoa, do extrato hexânico da casca do caule de *B. glabra* foram isoladas dois princípios ativos, o 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona e o 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona e do extrato hexânico da casca externa da raiz de *B. glabra* foram isolados dois outros princípios ativos a Isohemigossipolona e o *p*-cumarato de triacontila^[43]. O *p*-cumarato de triacontila (PCT) (Figura 21) é um éster derivado do ácido *p*-cumárico. Sua síntese no vegetal ocorre como intermediário na rota de produção de derivados do ácido cinâmico que é resultado da metabolização do aminoácido fenilalanina produzido a partir de glicose na rota do ácido chiquímico (Figura 15).

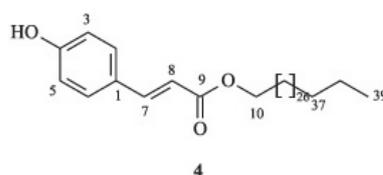


Figura 21: *p*-cumarato de triacontila.

Algumas moléculas derivadas de plantas, encontradas naturalmente como intermediárias do ácido cinâmico, um derivado do ácido chiquímico, foram testadas quanto a sua capacidade de inibir os efeitos dos envenenamentos ofídicos. Na literatura está descrito o ácido rosmarínico e o ácido caféico como inibidores das atividades induzidas pelas PLA₂ e das SVMPS. O ácido rosmarínico isolado de *Cordia verbenácea* foi capaz de neutralizar a atividade PLA₂ da peçonha de *B. jararacussu*^[29] e o mesmo

composto isolado de *Argusia argentea* neutralizou a atividade hemorrágica de *Protophthrops flavoviridis*^[44]. Esses dados mostram que esses intermediários do ácido cinâmico apresentam potencial bastante interessante como inibidores de duas das principais atividades lesivas de peçonhas ofídicas, responsáveis pelo dano tecidual local característico dos envenenamentos botrópicos.

O composto *p*-cumarato de Triacontila (PCT), utilizado no presente trabalho^[45] (capítulo 3), foi capaz de neutralizar significativamente com doses relativamente reduzidas a ação hemorrágica da peçonha de *B. pauloensis* bem como a ação hemorrágica da metaloprotease jararagina. PCT também foi capaz de neutralizar a degradação do fibrinogênio induzida pela peçonha de *B. pauloensis* e das toxinas BleucMP isolada da peçonha de *B. leucurus* e da jararagina. Ainda nesse estudo foi proposto o mecanismo de inibição dessas toxinas baseados em estudos teóricos de modelagem molecular sobre a interação do PCT com a neuviedase uma metaloprotease de classe PI isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*. Os interessantes achados desse trabalho evidenciaram que a neutralização eficiente da hemorragia no local da inoculação da peçonha pode significar uma regeneração ou reparo tecidual mais eficiente.

Estudos como esse, que buscam descobrir e desenvolver novos métodos de tratamento para envenenamentos ofídicos que visam auxiliar e também complementar a soroterapia de forma a melhorar a recuperação e o prognóstico das vítimas de picadas de serpentes são muito importantes e potencialmente promissores.

Entretanto, apesar do crescente interesse no estudo de plantas como fonte para novas drogas este potencial tem sido pouco explorado, uma vez que, estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no planeta e apenas 5.000 haviam sido estudadas até 1991^[8]. Segundo RASKIN et al. (2002)^[46] as espécies de plantas existentes são capazes de produzir uma diversidade de princípios ativos, maior que qualquer biblioteca química criada por humanos, servindo não apenas para aplicações terapêuticas diretas como também sendo usadas como modelos para produção de novas drogas.

Nesse sentido, nossos estudos de ação antiofídica utilizando o extrato aquoso de *S. parahyba*, *Boombacopsis glabra* e seus componentes isolados, além dos estudos de toxicidade aguda^[47] (Capítulo 4) abrem novas e promissoras perspectivas para a

aplicação e novas tentativas de bioprospecção de moléculas, bem com a síntese química em larga escala de drogas que poderão auxiliar no tratamento do envenenamento ofídico.

2.8 Referências

- 1 AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, 2011.
- 2 SWERDLOW, J. Nature's Medicine: Plants that health. **National Geographic Society**, 2000.
- 3 FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants — the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 148, p. 46–52, 1976.
- 4 RATES, S. M. K. Plants as sources of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–913, 2001.
- 5 PIERPOINT, W. S. Salicylic acid and its derivatives in plants: Medicine, metabolites and messenger molecules. **Botanical Research**, v. 20, p. 163–235, 1994.
- 6 NICOLAOU, K. C.; YANG, Z.; LIU, J. J.; UENO, H.; NANTERMET, P. G.; GUY, R. K.; CLAIBORNE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E. A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E. J. Total synthesis of taxol. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 630–634, 1994.
- 7 RYAN, M. P. Patent incentives, technology markets, and public-private bio-medical innovation networks in Brazil. **World Development**, v. 38, p. 1082–1093, 2010.
- 8 PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULLER, M. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. In: **Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems**. Oxford: Oxford University Press, 1991.
- 9 BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 1663–1672, 1999.
- 10 FURLAN, M. R. **Cultivo de plantas medicinais**. 2. ed. Cuiabá-MT: SEBRAE, 1999.
- 11 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **FISIOLOGIA VEGETAL**. 4. ed. [S.l.]: ARTMED EDITORA S.A., 2007.

- 12 SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 123–130, March 2003.
- 13 SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre–Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102 p.
- 14 PUTCHA, L.; CINTRÓN, N. M.; TSUI, J.; VANDERPLOEG, J. M.; KRAMER, W. G. Pharmacokinetics and oral bioavailability of scopolamine in normal subjects. **Pharmacology Research**, v. 6, p. 481–485, 1989.
- 15 BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.
- 16 Fundação Nacional de Saúde. **Sistema de informação de agravos e notificação**. 48. ed. Brasília-DF, 2001.
- 17 CHERDCHU, E.; SRIDUKAVAT, K.; KOON, K. R. Cobra neurotoxin inhibiting activity found in the extract of *Curcuma sp.* (Zingiberaceae). **Journal Medicine Thailand**, v. 61, p. 544, 1978.
- 18 MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131–1141, 1992.
- 19 PITHAYANUKUL, P.; LAOVACHIRASUWAN, S.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 347–352, 2004.
- 20 PEREIRA, N. A.; PEREIRA, P. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta med**, v. 60, p. 99–100, 1994.
- 21 RODRIGUEZ, M.; CARVALHO, J. C. T.; LUCIA, M.; MESQUITA, J. M.; SARTI, S. J. Avaliação da atividade antiofídica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre modelos animais estimulados com veneno de *Bothrops alternatus*. **III Jornada Paulista de Plantas medicinais**, v. 3, p. 110–111, 1997.

- 22 BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on action of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 127, p. 21–30, 2000.
- 23 IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRAMDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flaucortiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.
- 24 BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 21–29, 2005.
- 25 OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANTANA, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213–216, 2005.
- 26 ADZU, B.; ABUBAKAR, M. S.; IZEB, K. S.; AKUMKA, D. D.; GAMANIEL, K. S. Effects of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricollis nigricollis* venom in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 507–513, 2005.
- 27 MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER M, A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364–370, 2005.
- 28 NUÑES, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts

- towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017–1025, 2005.
- 29 TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, N. 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 A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318–327, 2005.
- 30 SILVA, J. O.; COPPED, J. S.; FERNANDIS, V. C.; SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 145–152, 2005.
- 31 CAVALCANTE, W.; OLIVEIRA, T.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P.; OLIVEIRA, C.; SOARES, A.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Toxicology Letters**, v. 172, n. Supplement 1, p. S226–S226, 2007.
- 32 MUKHERJEE, A. K.; DOLEY, R.; SAIKIA, D. Isolation of a snake venom phospholipase A₂ (Pla₂) inhibitor (AIPLAI) from leaves of *Azadirachta indica* (neem): Mechanism of Pla₂ inhibition by AIPLAI “in vitro” condition. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1548–1553, 2008.
- 33 LEANPOLCHAREANCHAI, J.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R. Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, p. 556–562, 2009.
- 34 PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; SAPARPAKORN, P. Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of thai mango seed kernel extract. **Molecules**, v. 14, p. 3198–3213, 2009.
- 35 PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S1, p. S56–S62, 2010.

- 36 HASSON, S. S.; AL-JABRI, A. A.; SALLAM, A.; AL-BALUSHI, M. S.; MOTHANA, R. A. A. Antisnake venom activity of *Hibiscus aethiopicus* l. against *Echis ocellatus* and *Naja n. nigricollis*. **Journal of Toxicology**, v. 2010, p. 234–249, 2010.
- 37 VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Blackwell Publishing Inc, v. 103, n. 1, p. 104–107, 2008.
- 38 MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCANTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltda, v. 22, n. 7, p. 859–866, 2008.
- 39 VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R. F. .; S.HAGE-MELIM, L. I.; SOUSA, M. A.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FRANCA, S. C.; SILVA, C. H. T. P.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Protective effect of schizolobium parahyba flavonoids against snake venoms and isolated toxins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2566–2577, 2011.
- 40 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 215–222, 1998.
- 41 DONADIO, L. C. **Frutas Brasileiras**. [S.l.]: FUNEP - Jaboticabal, 2002.
- 42 ARAUJO, F. D. S.; TOZETTO, L. J.; CHAVES, M. H. Potencialidade da castanha do Maranhão (*Bombacopsis glabra*) para a produção de Biodisel. **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodisel**, v. 1, p. 1–6, 2007.
- 43 PAULA, V. F.; CRUZ, M. P.; BARBOSA, L. C. A. Constituintes químicos de *Bombacopsis glabra* (bombacaceae). **Química Nova**, v. 29, p. 213–216, 2006.

- 44 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. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 2392–2396, 2011.
- 45 MENDES, M. M.; GOMES, M. S. R.; PAULA, V. F.; VIEIRA S. A. P .B.AND GIMENES, S.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; SANTOS, J.; MAGRO, A.; FONTES, M.; RODRIGUES, V. a. Triacontil P-Coumarate isolated from *Bombacopsis glabra* vegetal extract: A novel inhibitor of Snake Venoms Metalloproteinases. **A ser escolhido após a defesa**, 2011.
- 46 RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; RIPOLL, D. A. M. andCHRISTOPHE; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–530, December 2002.
- 47 MENDES, M. M.; VALE, L. H. F.; LUCENA, M. N.; VIEIRA, S. A. P. B.; IZIDORO, L. F. M.; JUNIOR, R. J. O.; SOARES, A. M.; ALCÂNTARA, T. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltd., v. 24, n. 3, p. 459–462, 2010.

Capítulo 3

Triacontil *p*-Coumarate isolated from *Bombacopsis glabra* vegetal extract: A novel inhibitor of Snake Venoms Metalloproteinases

Resumo

O uso de extratos de plantas como antídoto contra venenos animais é uma prática antiga, principalmente nos casos de envenenamentos ofídicos, além de também poderem ser usados como complemento para a soroterapia. As peçonhas de serpentes são complexas misturas de proteínas envolvidas em uma complexa série de eventos que dependem da ação sinérgica dessas moléculas. O presente estudo explora a capacidade do P-cumarato de triacontila, um composto isolado do extrato da casca externa de *Bombacopsis glabra* contra os efeitos lesivos da peçonha de *Bothropoides pauloensis* e toxinas isoladas. Para os ensaios *Bombacopsis glabra* ou do P-cumarato de triacontila foram previamente incubados com a peçonha ou as toxinas isoladas na razão de 1:1 (m/m) por 30 minutos a 37 °C antes dos testes. A condição de tratamento também foi ensaiada para simular a picada de serpente com do P-cumarato de triacontila inoculado no mesmo local da inoculação da peçonha ou toxina. O composto P-cumarato de triacontila foi capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica e a redução dos níveis de fibrinogênio plasmático induzidas pela peçonha de *B. pauloensis* ou toxinas testadas. Este composto foi capaz também de inibir a miotoxicidade e a hemorragia causada pela peçonha de *B. pauloensis* ou da toxina jararagina. Estes resultados foram confirmados por análise histopatológica de músculos gastrocnemios inoculados, mostrando que a jararagina foi fortemente inibida e foi possível perceber também o efeito protetor do do P-cumarato de triacontila pelo grande número de células regenerativas após uma semana de inoculação. Nossos resultados sugerem que do P-cumarato de triacontila apresenta especificidade para inibir as metaloproteases de peçonha. Para determinar o possível mecanismo de inibição ensaios de modelagem foram realizados com simulação de Docking, usando dados da estrutura da toxina Neuwiedase. Assim nós sugerimos que a inibição da Neuwiedase pelo composto do P-cumarato de triacontila é devido a interação dentro do domínio catalítico causando impedimento estérico ou a desorganização do sítio catalítico. Nesse sentido o P-cumarato de triacontila pode fornecer uma nova e alternativa terapia complementar para o tratamento de envenenamentos ofídicos.

Palavras chave: *Bombacopsis glabra*, *Bothropoides pauloensis*; Jararagina; Metaloprotease; Plantas antiofídicas; peçonha de serpente.

