

NEUTRALIZAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO DE *BOTHROPS ATROX* POR
ANTICORPOS MONOCLONAIS E EXTRATOS DA PLANTA *ANNONA MURICATA*

THIAGO SILVA FRAUCHES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO, 2013

NEUTRALIZAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO DE *BOTHROPS ATROX* POR
ANTICORPOS MONOCLONAIS E EXTRATOS DA PLANTA *ANNONA MURICATA*

THIAGO SILVA FRAUCHES

Tese apresentada ao Centro de Biociências
e Biotecnologia, da Universidade Estadual
do Norte Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Biociências e Biotecnologia.

ORIENTADOR:

MILTON M. KANASHIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO, 2013

NEUTRALIZAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO DE *BOTHROPS ATROX* POR
ANTICORPOS MONOCLONAIS E EXTRATOS DA PLANTA *ANNONA MURICATA*

THIAGO SILVA FRAUCHES

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 01 de agosto de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. Maurício Afonso Verícimo (Doutor em Biociências e Biotecnologia) UFF - RJ

Prof^a. Maria Raquel Garcia Vega (Doutora em Química) – UENF

Prof^a. Elizangela Costa da Silva (Doutora em Biologia Parasitária) – UENF

Prof. Milton M. Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF Orientador

*“Se fui capaz de ver mais longe,
é porque me apoiei em ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Milton M. Kanashiro. Agradeço não só pela orientação, mas por ele ter me deixado ir até o fim com a minha tese. Acredito que onde muitos teriam abandonado, ele acreditou na minha persistência. Serei eternamente grato por isso.

Em segundo lugar, agradeço ao Prof. Jorge Hudson Petretski. Sua ajuda foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Agradeço muito pelo suporte intelectual e moral que ele me deu.

Acima de tudo agradeço à Prof^a Daniela Barros de Oliveira pela colaboração. Principalmente à Clara dos Reis Nunes pela disponibilização das amostras analisadas nesta tese. Sobretudo agradeço à Prof^a Michelle Frazão Muzitano por ter intermediado esta colaboração.

Agradeço ainda ao Prof. Jorge Hernandez Fernandez, pela colaboração com a Biologia Computacional. Confesso que foi um dos momentos mais prazerosos deste trabalho, poder me divertir com as simulações de *Docking*. Obrigado Prof. Jorge por ter me proporcionado isto.

Agradeço também a todos os meus professores, desde os do jardim de infância até os da faculdade. Todos eles têm parcela de responsabilidade na pessoa que me tornei. Serei eternamente grato por todo o conhecimento que eles me transmitiram.

Gostaria de agradecer também à nossa chefe de laboratório Prof^a Andrea Cristina Vetö Arnholdt e ao corpo técnico do laboratório, ao Fernando, Juju, Rita, Núbia, Verônica e Sr. Jorge. A competência deles em suprir todas as nossas demandas foram primordiais para que nossos projetos gerassem frutos.

Aproveito para incluir nesses agradecimentos, o corpo técnico do Biotério. Agradeço ao Fábio, Paulo e Maurício pela presteza e eficiência na disponibilização dos animais utilizados neste trabalho. Pois se não fosse a competência deles, os principais resultados desta tese não teriam sido gerados.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas e amigos de bancada, Franz, Thaís, Willian, Layla, Marcelle, Simone, David, Marcela, Flavia, Lívia e Bianca por todo esse tempo de convivência e intercâmbio de experiências. O dia a dia de bancada fica mais leve com o profissionalismo de deles.

Não poderia esquecer-me de agradecer à minha família, apesar de até hoje eles não saberem o que eu faço, eles sempre me deram suporte e incentivo.

Por fim, reservo este último agradecimento à Fernanda Heloise Côrtes, minha esposa. A Fernanda suportou todos esses anos de distância e mesmo assim sempre esteve ao meu lado, sempre incentivou, acreditou em mim. Nunca deixou por um momento sequer que meu amor pela Ciência enfraquecesse.

A todos o meu muito obrigado.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia.....	2
1.2. O gênero <i>Bothrops</i>	3
1.3. O veneno.....	3
1.4. Componentes dos venenos.....	4
1.4.1. Toxinas hemorrágicas (SVMPs)	4
1.4.2. Trombina - simile.....	7
1.4.3 Fosfolipase A2 (PLA2)	8
1.5. O Envenenamento.....	12
1.6. O Tratamento.....	14
1.6.1. A Soroterapia.....	15
1.6.2 Fitoterapia.....	17
1.7. <i>Annona muricata</i>	19
1.7.1. Propriedades medicinais e biológicas descritas.....	20
1.7.2. Constituintes químicos descritos.....	21
2. Objetivo.....	24
2.1. Objetivos específicos.....	24
2.1.1 – Parte I.....	24
2.1.2 – Parte II.....	24
3. Materiais e métodos.....	25
3.1. Venenos.....	25
3.2. Animais.....	25
3.3. Neutralização da ação letal do veneno de <i>B. atrox</i>	25
3.4. Análises histológicas.....	25
3.5. Fosfolipase A2.....	26
3.6. Frutos e folhas da <i>Annona muricata L.</i>	26
3.7. Preparação dos extratos.....	26
3.7.1. Extrato aquoso.....	26
3.7.2. Extrato etanólico.....	27
3.8. Fracionamento, isolamento e identificação de substâncias.....	27
3.9. Culturas.....	28
3.9.1. Células C2C12.....	28
3.9.2. Células RAW 264.7.....	29

3.10. Ensaio neutralização da atividade proteolítica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	29
3.11. Ensaio de neutralização da atividade serinoproteásica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	30
3.12. Ensaio de Neutralização da Atividade Fosfolipásica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	30
3.13. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	31
3.13.1. Células C2C12.....	31
3.14.2. Células RAW 264.7.....	31
3.15. Ensaio de Neutralização da produção de óxido nítrico (NO) em Culturas RAW 264.7.....	32
3.16. Ensaio de neutralização de edema <i>in vivo</i>	33
3.17. Ensaio neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>B. atrox in vivo</i>	33
3.18. Ensaio de neutralização da atividade miotóxica do veneno de <i>B. atrox in vivo</i>	34
3.19. Construção do modelo G1.....	35
3.20. Construção do modelo de PLA2.....	35
3.21. <i>Docking</i>	35
3.22. Análise Estatística.....	36
4. Resultados.....	37
4.1. Parte I.....	37
4.1.1. Ensaio de neutralização da atividade letal do veneno total <i>in vivo</i> pelo <i>pool</i> de mAbs.....	37
4.1.2. Análises Histológicas.....	39
4.2. Resultados Parte II.....	43
4.2.1. Fracionamento, isolamento e identificação de substâncias do sumo dos frutos de <i>A. muricata</i>	43
4.2.2. Neutralização da atividade edematogênica do veneno de <i>B. atrox</i>	43
4.2.3. Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>B. atrox in vivo</i>	45
4.2.4. Neutralização da atividade proteolítica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i> ..	49

4.2.5. Neutralização da atividade serinoproteásica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	50
4.2.6. Neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. atrox in vivo</i>	52
4.2.7. Neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	53
4.2.8. Caracterização biológica da fração purificada do sumo do fruto de <i>A. muricata</i> frente à toxinas isoladas do veneno de <i>B. atrox</i>	56
4.2.9. Efeito da fração G1 sobre a atividade edematogênica da PLA2 P4....	57
4.2.10. Neutralização da Atividade Fosfolipásica pela amostra G1 <i>in vitro</i>	62
4.2.11. Ensaio de neutralização de citotoxicidade <i>in vitro</i>	65
4.2.12. Ensaio de Neutralização da produção de óxido nítrico (NO) em Culturas RAW 264.7.....	68
4.2.13. Análises de <i>Docking</i>	69
5. Discussão.....	76
6. Conclusões.....	87
7. Referências Bibliográficas.....	88
8. Anexo.....	102

Lista de figuras

Figura 1. Processo de purificação do sumo de <i>A. muricata</i> L.....	28
Figura 2. Análises Histopatológicas	
A e B) Análises histológicas da parede do peritônio.....	40
C e D) Análises histológicas da parede do pâncreas.....	41
E e F) Análises histológicas da parede dos rins.....	42
Figura 3. Inibição da atividade edematogênica do veneno de <i>B. atrox</i> pelas frações aquosas de <i>A. muricata</i>	44
Figura 4. Atividade hemorrágica provocada pelo veneno de <i>B. atrox</i>	46
Figura 5. Neutralização da atividade hemorrágica do veneno <i>B. atrox</i> pelas frações de <i>A. muricata</i>	47
Figura 6. Ensaio de neutralização da atividade proteolítica do veneno de <i>B. atrox</i>	49
Figura 7. Avaliação da atividade serinoproteásica <i>in vitro</i>	51
Figura 8. Inibição da atividade miotóxica <i>in vivo</i> pelas frações aquosas de <i>A. muricata</i>	52
Figura 9. Análise da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. atrox in vitro</i>	54
Figura 10. Ensaio de Neutralização da Atividade PLA ₂ do veneno <i>B. atrox</i> pela fração GSS de <i>A. muricata</i>	55
Figura 11. Inibição da atividade PLA ₂ pelos extratos etanólicos de <i>A. muricata in vitro</i>	56
Figura 12. Amostra G1 (di-heptil-ftalato). Molécula obtida a partir da purificação do sumo de frutos de <i>A. muricata</i>	57
Figura 13. Inibição da atividade edematogênica da PLA ₂ P4 pela fração GSS.....	59
Figura 14. Inibição da atividade edematogênica do veneno de <i>B. atrox</i> pela fração GSS.....	60
Figura 15. Análise da atividade fosfolipásica da PLA ₂ P4 purificada do veneno de <i>B. atrox</i>	61
Figura 16. Efeito de diferentes doses de p-BPB na atividade fosfolipásica da PLA ₂ P4.....	62
Figura 17. Efeito da fração G1 sobre a atividade fosfolipásica da PLA ₂ P4.....	63
Figura 18. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> com células C2C12.....	66
Figura 19. Efeito da fração G1 sobre a citotoxicidade induzida pela PLA ₂ P4 em células C2C12 <i>in vitro</i>	66
Figura 20. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> com células RAW 264.7.....	67
Figura 21. Efeito da fração G1 sobre a produção de NO induzida por LPS em células RAW 264.7 <i>in vitro</i>	68
Figura 22. Modelos tridimensionais para o estudo da interação G1/PLA ₂	69
Figura 23. Alinhamento entre as sequências das cadeias A de PLA ₂ K49 de <i>B. moojeni</i> e <i>B. atrox</i>	70

Figura 24. Comparação das estruturas diméricas tridimensionais dos modelos de PLA ₂	70
Figura 25. Monômeros da cadeia A de PLA ₂ K49 de <i>B. atrox</i>	72
Figura 26. Mapa do <i>grid</i> para o modelo PLA ₂ K49 de <i>B. atrox</i>	73
Figura 27. Posições de interação do ligante G1 com o modelo de PLA ₂ K49 de <i>B. atrox</i>	74

Lista de tabelas

Tabela 1. Ensaio de soroproteção <i>in vivo</i> de camundongos desafiados com o pool de mAbs e veneno.....	37
Tabela 2. Ensaio de soroproteção <i>in vivo</i> de camundongos desafiados com misturas de mAbs e veneno.....	38

Lista de abreviaturas

CNCZAP	Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos
°C	Grau celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AA	Ácido araquidônico
AM1	<i>Austin model 1</i>
AO	Ácido oléico
Arg (R)	Arginina
Asp (D)	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BapNa	<i>Nα-Benzoil-DL-Arginine-p-Nitroaniline</i>
C	Cisteína
Ca	Cálcio
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	Creatina cinase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
D.O.	Densidade óptica
DAO	Ácido láurico
DEHP	<i>di-2-ethylhexyl phthalate</i>
DEMEM-HG	<i>Dulbecco's modified medium-high glucose</i>
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EeF	Extrato foliar
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i>
FA	Fração aquosa
FAcET	Fração Acetato de etila
FB	Fração Butanol
FH	Fração Hexano
g	Gravidade
g	Gramma
Gly (G)	Glicina
GS	Sumo expresso
GSP	Precipitado
GSS	Sobrenadante
h	Hora
H&E	Hematoxilina e eosina

HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endotelial Cell</i>
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kDa	Quilodanton
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LOX-5	5-lipoxygenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
Lys (K)	Lisina
M	Metionina
M	Molar
mAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEHP	<i>Mono(2-ethylhexyl) Phthalate</i>
mg	Milligrama
min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MNDO	<i>Modified neglect of diatomic differential overlap</i>
MT-MMP	<i>Membrane Type Matrix Metalloproteinase</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH	<i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometro
NO	<i>Nitric Oxide</i>
P	Prolina
p/v	Peso/volume
p-BPB	<i>Para-Bromophenacil Bromide</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PE	Pectinesterase
PGE	Prostoglandina E
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
PM3	<i>Parametric method 3</i>

PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoxidase
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i>
RAIs	Reações adversas imediatas
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Reativos de oxigênio
RP	<i>Reverse phase</i>
s.c.	Subcutânea
SBTI	<i>Soybean Trypsin Inhibitor</i>
SFB	Soro fetal bovino
SVMPs	<i>Snake Venom Metalloproteinases</i>
T	Treonina
TAME	<i>Tert-Amyl Methyl Ether</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFF	<i>Universal force field</i>
UV	Ultravioleta
V	Valina
Zn	Zinco

RESUMO

Acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública no Brasil, anualmente milhares de vítimas são acometidas. O tratamento convencional contra o envenenamento causado pela serpente *Bothrops atrox*, típica da região amazônica, é ineficaz além de causar drásticos efeitos adversos. Outro fato preocupante é a dificuldade de acesso ao tratamento pelas comunidades isoladas, pois a demora entre o acidente e tratamento, agrava os feitos provocados pelo veneno e em casos graves leva a vítima a óbito. Portanto, é necessário o desenvolvimento de antivenenos mais eficazes e de antídotos que possam ser administrados nas primeiras horas após o acidente. Por isso, o objetivo desse trabalho é avaliar a eficácia de antivenenos baseados em anticorpos monoclonais contra as principais toxinas do veneno e avaliar o potencial antiofídico apresentado por extratos e possíveis substâncias isoladas da planta *Annona muricata*. Para tanto, anticorpos monoclonais foram desenvolvidos contra fosfolipase A₂, metaloproteinase e trombina-simile do veneno de *B. atrox*. Anticorpos purificados foram agrupados e testados quanto à capacidade de neutralização da letalidade provocada pelo veneno em camundongos Suíços albinos. Órgãos e tecidos dos animais utilizados no ensaio foram coletados para análises histológicas. Paralelamente, extrato aquoso obtido do sumo do fruto de *A. muricata* foi testado quanto à capacidade de neutralização das principais atividades do veneno. O grupo de animais previamente tratado com a mistura de anticorpos monoclonais e posteriormente desafiado com veneno apresentou 100% de sobrevivência enquanto que o grupo não tratado apresentou apenas 20%. Análises histológicas dos animais tratados revelaram redução das lesões hemorrágicas. As frações aquosas do sumo de *A. muricata* foram capazes de inibir a atividade hemorrágica, miotóxica e edematogênica provocadas pelo veneno. Além disso, a substância isolada di-heptil-ftalato, isolada durante o processo de purificação do extrato, foi capaz de inibir a fase tardia do edema provocado pelo veneno. Nossos resultados mostram que o uso de anticorpos monoclonais específicos contra toxinas de veneno demonstra a possibilidade promissora do desenvolvimento de antivenenos baseados em anticorpos humanizados. Além disso, extratos do fruto de *A. muricata* apresentaram potencial como fonte de biomoléculas para o desenvolvimento de antídotos contra o veneno de *B. atrox*.