Triacontil *p*-Coumarate isolated from *Bombacopsis glabra* vegetal extract: A novel inhibitor of Snake Venoms Metalloproteinases

Mendes, M. M.*¹ Gomes, M. S. R.^{1,2} Paula, V. F.² Vieira, S. A. P. B.¹ Gimenes, S.N.C.¹
Alcântara, T. M.¹ Honsi-Brandeburgo, M. I.¹ M. I.¹ Hamaguchi, A.¹ Santos, J.³ Magro, A.³
Fontes, M. R. M.³ Rodrigues, V. M.*^{1,3}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

²Departamento de Química. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié-BA, Brazil

³Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia – Nanobiofarmacêutica

Abstract

The use of plant extracts as antidote against animals venoms is an old practice, mainly envenomations by snakes, besides also may used as supplemental of serum therapy. Snake venoms are a rich mixture of proteins involved in a complex series of events that depends on the synergic action of these molecules. The present study explores the ability of Triacontil *p*-Coumarate (PCT) an active compound isolated from root bark of *Bombacopsis glabra* vegetal extract (Bg) against harmful effects of *Bothropoides pauloensis* snake venom and isolated toxins. For assays Bg or PCT were previously incubated with venom or toxins at ratios 1:1 and 1:5 (w/w; venom/PCT) for 30 min at 37 °C before the tests. Treatment condition was also assayed to simulate a snake bite with PCT inoculated at same site of venom or toxin. The PCT was able to neutralize fibrinolytic activity and plasmatic fibrinogen depletion induced by *B. pauloensis* venom or toxins tested. This compound was also able to inhibit the myotoxicity and hemorrhage caused by *Bothropoides pauloensis* venom or jararhagin toxin. These results were confirmed by histological studies of inoculated gastrocnemius muscle showing that jararhagin is strongly inhibited and is possible see the protective effect of PCT by larger number of regenerative cells after one week of inoculation. Our results suggest that PCT present a specificity to inhibit snake venom metalloproteinases. To determinate the possible inhibition mechanism from PCT a molecular modeling was made with docking simulations using Neuwiedase structure data. Thus, we suggest

that Neuwiedase inhibition by PCT is due an interaction inside of the catalytic domain causing steric hindrance and/or disorganization of the catalytic net. In this way, PCT may provide new complementary alternative to treatments for ophidian envenomations.

Keywords: *Bombacopsis glabra*, *Bothropoides pauloensis*; Jarharagin; Medicinal plant; Metalloproteinase; Plant anti-snake venom; Snake venom;

*Corresponding author: V. M. Rodrigues; e-mail: veridiana@ingeb.ufu.br and/or M. M. Mendes; e-mail: mirianmmendes@yahoo.com.br

Abbreviations: PCT- Triacontil *p*-Coumarate; Bp- *Bothropoides pauloensis*; Jar- jarharagin; Bg- *Bombacopsis glabra*; PLA₂ – phospholipase A₂.

3.1 Introduction

Snakebites envenomations remain a considerable challenging in many parts of the world and consist at global public problem, affecting mainly poor people and had received inadequate attention from research funding agencies^[1]. Current data suggest that there are more than 2.5 millions bites per year, with 150,000 deaths worldwide^[2, 3]. In Brazil occurs around 20,000 accidents annually and the profile of snakebites are frequently among male farm workers between 15-49 years old, affecting mainly the lower limbs and are caused mainly by snakes from *Bothrops* and *Bothropoides* genus^[4, 5, 6].

In 2009 *Bothrops* genera was reclassified according to morphological and molecular characters as mitochondrial DNA analysis. The systematic revision classified some *Bothrops* snakes as *Bothropoides* genera that have 10 species, including *Bothropoides pauloensis*, *Bothropoides neuwiedi* and *Bothropoides jararaca* and the *Bothrops* genera is composed by 17 species, including *Bothrops leucurus* and *Bothrops moojeni*^[7].

Snake Venoms are complex mixtures of peptides and proteins including mainly disintegrins, phospholipases A₂, phosphodiesterases, phosphomonoesterases, L-amino acid oxidases, hyaluronidases, serine proteinases and metalloproteinases^[8, 9] involved

in a complex series of events that depends on the synergic action of these molecules.

The snake venom metalloproteinases (SVMPs) are among the most widely studied animal toxins. They are responsible for the majority of local and systemic effects observed after envenomations, such as hemorrhage, edema, myonecrosis, inflammation and changes in the haemostatic system^[10]. Most of the venom metalloproteinases display a large proteolytic diversity and fibrinogen is one of their main substrates. They show specificity directed preferentially towards the A α -chain and with somewhat lower activity towards the B β -chain^[11, 10]. Substrates specificities have been demonstrated upon as casein, oxidized insulin B chain, fibrin, as well as over extracellular matrix proteins, such as collagen type IV, laminin, fibronectin, proteoglycan^[12, 13, 14, 15]. The hemorrhage is the main effect induced by several SVMPs. These enzymes can cause degradation and disruption of the capillary basement membrane^[15, 16, 17, 18, 19] subsequently lead to edema, shock, myonecrosis and reduced ability to regenerate muscle tissue^[20]. This way, the inhibition of SVMPs may result in a significant overall reduction in local tissue damage following the envenomation. Therefore the SVMPs inhibitors have become important targets of research during last years.

Several SVMPs (EC 3.4.24) have been isolated from snake venoms and their structure and action mechanisms have been showed. These toxins are zinc-dependent which belong to the Metzincin family. They are classified into PI to PIII groups, according to your structural domains^[21]. The PI metalloproteinases are composed in the mature form only by catalytic metalloprotein domain and are weakly or no hemorrhagic. BleucMP^[22] and Neuwiedase^[23], which we used in this work, are no hemorrhagic metalloproteinases isolated from *Bothrops leucurus* and *Bothrops neuwiedi* venoms, respectively. These toxins are able to degrade fibrinogen, extracellular matrix proteins and to cause muscle necrosis^[24, 25, 22]. Jarharagin, another model of SVMPs inhibition showed in this work, is a 52 kDa PIII metalloproteinase strongly hemorrhagic isolated from *Bothrops jararaca* venom^[26]. This toxin possesses the metalloprotease, desintegrin-like and cysteine-rich domains^[8, 27] which can be responsible for its many functions such as disturbances on hemostasis^[28], pro-inflammatory activity^[29] platelet aggregation inhibition^[30], and pro-apoptotic in endothelial cells^[31].

The use of plant extracts as antidote against animals venoms is an old practice,

mainly envenomation for snakes, especially tropical and subtropical development countries, where antivenom is not readily available. Besides also used as supplemental of serum therapy.

Several plants were studied about their antiophidic potential, such as *Cordia verbenacea*^[32], *Musa paradisiaca*^[33], *Schizolobium parahyba*^[34, 35], *Casearia sylvestris*^[36], *Azadirachta indica*^[37], *Areca catechu* and *Quercus infectoria*^[38], *Magifera indica*^[20], *Camellia sianesis*^[39], and *Hibiscus aethiopicus*^[40].

The continuous research to discover new compounds that may be useful as a complementary treatment to serum therapy is very important, once antiophidian serum shows some disadvantages, such as, hypersensitivity, non-availability and lack of protection against local effects^[30, 36, 41, 42].

Bombacopsis glabra or “Maranhão's Chestnut” is a native species that exist on northeast and southeast Brazilian seashore on Atlantic forest formations^[43] and present compounds able to neutralize some harmful venom effects. From its root bark were isolated four active compounds or secondary metabolites, 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone, isohemigossypolone and Triacontil *p*-Coumarate (PCT)^[44].

The present study explores the ability of *Bombacopsis glabra* vegetal extract and the Triacontil *p*-Coumarate (PCT) to inhibit the harmful effects, such as clotting disturbances, hemorrhage and myonecrosis induced by *Bothropoides pauloensis* snake venom (Bp), Jararhagin^[26, 14] (Jar), BleucMP, TL-LeucGomes et al. (2011)^[45] and BnSP-6^[46] toxins. Furthermore, we used a PI metalloproteinase, Neuwiedase, in order to investigate possible interactions between the metalloproteinase domain and PCT by molecular docking studies.

3.2 Material and methods

3.2.1 Animals

Swiss male mice (18 – 22 g) were obtained from Valle Institute (Uberlândia, Minas Gerais, Brazil). The animals were kept under standard conditions (temperature 22 ± 1 °C, relative humidity $60 \pm 5\%$, 12 h light/dark cycle) with standard diet and water ad libitum.

3.2.2 Ethical aspects

The procedures and assays involving animal tests were approved by Committee for Ethics in Animal Experiments (Protocol number: CEUA/UFU 047/09) and is in agreement with the ethical principles of animal experimentation adopted by the Brazilian Society of Science in laboratory animals.

3.2.3 Snake venom and toxins

Bothropoides pauloensis (Bp) snake venom was supplied by the Bioativas Serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil). The lyophilized venom was weighed, dissolved in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and centrifuged at 3.000 xg for 10 min. The supernatant was collected and immediately used. The BleucMP was isolated from *Bothrops leucurus* venom according to Gomes et al. (2011)^[22]. The PLA₂ BnSp-6 toxin was isolated from *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) venom according to RODRIGUES et al. (1998)^[46] e TL-Leuc, a thrombin like toxin was isolated from *B. leucurus* snake venom according to Gomes et al. (2011)^[45]. The Jararhagin toxin was kindly donated by Dra. Ana Maria Moura da Silva and Dra. Cristiani Baldo (Butantan Institute-Brazil). Venom or toxins were dissolved in NaCl 0.9% for protein quantification according to method of BRADFORD (1976)^[47].

3.2.4 *Bombacopsis glabra* vegetal extract and Triacontil *p*-Coumarate

The vegetable material was collected from a specimen of *Bombacopsis glabra* in Jequié city (Bahia, Brazil). The botanical identification was accomplished by Dr. J. Semir, from the State University of Campinas Herbarium, Campinas city (São Paulo, Brazil). The root of *B. glabra* was collected and dried at room temperature. The material was triturated and then submitted to extractions with hexane. The distillation of the solvent was accomplished under reduced pressure in a rotating evaporator. The obtained dry mass was called *Bombacopsis glabra* vegetal extract brute (Bg).

The Triacontil *p*-Coumarate (PCT) was isolated from hexane extract from *B. glabra* root external peel^[44] and was kindly donated by Dra. Vanderlucia Fonseca de Paula from State University Southwest of Bahia-UESB.

3.2.5 Inhibition of "in vitro" and "in vivo" assays

The "in vitro" and "in vivo" inhibition assays were carried out by mixing the Bg or PCT at ratios 1:1, 1:5 (w/w) for 30 min at 37 °C before the tests. For the "in vivo" inhibition assays, another protocol was also used, called treatment condition. Briefly, the animals received solutions containing Bp or Jararhagin and 15 min later the animals were inoculated by the same route with the inhibitor PCT. For these experiments, ratios 1:5 venom or toxin: PCT (w/w) were used. The concentration of aqueous extract of Bg or PCT were expressed in terms of dry weight^[35].

3.3 "In vitro" activities

3.3.1 Coagulant activity

The coagulant activity of *B. pauloensis* venom and TL-Leuc, a 'thrombin-like' toxin was assayed on bovine plasma according to ASSAKURA et al. (1992)^[48]. Solutions containing PBS plus calcium, venom or PCT alone were used as controls. The time to clot the plasma solutions was recorded in a micro-processor Quick-Timer analyzer

(DRAKE LTDA). Coagulant activity was expressed by the mean time of coagulation (in seconds) (n=3).

3.3.2 PLA₂ activity

PLA₂ activity was determined by using an indirect hemolytic assay in a gel plate containing egg yolk (1 egg yolk/ 167 mL NaCl 0,9%), CaCl₂ (0.56 g/L) and agar (20 g/L), according to GUTIÉRREZ et al. (1988)^[49]. This activity was assayed with 10 µg of *B. pauloensis* snake venom. Enzymatic activity was expressed as halo diameter. Each experiment was expressed as the mean ±SD (n = 3).

3.3.3 Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity was evaluated according to RODRIGUES et al. (2000)^[24]. Samples of 50 µL of bovine fibrinogen (1 mg/mL PBS) were incubated with 10 µg of *B. pauloensis* venom or toxins (Jararhagin or BleucMP) at 37 °C for 2 h. The reactions were stopped with 25 µL of 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.5 containing 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-mercaptoethanol and 0.05% (w/v) bromophenol blue. Samples were then analyzed by 14% (w/v) SDS-PAGE.

3.4 "In vivo" activities

3.4.1 Plasma fibrinogen determination

Groups of four Swiss male mice (18 – 22 g) were injected by *i.p.* route with 30 µg *B. pauloensis* venom or Jararhagin. After 6 h, the blood was collected by cardiac puncture in the presence of sodium citrate (0.109 M). The plasma fibrinogen concentration was determined by measuring the clotting time using a commercial kit (Biotécnica, Brazil). Each experiment was expressed as the mean ±SD (n = 3). The inhibition potential of PCT was presented as percent inhibition of consumption of plasma fibrinogen.

3.4.2 Hemorrhagic activity

Hemorrhagic activity was performed according to NIKAI et al. (1984)^[50], with modifications. Initially, groups of Swiss male mice (n = 4, 18 – 22 g) were injected intradermally in the dorsal region with 3 Minimum Hemorrhagic Doses (MHD) of *B. pauloensis* snake venom (24.39 µg)^[23] or Jararhagin (4.5 µg)^[28]. After 150 minutes the animals were anesthetized (ketamina 10% (0,05 mL/kg) + xilasina 2% (0.025 mL/kg)) and sacrificed. Their skins were removed and the hemorrhagic halo was then measured with a digital caliper DIGMESS 100.174BL. Control mice received only saline, Bg or PCT. Each experiment was expressed as the mean ±SD. The anti-hemorrhagic potential of Bg or PCT was presented as percent inhibition of the hemorrhagic activity.

3.4.3 Myotoxic activity

Swiss male mice (n=4, 18 – 22 g) were injected in the right gastrocnemius with 25 µg of *B. pauloensis*, 50 µg of Jararhagin or PLA₂ (BnSP-6) toxins. Control mice received only Saline or PCT. After 3 h, the animals were bled and blood was collected by cardiac puncture. Activity from plasmatic creatine kinase was determined by using a commercial kit (Biotécnica, Brazil). The activity was expressed in units/L, one unit corresponding to the production of 1 µmol of NADH per min at 30 °C^[35]. The anti-myotoxic potential of PCT was presented as percent inhibition of the myotoxic activity.

3.4.4 Histopathological alterations

Swiss male mice (n=4, 18 – 22 g) were inoculated in the gastrocnemius muscle with Jararhagin (10 µg) and 1, 24 and 168 hours after toxin inoculation, animals were killed by deep anesthesia (ketamina 10% (0.05 mL/kg) + xilasina 2% (0.025 mL/kg)) and the muscle was excised and soaked in fixing solution (10% formaldehyde in NaCl 0.9%). The material was dehydrated with ethanol and included in to paraffin blocks. Histological cuts of 5 µm were made and stained with hematoxylin and eosin (HE) to be examined under a light microscope and morphological alterations were evaluated. Control mice received only Saline or PCT^[35, 23, 51].

3.5 Molecular Docking Studies

3.5.1 Metalloproteinase Neuwiedase modeling

According to alignment data from HHpred server^[52], the crystallographic model of BaP1 - a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom (PDB code 1ND1_chain A)^[53] – was selected as a template for the construction of the initial theoretical neuwiedase structural model. This template, selected in the Protein Data Base (PDB) using the algorithm BlastP (*default* parameters), was chosen based on the alignment score (374.1) and its identity (70%) and similarity (83%) related to the Neuwiedase sequence. The program MODELLER 8v2^[54] was then used to generate ten structural models based on the selected template. Variable target function method (VTFM) with conjugate gradients (CG)^[55] and molecular dynamics (MD) with simulated annealing (SA)^[55] were used in order to refine the models. The Zn⁺⁺ ion of each model was added based on the coordinates of this ion in BaP1 crystallographic model. The best Neuwiedase model generated by the program MODELLER 8v2 was selected according the better stereochemical and energetic parameters determined respectively by the programs RAMPAGE^[56] (98.5% of its residues are distributed in the favorable regions and 1,5% in the allowed regions of the Ramachandran plot) and ProSA-web^[57] (Z-score = -5.97).

3.5.2 Triacontil *p*-coumarate (PCT) in silico design and docking simulations

The program Avogadro v.0.9.4 (<http://avogadro.openmolecules.net/>) was used to design the Triacontil *p*-coumarate (PCT) molecule and improve its overall structure by an energy minimization process based on the MMF94 force field and in a steepest-descent algorithm. All docking simulations between the Neuwiedase model and the ligand were executed by the program GOLD v.4.0 (CCDC Software Limited, Cambridge, U.K.)^[58]. The docking site was defined within a 20 Å radius around the ion Zn⁺⁺ localized at the Neuwiedase active site. Additionally, more cavities found on the protein surface were also tested in order to identify other potential docking sites. N δ 1 atoms from catalytic histidines of Neuwiedase were protonated and the coordination of the Zn⁺⁺ ion

was tested as tetrahedral or default to evaluate the influence of this parameter on the PCT/Neuwiedase complexes. The options on/fix, on/spin, toggle/fix, and toggle/spin were tried to evaluate the role of the Glu142/Zn⁺⁺ – coordinated catalytic water in inhibitor/protein complexation. It was defined the maximum number of 20 docking solutions generated per each simulation; the other docking parameters were defined according to the GOLD v.4.0 default settings. The docking solutions between PCT and the native Neuwiedase structural model were scored and rescored using, respectively, the GoldScore and ChemScore fitness functions^[58].

3.5.3 Molecular dynamics simulations

The Neuwiedase/PCT docking solutions which presented the better GoldScore and ChemScore values were submitted to MD simulations using the program GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) v.4.0.2^[59]. All simulations were executed using the protein models in presence of explicit water molecules^[60] and calculated in an Intel Core 2 Quad x64 with an Ubuntu 8.04 Linux operational system. GROMOS 96 53a6 force field^[61] was chosen to perform the MD simulations and the protonation states of the charged groups were set to pH 7.0. The minimum distance between any atom of the models and the box wall was 1.0 nm. An energy minimization (EM) using a steepest descent algorithm was performed to generate the starting configuration of the systems. After this step, 200 ps of MD simulation with position restraints applied to the protein (PRMD) was executed in order to relax the systems gently. Then, 15 ns of unrestrained MD simulation were calculated to evaluate the stability of the structures. All MD simulations were carried out in a periodic truncated cubic box under constant temperature (298 K) and pressure (1.0 bar), which were hold by coupling to an isotropic pressure and external heat bath^[62]. The distances between the catalytic histidines and the Zn⁺⁺ ion of the native Neuwiedase structural model and the Neuwiedase/PCT complexes were kept according to Andreini et al. (2005)^[63] PCT topology and coordinates files used for molecular dynamics (MD) simulations were generated by the Dundee PRODRG2.5 Server (beta) (http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta).

3.5.4 Evaluation of the theoretical structural models

Overall stereochemical and fold quality of the native Neuwiedase structural model obtained after initial modeling and MD simulation and Neuwiedase/PCT docking solutions submitted to MD simulations were checked with the programs RAMPAGE^[56] and ProSA-web^[57].

3.6 Statistical analysis

The results were presented as the mean Value \pm SD obtained with the indicated number of tests. The statistical significance of differences between groups was evaluated using ANOVA test. A *P-value* <0.05 was considered indicated of significance.

3.7 Results and Discussion

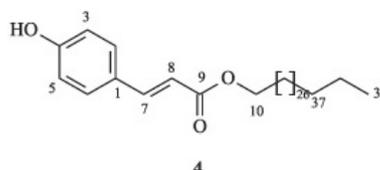
Plants has been used in Brazil as an antidote against snake venoms for farmers and healers, but only a few species have been scientifically investigated with their active components isolated and characterized both structurally and functionally. The chemistry of secondary metabolism opens a window for large diversity of compound or secondary metabolites potentially useful in industrial applications and human health.

In the present study, the inhibitory effects of *Bombacopsis glabra* vegetal extract and Triacantil *p*-Coumarate (Figure 22) on *B. pauloensis* venom and some isolated toxins were evaluated by different "in vitro" and "in vivo" assays. PCT is a phenolic compound derived from the *p*-Coumaric acid and the biosynthesis in plants occurs via hydroxylation and cyclization of cinnamic acid, which is produced from phenylalanine amino acid in the plant secondary metabolism^[64, 65, 66]. Some cinnamic acid analogues were examining against snake venoms. An example is the Rosmarinic acid present in several plants^[32, 66, 67].

Snake venoms are a complex mixture of proteins that provoke a complex series of events that depend on your combined action. These proteins are used as offensive



(A)



(B)

Figura 22: **(A)** *Bombacopsis glabra*. **(B)** Triacontil *p*-Coumarate structure elucidated by spectroscopic analysis ($C_{39}H_{68}O_3$). Font: Paula et al. (2006)^[44].

weapons for immobilizing, killing and digesting their prey^[68]. Bothropic and bothropoic snake bites in human can cause acute medical emergencies involving intense pain^[69], local tissue damage that can cause permanent disability and may result in limb amputation^[1, 11, 70] and bleeding disorders due mainly the alterations of haemostatic system^[68].

The alterations of haemostatic system can be induced by some venoms components such as anticoagulant and procoagulant enzymes. The coagulating enzymes can lead to activation of prothrombin and factor X unlike anticoagulants enzymes that can act on fibrinogen and platelets^[8]. The coagulant activity induced by *B. pauloensis* snake venom was inhibited by Bg extract (results not shown). These results showed that Bg extract possesses active compounds able to neutralize the coagulant activity of Bp venom. Indeed, the isolated compound PCT, when incubated at highest ratio 1:5 (venom or toxin, w/w) was able to inhibit approximately 45% and 1% the coagulant activity of Bp venom and TL-Leuc a thrombin-like isolated from *B. leucurus* venom, respectively (results not shown). These results suggest that PCT is not able to inhibit serine proteases with thrombin-like activity from this venom.

Several snake venom toxins display a large proteolytic diversity and fibrinogen is one of their main substrates. The fibrinogenases can be classified into three groups according to the specificity of hydrolysis of the chains of fibrinogen. The first group of fibrinogenases is represented mainly by metalloproteinases, with specificity directed

preferentially towards the A α -chain and with somewhat lower activity towards the B β -chain^[24, 22]. The fibrinogenases of second group preferentially cleave the B β -chain with lower activity towards the A α -chain^[71]. The third group of fibrinogenases has specificity for chain of fibrinogen. These fibrinogenases are quite rare having been purified only from the venom of *Crotalus atrox*^[50].

The inhibition of proteolytic activity of Bp venom, Jararhagin and BleucMP upon fibrinogen is showed in the present work (Figure 23). Partial inhibition was observed when venom and Bg vegetal extract were incubated at ratio 1:10 (w/w). The degradation of A α chain was partially inhibited by Bg extract indicating that crude extract has components capable to neutralize this activity (Figure 23(A)). The Figure 23(B) shows the action of PCT against Jararhagin toxin. PCT at ratio 1:1 (w/w) was very efficient protecting the fibrinogen chains degradation. Figure 23(C) shows the same protection of fibrinogen degradation, against the BleucMP toxin by PCT.

Some snake venoms are able to activate blood clotting factors, causing the consumption of fibrinogen and often leading to blood incoagulability^[25, 22, 72, 73]. The plasma fibrinogen level was reduced significantly when 30 μ g of Bp or Jararhagin were administered intraperitoneally in mice (Figure 23(D)). This effect was reduced significantly after PCT inhibition (Figures 23(D) and 23(E)). PCT inhibited 53% and 26% the decreasing of plasma fibrinogen concentration induced by Bp venom and Jararhagin at ratio 1:1 (venom or toxin:PCT, w/w), respectively. This inhibition was also observed when the PCT was inoculated 15 min later the venom or toxin inoculation (Figures 23(D) and 23(E)).

Another approach in the present study, was evaluate the inhibitory effect of PCT over the muscle tissue damage induced by Bp and isolated toxins. Muscle tissue damage (myonecrosis) is the most dramatic and severe characteristic of envenomations by bothropic and bothropoic snakes^[74, 75]. The proteins that cause myonecrosis are mainly phospholipases A₂ and metalloproteinases. The myotoxic PLA₂s induce damage in the muscle fibers and cause an important medical complication of snake bites and can lead drastic sequelae, such as permanent disability or amputation^[76, 77]. The group of myotoxic PLA₂s causes a drastic perturbation of the plasma membrane or sarcolemma, provoking loss in the control of calcium permeability, and consequently,

causing disruption of this membrane, and inducing a rapid release of cytosolic markers, such as lactic dehydrogenase and creatine kinase (CK)^[78, 1]. The myotoxicity induced by snake venom metalloproteinases occurs due to hemorrhagic and ischemia effects provoked by these toxins which can lead to muscular necrosis and consequent CK release^[1, 79].

The myotoxicity induced by Bp venom, Jararhagin, and PLA₂ Lys-BnSP-6 toxins was evaluated by CK plasma levels. The Figure 24(A) shows the capacity of PCT to inhibit the myotoxicity induced by Bp venom. This activity was inhibited 27% when this venom was incubated with PCT at 1:5 ratio (w/w) for 30 min and 24% when PCT at ratio 1:5 (w/w) was inoculated 15 min later Bp venom injection. The myotoxicity induced by Jararhagin was inhibited at lowest ratio (Figure 24(B)), and at ratio 1:5 (w/w) the inhibition was very intense, approximately 88%. In the treatment condition the inhibition was approximately 32%. The myotoxicity induced by PLA₂ BnSP-6 toxin, a Lys49-PLA₂ myotoxin isolated from the *B. pauloensis* (*B. neuwieidi pauloensis*)^[46] was not neutralized by PCT (Figure 24(C)).

Interestingly, the Bp venom PLA₂ activity evaluated by an indirect hemolytic assay^[49] was not significantly inhibited by PCT. This compound was able to inhibit only 16.14% and 16.70%, of enzymatic PLA₂ activity at ratios 1:1 and 1:5 (w/w), respectively, but these values were not statistically significant (results not shown). These findings suggest that PCT may inhibit preferentially SVMPs than PLA₂s, as showed in Figure 24.