Palavras-chaves: Veneno, *Bothrops atrox*, antiveneno, anticorpos monoclonais, *Annona muricata*, extratos vegetais, ftalatos

ABSTRACT

Accidents caused by snake venom are a problem health in Brazil, every year thousands victims are reported. Conventional treatment against amazon forest *Bothrops atrox* snake venom accident is unable to neutralize efficiently the venom effects besides to cause severe side effects. Another fact is the difficult access to treatment in isolated communities, because the time between accident and beginning treatment is quite important to prevent tissue damage and death. So the development of antivenoms more efficient and antidote to the first time aid after accident are necessary. This work aims the analysis of monoclonals antibodies antivenoms efficacy against the main venom toxins; and the elucidation of snake venom antidote potential showed by extract and isolated substances from *Annona muricata*. To that, monoclonal antibodies against phospholipase A₂, metalloprotease and thrombin-simile of *B. atrox* snake venom were developed. Purified antibodies were pooled and tested to neutralize the lethal effect in Swiss mice. Tissue and organs were collected to histological analysis. Concomitantly, aqueous extract and isolated substances *A. muricata* juice were tested to neutralize the main venom activities. In group previously treated with pool of monoclonals antibodies and after challenged with venom, 100% of animals survived, while only 20% of control group survived. Histological analysis showed reduction of hemorrhage lesions. Aqueous fractions from *A. muricata* were able to inhibit hemorrhage and miotoxic effect and flavonoids probably are involved in inhibition. Besides, the isolated substance di-heptil-phthalate was able to neutralize the late phase edema induced by *B. atrox* snake venom. Our results indicate that there is a reasonable possibility of developing antivenoms based on humanized monoclonals antibodies to treat victims of venomous animals in the future. Moreover, juice extract from *A. muricata* show potential as source of biomolecules to development of antidotes against *B. atrox* snake venom.

Key words: Venom, *Bothrops atrox*, antivenom, monoclonal antibody, *Annona muricata*, plant extract, phthalate

1. Introdução

É possível que a forma alongada do corpo, sem patas e dotado de movimentos ondulatórios ágeis, o olhar fixo, as cores vivas e, definitivamente, a capacidade de algumas espécies de produzir e injetar um veneno mortal tenha feito das serpentes uns dos animais mais temidos e rejeitados da humanidade (MELGAREJO, 2003).

As serpentes são vertebrados, tetrápodos e amniotas. Entende-se por vertebrados o grupo de animais cujos representantes possuem vértebras e, por tetrápodos, aqueles vertebrados que possuem quatro membros locomotores. As serpentes e alguns lagartos não apresentam membros locomotores, mas descendem de animais com quatro patas, portanto são tetrápodos também. Denominamos como amniotas os tetrápodos que nascem de ovo amniótico, ou seja, ovos que possuem as membranas córion, âmnion e alantóide, responsáveis pela manutenção do ambiente aquático dentro do ovo e trocas gasosas (POUGH *et. al*, 1998).

As serpentes apresentam como características diagnósticas o corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular; perda da sínfise mandibular (perda da sutura óssea das hemimandíbulas no mento, substituída por um ligamento elástico); fechamento lateral da caixa craniana e perda das pálpebras móveis, entre outras características (FRANCO, 2003). Esses animais alimentam-se de presas inteiras, e caçam utilizando estruturas quimiossensíveis. São exclusivamente carnívoras, predando tanto vertebrados quanto invertebrados (GREENE, 1997). A perda da sínfise mandibular e da cintura, entre outras modificações cranianas, permite às várias serpentes abrirem a boca e engolirem presas grandes, algumas com até 3,5 vezes o seu diâmetro. Existem serpentes muito pequenas, como os escolecofídios (cobras-cegas), dentre os quais algumas serpentes alcançam a maturidade sexual com pouco mais de 10 centímetros, até serpentes gigantes, com mais de 10 metros de comprimento, caso de boídeos e pitonídeos como a sucuri (*Eunectes murinus*) e a pitão-reticulada (*Python reticulatus*), respectivamente (FRANCO, 2003).

Esses animais distribuem-se por quase todos os ambientes do globo, com exceção das calotas polares, onde o clima demasiadamente frio impossibilita a vida

de vertebrados ectotérmicos (CADLE, 1997). Há serpentes aquáticas e terrestres. Dentre as aquáticas, temos as de água doce e as marinhas. No ambiente terrestre, ocupam os habitats fossoriais, terrestre e arborícola. Vivem em matas, savanas ou desertos (GREENE, 1997).

Há, atualmente, cerca de 2.900 espécies de serpentes catalogadas no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. A fauna de serpentes brasileiras é muito diversa, sendo encontradas várias espécies por todo o território nacional. No Brasil, temos representantes de 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, ou seja, cerca de 10% do total de espécies (FRANCO, 2003). Em nosso país, as serpentes venenosas distribuem-se em quatro gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Os três primeiros pertencem à família Viperidae, subfamília Crotalinae e a última Elapidae, subfamília Elapinae (MELGAREJO *et. al*, 2003).

1.1. Epidemiologia

A apresentação dos dados sobre acidentes ofídicos no Brasil é baseada na notificação à Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP), que no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, foi de 81.611 acidentes, o que representou uma média de 20.000 casos/ano para o país. A maioria dos acidentes foi registrada nas Regiões Sudeste e Sul, as mais populosas e que contam com melhor organização de serviços de saúde e sistema de informação. Os coeficientes anuais de incidência para o Brasil estiveram em torno de 13 acidentes/10.000 habitantes, com distribuições desiguais nas diferentes macrorregiões (ARAÚJO *et. al*, 2003). Nas diferentes regiões do país, o maior índice foi no Centro-Oeste, ainda que apresente um alto coeficiente, é possível que ocorra subnotificação na região Norte, tendo em vista as dificuldades de acesso aos serviços de saúde, o mesmo ocorrendo para o Nordeste (FUNASA, 2001). A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana no campo. Com isso, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, observa-se incremento do número de acidentes no período de setembro a março. Na região Nordeste, os acidentes aumentam de janeiro a maio, enquanto que, na região Norte, não se observa sazonalidade marcante, ocorrendo uniformemente durante todo o ano (FUNASA, 2001). O pé e a perna foram atingidos em 70,8% dos acidentes notificados e em 13,4% a mão e o antebraço. A utilização

de equipamentos individuais de proteção como sapatos, botas, luvas de couro e outros poderiam reduzir em grande parte esses acidentes. Em 52,3% das notificações, a idade dos acidentados variou de 15 a 49 anos, que corresponde ao grupo etário onde se concentra a força de trabalho. O sexo masculino foi acometido em 70% dos acidentes, o feminino em 20% e, em 10%, o sexo não foi informado. Dos 81.611 casos notificados, houve registro de 359 óbitos. Excluindo-se os 2.361 casos informados como “não peçonhentos”, a letalidade geral para o Brasil foi de 0,45%. O maior índice foi observado nos acidentes por *Crotalus*, onde em 5.072 acidentes ocorreram 95 óbitos (1,87%) (FUNASA, 2001).

1.2. O gênero *Bothrops*

Este gênero possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, já que produzem cerca de 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra (FUNASA, 2001). Das 20 espécies de *Bothrops* reconhecidas no país, quatro delas são comumente responsáveis pelos acidentes humanos: *B. moojeni*, no Centro Oeste; *B. erythromelas*, no Nordeste; *B. jararaca* nas regiões Sul e Sudeste; e *B. atrox* na região Norte do país. Trata-se de uma serpente ágil e ativa, que pode superar 1,5m de comprimento, de colorido variável, que frequenta bastante as beiras de rios, córregos e igarapés. É o viperídeo mais freqüente no vale amazônico, sendo o principal causador de acidentes da região Norte (MELGAREJO, 2003).

1.3. O veneno

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos. Contém vinte ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. As frações não-protéicas são representadas por carboidratos, lipídios, metais (frequentemente na forma de glicoproteínas e enzimas metaloprotéicas), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. A função de cada um desses componentes, bem como suas interações no envenenamento humano, ainda não foram totalmente esclarecidas (MELGAREJO *et. al*, 2003). A maioria desses componentes é produzida por duas glândulas de secreção exócrina situada uma de cada lado na

base da mandíbula, cujos ductos excretorios principais se comunicam com as correspondentes presas. No ato da picada as glândulas são comprimidas e lançam suas secreções nos ductos que levam aos tecidos da vítima (FRANÇA *et al.*, 2003). Além disso, os venenos de serpentes, que são ricos em componentes farmacologicamente ativos, podem servir como ferramenta de estudo em várias patologias, como doenças inflamatórias, nas quais as fosfolipases estão envolvidas (VALENTIN & LAMBEAU, 2000), ou em metástases tumorais e angiogêneses. Os venenos também podem servir de protótipo para o estudo e desenvolvimento de novas drogas, como foi o caso, por exemplo, da descoberta da bradicinina a partir do veneno de *B. jararaca* (ROCHA & SILVA *et al.*, 1949).

1.4. Componentes do veneno

A variedade e complexidade dos elementos que compõem os venenos ofídicos são responsáveis pelas dificuldades dos estudos das serpentes. Cerca de 90% do peso seco dos venenos é composto de proteínas. Carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, riboflavinas, cátions e ânions também compõem os venenos e, embora nem todos eles sejam tóxicos por si, em conjunto podem ser responsáveis pelos efeitos secundários de toxicidade (LOMONTE, 1994). Dentre os componentes tóxicos dos venenos, três deles são os principais causadores de danos locais aos tecidos: toxinas hemorrágicas, as trombinas-símiles e as fosfolipases A₂.

1.4.1. Toxinas hemorrágicas (SVMPs)

Ohsaka (1979), estudando componentes do veneno de uma espécie de serpente semelhante à *Bothrops*, mostrou que alguns deles induzem hemorragia, promovendo abertura de junções intercelulares das células endoteliais dos capilares. Entretanto, Ownby *et al.* (1990), estudando toxinas hemorrágicas de *Crotalus atrox* e *Crotalus horridus*, propuseram um mecanismo diferente para atividade hemorrágica destas toxinas: estas induziriam hemorragia rompendo a integridade das células endoteliais e promovendo o escape de eritrócitos através dos espaços formados entre elas.

Metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs) estão presentes em altas concentrações em venenos de serpentes pertencentes à família Viperidae e

mais recentemente, elas têm sido reportadas, embora em menores proporções, também em venenos de serpentes da família Elapidae (MATSUI *et al.*, 2000). SVMPs são classificadas em classes PI a PIV de acordo com a organização de seus multidomínios (BJARNASON & FOX, 1994; FOX & SERRANO, 2005). Estas enzimas são sintetizadas *in vivo* como proteínas multimodulares que compreendem um peptídeo sinal, um pró-domínio e um domínio metaloproteinase (classe PI). Algumas SVMPs também exibem domínios C-terminal subsequentes, denominados desintegrinas (classe PII) ou domínio desintegrina-simile (classe PIII) e domínio lectina-simile tipo-C (classe PIV) (HITE *et al.*, 1994; BJARNASON & FOX, 1994). Fox e Serrano (2005) atualizaram a proposta de classificação das SVMPs, incluindo os seguintes precursores: precursor PIIa-II cuja forma madura não libera o domínio desintegrina; precursor PIIb-II cuja forma madura compreende SVMPs dimérica; precursor D-I que não contém o domínio metaloproteinase; precursor PIIIa-III que libera seus domínios ricos em cisteína; e precursores PIIIb-III que forma SVMPs dimérica.

Todas as toxinas hemorrágicas isoladas até recentemente de crotalídeos e viperídeos possuem atividades proteolíticas do tipo caseína ou dimetil caseína. As caracterizações bioquímicas destas enzimas mostraram serem todas Zn-metaloproteases (BJARNASON & FOX, 1988). Poucas destas toxinas foram sequenciadas. No entanto, a comparação das sequencias mostrou que apesar de possuírem diferentes pesos moleculares (25-30 kDa a 60 kDa e 60-90 kDa) todas estão relacionadas a um gene ancestral comum e não possuem similaridade a nenhuma outra proteína conhecida, exceto uma significativa homologia com o sítio de ligação do Zn em outras proteínas que o possuem (HITE, 1992; PAINE, 1992).

A relação entre atividade proteolítica e mecanismos hemorrágicos está relacionada com a degradação de componentes da membrana baso-lateral do endotélio vascular. Usando substratos específicos como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, os fatores hemorrágicos purificados mostraram-se altamente proteolíticos. Maruyama e colaboradores (1992) e Bjarnason & Fox (1988) propuseram um mecanismo de ação baseado na digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura. Em outro modelo, utilizando células endoteliais em cultura, foi demonstrado a participação de hemorraginas na organização de

componentes da matriz extracelular através de técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica (TIMPL, 1989).

As toxinas hemorrágicas de alto peso molecular possuem um domínio do tipo desintegrina (HITE, 1992; PAINE, 1992). Desintegrinas são peptídeos ricos em resíduos de cisteína, encontrados nos venenos de várias espécies de serpentes, todos eles contendo a sequência Arg-Gly-Asp (RGD). Esta sequência conservada permite-lhes inibir a agregação plaquetária e também interagir com as integrinas celulares (GOULD *et al.*, 1990; SCARBOROUGH *et al.*, 1993). Especula-se também, quanto à possibilidade desse domínio desintegrina, nas metaloproteinases hemorrágicas, funcionar como unidade de direcionamento da atividade catalítica lesando o endotélio em sítios específicos, aumentando assim a eficiência destas enzimas. Um destes possíveis sítios de atuação seria as integrinas, localizadas na superfície das células endoteliais, que estão envolvidas em processos de adesão à matriz extracelular (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987) e (TASHIRO *et al.*, 1989). A proteólise destes receptores e/ou das proteínas da matriz extracelular a eles associados causariam a desagregação das células do endotélio vascular. Um outro possível sítio seria as metaloproteinases endógenas de matriz (MMPs), as quais estão relacionadas com a degradação da membrana baso-lateral do endotélio vascular em eventos como angiogênese e metástase tumoral (MURPHY *et al.*, 1993; BENELLI *et al.*, 1994).

A análise da sequência de ácidos nucleicos que codifica as SVMPS indica que elas são sintetizadas *in vivo* como zimógenos inativos (BJARNASON & FOX, 1994; SELISTRE-DE-ARAUJO & OWNBY, 1995; KINI, 1996). A ativação *in vitro* destas enzimas pode ser executada tanto por serino-proteases extracelulares (calicreína, plasmina, tripsina e elastase) quanto por metaloproteinases. Uma exceção aparente é a pró-MMP-2 (gelatinase A), que não contém os sítios necessários de clivagem para serino-proteases em seu domínio pró-proteína (SPRINGMAN *et al.*, 1990) dependendo da ação de uma metaloproteinase associada à membrana (Membrane Type Matrix Metalloproteinase 1, MT-MMP1) para a sua ativação. Grams *et al.* (1993) sugeriram que ativação *in vivo* ocorra pela troca de cisteínas ou mecanismo do tipo velcro. De acordo com esse mecanismo, o motivo conservado "PKMCGVT" encontrado no pró-domínio, interage com sítio ativo. O grupo tiol do resíduo conservado da cisteína presente neste motivo atua como quarto ligante do zinco

catalítico no sítio ativo, portanto bloqueando a formação do complexo enzima substrato.