SVMPs are important component in venoms of bothropic and bothropoic snakes. They are main responsible for hemorrhage in the bite site^[1, 11] which can appear few minutes after SVMPs injection^[21]. The SVMPs are among the most widely studied animal toxins and the mechanisms by which SVMPs cause hemorrhage have been the most studied issue.

Histological and ultrastructural studies showed that hemorrhagic SVMPs cause alterations in blood vessels by two different mechanisms, named hemorrhage *per rhexis* and hemorrhage *per diapedesis*. In the first, it can be observed a separation of endothelial cells from the surrounding basement membrane (BM), formation of blebs pinching off endothelial cells, and reduction in the width of these cells, together with loss of BM^[11, 13, 12, 80]. All these alterations can induce loss of integrity of endothelial

cells, with formation of gaps allowing the plasma extravasation^[80]. In the second mechanism of hemorrhage induction, the blood extravasation occurs in the venules, through widened intercellular junctions in the endothelial.

In order to evaluate the inhibition of hemorrhagic activity the animals received 3 MHD (Minimum hemorrhagic dose = 24.39 µg) of *B. pauloensis* crude venom (Figure 25(A)). The neutralization of this activity by Bg vegetal extract at ratio 1:5 (w/w) was very efficient; inhibiting almost 100% the hemorrhage induced by Bp venom. The isolated compound (PCT) was also efficient to inhibit Bp crude venom (Figure 25(B)) reducing the diameter of hemorrhagic halo approximately 64% and 76%, at ratios 1:1 and 1:5 (w/w), respectively. The hemorrhagic activity induced by jararhagin was inhibited approximately 11% and 54% by PCT at ratios 1:1 and 1:5 (w/w), respectively (Figure 25(C)). The Figure 25(D) shows the neutralization of the hemorrhage induced by jararhagin by PCT in both experimental conditions. It can be shown the reduction of skin bleed intensity, mainly at ratio 1:5 (w/w).

The treatment condition is an interesting method to evaluate the neutralizing capacity from inhibitor. The PCT injections 15 min later venom or toxin inoculation simulate that occurs of course out of laboratory. The treatment condition with PCT, both, Bp and jararhagin were inhibited significantly 58% and 44%, respectively (Figures 25(B) and 25(C)).

Hemorrhagic SVMPs cause basement membrane hydrolysis^[81, 11, 1]. The basement membrane besides keep the tissue architecture is a warehouse of growth factors and undifferentiated cells, as satellite cells, responsible by regeneration and repair of muscular tissue. The start of muscular regeneration is the appearance of muscle satellite cells due to action of mediators released by affected tissue^[1].

The regeneration of necrotic areas after venom injection is very poor, by the other hand muscle regeneration after myotoxic PLA₂ injection occurs normally. Thus has accepted that SVMPs damage is responsible for the poor muscle regeneration^[81, 11, 1].

Histological examination of muscle tissue after Saline and PCT (controls) showed features typical of normal muscle tissue (Figures 26(D) and 26(E)). In opposition, injection of 10 µg of Jararhagin (after 1 hour) induced tissue alterations such as swelling

characterized by the increase of fibers spaces and intense hemorrhagic areas (H) (Figure 26(A)). This effect can be due to the damage in endothelial cell and disorganization of basement membrane by its proteolytic action as already been described for other SVMPs^[1, 11, 12, 13]. After 24 hours (Figure 26(F)), a number of muscle fibers present characteristic signs of necrosis (N) and an intense leukocyte accumulation (I) is seen within all spaces between muscle fibers. This infiltrate is composed mainly of polymorphonuclear leukocytes. After 168 hours (1 week) of Jarharagin inoculation, the muscle tissue section is composed by a large number of necrotic debris (Figure 26(L)).

PCT compound at ratio 1:1(w/w) was not able to neutralize the effects provoked by Jararhagin (results not shown), but at ratio 1:5 (w/w) the hemorrhage and necrotic areas were efficiently reduced (Figures 26(B) and 26(G)). Is possible to see a larger number of regenerative cells (RC) formed that are characterized by central nuclei (Figures 26(M)).

This compound was also able to inhibit these effects, mainly the hemorrhage when administrated after toxin. There was also presence of regenerated muscle cells and lesser amount of necrotic debris indicating that PCT treatment condition was very efficient (Figures 26(H) and 26(N)).

The light microscopy analysis of gastrocnemius muscle clearly demonstrated that PCT was able to inhibit the Jararhagin toxin minimizing the harmful effects in the muscle tissue. These results show the protective effect of PCT against the main proteins responsible for the tissue local damage after envenomation and open the new perspectives for its use as a complement for serum therapy.

In your study Aung et al. (2010)^[67] report the anti hemorrhagic activity of rosmarinic acid that consists of one caffeic acid molecule and one 3-(3,4-dihydroxyphenil) lactic acid molecule. This compound was isolated from *Argusia argentea* and in the work is speculated that the 3,4-dihydroxyphenil group shows a key moiety in the inhibition. Later Aung et al. (2011)^[66] demonstrate the structural requirement to hemorrhage inhibition induced by rosmarinic acid and conclude that phenyl group does not critical to anti hemorrhagic activity. In the work is speculated that the inhibition occurs probably due the binding of the venom toxin allosterically through the carboxylic group and the double bond of carbonic chain cause conformational changes in the toxin.

The rosmarinic acid is composed of two phenylpropanoic cinnamic acid analogues, such as PCT that possesses a 4-hydroxyphenyl group and a double bond in the carbon 7 of chain. In order to study the possible mechanism of inhibition of SVMPs by PCT, a molecular model of this complex was made by using the metalloproteinase Neuwiedase and PCT structures. After the execution of the docking solutions, it was observed three Neuwiedase/PCT complexes with a good correlation between the GoldScore and ChemScore values. These docking solutions were, respectively, the number 1 (GoldScore = 52.27; ChemScore = 18.24), 13 (GoldScore = 44.16; ChemScore = 18.82), and 16 (GoldScore = 42.98; ChemScore = 11.48), calculated by the simulation where the option toggle/fix was set for Glu142/Zn⁺⁺ – coordinated catalytic water and the Zn⁺⁺ coordination was defined as default. Additionally, the docking solution number 4, calculated in a simulation where the option toggle/spin was used and the Zn⁺⁺ coordination was defined as tetrahedral, showed also good scores (GoldScore = 46.53; ChemScore = 27.45) in relation to the results of the remain simulations. All these docking solutions showed an adequate structural stabilization, as exemplified in the Figure 27.

In spite of the toggle option had been set in these simulations, the Glu142/Zn⁺⁺ – coordinated catalytic water were removed, indicating thus the PCT probably displaces this molecule. Indeed, this finding agrees with other crystallographic structures of complexed snake venom class I – metalloproteinases deposited in the PDB database^[82, 83, 84]. Remarkably, the orientation of the PCT molecules in the hydrophobic channel of Neuwiedase is not the same in the analyzed docking solutions, revealing thus the binding between the protein and the inhibitor occurs mainly close to the active site region, where the PCT atomic deviation is less significant (Figure 28(A) e 28(B)). Therefore, the better anchorage of the ligand at the vicinity of the active site region and the related displacement of the Glu142/Zn⁺⁺ – coordinated catalytic water are structural features which may explain the PCT inhibitory activity, possibly caused by steric hindrance and/or disorganization of the catalytic net.

3.8 Concluding Remarks

The SVMPs have key role in the pathophysiology of snake envenomations characterized by local hemorrhage, skin damage and local myonecrosis. The development of complementary treatment to serum therapy aimed SVMPs inhibition is a very important pathway to minimize the bite site local tissue damage. Thus, alternatives therapies, such as the local administration of SVMPs and PLA₂ inhibitors are a very interesting way to minimize the serious consequence of snake bites.

Our results suggest that Triacontil *p*-Coumarate has a protective effect against local tissue damage induced by snake venom due its capacity to inhibit the SVMPs. Docking simulations here performed have contributed to propose a binding model of PCT inside the Neuwiedase catalytic domain possibly by causing steric hindrance and/or disorganization of the catalytic net. X-ray diffraction studies using isolated toxins and PCT can bring a better elucidation of their structure-function relationship which would be extremely useful to complement our data as well as propose a design of specific drugs to be used in serum therapy.

3.9 Acknowledgements

The authors express their gratitude to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. The authors thank Dra. Ana Maria Moura da Silva and Dra. Cristiani Baldo (Butantan Institute-Brazil) by having gently donated Jararhagin toxin. Biotécnica (Brazil) by the Kits for the accomplishment of this work. This work was performed as partial requirement for the PhD degree of Mirian Machado Mendes, at the Universidade Federal de Uberlândia.

3.9. Acknowledgements

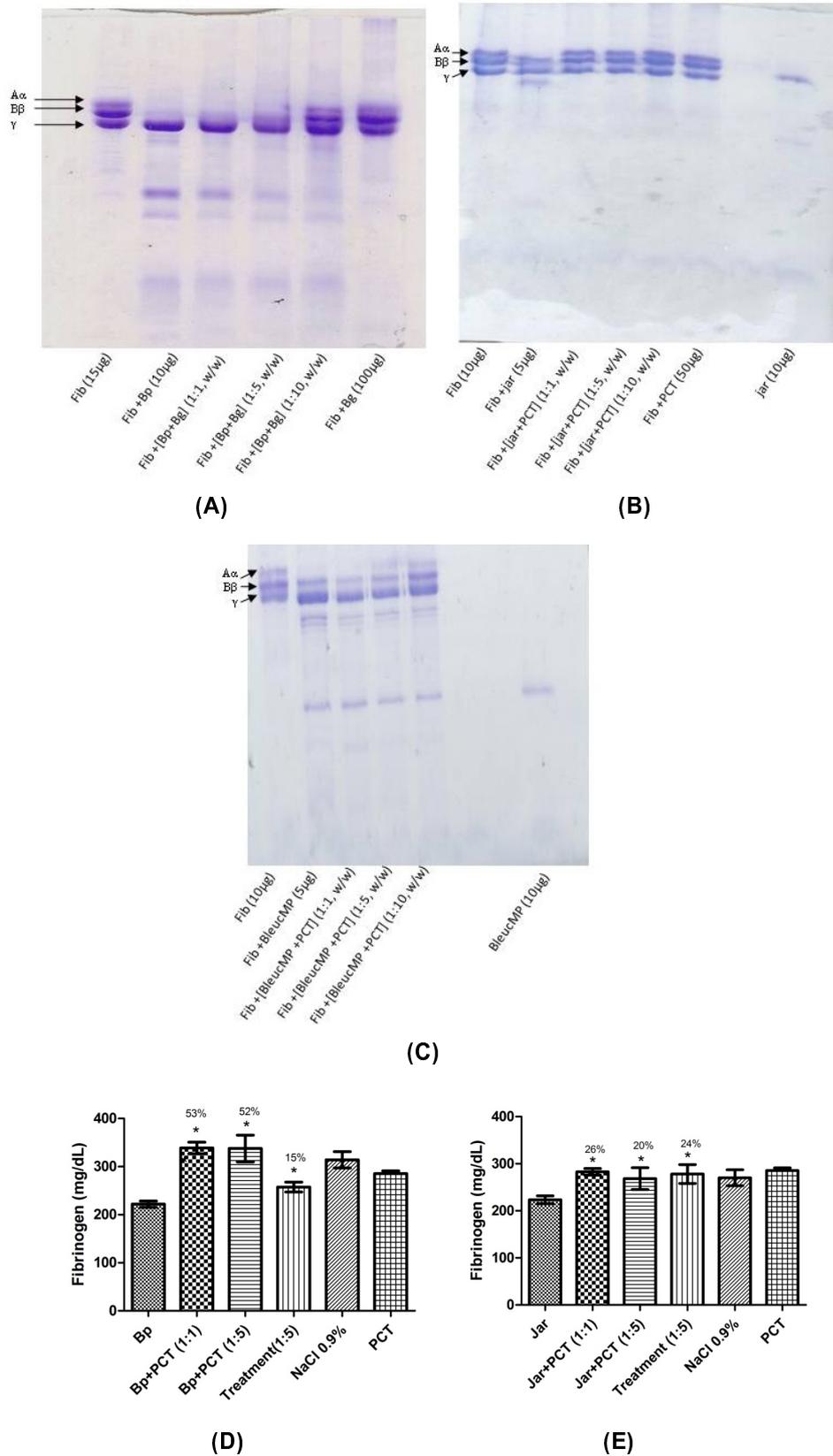


Figure 23: Inhibition of the fibrinogenolytic activity of *Bothropoides pauloensis* (B.p) crude venom, Jararahagin (Jar) and BLEucMP by *Bombacipsis glabra* (Bg) vegetal extract and Triacontil *p*-Coumarate (PCT). **(A)** (Bp) + (Bg) vegetal extract. **(B)** (Jar) + (PCT). **(C)** BleucMP + (PCT). **(D)** and **(E)** Inhibition of decreasing of plasma fibrinogen. **(D)** (Bp) + (PCT) **(E)** (Jar) + (PCT). Results are reported as mean \pm SD (n=4). * The difference of inhibitions with significant ($p < 0.05$)

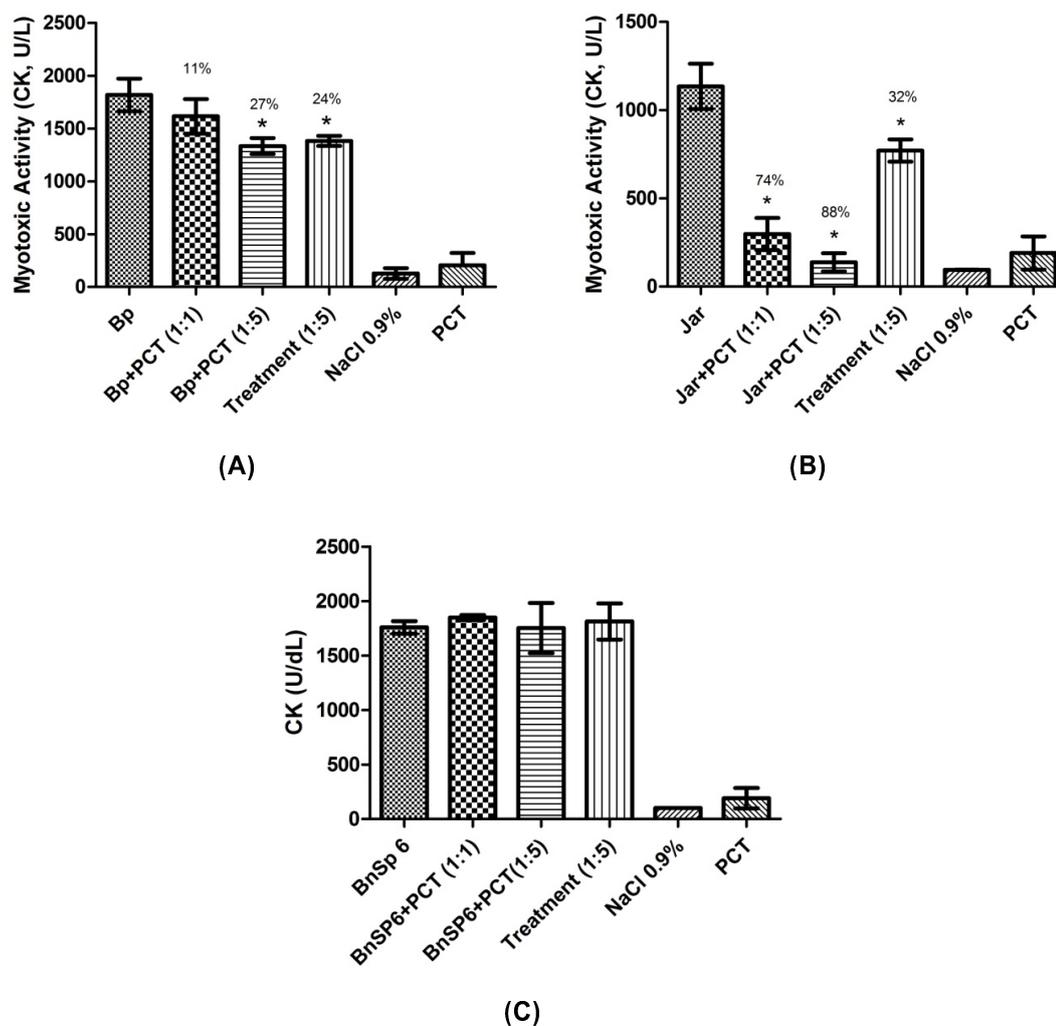


Figura 24: Inhibition of myotoxic activity induced by *Bothropoides pauloensis* (Bp) and isolated toxins by Triacontil *p*-Coumarate (PCT). **(A)** Bp **(B)** Jararhagin (jar) **(C)** PLA₂-BnSP-6. Animals were injected by i.m route with venom or toxins and after 3 h Creatine kinase (CK) levels were measured. Control mice received saline solution (NaCl 0.9%; m/v) or PCT alone. Results are reported as mean \pm SD (n=4). * The difference of inhibitions with significant (p<0.05)

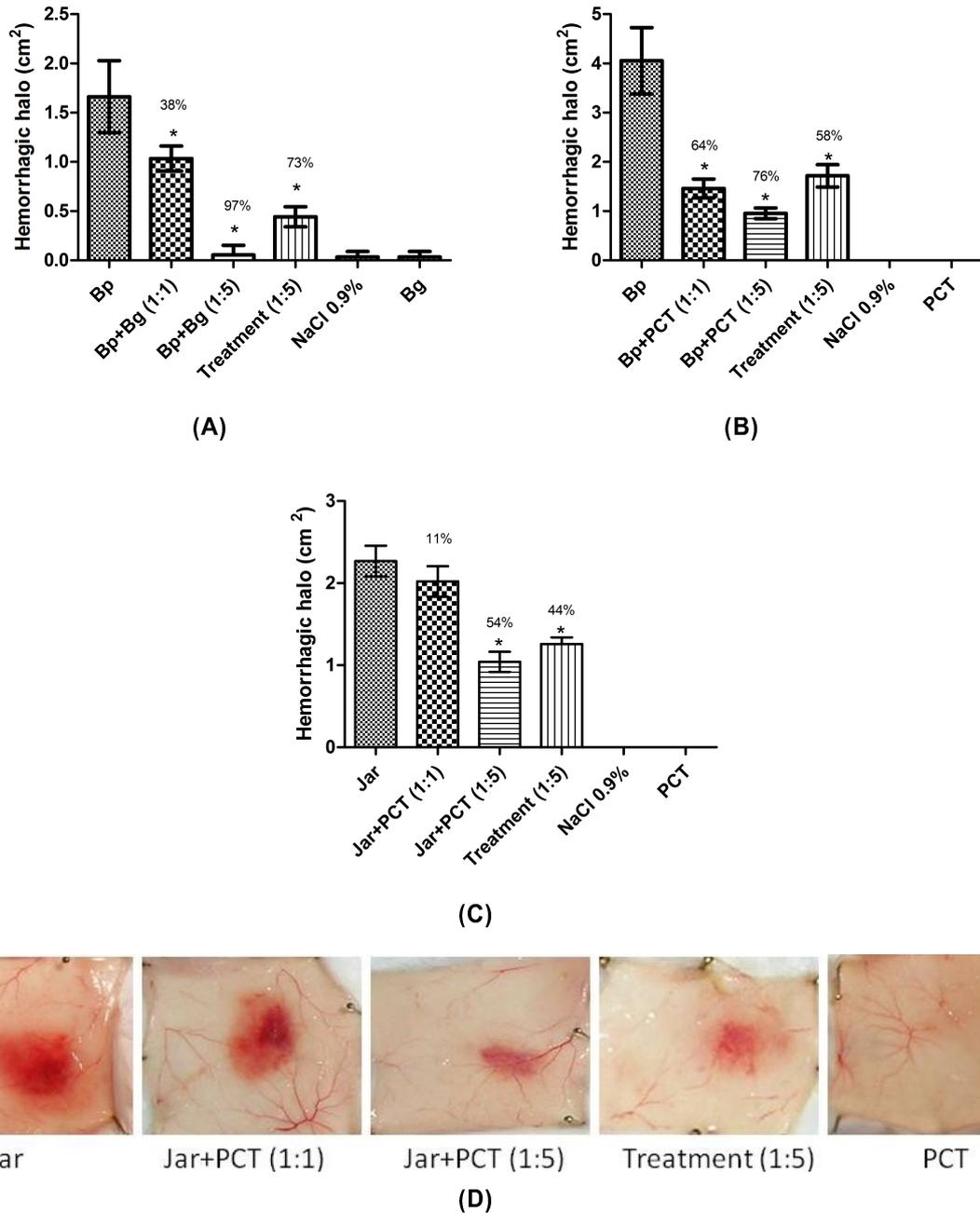


Figura 25: Inhibition of hemorrhagic activity induced by 3 MDH (minimum hemorrhagic doses) of *Bothropoides pauloensis* venom (Bp) or Jararhagin (Jar) by *Bombacopsis glabra* (Bg) and Triacontil *p*-Coumarate (PCT). Control mice received saline solution (NaCl 0.9%; m/v), *Bombacopsis glabra* (Bg) or PCT alone. **(A)** (Bp) + (Bg); **(B)** (Bp) + (PCT) **(C)** and **(D)** Jar + PCT. Results are reported as mean \pm SD (n=4). * The difference of inhibitions with significant (p<0.05)

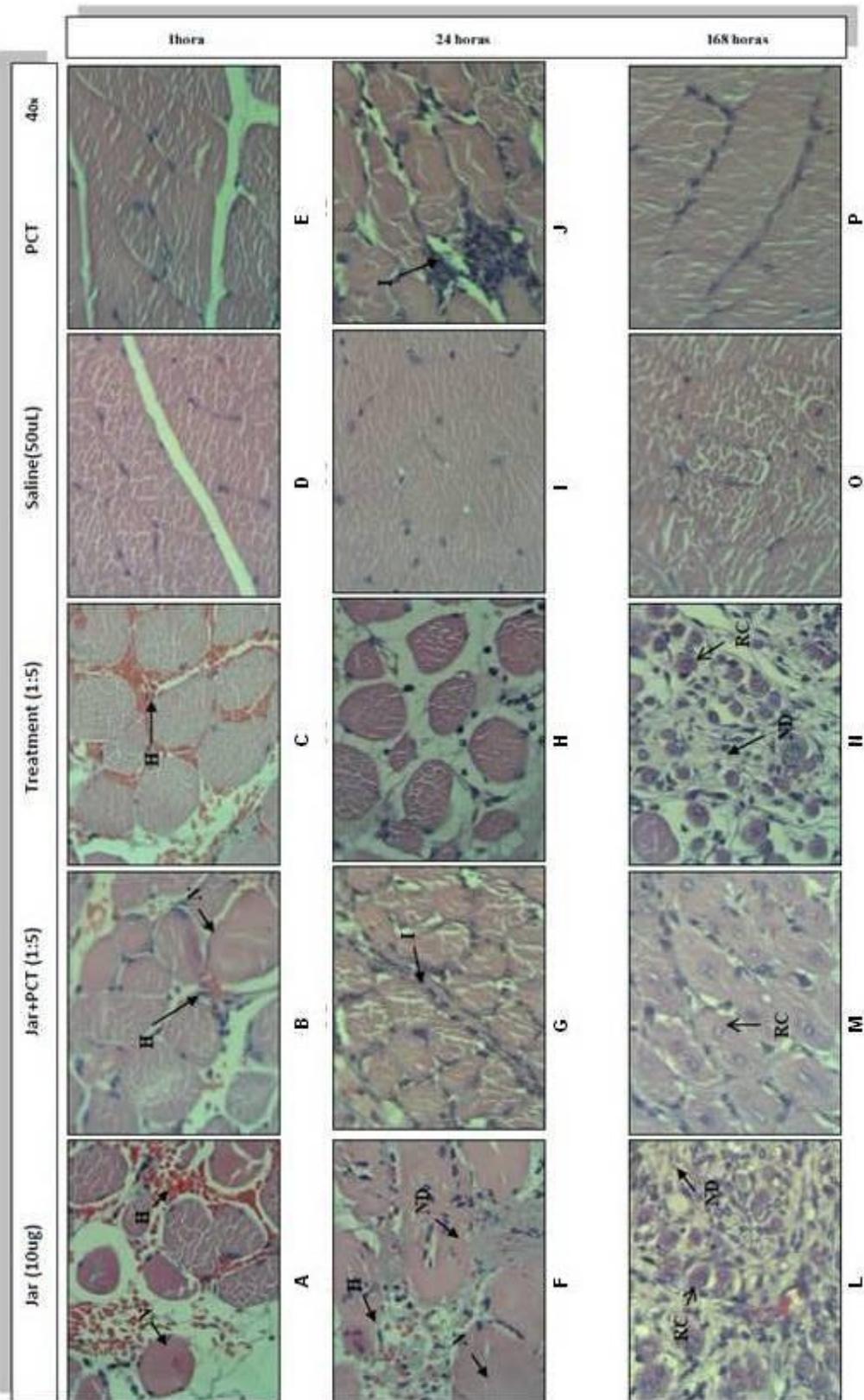


Figura 26: Histopathological analysis of sections of gastronomius mice muscle inoculated with 10 μ g of Jarharagin (Jar) and after 1, 24 and 168 hour samples of muscles were collected and analyzed by light microscopy. Control mice received saline solution (NaCl 0.9%; m/v) or PCT (100 μ g) alone.

. H -hemorrhage; N - necrosis; ND - Necrotic debris; RC - Regenerative cells.