A ativação enzimática pode ser alcançada tanto pela atividade autocatalítica residual quanto por outras proteases do veneno (SHIMOKAWA *et al.*, 1996). O remodelamento da forma purificada do zimógeno de (Pro-ACLF) produzido em bactéria gerou valiosa evidência para suportar a hipótese de ativação autocatalítica. Durante o processo de remodelamento, a ativação de intermediários com sucessiva perda de peso molecular foi gerada. A seqüência N-terminal de três intermediários ativos revelou que duas delas, com alta massa molecular, tiveram sucessivas perdas de segmentos N-terminais, mas mantendo o motivo pró-domínio relacionado ao mecanismo de troca de cisteínas, e embora, os três intermediários não apresentem este motivo e correspondem ao N-terminal geralmente encontrado em espécies ativas. Em todos intermediários ativos, a hidrólise ocorreu na região N-Terminal de resíduos hidrofóbicos (RAMOS *et al.*, 2003).

1.4.2. Trombina - simile

A ação coagulante, também conhecida como síndrome da desfibrinação, é resultante da propriedade que o veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* têm de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989). Esta ação é conhecida como “ação coagulante do tipo trombina”. Além disso, a maioria dos venenos botrópicos tem capacidade de ativar o fator X (atividade pró-coagulante) e a pró-trombina da cascata da coagulação, cujo resultado final é o consumo de fibrinogênio que eleva o tempo da coagulação sanguínea (SANO-MARTINS *et al.*, 1995). Componentes do veneno das serpentes que possuem atividade biológica semelhantes à trombina, denominados trombina-simile, têm sido encontrados no veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. A maioria desses componentes age, apenas, sobre a extremidade N-terminal da cadeia A α do fibrinogênio originando o fibrinogênio A. Como, geralmente, não agem sobre a cadeia B β do fibrinogênio, os monômeros formados carecem de um sítio de polimerização na extremidade N-terminal (SANO-MARTINS *et al.*, 1995). Sendo serino-proteinases, tais enzimas são inibidas com maior ou menor eficiência por PMSF (*Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*), porém mostram-se insensíveis à heparina, hirudina, SBTI (*Soybean Trypsin Inhibitor*),

aprotinina (STOCKER & MEYER, 1989), além disso, essas enzimas possuem outras características como ativação da proteína C (KISIEL *et al.*, 1987), clivagem do componente C3 do sistema complemento (TAMBOURGI *et al.*, 1994) e atividade girotóxica (ROSING & TASS, 1992). Trombina-simile de *B. jararaca*, *B. asper* e *B. atrox* (CAVINATO *et al.*, 1998; PETRETSKI *et al.* 2000b) entre outras, já foram descritas. Embora possuindo algumas características particulares no que se refere à massa molecular (22.000 kDa a 62.000kDa), ao conteúdo de carboidratos, à especificidade do sítio de clivagem, às atividades biológicas e à conversão de fibrinogênio, todas as trombinas-simile compartilham algumas características como: a presença de um resíduo de serina no sítio ativo; uma baixa capacidade de hidrolisar substratos como a caseína, hemoglobina, insulina ou glucagon e uma alta atividade esterásica sobre substratos sintéticos como TAME (tert -Amyl Methyl Ether) e BapNa (N α -Benzoil-DL-Arginine-p-Nitroaniline) (Sano-Martins *et al.*, 1995). Além disso, recentemente, Pérez *et al.* (2007) demonstraram atividade girotóxica atribuída à trombina-símile BjussuSP-I, isolada do veneno de *B. jararacussu*. Essa peculiaridade também já foi demonstrada em trombinas-símile presente em venenos de *Crotalus* (Martins *et al.*, 2002) e *Lachesis* (MAGALHÃES *et al.*, 1993; SANCHEZ *et al.*, 2000).

1.4.3 Fosfolipase A₂ (PLA₂)

A superfamília das fosfolipases A₂ (PLA₂; fosfatidilcolina-2-acilhidrolase, EC 3.1.1.4), consiste em uma grande variedade de enzimas definidas pela sua habilidade de catalisar, especificamente, a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 de fosfolipídeos liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (DENNIS, 1994). Estes ácidos graxos livres, araquidônico (AA) e oléico (AO), podem funcionar como reserva de energia, mas o AA pode também funcionar, principalmente, como segundo mensageiro e como precursor de eicosanóides que são potentes mediadores inflamatórios e de transdução de sinais (HANASAKI & ARITA, 1999). O outro produto resultante da ação hidrolítica da PLA₂, lisofosfolipídeo, desempenha um papel importante na sinalização celular, remodelagem de fosfolipídeos e perturbação da membrana celular (SIX & DENNIS, 2000).

As PLA₂s, atualmente consideradas uma superfamília de enzimas classificadas principalmente em três grupos: PLA₂ citosólica (cPLA₂), PLA₂

secretórias Ca^{2+} dependentes (sPLA₂) e PLA₂ intracelular Ca^{2+} independentes (CHAKRABORTI, 2003). Essas enzimas, ainda são classificadas com base em suas sequências de aminoácidos (BALSINDE *et al.*, 1999), que resultou na divisão das PLA₂ em 10 grupos. E associado a novos critérios, Six e Dennis (2000) reclassificaram as PLA₂ dos venenos de serpentes, insetos e moluscos nos grupos I, II, III e IX sendo os venenos de viperídeos e crotalídeos inseridos no grupo IIA. As PLA₂s de veneno botrópico, são ainda, subdivididas em dois grupos, as Asp49 e Lys49. A presença do ácido aspártico na posição 49 é bastante conservada e está intimamente envolvida na ligação do cofator Ca^{+2} , essencial para a atividade catalítica da enzima (SCOTT, *et al.*, 1992) e faz com que estas PLA₂s tenham alta atividade sobre substratos sintéticos; por outro lado, a presença da lisina na posição 49, faz com que as atividades catalíticas dessas enzimas sobre substratos sintéticos, sejam desprezíveis ou mesmo ausentes. Apesar disso, em geral, as PLA₂ são extremamente ativas na indução de mionecrose (OWNBY, *et al.* 1999; MARAGANORE *et al.* 1984). A presença de um grande número de resíduos básicos, principalmente lisina (em torno de 15% do total de aminoácidos), é bastante característica das PLA₂s Lys49, que inclui também uma região rica em lisina na porção C-terminal da molécula e dois sítios consenso de ligação à heparina, que estão associados com a indução da mionecrose (OWNBY *et al.* 1999; SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.* 1996a e b; DUA & CHO, 1994).

A proposta de que a atividade miotóxica da PLA₂ se expresse pela hidrólise de lipídeos da membrana alvo é respaldada por algumas evidências que correlacionam a miotoxicidade com a atividade catalítica da enzima (TAKASAKI *et al.* 1990; DIAZ *et al.* 1991). Entretanto, a grande maioria dos dados experimentais, obtidos principalmente na inibição química das PLA₂s ou seu bloqueio com anticorpos monoclonais ou policlonais, demonstram claramente que a atividade farmacológica (miotoxicidade, edematogênica) de várias PLA₂s independe ou depende parcialmente da atividade catalítica da enzima (WARD *et al.* 1998a).

Os mecanismos pelos quais as PLA₂s exercem toxicidade ainda não foram bem esclarecidas. Kini e Evans (1989) propuseram um modelo, no qual sugerem que a PLA₂ se liga preferencialmente à célula ou no tecido alvo por afinidade para alguma proteína de superfície ao invés do domínio lipídico. Após a ligação inicial, as PLA₂s podem induzir vários efeitos farmacológicos que são dependentes ou

independentes da sua atividade enzimática. Ward *et al.* (1998b) identificaram, através de análise por “SequenceSpace”, nove aminoácidos bastante conservados na sub-família das PLA₂s Lys49. Estes aminoácidos eram agrupados três a três e localizados no sítio ativo, no canal hidrofóbico de ligação com o substrato e na interface de formação de homodímeros, sugerindo que estes três grupos de aminoácidos estejam envolvidos na atividade farmacológica Ca⁺² independente.

O sítio de interação da miotoxina II de *B. asper* com a heparina foi mapeado em uma região que compreende aos resíduos 115-129 próximo da região C-terminal da molécula. A injeção intramuscular em camundongo do peptídeo recombinante correspondente a esta sequência não induziu mionecrose (CALDERÓN & LOMONTE, 1998). Este peptídeo também demonstrou ter atividade bactericida (PÁRAMO *et al.* 1998). Posteriormente, Calderón e Lomonte (1999) demonstraram que camundongos imunizados com o peptídeo 115-129 da miotoxina II e desafiados com a miotoxina II nativa apresentaram necrose tecidual reduzida em comparação com os controles. Considerando que a ação farmacológica do peptídeo 115-129 da miotoxina II é dependente da sua característica anfifílica, dada pela combinação de resíduos catiônicos e hidrofóbicos, Lomonte *et al.* (1999b), substituíram as três moléculas de tirosina por triptofano no peptídeo recombinante 115-129 da miotoxina II. Os estudos farmacológicos demonstraram que esta substituição foi capaz de reproduzir a atividade miotóxica e edematogênica observada na miotoxina II.

A atividade edematogênica já foi observada em várias miotoxinas purificadas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. O edema geralmente se inicia entre 10-15 min após a inoculação e se estende até 6-8 h após a injeção (YAMAGUCHI *et al.* 2001; OWNBY *et al.* 1999; LIU *et al.* 1991). Através de estudos com videomicroscopia, Lomonte *et al.* (1994a) observaram que o extravasamento de plasma de vênulas e capilares inicia-se a partir de 2min e é intenso após 4 –5min após o tratamento. O edema inicial (até 30min após a injeção) é inibido pelo tratamento com ciproheptadina, indicando o envolvimento da histamina e/ou serotonina. O edema tardio (5h após a injeção) é inibido pelo pré-tratamento com aspirina, sugerindo a participação da prostaglandina neste tipo de edema (GUTIÉRREZ *et al.* 1986a).

Embora alguns autores tenham associado o edema à capacidade das PLA₂s de hidrolisar fosfolípidos (LLORET & MORENO, 1993; VISHWANATH *et al.* 1988),

vários outros autores demonstraram que a atividade edematogênica independe da atividade catalítica das PLA₂s (DIAZ-OREIRO & GUTIÉRREZ, 1997; DANIELE *et al.* 1997; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; LIU *et al.* 1991). O fato de que a miotoxina II, PLA₂ Lys-49 cataliticamente inativa, de *B. asper* induz a formação de edema, sugere que esta atividade farmacológica seja causada por mecanismo independente da catálise enzimática (LOMONTE *et al.* 1993). Inclusive, Ambrosio *et al.* (2005) propuseram um mecanismo baseado na estabilização de uma estrutura canônica dentro da região C-Terminal da molécula que é favorecida pela presença de um ligante de cadeia longa dentro do sítio ativo/canal hidrofóbico. Esta estrutura provavelmente pode ser um ácido graxo ou fosfolípídeo *in vivo*. A estrutura canônica leva à formação e exposição de extensões hidrofóbicas que se inserem na membrana através de interações eletrostáticas envolvendo as lisinas da porção C-Terminal, isso poderia levar a uma perturbação da membrana. Além disso, a possibilidade de que o edema possa ser decorrente da necrose muscular causada pelas miotoxinas parece ser infundada, uma vez que venenos com alta atividade miotóxica (Ex. *Micrurus* spp) não induzem edema significativo em camundongos (GUTIÉRREZ *et al.* 1983).

Modificações químicas da bothropstoxin-I (Lys49) e bothropstoxin-II (Asp49) realizadas por Andrião-Escarso *et al.* (2000), demonstraram que para a bothropstoxin-I os aminoácidos histidina, tirosina e triptofano desempenham um papel importante na miotoxicidade, mas não interferem na indução de edema e ruptura de lipossomos. Enquanto que para a bothropstoxin-II, esses resíduos parecem ser relevantes nas atividades anticoagulante, miotóxica, citotóxica e indutora de edema, e sem efeito na ruptura de lipossomos. Diaz *et al.* (1993) mostraram que a alquilação da histidina 48 da miotxina II de *B. asper* não provocou alterações na carga nem nas propriedades imunológicas, porém reduziu a sua atividade miotóxica.

Os antissoros convencionais não são capazes de neutralizar adequadamente a atividade edematogênica do veneno, mesmo quando estes antissoros são previamente incubados com o veneno e inoculados em animais (GUTIÉRREZ *et al.* 1986b). Além do edema, uma grande quantidade de células inflamatórias é observada no local da lesão (FARSKY *et al.*, 1999 e 1997; ZULIANIA *et al.*, 2005).

1.5. O Envenenamento

Os sintomas do envenenamento e lesões variam conforme a espécie de serpente e/ou quantidade de veneno injetada. Venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus* (AZEVEDO-MARQUES *et. al.*, 2003) e *Micrurus* (DA SILVA JR. *et. al.*, 2003), que são ricos em neurotoxinas, praticamente não lesam os tecidos; porém, às vezes, induzem graves sintomas neurológicos irreversíveis causados pela ação desses componentes nas sinapses nervosas. Venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, pobres em neurotoxinas, porém ricos em enzimas de largo espectro de especificidade, produzem intensas lesões teciduais no local da picada, geralmente, seguidas por sintomas sistêmicos decorrentes de complexas alterações dos sistemas de coagulação, das calicreínas-cininas, do complemento e das paredes vasculares (FRANÇA *et. al.*, 2003; MÁLAQUE *et. al.*, 2003).

Os efeitos locais do veneno botrópico aparecem logo após sua injeção e são caracterizados por hemorragia, edema, dermonecrose, mionecrose, (GUTIÉRREZ, 1990). Eichbaum (1947), Amorim *et al.* (1951) demonstraram que no envenenamento por *B. jararaca* a hemorragia e o edema instalam-se poucos minutos após a inoculação do veneno, seguindo-se então, necrose coagulativa da musculatura e dos vasos sanguíneos, acompanhada de uma intensa reação inflamatória aguda. Os venenos botrópicos causam também liberação de substâncias farmacologicamente ativas que agem ou interagem com receptores sobre as membranas celulares.