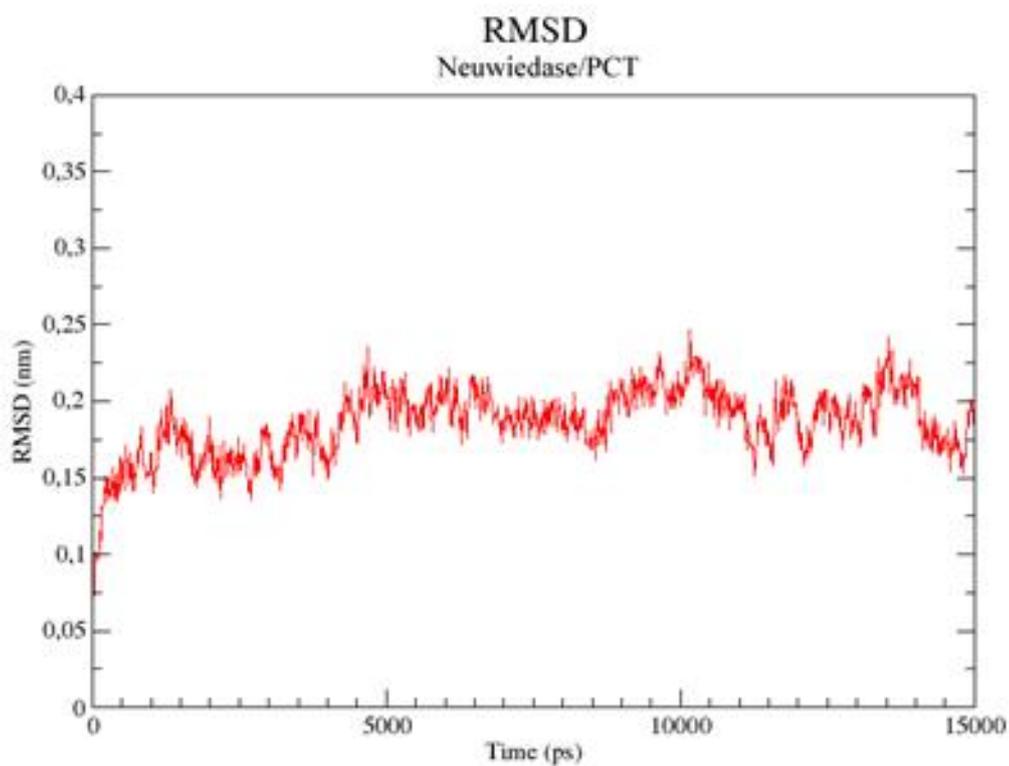


Figura 27: C^α atom root mean square deviation (r.m.s.d.) of the docking solution 1 during a 15 ns molecular dynamics (MD) simulation. The stabilization of the structure model occurred in the beginning of the simulation and the C^α r.m.s.d. was kept around 1.0 Å until the time = 15000 ps (15 ns).

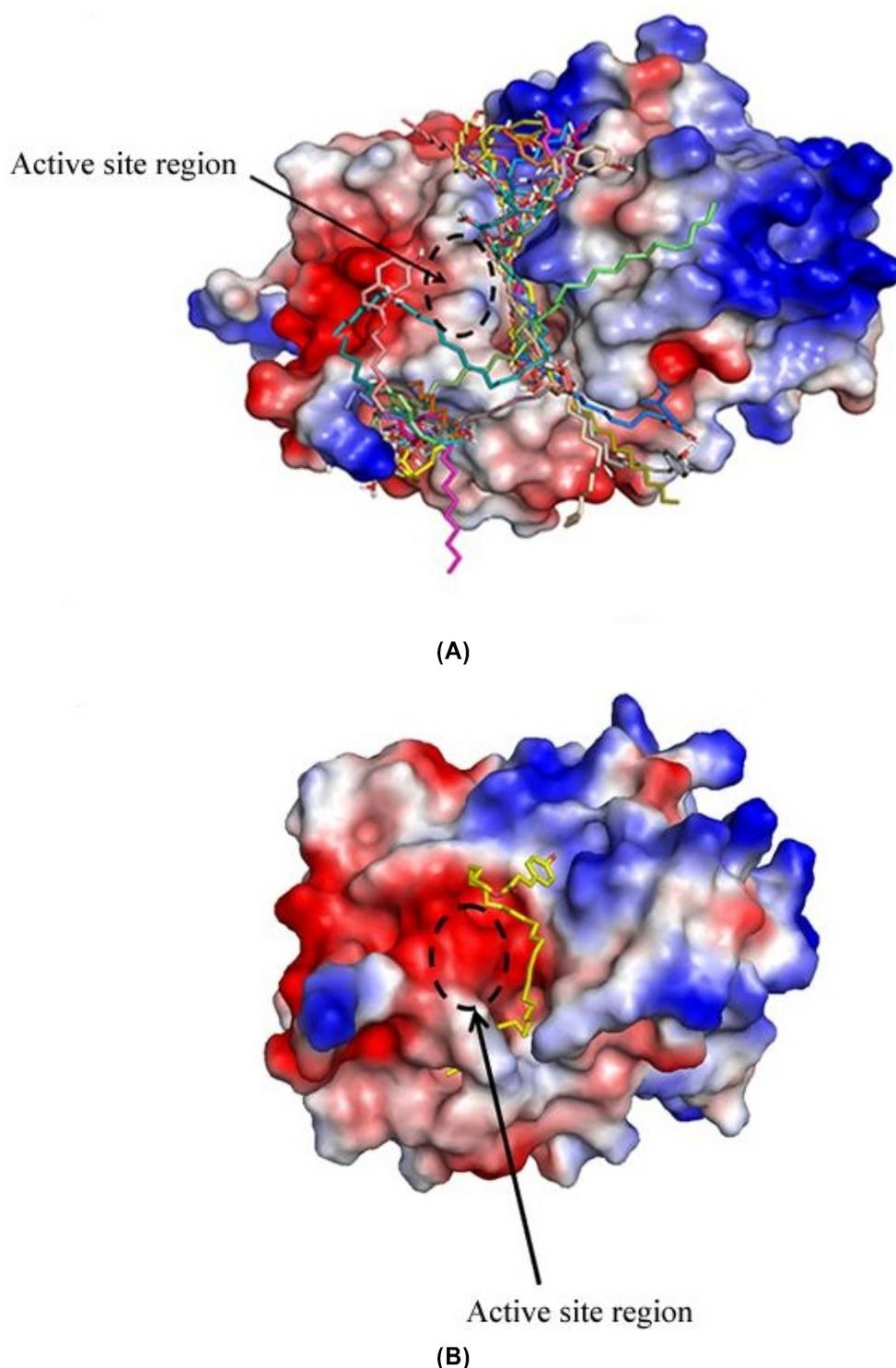


Figure 28: **(A)** PCT docking solutions obtained after the simulations. The orientation of the PCT molecules (represented as colored sticks) in the hydrophobic channel of Neuwiedase is not the same, revealing thus the binding between the protein and the inhibitor occurs mainly close to the active site region, where the PCT atomic deviation is less significant. **(B)** The structural arrangement of the docking solution 1 after a 15 ns – molecular dynamics (MD) simulation. The molecule remains in the hydrophobic channel. The position of PCT molecule at the vicinity of the active site region and the displacement of the Glu142/Zn⁺⁺ – coordinated catalytic water after the docking simulation may explain the inhibitory activity of this ligand, possibly caused by steric hindrance and/or disorganization of the catalytic net

3.10 Referências

- 1 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.
- 2 CHIPPAUX, J. P. Snake bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p. 515–524, 1998.
- 3 WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951–967, 2005.
- 4 SAÚDE, M. D. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonentos**. 2. ed. Brasília, 2001.
- 5 Da SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brasil. **Toxicon**, v. 41, p. 251–255, 2003.
- 6 PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v. 1, n. 50, p. 93–96, 2004.
- 7 FENWICK, A. M.; JR, R. L. G.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617–640, 2009.
- 8 SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115–1132, 2005.
- 9 KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1147–1161, 2005.
- 10 RAMOS, O.; ARAUJO, H. S. de. Snake venom metalloproteinases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 328–346, 2006.
- 11 GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

- 12 HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake Venom Hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1–19, 1999.
- 13 INOUE, S. Ultrastructure of basement membranes. **International Review of Cytology**, v. 117, p. 57–98, 1989.
- 14 SILVA, A. M. Moura-da; RAMOS, O. H.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J. S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M. S.; TANJONI, I.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; EBLE, J. A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 3, p. 484–492, 2008.
- 15 BALDO, C.; FERREIRA, M. J.; LOPES, D. S.; IZIDORO, L. F. M.; O, G. A.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; BRANDEBURGO, M. I. H.; RODRIGUES, V. M. Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, p. 462–469, 2010.
- 16 HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 933–945, 2003.
- 17 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 2005.
- 18 PÉREZ, A. V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 1063–1069, 2007.
- 19 LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. de F.; ALCÂNTARA, T. M. de; OLIVEIRA, J. D. D.; GOURLART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SILVA, A. M. M. da; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. de M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 42–49, 2009.

- 20 PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; SAPARPAKORN, P. Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of thai mango seed kernel extract. **Molecules**, v. 14, p. 3198–3213, 2009.
- 21 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, Blackwell Publishing Ltd, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.
- 22 GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R. de; MAMEDE, C. C.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F. de; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290–300, 2011.
- 23 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIO-ESCARSO, S. H.; FRANSHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471–479, 2001.
- 24 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 381, p. 213–224, 2000.
- 25 GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F. de; ANDRADE, R. M. de; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M. de; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 24–32, 2009.
- 26 PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 22869–22876, 1992.

- 27 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- 28 LAING, G. D.; SILVA, A. M. M. da. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 987–996, 2005.
- 29 CLISSA, P.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M.; FARSKY, S.; MOURA-DA-SILVA, A. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 591–596, 2006.
- 30 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.
- 31 TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, p. 801–808, 2003.
- 32 TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, N. 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 A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318–327, 2005.
- 33 BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 21–29, 2005.
- 34 VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Blackwell Publishing Inc, v. 103, n. 1, p. 104–107, 2008.

- 35 MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltda, v. 22, n. 7, p. 859–866, 2008.
- 36 CAVALCANTE, W.; OLIVEIRA, T.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P.; OLIVEIRA, C.; SOARES, A.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Toxicology Letters**, v. 172, n. Supplement 1, p. S226–S226, 2007.
- 37 MUKHERJEE, A. K.; DOLEY, R.; SAIKIA, D. Isolation of a snake venom phospholipase A₂ (Pla₂) inhibitor (AIPLAI) from leaves of *Azadirachta indica* (neem): Mechanism of Pla₂ inhibition by AIPLAI “in vitro” condition. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1548–1553, 2008.
- 38 LEANPOLCHAREANCHAI, J.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R. Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, p. 556–562, 2009.
- 39 PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S1, p. S56–S62, 2010.
- 40 HASSON, S. S.; AL-JABRI, A. A.; SALLAM, A.; AL-BALUSHI, M. S.; MOTHANA, R. A. A. Antisnake venom activity of *Hibiscus aethiopicus* l. against *Echis ocellatus* and *Naja n. nigricollis*. **Journal of Toxicology**, v. 2010, p. 234–249, 2010.
- 41 GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; ROJA, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1998.
- 42 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.

- 43 LORENZI, H. **Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. [S.l.]: Nova Odessa, 1992.
- 44 PAULA, V. F.; CRUZ, M. P.; BARBOSA, L. C. A. Constituintes químicos de *Bombacopsis glabra* (bombacaceae). **Química Nova**, v. 29, p. 213–216, 2006.
- 45 GOMES, M. S. R.; MAMEDE, C. C. N.; SOUZA, D. L. N. de; MACÊDO, J. K. A.; AQUINOD, E. N.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F. de; RODRIGUES, V. M. TL-Leuc: a α -fibrinogenase thrombin-like with procoagulant and kallikrein-like activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, In Press, 2011.
- 46 RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 215–222, 1998.
- 47 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- 48 ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compendium Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 727–732, 1992.
- 49 GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1988.
- 50 NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 231, p. 309–311, 1984.
- 51 MENDES, M. M.; VALE, L. H. F.; LUCENA, M. N.; VIEIRA, S. A. P. B.; IZIDORO, L. F. M.; JUNIOR, R. J. O.; SOARES, A. M.; ALCÂNTARA, T. M.; HAMAGUCHI, A.;

- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltd., v. 24, n. 3, p. 459–462, 2010.
- 52 SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 244–248, 2005. Disponível em: <<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>>.
- 53 WATANABE, L.; SHANNON, J.; VALENTE, R.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRON, A.; KAMIGUTI, A.; THEAKSTON, R.; FOX, J.; GUTIERREZ, J.; ARNI, R. Amino acid sequence and crystal structure of bap1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Science**, v. 12, p. 2273–2281, 2003.
- 54 MARTI-RENOM, M.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291–325, 2000.
- 55 SALI, A.; BLUNDELL, T. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779–815, 1993.
- 56 LOVELL, S.; DAVIS, I.; III, W. A.; BAKKER, P. de; WORD, J.; PRISANT, M.; RICHARDSON, J.; RICHARDSON, D. Structure validation by C α geometry: phi, psi and C β deviation. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 50, p. 437–450, 2003.
- 57 WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 407–410, 2007.
- 58 JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, p. 43–53, 1995.
- 59 BERENDSEN, H.; SPOEL, D. van der; DRUNEN, R. van. GROMACS: a message passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43–56, 1995.

- 60 BERENDSEN, H.; POSTMA, J.; GUNSTEREN, W. van; HERMANS, J. **Interaction models for water in relation to protein hydration**. [S.l.]: Intermolecular Forces, D. Reidel Publishing Company, 1981. 331–342 p.
- 61 OOSTENBRINK, C.; SOARES, T.; VEGT, N. van der; GUNSTEREN, W. van. Validation of the 53a6 GROMOS force field. **European Biophysics Journal**, v. 34, p. 273–284, 2005.
- 62 BERENDSEN, H.; POSTMA, J.; DINOLA, A.; HAAK, J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 3684–3690, 1984.
- 63 ANDREINI, C.; BANCI, L.; BERTINI, I.; ELMI, S.; ROSATO, A. Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families. **Journal of Protein Research**, v. 4, p. 881–888, 2005.
- 64 MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C. D.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.
- 65 SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre–Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102 p.
- 66 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. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 2392–2396, 2011.
- 67 AUNG, H. T.; NIKAI, T.; NIWA, M.; TAKAYA, Y. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p. 482–486, 2010.
- 68 SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627–645, 2011.
- 69 COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; SOUZA, B. M. de; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their

- C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008.
- 70 ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A. F. M.; TERRA, R. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 5120–5131, 2009.
- 71 HUNG, C. C.; CHIOU, S. H. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of taiwan habu: Serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, p. 1012–1018, 2001.
- 72 COSTA, F. L.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; ARAÚJO, H. S. S. de; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725–735, 2009.
- 73 COSTA, J. de O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N.; ARAÚJO, H. S. S. de; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. de. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1365–1377, 2010.
- 74 A., W. D. **Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical Features, and Clinical Management**. The venomous reptiles of the western hemisphere. [S.l.]: Comstock Publishing Associates, 2004.
- 75 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; FOX, J. W. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 166–170, 2010.
- 76 OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M. A. A. B.; DUQUE, E.; ACCENT]GUEZ, O. R. A.; ARANGO, J. L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; ACCENT]GUEZ, L. M. A.

- A. R. A.; CARO, E.; ACCENTJNEZ, J. M. A.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L. M.; URIBE, F. L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; ACCENTJAZ, A. D. 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.
- 77 LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885–901, 2003.
- 78 GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Molec. Pathol.**, v. 40, p. 367–379, 1984.
- 79 GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑES, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; MICHAELOVADIA. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 28–41, 1995.
- 80 ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, In Press, Corrected Proof, 2011.
- 81 GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 217–229, 1991.
- 82 GOMIS-RUTH, F.; MEYER, E.; KRESS, L.; POLITI, V. S. o. a. l. w. p. i. Implications for the design of tumor necrosis factor alpha convertase inhibitors. **Protein Science**, v. 7, p. 283–292, 1998.
- 83 HUANG, K.; CHIOU, S.; KO, T.; WANG, A. Determinants of the inhibition of a Taiwan habu venom metalloproteinase by its endogenous inhibitors revealed by X-ray crystallography and synthetic inhibitor analogues. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3047–3056, 2002.

- 84 LINGOTT, T.; SCHLEBERGER, C.; GUTIERREZ, J.; MERFORT, I. High-resolution crystal structure of the snake venom metalloproteinase BaP1 complexed with a peptidomimetic: insight into inhibitor binding. **Biochemistry**, v. 48, p. 6166–6174, 2009.

Capítulo 4

***Acute toxicity of Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice**

Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice

Mirian M. Mendes^{a,*} Luis H. F. Vale^a Malson N. Lucena^a Sâmela A. P. B. Vieira^a Luiz Fernando M. Izidoro^d Robson J. O. Junior^a Andreimar M. Soares^b Tânia M. Alcântara^c Amélia Hamaguchi^a Maria Inês Homs-brandeburgo^a Veridiana M. Rodrigues^{a,*}

^aLaboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG, Brazil

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil

^cFaculdade de Medicina. Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia - MG, Brazil

^dFaculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia - MG, Brazil

*Corresponding author: M. M. Mendes (mirianmmendes@yahoo.com.br) and/or V. M. Rodrigues (veridiana@ingeb.ufu.br).

Abstract

The herbal extract of *Schizolobium parahyba* leaves is commonly used in the Brazil central region to treat snakebites. This study evaluates the acute toxicological effects of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice 24 hours after intra-peritoneal administration. Acute toxicity was evaluated using biochemical, hematological and histopathological assays. Alterations on the levels of transaminases, bilirubin, albumin and prothrombin time were observed, and these are likely to occur due to hepatic injury, which was confirmed by light microscopy. Liver histopathological analysis revealed the presence of lymph plasmocitary inflammatory infiltrate, but no other histopathological alterations were observed in any of the other organs analyzed. Our data confirm the low toxicity of the extract of *Schizolobium parahyba* and provide a model for the selection of a dose that does not cause injuries in the organism.

Keywords: medicinal plant extracts; acute toxicity; anti-snake venom plants; biochemical and histopathological analysis; *Schizolobium parahyba*.

4.1 Introduction

Schizolobium parahyba, popularly known as “faveira, guapuruvu or umbela”, is a plant used in popular medicine to treat snakebites in the Brazil central region, called “Triângulo Mineiro”. In recent studies, the herbal extract of *S. parahyba* leaves and fractions showed to possess potent secondary metabolites that are able to inhibit local tissue damage, such as hemorrhage and myotoxicity induced by *Bothrops* snake venoms^[1, 2]. Other studies with this plant showed the isolation of serine proteinase inhibitors from its seeds^[3, 4, 5, 6]. In many countries, plant extracts are traditionally used in the treatment of snakebite envenomations. Herbal extracts present a wide range of antiophidian activities, however, in most cases, scientific evidences of these activities are still necessary. Several plants have already been proved to display antivenom activity^[1, 2, 7, 8, 9, 10].

The number of snakebites in Brazil central region represents a public health problem. The traditional therapy for snakebite envenomations is usually the parenteral administration of antiophidian serum, obtained from hyperimmunized equines, which often induces adverse reactions. Through serum therapy, neutralization of the systemic toxic effects is usually reached, but that of local tissue injure is not^[11]. An alternative to that is the use of medicinal plants to treat effects such as pains, edema, muscular necrosis and local or systemic hemorrhages^[11, 12, 13, 14].

The aim of this study was to evaluate the acute toxicity of the aqueous extract of *Schizolobium parahyba* leaves in order to establish a safe use of this plant as a medicine.

4.2 Material and Methods

4.2.1 Plant extract

The leaves of *Schizolobium parahyba* (voucher specimen number 6156V) (Sp), collected in Uberlândia, MG, Brazil, was prepared as previously described^[2].

4.2.2 Animals

Male Swiss mice (18 – 22 g) were maintained under standard conditions (temperature 22 ± 1 °C, relative humidity $60 \pm 5\%$, 12 h light/dark cycle) with diet and water ad libitum. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics for the Use of Animals of Federal University of Uberlândia (Minas Gerais-Brazil), protocol number 027/08.

4.2.3 Acute toxicity assays

Male Swiss mice (18 – 22 g) were divided in groups of 20. The Sp aqueous extract was dissolved and suspended in saline and administered intraperitoneally (*i.p.*) at doses of 0.5 mg; 1.0 mg; 1.5 mg and 2.0 mg/g. The control group received sterile saline. Sp (2 mg/g animal) was also administered by gavages. Toxicity symptoms and mortality were observed. After 24 hours, 10 animals from each group were weighed, anesthetized and bled by cardiac puncture and autopsied to analyze the biochemical, hematological and histopathological alterations induced by Sp. The remaining animals were observed for 7 days. The food and water supplied during the tests were weighed in the beginning and end of the experiment to verify whether there was any ingestion alteration during the test.

4.2.4 Biochemical and hematological parameters

Blood was collected in the presence of EDTA and centrifuged at $2,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The plasma was used to quantify albumin, glucose, urea, creatinine and transaminases [aspartate amino-transferase (ASA; IU/L) and alanine amino-transferase (ALA; IU/L)]. Bilirubin (total and direct) was determined in the serum. To quantify these parameters, commercial kits from Biotécnica, Brazil were used, using a spectrophotometer from Pharmacia Biotech. An automated cell counter (Sysmex LX-21N) was used to analyze blood hematological parameters, to quantify the erythrocytes, leukocytes, platelets and to determine the hemoglobin concentration and hematocrit.

4.2.5 Histopathological analysis

The organs: liver, kidney, spleen and heart were analyzed for the presence or absence of macroscopic abnormalities. The organs were fixed with 10% saline/formol (v/v) for 24 hours, dehydrated and included into paraffin blocks. Histological cuts of 5 μm were made and stained with hematoxylin and eosin (HE) to be examined under a light microscope.

4.2.6 Statistical analysis

The results were presented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance of results was evaluated by Kruskal-Wallis-test, using the program R Language (R Development Core Team). The value of $p < 0.05$ was considered significant.

4.3 Results and Discussion

Plants present a great variety of active compounds that can cause asymptomatic and toxic effects, as nephrotoxicity and liver toxicity (EMEA, 2000). Adverse effects were observed immediately after the *i.p.* administration of Sp, including hypo-activity, abdominal contractions, accelerated respiratory rhythm, bristled coat and abnormal posture. These symptoms were minimized and disappeared 50, 60, 80 and 120 minutes after administration of Sp/g (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg, respectively). Despite of the initial symptoms, Sp was not able to cause death at any dose assayed. The 2.0 mg/g dose would correspond to 130 g of extract to a 65 kg human^[15, 16, 17]. Higher doses were not assayed due to the difficulty to prepare and to administrate the Sp extract. The animals that received 2.0 mg of Sp/g by *i.p.* route had a weight loss and significant reduction of 41 and 45% in the water and food ingestion, respectively, when compared with the control group (results not shown).

Biochemical parameters are used to evaluate the physiological effect caused by administration of plant active compounds or any other foreign substance to the organism^[16]. Urea and creatinine plasmatic elevation are considered significant markers of renal

dysfunction^[15]. The urea increase in blood can be related with the increase of protein catabolism or kidney dysfunction^[18]. The urea levels did not show significant alterations in the first 24 hours after Sp administration (Table 1). The control group showed 0.40 mg/dL of urea while the group treated with 2.0 mg/g showed 0.37 mg/dL (Table 1).

Sp did not cause changes in the renal function of animals (Table 1), since there was no significant alteration on the creatinine levels. The creatinine serum level increases when the glomerular filtration level decreases and, because of this, these levels can be used as renal function markers^[19]. Corroborating with these results, Sp was not able to induce morphological alterations in the renal tissue (results not shown).

The plasmatic glucose concentration was significantly modified in the treated groups (78 mg/dL), while the control group showed 159.25 mg/dL (Table 1). Many studies have shown that some plants such as *Bauhinia forficata*^[20], *Eugenia jambolana*^[21] and *Salacia oblonga*^[22, 23] present active compounds able to promote glycemie reduction, although glycemie control mechanisms were not shown. Our data suggest that the decrease of glycemie can result of the reduction in the food ingestion observed during the 24 hours after the Sp inoculation.

The animals treated with 2.0 mg/g of Sp showed an increase in the direct and total bilirubin levels, with a significant increase of 42 and 60%, respectively (Table 1). The ASA values also increased when compared with the control group treated with saline solution (Table 1). The liver is involved in many physiological processes of the organism, including metabolism, secretion and stock, also eliminating or modifying toxic compounds^[24, 25, 26]. Considering this, the quantification of hepatic enzymes is a good parameter to evaluate whether lesions in the liver are occurring^[25, 27].

High levels of ALA and ASA in plasma are usually indicatives of hepatic diseases^[28]. The bilirubin levels can increase in plasma due to the elevation of erythrocyte destruction or hepatic lesion, as periportal necrosis^[16, 29], which diminishes the bilirubin conjugation and, consequently, its secretion^[19]. Our results show that the bilirubin increased values can be a consequence of a hepatic dysfunction, not due to hemolytic processes, since the counting of the hematological variables clearly showed that the Sp extract did not cause any significant alteration in the blood cell number (Table 1).

Tabela 1: Biochemical profile and hematological parameters of mice treated with *Schilozobium parahyba* aqueous extract by *i.p.* route.

Dose (mg/g)	0	2.0
Albumin (g/dL)	3.66 ± 0.20	2.88 ± 0.15
Total bilirubin (mg/dL)	0.60 ± 0.03	*1.05 ± 0.22
Direct bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.02	*0.43 ± 0.02
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.47 ± 0.31	0.62 ± 0.19
Creatinine (mg/dL)	0.40 ± 0.06	0.37 ± 0.05
Glucose (mg/dL)	159.25 ± 8.67	*78.93 ± 15.84
ASA (U/L)	96.9 ± 4.52	*192.79 ± 23.93
ALA (U/L)	44.23 ± 16.43	55.12 ± 7.24
PT (sec)	8.57 ± 0.21	*21.43 ± 2.06
Urea (mg/dL)	41.96 ± 5.23	41.25 ± 6.13
RBC (10 ⁶ μL)	6.99 ± 0.73	7.26 ± 0.78
WBC (10 ³ μL)	7.15 ± 1.18	6.65 ± 1.32
Hemoglobin (g/dL)	12.25 ± 1.16	12.8 ± 1.76
Hematocrit (vol. %)	41.7 ± 4.83	42.65 ± 5.19
Platelets (10 ⁴ μL ⁻¹)	1,24.67 ± 438.16	1,13.75 ± 215.05

The results are shown as mean (n=10) ± standard deviation. (*) indicates significance (p<0.05) of the difference between absence and presence of Sp.