O edema induzido por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* provavelmente seja devido à ação combinada de componentes farmacologicamente ativos e bioquimicamente heterogêneos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989). Dentre eles encontram-se: (a) toxinas hemorrágicas que rompem a microvasculatura induzindo extravasamento de fluidos (OHSAKA, 1979; OWNBY, 1982); (b) toxinas que atuam diretamente nas células endoteliais das vênulas e capilares, aumentando a permeabilidade destes (OHSAKA, 1979; OWNBY, 1982); (c) componentes do veneno, fosfolipases ou citotoxinas, que induzem a liberação de histamina de mastócitos; (d) PLA₂s que liberam ácido araquidônico e ácido graxo através da hidrólise de fosfolipídeos de membranas celulares, iniciando a via que leva à síntese de prostaglandinas (ROBBINS *et al.*, 1987); (e) proteases que atuam sobre cininogênios, liberando cininas, por exemplo, bradicinina (ROCHA & SILVA *et al.*,

1949). Calicreínas podem ser ativadas pelo fator XII da cascata de coagulação, uma vez que este fator é ativado depois que a vasculatura tenha sofrido danos e (f) componentes da cascata do complemento, particularmente C3a e C5a, que participam da reação inflamatória (DIAS DA SILVA *et al.*, 1967), um problema que pode ser acentuado pela capacidade das metaloproteinasas (BaP-1) em ativar o sistema complemento (FARSKY *et al.*, 2000). O edema pode contribuir para outros efeitos do veneno, como compressão do tecido e subsequente isquemia. A mionecrose, causada principalmente pelo componente PLA₂ do veneno, pode resultar em perda tecidual permanente, perda da habilidade motora e amputação do membro acometido (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

A injeção subcutânea de veneno ou da miotoxina II de *B. asper* em camundongos, induziu um aumento dos níveis séricos de IL-6 entre 3 e 6 horas após a injeção, enquanto que IL-1 α e TNF- α não foram detectados (LOMONTE *et al.*, 1993). Barros *et al.* (1998) demonstraram que em camundongos BALB/c inoculados com veneno de *B. atrox* por via intraperitoneal apresentaram níveis séricos elevados de IL-6, IL-10, INF- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO), e *in vitro*, células esplênicas desafiadas com veneno produziram somente IL-10, enquanto que as células peritoneais aderentes produziram IL-6, IL-10 e INF- γ , sugerindo que estas citocinas e NO podem estar envolvidos na lesão tecidual. Petricevich *et al.* (2000) utilizando camundongos BALB/c inoculados com venenos de *B. asper* ou *B. jararaca*, também detectaram altos níveis das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e INF- γ no soro destes animais. A concentração máxima de IL-6 no soro foi atingida entre 4 e 6 horas, sugerindo que esta citocina poderia estar modulando a secreção de TNF- α , IL-1 e a síntese de proteínas de fase aguda. Além disso, estes autores sugerem também que o TNF- α , IL-1 e NO podem desempenhar um papel relevante nas alterações patofisiológicas sistêmicas causadas por estes dois venenos. Zuliania *et al.* (2005) observaram distinção na produção de citocinas quando frações purificadas de Asp e Lys49 do veneno de *B. asper* foram injetadas em camundongos suíços, houve a produção de IL-1 e IL-6 para ambas isoformas, porém só houve produção de TNF- α quando injetados com Asp49.

Barraviera (1994), ao estudar pacientes humanos picados por serpentes do gênero *Bothrops* ou *Crotalus durissus terrificus*, detectou a IL-1 somente em 37,5% dos pacientes acidentados com *C. d. terrificus*, a IL-6 foi detectada em 75% e 100%

dos pacientes acometidos por *Bothrops* e *C. d. terrificus*, respectivamente. Já a IL-8 foi observada em 12,5% e 62,5% dos pacientes respectivamente picados por *Bothrops* e *C.d. terrificus*. Enquanto que o TNF- α não foi detectado no soro de nenhum paciente, sugerindo que a IL-6 e a IL-8 podem estar envolvidos no aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda e na inibição da produção de albuminas.

Dosagens de citocinas séricas em pacientes humanos que sofreram acidentes escorpiônicos realizadas por Meki e El-Dean, (1998), detectaram níveis elevados de IL-1 β , IL-6, NO e α_1 -antitripsina, que declinavam após 24 horas de internação, enquanto que nos casos fatais a IL-1 β e IL-6 se mantinham elevados após 24 horas, sugerindo que estas citocinas estão envolvidas na patogênese do envenenamento e se correlacionam com a severidade do envenenamento. Barraviera (1997), comparando o perfil bioquímico sérico observado durante o envenenamento ofídico e escorpiônico, sugeriu que este quadro se assemelha ao trauma agudo, induzindo uma típica resposta de fase aguda.

A importância do papel das citocinas e quimiocinas no desenvolvimento e regulação das reações inflamatórias, observadas em várias condições patológicas, tem sido extensivamente estudada nestes últimos anos, porém o envolvimento de citocinas e quimiocinas na patofisiologia do envenenamento por serpentes, bem como os mecanismos de sinalização intracelular induzida por componentes do veneno em células alvo, tais como, endotélio vascular e musculatura estriada esquelética, ainda não foram esclarecidos. Um melhor entendimento destes mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do envenenamento botrópico pode abrir novas abordagens de interesse na terapêutica do envenenamento ofídico.

1.6. O Tratamento

A preocupação com o envenenamento ofídico e seu tratamento é bastante antiga. No Brasil, já durante o período de colonização, o ofidismo era considerado responsável por um número significativo de óbitos, sendo catalogado como uma das grandes pragas existentes até então. Com relação ao tratamento, a literatura produzida na época referia-se basicamente a ervas, rituais e manipulações utilizados pela população para neutralizar os efeitos do veneno (SANTOS FILHO, 1991).

Esse tipo de abordagem sofreu modificação substancial na transição entre os séculos XIX e XX, com o desenvolvimento da Microbiologia e Imunologia. As grandes descobertas científicas vieram privilegiar a observação e a experiência sistemáticas que deixavam de ser uma prática circunstancial (WEN, 2003).

1.6.1. A Soroterapia

A utilização da soroterapia para o tratamento de acidentes por animais peçonhentos data das últimas décadas do século XIX e a produção de soros antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil que imunizou cavalos com os venenos das espécies *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* e mostrou que a utilização do soro desses animais podia neutralizar a ação dos venenos dessas serpentes (BRAZIL, 1903 e 1905).

A produção de soros antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos. Animais de grande porte são imunizados com venenos de uma ou mais espécies de animais peçonhentos de importância médica. O soro desses animais contém os anticorpos com capacidade de neutralizar as toxinas dos venenos e é classificado como mono-específico ou poli-específico (monovalente ou polivalente, respectivamente), segundo o número de venenos empregados na imunização (CARDOSO *et al.*, 2003)

Dessa forma, a escolha dos antígenos utilizados na imunização dos animais é um fator primordial para a obtenção dos produtos ativos. A composição dos venenos animais é bastante variável. Assim, vários soros devem ser produzidos, com a finalidade específica de utilização em certo tipo de acidente. De modo geral, os principais grupos de animais peçonhentos com importância médica causam manifestações clínicas de envenenamento distintas, com exceção das serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis*. Nesses casos, usa-se o recurso da administração do soro poli-específico, que tem as propriedades de neutralizar os efeitos induzidos pelos diferentes venenos e, embora a utilização desses soros seja uma decisão correta para essas circunstâncias, esse procedimento leva a uma série de desvantagem (CARDOSO *et al.*, 2003).

Os soros poliespecífico podem ser obtidos pela imunização dos animais com uma mistura de diferentes venenos ou pela mistura de soros monoespecíficos

(obtido pela imunização independente com venenos de uma única espécie ou gênero). As desvantagens desse processo consistem principalmente na baixa eficiência do soro resultante. Dadas às características estruturais de cada toxina, algumas delas são muito mais eficientes em induzir resposta imune. A imunização de animais com misturas complexas de antígenos pode então levar a produção de anticorpos predominantemente contra as toxinas presentes no veneno de uma das espécies, deixando sem proteção os efeitos causados por toxinas menos imunogênicas. Por outro lado, a mistura de soros mono-específicos leva, necessariamente, a uma diluição do conteúdo total de anticorpos contra o veneno de cada espécie. Dessa forma, a eficiência dos soros poli-específicos é sempre muito reduzida quando comparado aos mono-específicos (CARDOSO *et al.*, 2003). Outro fenômeno que também pode ocorrer é a redução da resposta imune, e conseqüentemente, redução da produção de anticorpos, devido à presença de proteínas com atividade imunossupressoras, como as descritas no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (CARDOSO *et al.*, 1997).

Outro aspecto a ser considerado na escolha dos antígenos é a variabilidade que existe nos venenos de animais mesmo dentro do mesmo gênero, ou ainda dentro da mesma espécie. Essa variabilidade está geralmente relacionada com a distribuição geográfica do animal, sua idade, ou época do ano em que o animal foi capturado. A mistura de imunização deve incluir venenos de indivíduos de diferentes idades, coletados em diferentes épocas do ano, nas regiões onde o soro vai ser utilizado (WARRELL, 1997).

Além disso, no “Encontro Nacional dos Laboratórios Produtores de Soro e do Programa de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos em setembro de 2003”, realizado no Instituto Butantan, foram analisadas as vantagens e as desvantagens do uso de anticorpos heterólogos na soroterapia dos envenenamentos causados por animais peçonhentos. Nos Dados do Ministério da Saúde do Brasil constam que a presteza na administração do soro específico (primeiras horas após o acidente), na dose correta e única (por exemplo, 10 ampolas de 10mL nos acidentes considerados graves) e pela via correta (via intravenosa), como indicado Manual de Diagnóstico e Tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos (Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 1998, p. 13), reduziu o número de óbitos decorrentes de acidentes ofídicos. Apesar dessa

aparente melhora obtida com a soroterapia, os inconvenientes da utilização de anticorpos heterólogos induzem reações adversas imediatas (RAIs). A incidência de RAIs oscila: 14% em Belo Horizonte; 24% em Ribeirão Preto; 46% em Campinas e 25-80% em São Paulo. As RAIs representam a expressão clínica dos mecanismos de hipersensibilidade às proteínas heterólogas do antiveneno. São classificadas em reações precoces e tardias. As reações precoces se manifestam na pele (urticária e angiodema), nos tratores gastrointestinal (náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia), respiratório superior (obstrução por edema da laringe) e inferior (broncoespasmo) e cardiovascular (hipotensão e choque). As reações tardias, bem menos frequentes, são reações de hipersensibilidade do tipo III produzidas por imunocomplexos formados por anticorpos humanos anti-anticorpos equinos (doença do soro a mais frequente) (WEN, 2003). Glomerulopatias podem ocorrer principalmente em crianças cujo limite de tolerância a proteínas heterólogas circulantes seria da ordem de 60mg (MAZZUCCONI *et al.*, 1989). A maioria dos pacientes submetidos à soroterapia heteróloga fica quase definitivamente impossibilitada de receber anticorpos da mesma origem devido ao risco de desenvolver doença do soro e/ou choque anafilático. A esses grandes inconvenientes acrescem-se a administração endovenosa de grandes volumes de soro principalmente para crianças, as dificuldades de transporte e armazenamento nos postos de saúde de grandes quantidades de soro em temperaturas de ordem de 4°C, o custo de produção desses soros que exigem renovação periódica dos estoques armazenados nos postos de saúde. Além disso, nos soros heterólogos apenas 10-20% dos anticorpos são específicos para toxina importantes nos envenenamentos por animais peçonhentos (WEN, 2003).

1.6.2 Fitoterapia

O uso das plantas como fonte de alimentos e produtos terapêuticos talvez seja tão antigo quanto à própria humanidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2000). As fontes vegetais contêm reservatórios de metabólitos secundários potenciais para o desenvolvimento de novas drogas, os quais estão amplamente projetados para o propósito medicinal (KIM *et al.*, 2004). Atualmente, dentre os mais estudados estão os flavonoides, que são um grupo de pigmentos vegetais com extensa distribuição

na natureza, encontrando-se disponíveis nos frutos, sementes, flores e cascas (RIBEIRO *et al*, 2004).

Os flavonoides possuem capacidade anti-inflamatória, visto que inibem a produção de mediadores inflamatórios ao modular o mecanismo do ácido araquidônico, inibindo várias enzimas como, por exemplo: ATPase, prostaglandina ciclooxygenase, lipoxigenase, NADH oxidase, proteína quinase, hidrolases, peroxidases, metalopeptidases, tirosinases e as fosfolipases. As isoformas da fosfolipase A2 constituem o principal componente tóxico do veneno ofídico. Assim, os flavonoides têm sido alvo de crescente interesse como potencial droga de uso terapêutico na inibição ou mesmo na diminuição da atividade inflamatória causada por sPLA2 de serpentes. O potencial terapêutico dos flavonoides contra alguns tipos de toxinas presentes em venenos de serpentes poderá ter significantes implicações sendo uma alternativa para o tratamento por envenenamentos (CAMPOS & MIRALDO, 2006).

Muitos estudos têm mostrado também que o consumo de frutas e vegetais está associado com a redução ao risco de muitas doenças, incluindo o câncer, aterosclerose e doenças neurovegetativas, as quais estão relacionadas com os elevados níveis de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do sistema de defesa em que há uma produção excessiva das espécies reativas do oxigênio que supera a capacidade antioxidante de defesa do corpo, estando, portanto, sujeito a doenças infecciosas e degenerativas, além de mais frágil em relação à ação de toxinas como, por exemplo, as que estão presentes em venenos de serpentes (SPADA *et al*, 2008).

Diversas outras patologias, além da aterosclerose, de problemas pulmonares, processos inflamatórios e outras doenças degenerativas, podem ser agravadas pela formação de radicais livres e ainda gerarem lesões teciduais por promoverem a oxidação (SHAMI & MOREIRA, 2004). Compostos antioxidantes podem diminuir o estresse oxidativo, minimizando a incidência dessas doenças e as frutas fornecem diversas substâncias antioxidantes, tais como vitamina C, β -caroteno e outros polifenóis (SPADA *et al*, 2008). A procura por novos agentes antioxidantes a partir de fontes vegetais usadas na dieta humana e na medicina popular contra inflamações e infecções pode levar a descoberta de moléculas naturais com elevado

potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*. Estas substâncias poderiam justificar o uso popular de tais espécies vegetais como anti-inflamatórias (FANG & LIU, 2002).

1.7. *Annona muricata*

A espécie *Annona muricata* pertence à família Annonaceae e ao gênero *Annona*. É também conhecida como graviola, guanabara, araticum, coração-de-rainha, fruta-do-conde, jaca-do-pará, pinha, entre outros. Sua árvore mede até 8 metros de altura, dotada de copa piramidal, com folhas obovado-oblongas, brilhantes, medindo 8-15 cm de comprimento. As flores são solitárias, com cálice de sépalas triangulares e pétalas externas grossas de cor amarelada. Os frutos, do tipo baga, têm superfície ouriçada, de 25 a 35 cm de comprimento, com polpa mucilaginoso e levemente ácida. Originária da América tropical, principalmente Antilhas e América Central, é amplamente cultivada em todos os países de clima tropical, inclusive no Brasil (CORRÊA, 1984).

A gravioleira prefere os solos com boa drenagem, profundos, com pH entre 6,0 e 6,5. Quanto ao clima, não tolera geadas e vegeta muito bem em altitudes de até 1200 metros.

A graviola é um fruto altamente perecível com período de conservação limitado a poucos dias. Aliado à intensa atividade metabólica, alguns fatores têm contribuído para o elevado nível de perdas pós-colheitas neste fruto, sendo um deles o escurecimento enzimático, presente tanto nos frutos destinados à indústria, principalmente para a fabricação de polpa, bem como para o consumo *in natura*. O escurecimento enzimático relaciona-se à ação das polifenoloxidase (PPO) e peroxidases (POD), que usam compostos fenólicos como substratos. Os compostos fenólicos envolvidos no processo determinam, até certo limite, a adstringência dos frutos e estão presentes em diferentes graus de polimerização, sendo que os fenólicos oligoméricos formam complexos insolúveis com as proteínas e mucopolissacarídeos da saliva, resultando no sabor adstringente (ALVES *et al*, 2002).

1.7.1. Propriedades medicinais e biológicas descritas

A *Annona muricata* é considerada uma boa fonte natural de antioxidantes, sendo todas as suas partes utilizadas na medicina tradicional (BASKAR *et al.*, 2007). A literatura etnofarmacológica registra diversos usos medicinais baseados na tradição popular que, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido todas comprovadas cientificamente, apesar da planta, mas não a fruta, ser considerada potencialmente tóxica para o homem (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

Os usos etnobotânicos da graviola incluem: artrite, artrose, analgésico, atiespasmódico, antileishmanial, adstringente, desodorizador corporal, diarreia, feridas, úlceras, problemas renais, malária, tranquilizante, expectorante, próstata, função pancreática, diabetes I e II, depressão, sistema nervoso central, alcoolismo, funções digestivas e intestinais, depurativo sanguíneo, anticancerígenos e HIV, epilepsia, Parkinson e escleroses (JARAMILLO *et al.*, 2000).

Esta espécie é rica em compostos bioativos e diversos trabalhos têm demonstrado as atividades hipotensiva das folhas, antidepressiva do fruto e anti-herpes da casca do caule. Foram observadas ainda atividades antibacterianas, antifúngicas, ação relaxante muscular e cardiodepressiva para os extratos da casca e das folhas de *A. muricata* (LUNA, 2006).

As acetogeninas formam uma nova classe de compostos naturais de grande interesse. Sua ação primária está relacionada com sua capacidade de depleção dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e inibindo a NADH oxidase do plasma de membranas, principalmente de células tumorais, uma vez que essas células possuem uma alta demanda de ATP (FERELLI *et al.*, 2005).

Estudos têm avaliado a atividade antitumoral de várias acetogeninas presentes na *Annona muricata* contra diversas linhagens celulares tumorais *in vitro* como, por exemplo, contra células de carcinoma pancreático e prostático, carcinoma pulmonar, de mama, epidermóide (QUISPE *et al.*, 2006). Também tem sido observada a ação antioxidante dos extratos foliares (FREITAS *et al.*, 2007) e investigados os efeitos mutagênicos e antimutagênicos inclusive em frutos congelados, sugerindo os dados que o congelamento das frutas contribui para a prevenção contra danos biológicos (SPADA *et al.*, 2008).

Uma comparação da atividade antioxidante foi feita entre espécies do gênero *Annona*. As folhas de *Annona muricata*, *Annona squamosa* e *Annona reticulata* foram testadas e os resultados evidenciaram que os extratos etanólico de *Annona muricata* possuem atividade antioxidante mais potente *in vitro* quando comparado às folhas de *Annona squamosa* e *Annona reticulata*. Isso pode ser atribuído à presença de acetogeninas (BASKAR *et al.*, 2007).

Estudos visando à identificação e caracterização dos compostos químicos ativos dos extratos vegetais das folhas da graviola em comparação com os extratos vegetais da casca do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*) mostraram resultados promissores quando os extratos hidroalcoólicos das folhas da graviola foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante (AVANZI *et al.*, 2006). Também foi determinada a ação do extrato das sementes contra *Molinema dessetae* e isoladas algumas acetogeninas responsáveis por essa atividade (LUNA, 2006).

Jaramillo *et al* (2000) investigando os constituintes químicos do pericarpo de *A. muricata* para avaliar sua atividade citotóxica e antileishmanial, verificou ser a fração acetato de etila a mais efetiva contra linhagens celulares U-937 e cepas de promastigotas *Leishmania*.

1.7.2. Constituintes químicos descritos

Na composição química do fruto estão presentes açúcares, taninos, ácido ascórbico, pectinas e vitaminas A (β -caroteno), C e do complexo B, enquanto nas folhas, casca e raízes foram identificados vários alcalóides. Nas sementes foram registradas acetogeninas, que são encontradas também nas folhas, casca e raízes da planta (FERELLI *et al.*, 2005).

Estudos químicos com a *A. muricata* conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcalóides, terpenóides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos. Todavia, nos últimos anos as pesquisas fitoquímicas com esta espécie se dirigiram ao isolamento de compostos da classe das acetogeninas, principalmente nas folhas (LUNA, 2006).

Acetogeninas formam classe de compostos naturais de natureza policetídica, que se caracteriza por possuir uma larga cadeia alifática com um a três anéis de tetrahydrofurano (THF). A primeira acetogenina relatada foi a uvaricina, em 1982,

isolada do extrato etanólico das raízes de *Uvária accuminata*, e desde então há em crescente interesse, por serem farmacologicamente ativas como antitumoral, inseticida, citotóxica, antiparasitária entre outros. Há relatos que a *Annona muricata* possui mais de 50 acetogeninas (QUISPE *et al.*, 2006) como, por exemplo, a cohibina A e B (GLEYE *et al.*, 1997) e murihexol (YU *et al.*, 1998).

As acetogeninas são classificadas em mono tetrahidrofurano (THF), bis-THF adjacente, bis-THF não adjacente e compostos não-THF (SOUZA, 2003). Além disso, algumas enzimas presentes no fruto têm sido caracterizadas como, por exemplo, a polifenoloxidase (BORA *et al.*, 2004) e as pectinesterases PE I e PE II (ARBAISAH *et al.*, 1997) e estudos sobre a estabilidade de armazenamento do suco de graviola mostraram que a temperatura de armazenamento afeta grandemente a estabilidade microbiológica e conseqüentemente a qualidade do suco (ABBO *et al.*, 2006).

A determinação aproximada da composição nutricional e propriedades físico-químicas da polpa, das sementes e do óleo extraído das sementes da graviola também foram avaliadas e foi observado que se o óleo for desodorizado pode ser usado na culinária (ONIMAWO, 2002). Além disso, estudos têm sido realizados no que se refere à quantificação do conteúdo total de ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis nos frutos (SPADA *et al.*, 2008).

Os interesses pela *A. muricata* na inibição dos efeitos tóxicos do veneno de *B. atrox* surgiram a partir de evidências levantadas por trabalhos anteriores em nosso laboratório (COZENDEY, 2007), que demonstraram de forma preliminar, que extratos etanólicos de *A. muricata* eram capazes de neutralizar atividade hemorrágica *in vivo* e fosfolipásica *in vitro*, respectivamente. Portanto sugerindo a existências de inibidores naturais nestes extratos. É de suma importância a busca por novos inibidores e tratamentos alternativos. Contudo, o único tratamento de eficácia cientificamente comprovada ainda é a soroterapia. Porém, esta técnica esbarra em vários entraves: i) extrema dificuldade de acesso dos soros antiofídicos às comunidades rurais, onde a maioria dos acidentes ocorre; ii) as variações antigênicas, geográficas, intra e extraespecíficas diminuem a eficácia do soro; e iii) Reações adversas provocadas pela terapia, que limitam a sua aplicabilidade. Com isso, justifica-se o interesse pela contínua busca e identificação de novos componentes que possam ser empregados como alternativas de tratamento ou atuar

de forma suplementar até que o acidentado possa receber o tratamento convencional.

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivos: 1- avaliar a eficácia de antiveneno baseado em anticorpos monoclonais na proteção contra o envenenamento por *Bothrops atrox*; 2- caracterizar os efeitos de extratos de folhas e frutos de *Annona muricata* sobre a atividade tóxica de componentes do veneno da serpente, e caracterizar possíveis componentes bioativos da planta.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1 – Parte I

- Avaliar a eficácia do antiveneno baseado em mAbs em camundongos desafiados com veneno bruto;
- Analisar em nível histológico os tecidos dos animais que foram desafiados e tratados com o antiveneno baseado em mAbs.

2.1.2 – Parte II

- Analisar o potencial de neutralização dos extratos aquosos de *A. muricata* na inibição da atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox*;
- Analisar a capacidade de inibição dos extratos de *A. muricata* na neutralização dos efeitos tóxicos provocados pela PLA₂;
- Analisar o efeito inibitório dos extratos sobre a atividade serinoproteásica do veneno;
- Caracterizar o efeito antiofídico da substância di-heptil-ftalato, isolada durante o processo de purificação do extrato de *A. muricata*;
- Propor mecanismos de interação da molécula di-heptil-ftalato com a toxina PLA₂ do veneno de *B. atrox* empregando ferramentas de modelagem molecular.

3. Materiais e métodos

3.1. Venenos

O veneno da serpente *Bothrops atrox* que foi utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Instituto Butantan através do Dr. Wilmar Dias da Silva.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Suíços albinos de ambos os sexos com cerca de quatro semanas de vida, pesando entre 18 a 22g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Todos os experimentos deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UENF.

3.3. Neutralização da ação letal do veneno de *B. atrox*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta tese foram produzidos em trabalhos anteriores no Laboratório de Biologia do Reconhecer. O mAb 59/2-E4 (antiZn-metaloproteinase) desenvolvido por Barros *et al.* (1998); o mAb 6AD2-G5 (antitrombina-simile); produzido por Petretski *et al.* (2000a) e o mAb A85/9-4 (antifosfolipase A₂) gerado por Kanashiro *et al.* (2002).

Diferentes concentrações do *pool* de mAbs neutralizantes foram incubados com 2-3DL₅₀ (cada DL₅₀ corresponde a 100µg de veneno) do veneno de *B. atrox*, a seguir, esta mistura foi inoculada em camundongos Suíços albinos de 18 a 20g por via i.p. Em outro modelo de experimento, o *pool* de mAbs foi inoculado por via intraperitoneal (i.p.) e 30 min. depois, os camundongos foram desafiados com o veneno pela via subcutânea (s.c.).

3.4. Análises histológicas

Grupos de camundongos submetidos ao ensaio de neutralização, em tempos determinados (2h, 24h e 48h), foram sacrificados, órgãos e tecidos musculares e peritônio foram coletados e imediatamente embebidas em solução de formol 10% tamponado para fixação. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações seriadas de álcool (70, 90, 100%), imersas em Xilol e inclusas em

parafina de acordo com os protocolos de rotina para microscopia óptica. Os cortes de 5 μ m feitos em micrótomo semiautomático (Leica, Brasil) e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As análises das lâminas foram feitas em microscópio óptico Axioplan Zeiss (Alemanha). Nas análises, as lesões foram classificadas como: discreta, moderada e grave.

3.5. Fosfolipase A₂

Neste trabalho, foi utilizado PLA₂ do veneno de *B. atrox* purificada por Frauches (2005). O método utilizado para a purificação foi descrito por Kanashiro *et al.* (2002), sendo de uso rotineiro em nosso laboratório. Sucintamente, o *pool* das frações enriquecidas de PLA₂ obtidas de cromatografia de filtração em gel com emprego de coluna Sephadex G100 (Pharmacia, USA), foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa C4 (Pharmacia, Upsalla Suécia). Das frações obtidas por Frauches (2005), foi utilizada nos experimentos a fração P4 que possui alta atividade catalítica.

3.6. Frutos e folhas da *Annona muricata* L.

O material vegetal foi coletado no Município de Bom Jesus do Itabapoana - RJ nos períodos de frutificação, os quais corresponderam aos meses de dezembro de 2010 a fevereiro de 2011. As amostras foram retiradas das árvores com o uso de um alicate de poda. Frutos e galhos com folhas foram acondicionados de modo a não produzir danos nos mesmos. No laboratório as amostras foram lavadas com água destilada, a polpa dos frutos foi separada e processada, cascas e sementes foram estocadas a -20°C para análises futuras. Folhas e galhos foram separados deixados ao ambiente para secagem *overnight*, depois foram estocados em a -20°C até o uso.

3.7. Preparação dos extratos

3.7.1. Extrato aquoso

O sumo foi produzido e purificado por Nunes (2011). Resumidamente, a polpa fresca dos frutos de *A. muricata* foi submetida à extração com água, originando o

sumo expresso (GS). O extrato aquoso foi preparado na proporção de 75% (p/v), em liquidificador comercial e centrifugado, sendo em seguida liofilizado. Uma parte do sumo foi submetida a uma precipitação com etanol (1:1), esse procedimento gerou um sobrenadante (GSS) e um precipitado (GSP)

3.7.2. Extrato etanólico

Para o preparo do extrato etanólico, 4g de folhas não desidratadas foram trituradas utilizando um liquidificador convencional. Após procedimento, etanol 100% foi adicionado numa proporção 1:5 peso/volume. *A. muricata* comercial (Oito Ervas e Gosto da Terra, Brasil) encontradas na forma de suplemento alimentar também foi empregada neste trabalho para efeito comparativo. A extração de *A. muricata* na forma de suplemento alimentar foi realizada da mesma forma que a *A. muricata in natura*. Após a adição do solvente, as amostras permaneceram em temperatura ambiente e protegidas da luz. A cada 72 horas elas eram filtradas e o mesmo volume de etanol era acrescentado. O procedimento se repetiu até o solvente resultante da filtração estivesse clarificado. As soluções resultantes das filtrações eram concentradas por evaporação em ambiente refrigerado, a 18°C. Após a redução do volume, as amostras foram pesadas e estocadas a -20°C.

3.8. Fracionamento, isolamento e identificação de substâncias

O processo de purificação do extrato aquoso realizado por Nunes (2011) prosseguiu com uma extração líquido-líquido a partir do sobrenadante (GSS) com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as seguintes frações: hexano (FH), acetato de etila (FAcEt) e butanol (FB). A outra parte (GSP) foi armazenada a 4°C para os demais ensaios.

A purificação e caracterização química das amostras FH, FAcEt e FB foram de acordo com Oliveira (2005). Os métodos empregados na purificação dessas frações foram combinações de cromatografias de fase reversa em coluna aberta com resina RP-2, seguida de CLAE empregando coluna de filtração em gel com resina Sephadex LH-20. Após a extração líquido-líquido, a amostra FB foi a que apresentou massa suficiente para a continuação dos trabalhos de caracterização química. Por isso, FB foi submetida a uma cromatografia de fase reversa utilizando

coluna RP-2, desse processo resultaram três amostras: fração aquosa (FA), fração metanol 50% (F50%) e fração metanol 100% (F100%). Novamente, por apresentar maior massa recuperada, prosseguiu-se com a purificação de F100%, que foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel empregando coluna Sephadex LH-20. Essa cromatografia resultou em duas amostras (F100%A e F100%B). F100%B foi analisada por CLAE; e o perfil químico da amostra revelou dois picos que foram coletados e enviados para análise por RMN, IV, UV e Espectrometria de Massa. Todo o processo de purificação está resumido na figura 1. A substância isolada a partir da purificação da fração FB foi cedida para a caracterização biológica.