ASA-aspartate amino-transferase, ALA-alanine amino-transferase, PT-prothrombin time, RBC- red blood cells, WBC-white blood cells.

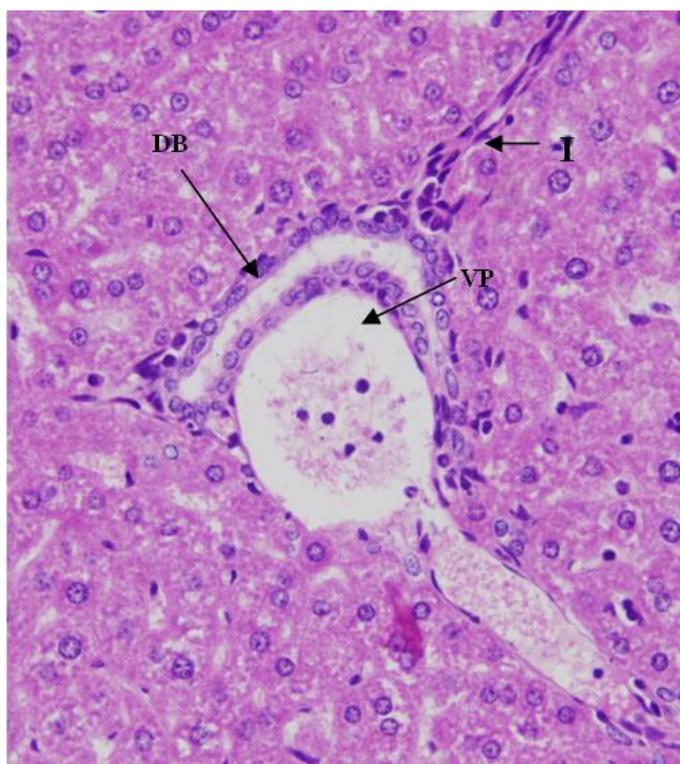
Reduction of albumin, one of the most abundant blood proteins, and of plasma coagulation factors can indicate lesions in the hepatic synthesis function, since these proteins are exclusively produced in the liver^[19]. The animals treated with Sp presented a reduction of 21% in the blood albumin level, but these values were not statistically significant (Table 1). The prothrombin time of animals treated with Sp (*i.p.*) showed twice higher values when compared with the control group, suggesting that Sp was able to induce hepatic dysfunction.

Analysis of bilirubin, albumin, transaminase levels and prothrombin time showed that Sp extract administered *i.p.* at high doses can cause damages in the hepatic function. Light microscopy analysis revealed a modest lymph plasmocitary inflammatory infiltrate (Figure 29).

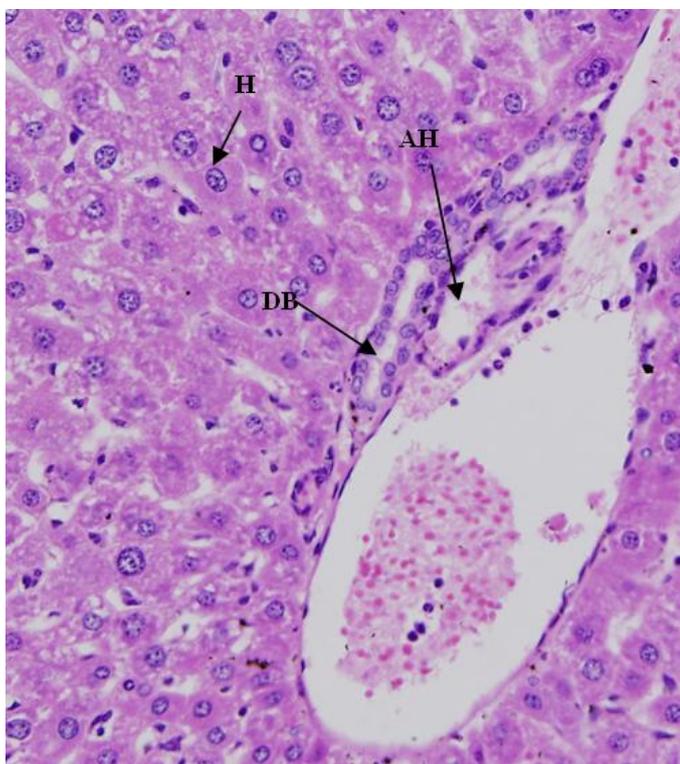
In conclusion, this study demonstrates that Sp extract shows low toxicity even at high doses, inducing little hepatic injury after 24 hours of *i.p.* administration in mice. Also, the herbal extract of Sp (2 mg/g animal) was non toxic when administered orally, not causing biochemical and hematological changes, or provoking histopathological alterations (result not shown). Active compounds can be isolated from Sp extract, and they could be used as therapeutic agents against snake venoms, once controlled doses are established. This study is an initial model for future researches involving genotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity and determination of the chronic toxicity of Sp extract, as well as the toxicity of isolated compounds that do not cause damages.

4.4 Acknowledgements

The authors wish to thank Ricardo Bernardes Coelho by statistical analysis and thank BIOTECNICA that kindly donated the Kits for the accomplishment of this work. This work received financial support of FAPEMIG, CNPq and CAPES.



(A)



(B)

Figura 29: Histopathological analysis of liver of male Swiss mice (18–22 g) after 24 hours of *i.p.* administration of 2 mg of Sp/g **(A)** or 100 µL of saline **(B)**. The following structures are observed: PV (Portal Vein), BD (Biliar Duct), HP (Hepatic Artery), H (Hepatocytes) and (I) modest lymph plasmocitary inflammatory infiltrate. 260x

4.5 Referências

- 1 VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Blackwell Publishing Inc, v. 103, n. 1, p. 104–107, 2008.
- 2 MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, John Wiley & Sons, Ltda, v. 22, n. 7, p. 859–866, 2008.
- 3 MIZUTA, K.; VENTURA, M. M. Isolation and some properties of a trypsin inhibitor from seeds of *Schizolobium parahyba* (Vell.) toledo. **Annais Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 577–590, 1976.
- 4 ELISABTH, M. T. H. S.; MISAKO, U.; CLAUDIO, A. M. S. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 521–525, 1995.
- 5 SAMPAIO, C. A.; OLIVA, M. L.; SAMPAIO, M. U.; BATISTA, I. F.; BUENO, N. R.; TANAKA, A. S.; AUERSWALD, E. A.; FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology**, v. 32, p. 62–66, 1996.
- 6 TELES, R. C. L.; SOUSA, E. M. T.; CALDERON, A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p. 793–799, 2004.
- 7 MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, p. 1131–1141, 1992.
- 8 MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C. D.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.

- 9 SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs Future**, v. 29, p. 1105–1117, 2004.
- 10 SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2625–2641, 2005.
- 11 ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63–68, 2002.
- 12 TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, v. 26, p. 292–300, 1989.
- 13 MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation from venoms of different species of *Bothrops* Snakes. **Toxicon**, v. 24, p. 713–723, 1991.
- 14 PEREZ, O. C. A.; KOSCINZUK, P.; TEILBLER, P.; NEGRETE, M. S.; RUIZ, R.; MURANAK, S.; BOGARIN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas in almofadilla plantas del raton inducidas por venenos de serpientes de cor genesos *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. **Toxicon**, v. 36, p. 1165–1172, 1998.
- 15 ALMDAL, T. P.; VILSTRUPP, H. Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats. **Diabetologica**, v. 31, p. 114–118, 1988.
- 16 YOUSEF, M. I.; EL-DEMERDASH, F. M.; I.KAMEL, K.; AL-SALHEN, K. S. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. **Toxicology**, v. 189, p. 223–234, 2003.
- 17 BALIGA, M. S.; JAGETIA, G. C.; ULLOR, J. N.; BALIGA, M. P.; VENKATESH, P.; REDDY, R.; RAO, K. V. N. M.; BALIGA, B. S.; DEVI, S.; RAJU, S. K.; BAIRY, K. L. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of

- saptharma *Alstonia scholaris* in mice and rats. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 317–326, 2004.
- 18 JANARDHAN, A.; RAO, A. B.; SISODIA, P. Short-term toxicity of methyl benzimidazole carbamate in dogs. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 704–711, 1988.
- 19 BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil – Tratado de medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.
- 20 DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. D. M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. V. C. Effect of *Bauhinia forticata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, p. 196–201, 2004.
- 21 SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 367–373, 2006.
- 22 COLLENE, A. L.; HERTZLER, S. R.; WILLIAMS, J. A.; WOLF, B. W. Effects of nutritional supplement containing *Salacia oblonga* extract and insulinogenic amino acids on postprandial glycemia, insulinemia and breath hydrogen responses in healthy adults. **Nutrition**, v. 21, p. 848–854, 2005.
- 23 HUANG, T. H.-W.; PENG, G.; LI, G. Q.; YAMAHARA, J.; LI, B. D. R. Y. *Salacia oblonga* root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic steatosis in Zucker diabetic fatty rats: Activation of PPAR- α . **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p. 225–235, 2006.
- 24 CLARKE, E. G. C.; CLARKE, M. L. Veterinary toxicology. In: . London: Cassel and Collier Macmillan, 1977. p. 268–277.
- 25 BIASI, F.; ALBANO, E.; CHIARPOTTO, E.; CORONGIU, F. P.; PRONZATO, M. A.; HARINARI, U. M.; PAROLA, M.; DIANZANI, M. U.; POLI, G. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. **Cell Biochemistry and Function**, v. 9, p. 111–118, 1991.
- 26 SHAHANI, S. Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A polyherbal formulation in vivo in rats. **Indian Drugs**, v. 36, p. 628–631, 1999.

- 27 OZARDALI; BITIREN, M.; KARAKILÇIK, A. Z.; ZERIN, M.; MUSA, D. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats. **Experimental and Toxicological Pathology**, v. 56, p. 59–64, 2004.
- 28 MANNA, Z.; GUOPEI, S.; MINUK, G. Y. Effects of hepatic stimulator substance herbal medicine selenium/vitamin E and ciprofloxacin on cirrhosis in the rat. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1150–1155, 1996.
- 29 CLIFFORD, J. I.; REES, K. R. The action of aflatoxin B₁ on rat liver. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 65–72, 1967.

Anexos

NORMAS PARA CONFECÇÃO DA VERSÃO FINAL DO DOUTORADO (fonte: www.cogeb.ufu.br)

I. **Capa** deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia
- Instituto de Genética e Bioquímica
- Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
- Título da Tese
- Nome do aluno
- Uberlândia-MG
- Ano da Defesa

II. **Papel:** Tamanho A4

Margens:

Superior 3,0cm

Inferior 2,5cm

Esquerda 3,0cm

Direita 2,5cm ou 24 pt

Fonte: Arial 12, espaço 1,5

III. **Ordenação do Conteúdo** O Mestrado e o Doutorado serão escritos sob a forma de Capítulo(s). Tanto o boneco quanto a versão final deverão ter a seguinte forma:

- 1 Capa (Anexo I)
- 1 Contra capa identificando: Curso, Título, Aluno, Orientador, Informes sobre a titulação, cidade e ano.
- Ficha Catalográfica: Deve ser colocada nas costas da CONTRA CAPA
- Palavras-chave: Deve ser colocada abaixo da Ficha Catalográfica na CONTRA CAPA
- Folha de Rosto com Curso, Título, Aluno, Comissão Examinadora, Cidade e Data

- Dedicatória
- Agradecimentos
- Índice/Sumário;
- **Introdução**
 1. deverá ser uma síntese do tema pesquisado, situando-o em um contexto geral sobre o conhecimento atual do assunto.
 2. Não deverá trazer citações bibliográficas.
 3. Será finalizada com a apresentação do(s) capítulo(s) com enfoque no(s) objetivo(s) do(s) capítulo(s).
- Quanto à revisão da literatura, a mesma poderá ou não estar na dissertação/tese, em se optando por colocá-la deverá ser apresentada na forma de capítulo e, neste caso, dispensasse tanto o resumo quanto o abstract do referido capítulo
- **Capítulo(s):**
 - Título
 - Resumo e abstract referentes ao capítulo
 - Se o Capítulo foi publicado, pode ser apresentado tanto na forma de separata quanto na forma do texto original do editor de texto, se foi ou está para ser submetido, constar a Revista.
 - Cada Capítulo (01 ou mais) deve ser escrito em conformidade com uma Revista de Divulgação Científica escolhida pelo Aluno e seu Orientador.
 - O Capítulo pode ser escrito somente em **Português** ou **Inglês**.
- **OPCIONAL**
 1. Anexar, ao final da Dissertação/Tese, os Protocolos utilizados em Metodologia para desenvolvimento da Pesquisa
 2. Fazer um Capítulo com RESULTADOS COMPLEMENTARES - para resultados que ainda serão completados para fins de publicação, mas que são relevantes e merecem uma Short Communication (nota prévia)