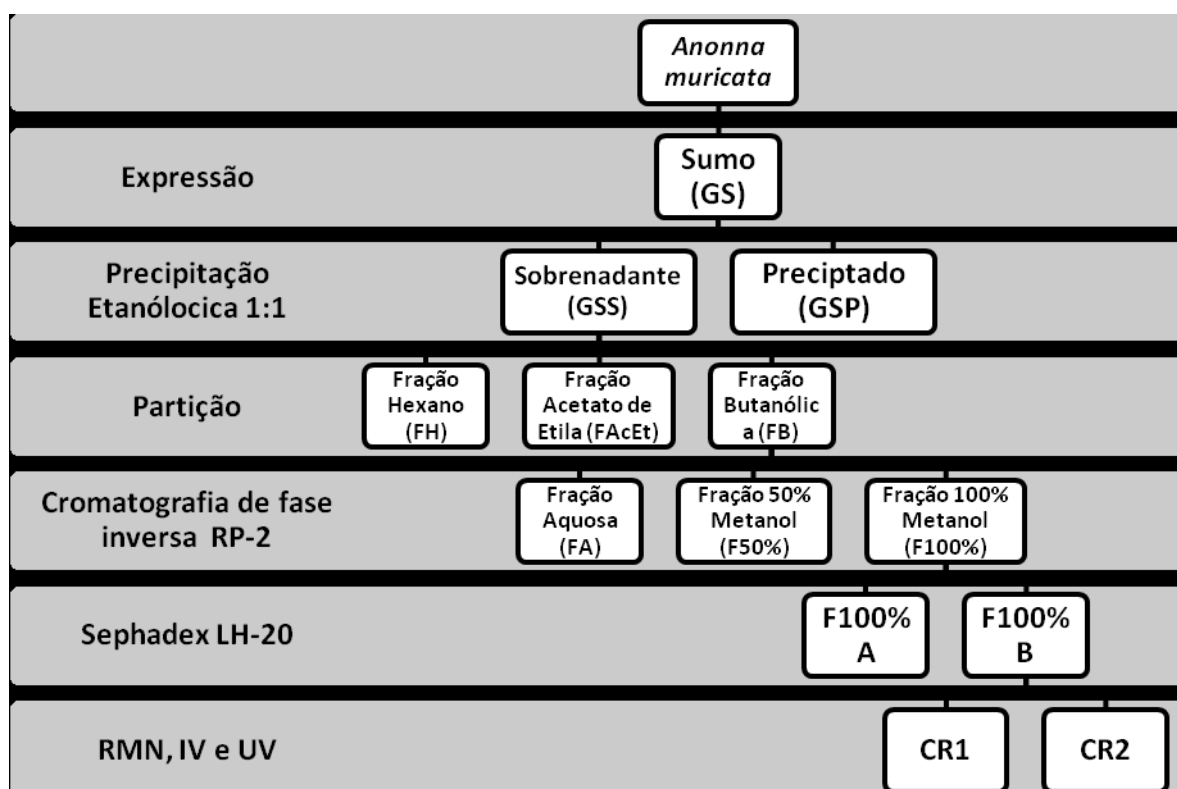


Figura 1: Processo de purificação do sumo de *A. muricata L.*

3.9. Culturas

3.9.1. Células C2C12

A linhagem de células musculares esqueléticas murinas, obtida da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA), foram cultivadas a 37°C em

estufa com 5% CO₂ (Forma Scientific – water-jacketed incubator) conforme Lomonte e colaboradores (1999). Brevemente, as células foram expandidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Medium-High Glucose (DMEM-HG, Gibco BRL) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco BRL), utilizando garrafas de cultura com 75cm² de área de crescimento (TPP-EUA) até atingir a confluência total. Em seguida as células foram soltas com solução Tripsina-EDTA (tripsina 0,25% p/v + 0,53mM EDTA) e distribuídas em placas de 96 poços (TPP-EUA) sob concentração de 1~4 x 10⁴ células/poço num volume de 0,3mL/poço. Vinte quatro horas após o plaqueamento, o meio foi substituído pelo meio de diferenciação (DMEM-HG + 1% SFB), e renovado a cada 48 horas. O meio foi trocado até ter se observado a formação de fibras multinucleadas, período que durou em média 10 dias.

3.9.2. Células RAW 264.7

Macrófagos murinos peritoneais da obtidos da ATCC, foram cultivados em estufa à 37°C e 5% de CO₂. As células foram expandidas em meio DMEM F-12, suplementado com 10% de SFB utilizando garrafas de cultura com 75cm² de área de crescimento. Em seguida, os macrófagos foram soltos com solução Tripsina-EDTA e transferidos para placas de 96 poços sob concentração de 5×10⁵ células/mL num volume de 0,2 mL/poço. A placa foi mantida em estufa, 37°C e 5% CO₂ por 3 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB.

3.10. Ensaio neutralização da atividade proteolítica do veneno de *B. atrox* in vitro

O ensaio de inibição da atividade proteolítica pelos extratos, utilizando o substrato azocaseína, foi realizado de acordo com Cozendey (2007) com modificações. Brevemente, quantidades variadas das frações GS, GSS ou GSP foram pré-incubadas com 25ug de veneno em 100µL de tampão de reação (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, CaCl₂•2H₂O 5mM, MgCl₂ 5mM pH7,5) por 30min a 37°C. Em seguida, as amostras foram incubadas com 400µL de tampão de reação com

azocaseína (Sigma-Aldrich, Brasil) a 5mg/mL por mais 30min a 37°C. A reação foi interrompida com 100µL de TFA 25% (Fisher Scientific, EUA). As amostras ficaram 30min em repouso a temperatura ambiente, depois foram centrifugadas a 2000 x g por 5min. Quatrocentos microlitros do sobrenadante foram coletados e a ele foram acrescentados 400µL de NaOH 2M. Por último, 300µL das amostras foram distribuídas em placa de 96 poços (Cartel, USA) e as densidades ópticas (D.O.) das amostras foram obtidas em espectrofotômetro de placas (Multiscan-Ex, EUA) sob comprimento de onda de 450nm. A atividade enzimática foi calculada através da variação total da D.O. dividida pelo tempo do ensaio. O resultado obtido foi multiplicado por 1000 para obter um valor inteiro. A atividade enzimática foi expressa em unidades por minuto (U/min).

3.11. Ensaio de neutralização da atividade serinoproteásica do veneno de *B. atrox* in vitro

O efeito das frações do sumo (GS, GSS e GSP) sobre a atividade serinoproteásica, provocada pelo veneno de *B. atrox*, foi avaliado empregando-se o substrato BapNa (Sigma-Aldrich, Brasil). Quinhentos microgramas de cada fração foram incubados com 15µg de veneno de *B. atrox* por 30min a 37°C. Em seguida, 65µL de cada mistura foram incubados com 200µL de BapNa 0,3mM, diluído em tampão Tris-base (Tris-base 50mM, CaCl₂•2H₂O 1mM pH8,2). A seguir, todo o volume das amostras foi transferido para placas de 96 poços e incubadas a 37°C. Após 20 min., a D.O. das amostras foi obtida em espectrofotômetro de placas, sob comprimento de onda de 405nm. A atividade enzimática foi calculada através da variação total da D.O. dividida pelo tempo do ensaio. O resultado obtido foi multiplicado por 1000 para obter um valor inteiro. A atividade enzimática foi expressa em unidades por minuto (U/min).

3.12. Ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de *B. atrox* in vitro

Os testes de dosagem da atividade foram realizados conforme (PRICE III, 2007). Brevemente, 1,25µg de veneno bruto foi pré-incubado com concentrações variadas das frações GS, GSS ou GSP, e quantidades fixas de extratos etanólicos

por 30min a 37°C. Todas amostras foram diluídas em solução salina contendo 2mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Brasil), pH 7,5. A seguir, 20µL de cada amostra, ou tampão como controle negativo, foram distribuídos em placas de 96 poços. A seguir, 180µL de tampão de reação contendo 5 mM TritonX-100, 5 mM fosfatidilcolina (Phosphatidylcholine (“>60%”), Sigma-Aldrich, Brasil), 2 mM HEPES, 10 mM CaCl₂•2H₂O e 0,124% (p/v) azul de bromotimol, pH 7.5 a 37 °C foi adicionado. A placa foi lida imediatamente no espectrofotômetro de placas com comprimento de 620nm, em intervalos de um minuto por 5min. A atividade enzimática foi calculada através da variação total da D.O. dividida pelo tempo do ensaio. O resultado obtido foi multiplicado por 1000 para obter um valor inteiro. A atividade enzimática foi expressa em unidades por minuto (U/min).

3.13. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

3.13.1. Células C2C12

O ensaio foi seguido de acordo com Lomonte *et al.* (1999). O ensaio consistiu em avaliar indiretamente a citotoxicidade provocada pelo veneno ou toxinas purificadas em células C2C12 através da atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes das culturas. Controles 100% de liberação de LDH foram obtidos incubando os poços com meio de diferenciação com 0,1% de Triton X-100. Controles 0% de liberação foram obtidos incubando os poços com meio de diferenciação somente. As frações G1 e GSS foram empregadas no ensaio. Concentrações variadas das amostras foram pré-incubadas com ou sem doses de veneno ou PLA₂ por 30min. a 37°C. Antes de distribuir as amostras na placa, o meio foi retirado e trocado pelo meio em que as amostras foram diluídas. Assim, cento e cinquenta microlitros de cada amostra foram adicionados aos poços. Após três horas, os sobrenadantes foram coletados e a atividade da LDH foi medida utilizando kit (Doles, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante.

3.14.2. Células RAW 264.7

O teste de citotoxicidade das amostras foi efetuado empregando os ensaios de LDH e de MTT. Culturas de macrófagos foram estimuladas com 1µg/mL de lipolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA) na ausência ou

presença das amostras diluídas em 100µL meio DMEM-F12 com 2% de SFB. Em seguida, a placa foi mantida em estufa a 37°C por 24h. Como controle 100% de células mortas, utilizou-se meio com 1% de Triton X-100, no controle negativo, as células foram incubadas com meio somente. Para o ensaio de MTT, ao final da incubação, 5 µl de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol [5mg/mL] (MTT, Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada poço e 2h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados solubilizados 100µL HCl (4mM) adicionado em isopropanol (Vetec). As densidades óticas (D.O.) obtidas foram convertidas em percentual de citotoxicidade. A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa a 570nm (RASO *et al.*, 2001).

No ensaio de LDH, para analisar o teor da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura, as células foram cultivadas nas mesmas condições do ensaio de MTT. Ao término da incubação, 50µl do sobrenadante de cada poço foram coletados e acrescidos de 100 µl de solução de alumen férrico e substrato, mantendo-se a 37°C por 3 min. Em seguida, acrescentou-se 100 µl da solução de NAD e fenasina metassulfato, mantendo-se a 37°C por mais 5min (Kit comercial Labrax). A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 490nm (MORAES *et al.*, 2011).

3.15. Ensaio de neutralização da produção de óxido nítrico (NO) em culturas RAW 264.7

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante de culturas de células RAW 264.7 (MORAES *et al.*, 2011). Cinquenta microlitros do restante do sobrenadante das culturas foram adicionados aos 100µL de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Chemical Co.), recém preparado. Após 10 min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 570nm em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada usando como referência uma curva de nitrito de sódio subtraída do valor obtido com os aditivos sem células. Foram utilizados como controle da produção de NO, macrófagos estimulados com LPS a 1µg/mL e macrófagos não estimulados.

3.16. Ensaio de neutralização de edema *in vivo*

A indução de edema foi avaliada por meio da injeção de veneno de *B. atrox* na região subplantar da pata esquerda de grupos (n=4) de camundongos Suíços albinos (18 a 22g). Os ensaios de neutralização do edema com extratos foram realizados incubando-se 3µg de veneno com 500µg das frações GS, GSS, GSP e G1 por 30min a 37°C. Em seguida, 30µL das amostras foram inoculadas nas patas esquerdas de camundongos. Como controle, nas patas direitas, foram inoculados 500µg das frações diluídas em 30µL de salina 0.9%. Após 30min, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e suas patas foram amputadas e pesadas. O edema foi avaliado pela diferença de peso entre a pata controle e a pata tratada com as frações de *A. muricata*.

Em outro modelo de análise, veneno ou PLA₂ purificada foram inoculados na mesma região do modelo anterior. Os ensaios de neutralização do edema com extrato foram realizados incubando-se 3µg de veneno ou 4µg de PLA₂ com 20, 100 e 500µg das frações GSS. Quatro microgramas de PLA₂ também foram incubados com 0,5, 1,0 e 4µg da fração G1. Após a inoculação das amostras nas patas dos animais, a espessura das patas dos camundongos foi obtida com paquímetro digital (Mitotoyo, Japão) nos intervalos de 30min, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a inoculação. O edema representou o aumento de espessura da pata tratada em relação a sua pata controle. Nas patas controles o edema representa o aumento de espessura da pata em relação ao momento antes da inoculação das amostras. Ambos foram expressos em porcentagens. No grupo controle, as patas tratadas receberam PLA₂ ou veneno e as patas controles salina 0,9%.

3.17. Ensaio neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox in vivo*

O ensaio de neutralização da atividade hemorrágica foi realizado determinando-se a concentração de hemoglobina nas lesões provocadas pelo veneno *B. atrox*. O experimento foi realizado de acordo com Esmeraldino *et al.*, 2005, com modificações. Assim, 15µg de veneno foram incubados com 500µg de cada fração (GS, GSS ou GSP) por 30min a 37°C, a seguir, as misturas foram injetadas no dorso depilado de camundongos Suíços Albinos adultos. Após duas horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. A pele da região dorsal foi

retirada e acondicionada em gelo até o momento da digitalização. Após o escaneamento, as lesões hemorrágicas foram cortadas no limite da borda dos halos e o tecido extraído foi fragmentado utilizando bisturi. Os fragmentos foram incubados em 1mL de salina 0,9% por 48h a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 800 x g por 5min. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi coletado. A concentração de hemoglobina foi determinada diluindo-se as amostras em Líquido de Von Kamper Zijlstra (200mg K₃Fe(CN)₆, 50mg KCN, 120g KH₂PO₄, 5g NaCl, 1mL Triton X-100 e 1000ml H₂O d.d. (q.s.p.)) a uma proporção 1:3, atingindo um volume final de 1mL. Em seguida as amostras foram incubadas por 5min a temperatura ambiente. Por último, as amostras foram lidas em espectrofotômetro Benfer Spectrum 210, com comprimento de onda de 540nm. A concentração de hemoglobina foi determinada empregando a equação:

$$(HB) = \frac{A_{540nm} \times 64.458}{44 \times d \times 1000} \times 4 = x \text{ hemoglobina/g de tecido.}$$

Onde: HB – concentração de hemoglobina

64.458 – peso molecular da hemoglobina

44 – 44 mmol⁻¹/cm – absorvância da hemoglobina

d – espessura da cubeta (d=1cm)

1000 – fator conversão – mililitro para litro

3.18. Ensaio de neutralização da atividade miotóxica do veneno de *B. atrox* in vivo

Neste ensaio, empregamos metodologia descrita por Kanashiro *et al.*, 2002. Brevemente, camundongos Suíços albinos adultos foram injetados com as 40µg de veneno por via intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmio. Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados com CO₂ e o sangue colhido por punção cardíaca. O soro foi separado e a enzima CK sérica foi dosada utilizando o kit comercial Bioclim Kit (Bioclin, Brasil). Para avaliar a atividade neutralizante 240µg dos extratos (GS, GSS ou GSP) foram incubados com veneno a 37°C durante 30

min, em seguida, 50µL das misturas foram inoculada pela via i.m. em camundongos. Duas horas após a injeção os animais foram sacrificados, o soro colhido e a enzima CK sérica foi dosada conforme instruções do fabricante. O experimento foi conduzido com três animais por grupo e repetido duas vezes.

3.19. Construção do modelo G1

O modelo da ligante G1 foi baseado nos resultados obtidos da caracterização química da substância isolada por Nunes (2011). Para a construção da molécula foi utilizado o programa ArgusLab 4.0.1 (Mark Tompson and Planaria Software LLC – EUA). A geometria da molécula foi otimizada com o uso dos seguintes campos de força, UFF, MNDO, PM3 e AM1, sendo empregados nessa ordem. Cada campo de força foi aplicado até que houvesse convergência na otimização da geometria da molécula. Feito isso, o arquivo PDB foi produzido para a sua utilização nas simulações de *docking*.

3.20. Construção do modelo de PLA₂

O modelo de PLA₂ Lisina 49 (K49) de *B. atrox* foi construído baseado na sequência FASTA depositada por Núñez *et al.* (2004) no banco de dados Uniprot com código de entrada Q6JK69. Com o auxílio da ferramenta de alinhamento de sequências proteicas BLAST-NCBI, foi realizado a busca da sequência de referência de maior similaridade que tivesse sua estrutura cristalizada depositada no RCSB-PDB. A próxima etapa foi a construção do modelo tridimensional da PLA₂ K49 de *B. atrox* baseado na sequência de referência, para isso foi utilizado o programa Modeller 9v6 9.10 (ESWAR *et al.*, 2007). Por último, a geometria do modelo foi otimizada com o emprego do programa NOC 3.01 (Florida State University – EUA).

3.21. Docking

As análises de interação ligante/receptor foram realizadas utilizando o programa AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, EUA). No estudo empregou-se a técnica de ligante flexível sobre receptor rígido. Os mapas de interação foram construídos envolvendo todo o monômero do modelo de PLA₂ K49.

Como ligante, utilizou-se o modelo da molécula G1. As conformações resultantes das simulações foram agrupadas de acordo com os domínios de interação. Os grupos de maior energia de interação foram selecionados.

3.22. Análise Estatística

A significância estatística dos resultados obtidos foi analisada empregando Student's *t-test* não pareado e *One Way ANOVA*. Valor de $p < 0.05$ foi considerado indicativo de significância. Para a realização dos cálculos foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.01, EUA.

4. Resultados

4.1. Parte I

A primeira parte desse trabalho é composta por dados produzidos para a complementação dos resultados obtidos na dissertação de mestrado de FRAUCHES (2007). Todo o conjunto de dados foram recentemente publicados pelo nosso grupo em Frauches *et al.* (2013) (ANEXO).

4.1.1. Ensaio de neutralização da atividade letal do veneno total *in vivo* pelo *pool* de mAbs

No primeiro ensaio preliminar o *pool* de mAbs foi constituído de 3,45mg de cada mAb (A85/9-4, 59/2-E4 e 6AD2-G5) totalizando 10,35mg a ser administrado para cada camundongo. O *pool* de mAbs foi incubado com 200 ou 300µg de veneno de *B. atrox* por 30 minutos e inoculado via i.p. em camundongos de 18-20g. A sobrevivência dos animais foi avaliada em 24 e 48 horas após a inoculação. Todos os animais que receberam o *pool* de mAbs incubados com 300µg de veneno morreram em até 48 horas, enquanto 3 de 5 animais inoculados que receberam o *pool* de mAbs pré-incubados com 200µg de veneno sobreviveram, conforme pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Ensaio de soroproteção *in vivo* de camundongos desafiados com o *pool* de mAbs e veneno

Grupos	mAbs*	Veneno**	Vivos/Total
Grupo 1	10,35mg	200ug	3/5
Grupo 2	----	200ug	1/5
Grupo 3	10,35mg	300ug	0/5
Grupo 4	----	300ug	0/5

* A mistura de mAbs utilizada corresponde a 3,45mg de cada anticorpo monoclonal A85/9-4, 59/2-E4 e 6AD2-G5 totalizando 10,35mg/camundongo.

**A quantidade de veneno utilizada por camundongo.

Pool de mAbs e veneno pré-incubados e inoculados via ip.

Em outro modelo de análise, os camundongos foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com o *pool* de mAbs e em seguida desafiados com veneno total de *B. atrox* pela via subcutânea (s.c.). Os três mAbs foram reunidos a uma concentração de 13,5 mg/camundongo (5,0mg de A85/9-4 e de 59/2-E4; e 3,5mg de 6AD2-G5) em um volume de final de 0,7 mL e inoculado via ip em camundongo Suíço albino com 18 a 20g. O grupo controle foi inoculado com a mesma concentração de IgG não relacionado. Em seguida, os animais foram desafiados com 350µg de veneno pela s.c. A sobrevivência dos animais foi observada por 48 horas. Na Tabela 2 podemos observar que o grupo experimental constituído de camundongos previamente tratados com os anticorpos específicos, todos os animais sobreviveram. Enquanto que no grupo controle, que recebeu IgG inespecífica, somente um camundongo sobreviveu.

Tabela 2: Ensaio de soroproteção *in vivo* de camundongos desafiados com misturas de mAbs e veneno

Grupos	mAbs*	Veneno**	Vivos/Total
Grupo 1	13,5mg	350ug	5/5
Grupo 2	-----	350ug	1/5

*A mistura de mAbs utilizada corresponde a 5,0mg dos mAbs A85/9-4 e 59/2-E4 e 3,5 mg de 6AD2-G5, por camundongo.

** A quantidade de veneno utilizada para cada camundongo.

Pool de mAbs inoculado via ip e veneno inoculado via s.c.

4.1.2. Análises Histológicas

Tecidos e órgãos dos camundongos utilizados nos ensaios de letalidade foram analisados por histopatologia. Duas horas após o início do ensaio, os animais apresentaram dispneia, exaustão e pelos eriçados, em contraste com animais tratados com os *pool* de mAbs, cujos sintomas foram menos evidentes. Durante a necropsia, todos os animais sacrificados, tanto do grupo controle positivo quanto do grupo tratado, exibiram sangramento na cavidade peritoneal. Esta observação foi muito mais evidente no grupo dos animais do controle positivo que no grupo dos animais tratados com os mAbs. Após 2h de ensaio, seções histopatológicas da parede do peritônio, formada pela membrana serosa e músculos esqueléticos do assoalho dorsal, de animais tratados com mAbs mostraram vasodilatação com leucocitose, edema e hemorragia discreta (Figura 2A). Amostras da cavidade peritoneal de animais controles apresentaram edema endomisial com dissociação de fibras musculares e hemorragia moderada (Figura 2B). Ainda podemos notar que algumas fibras exibiram coagulação necrótica, representada por fibras hialinizadas sem a presença de estrias e ligeiramente eosinofílicas. O pâncreas de camundongos tratados com mAbs exibiram hemorragia e edema discreto na interface com o intestino (Figura 2C). De forma recíproca, animais controles exibiram extensa hemorragia e dissociação de células acinares (Figura 2D). As análises histopatológicas dos rins não mostraram alterações dignas de nota entre os animais tratados e os do grupo controle negativo (Figura 2E e F).

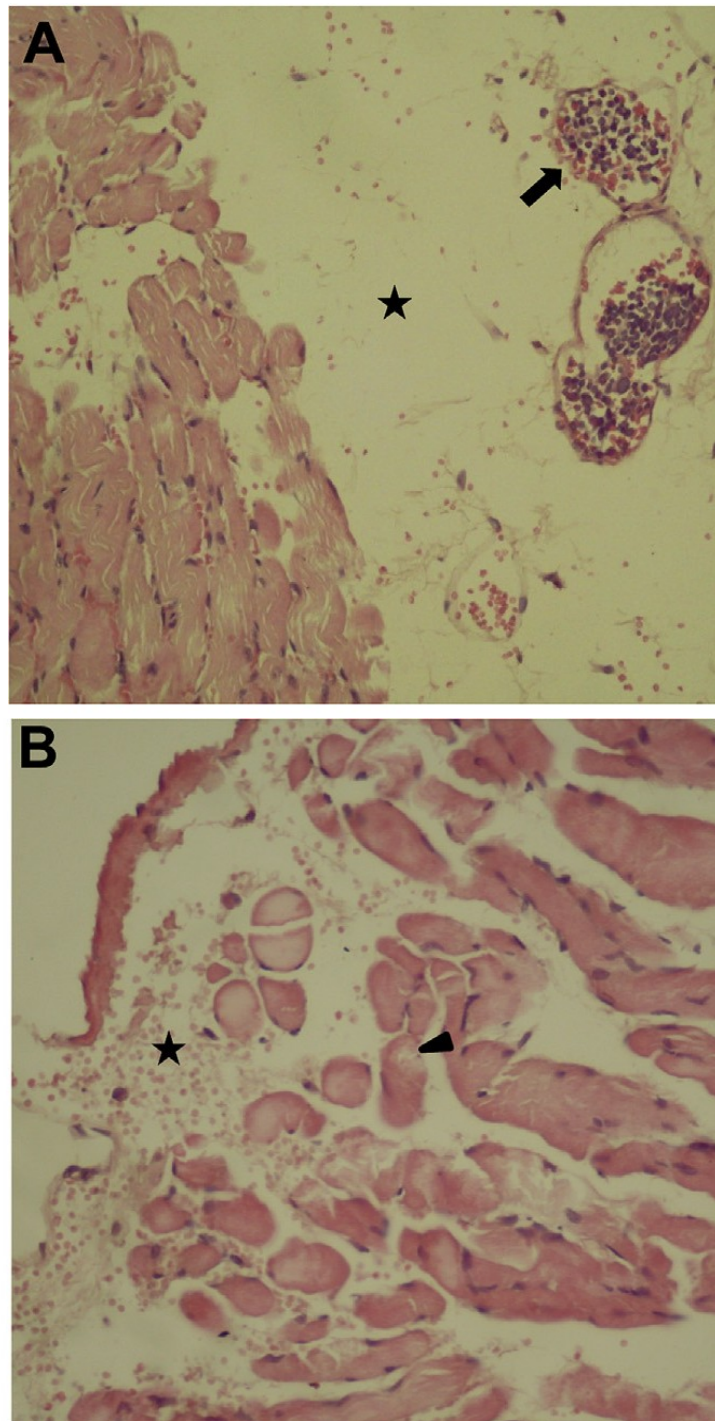


Figura 2 A e B: Análises histológicas da parede do peritônio. A mistura de mAbs (10,35mg) foi incubada com 200 μ g de veneno a 37 $^{\circ}$ C por 30min e inoculadas em camundongos Suíços albinos via i.p. Após 2h, os animais foram sacrificados e amostras da parede do peritônio foram coletadas e processadas para análise histológica. **A)** Animais tratados com a mistura de mAbs (aumento de 200x). **B)** Animais controles positivos, inoculados com veneno somente (aumento 400x). (★) Hemorragia e edema. (▶) Hialinização de fibras musculares. (➡) Leucocitose intravascular.

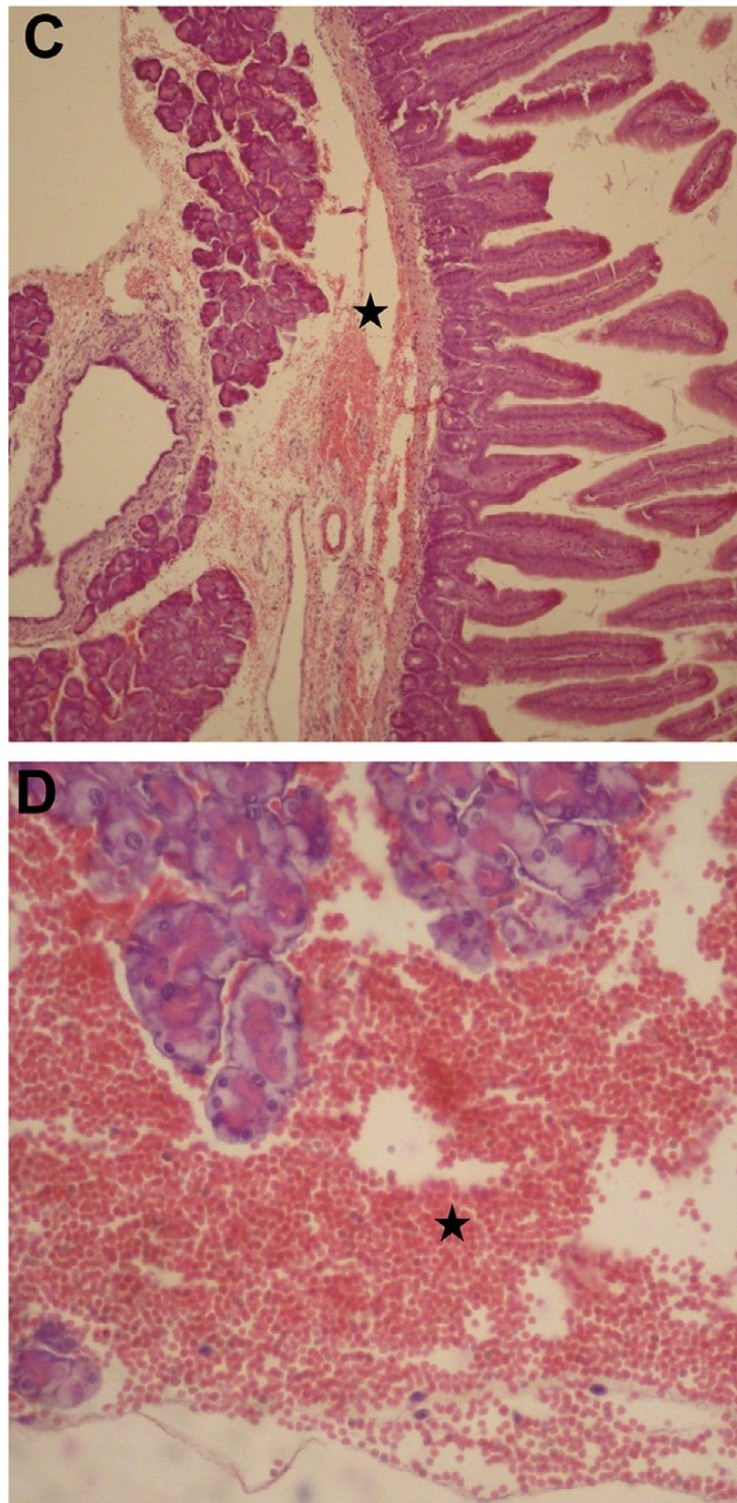


Figura 2 C e D: Análises histológicas do pâncreas. A mistura de mAbs (10,35mg) foi incubada com 200 μ g de veneno a 37°C por 30min e inoculadas em camundongos Suíços albinos via i.p. Após 2h, os animais foram sacrificados e amostras do pâncreas foram coletadas e processadas para análise histológica. **C)** Animais tratados com a mistura de mAbs (aumento de 100x). **D)** Animais controles positivos, inoculados com veneno somente (aumento 400x). (★) Hemorragia e edema.

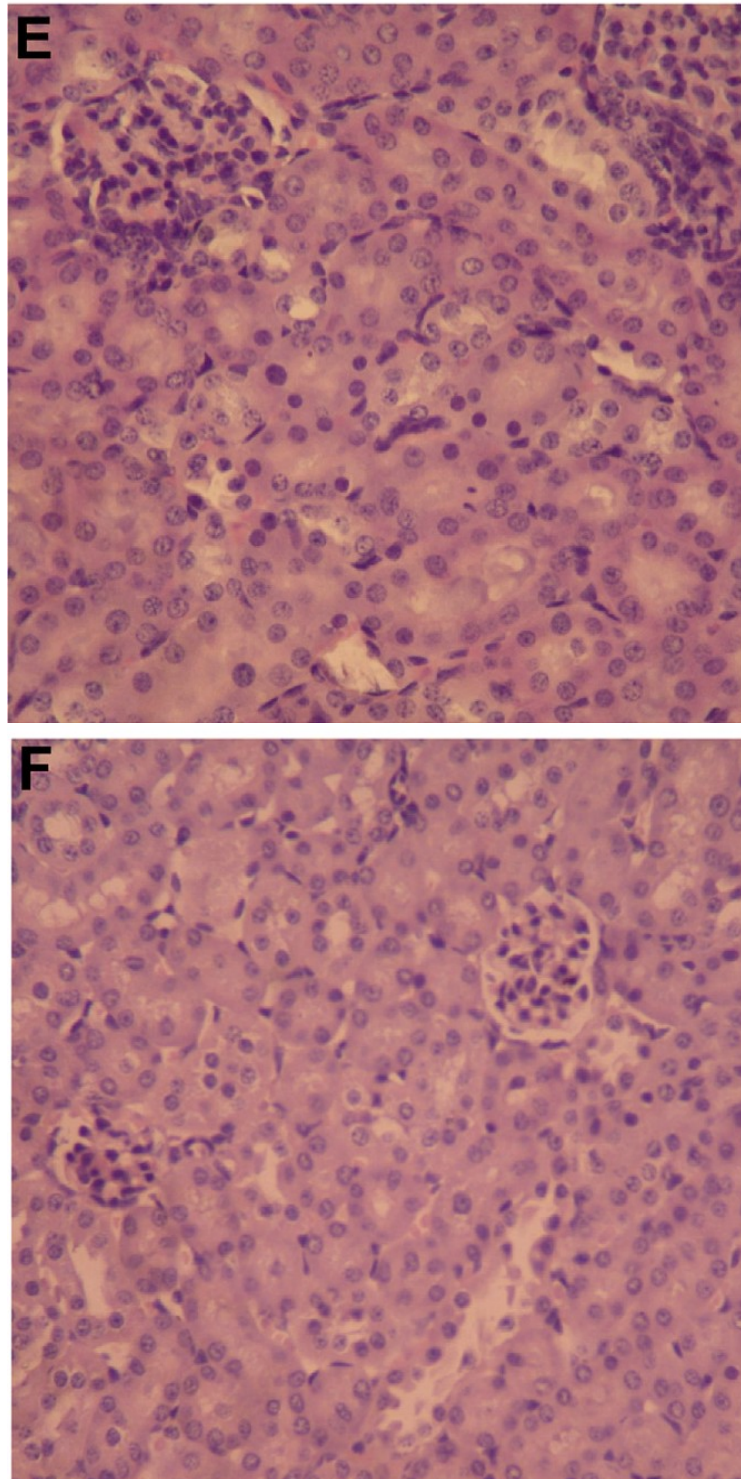


Figura 2 E e F: Análises histopatológicas dos rins. A mistura de mAbs (10,35mg) foi incubada com 200 μ g de veneno a 37 $^{\circ}$ C por 30min e inoculadas em camundongos Suíços albinos via i.p. Após 2h, os animais foram sacrificados e amostras dos rins foram coletadas e processadas para análise histológica. **E)** Animais tratados com a mistura de mAbs (aumento de 200x). **F)** Animais saudáveis (aumento 400x).

4.2. Resultados Parte II

4.2.1. Produção do extrato aquoso do sumo dos frutos e do extrato etanólico das folhas de *A. muricata*

O processo de produção do extrato aquoso realizado por Nunes (2011) do sumo resultou em três amostras: GS que foi obtida por meio da extração com água, originando o sumo expresso; GSS (sobrenadante) e GSP (precipitado) que foram obtidas através da precipitação com etanol. Parte das massas das amostras obtidas no processo foi disponibilizada para os ensaios preliminares de caracterização biológica e o restante foi utilizado no processo de caracterização química do extrato aquoso.

Após a extração etanólica das folhas e do suplemento alimentar de *A. muricata* obteve-se uma recuperação de aproximadamente de 50% e 30%, respectivamente. Uma parte do material foi separada para ensaios preliminares e a outra foi estocada em a -70°C para futura purificação. Cada fração foi nomeada da seguinte forma: extrato foliar (EeF) e extrato do suplemento alimentar (EeC1 e EeC2).

4.2.2. Neutralização da atividade edematogênica do veneno de *B. atrox*

As frações GS, GSS e GSP foram testadas quanto à capacidade de neutralização da atividade edematogênica promovida pelo veneno de *B. atrox*. Primeiramente foi realizada uma cinética para ajustar a dose de veneno que foi utilizado no ensaio. Sendo assim, 2, 4, 8 e $16\mu\text{g}$ de veneno foram inoculados na região subplantar das patas traseiras de camundongos Suíços albinos adultos. Após 30min de análise, foi observado que a partir de $4\mu\text{g}$, já havia a formação de exudato nas patas testadas camundongos. Por isso, decidiu-se trabalhar com uma dose de $3\mu\text{g}$ de veneno por animal (resultados não mostrados).

No ensaio de neutralização, $500\mu\text{g}$ de cada fração (GS, GSS e GSP) foram pré-incubados com $3\mu\text{g}$ de veneno bruto. Após o período de incubação, as amostras foram injetadas na região subplantar da pata traseira esquerda de camundongos Suíços albinos ($n=4$). Como controle, as frações incubadas na ausência de veneno foram inoculadas na pata traseira direita. O grupo controle recebeu na pata esquerda veneno somente, enquanto que a pata traseira direita foi inoculada com

solução salina. Após 30min de ensaio, os animais foram sacrificados e suas patas traseiras foram amputadas e em seguida pesadas. A análise da neutralização do edema foi obtida pela diferença entre a pata tratada e a pata oposta que recebeu a fração somente. O edema foi expresso em miligramas. Com isso, podemos ver na figura 3 que todas as frações foram capazes de inibir ($P < 0,0015$) o edema provocado pelo veneno de *B. atrox*.

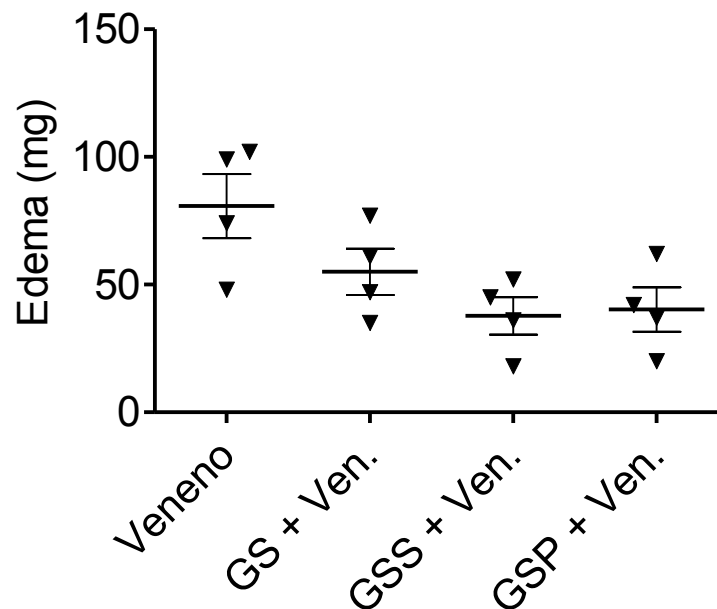


Figura 3: Inibição da atividade edematogênica do veneno de *B. atrox* pelas frações aquosas de *A. muricata*. Camundongos Suíços Albinos ($n=4$) receberam 500 μ g das frações de *A. muricata* previamente incubadas ou não com 3 μ g de veneno de *B. atrox*, por 30min a 37°C. Após 30min os animais foram sacrificados, suas patas foram amputadas e pesadas. O edema foi obtido subtraindo-se das patas tratadas, o peso das mesmas utilizadas como controle. Significância estatística foi calculada aplicando teste *one way* ANOVA. Valor de $P < 0,05$ foi considerado indicativo de significância.

4.2.3. Neutralização da Atividade Hemorrágica do veneno de *B. atrox in vivo*

As frações de *A. muricata* também foram testadas quanto à capacidade de neutralização da atividade hemorrágica provocada pelo veneno de *B. atrox in vivo*. Primeiro, foi realizado novamente o ajuste da dose de veneno, assim, quantidades variadas de veneno foram injetadas via s.c. no dorso depilado de camundongos Suíços albinos (n=2). Após 2h os animais foram sacrificados e a região dorsal da pele foi retirada para análise. Na figura 4 podemos observar que a dose de 16µg produziu lesões intensas e regulares, por isso, adotamos uma dose de 15µg de veneno para a realização dos ensaios. A intensidade da hemorragia foi avaliada através da liberação de hemoglobina das lesões. Para o ensaio de neutralização, 500µg das frações GS, GSS e GSP foram incubados com 15µg de veneno por 30min a 37°C. Em seguida, 30µL da mistura veneno/fração foi injetada via s.c. no dorso dos animais (n=3). Grupos controles receberam as frações somente. Ao término do ensaio, os animais foram sacrificados. Na figura 5 podemos constatar que todas as frações inibiram eficientemente a hemorragia provocada pelo veneno. O resultado fica ainda mais claro ao vermos no painel 1 a redução das lesões nos grupos tratados, quando comparados com o grupo que recebeu veneno somente.

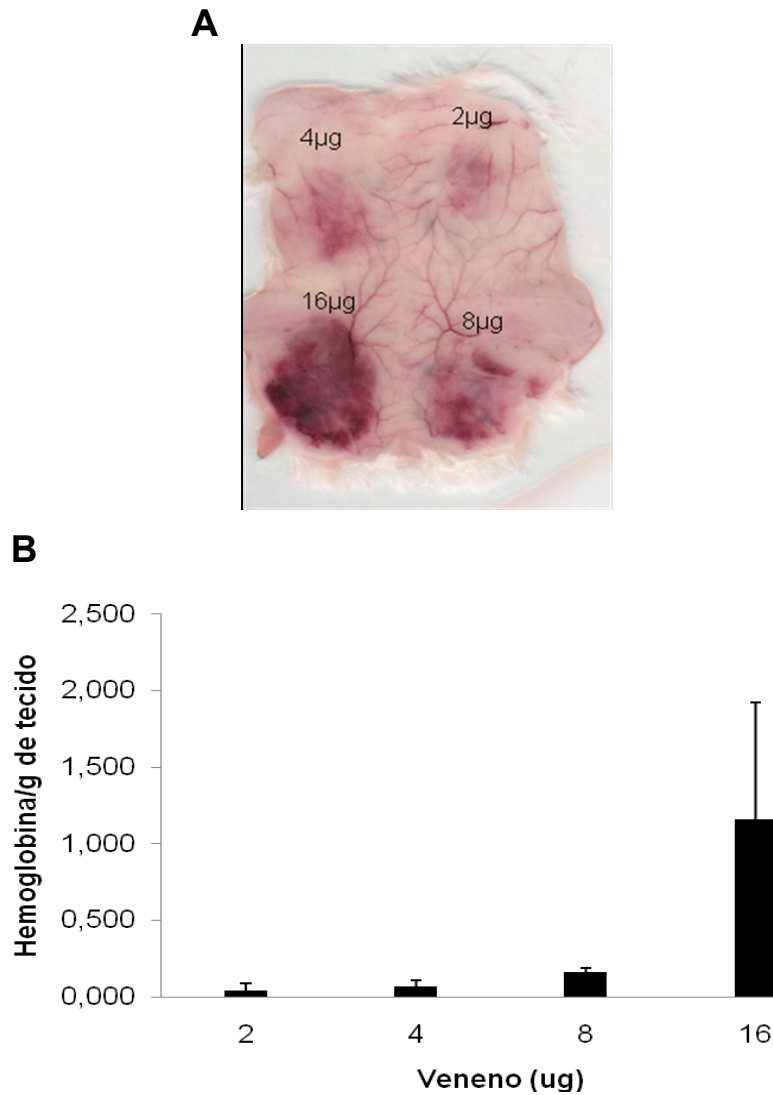


Figura 4: Atividade hemorrágica provocada pelo veneno de *B. atrox*. Dorsos de camundongos Suíços albinos (n=2) foram inoculados com 2, 4, 8 e 16µg de veneno bruto no dorso via s.c. Após 2h, animais foram sacrificados e a região foi retirada para análise. **A)** Foto representativa do dorso dos animais injetados com as doses de veneno. **B)** Após a digitalização dos dorsos dos animais, as lesões foram recortadas, fragmentadas e imersas em salina 0,9% por 48h a 4°C. Depois as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante coletado e a ele, adicionado Líquido de Von Kamper Zijlstra para a quantificação de hemoglobina nas lesões. Em seguida, a D.O. das amostras foi obtida em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 540nm.

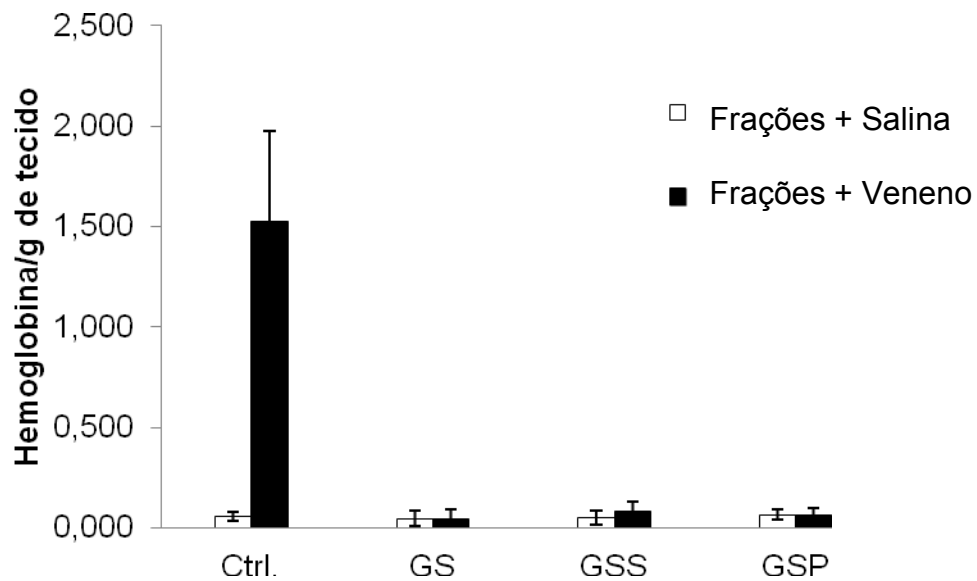
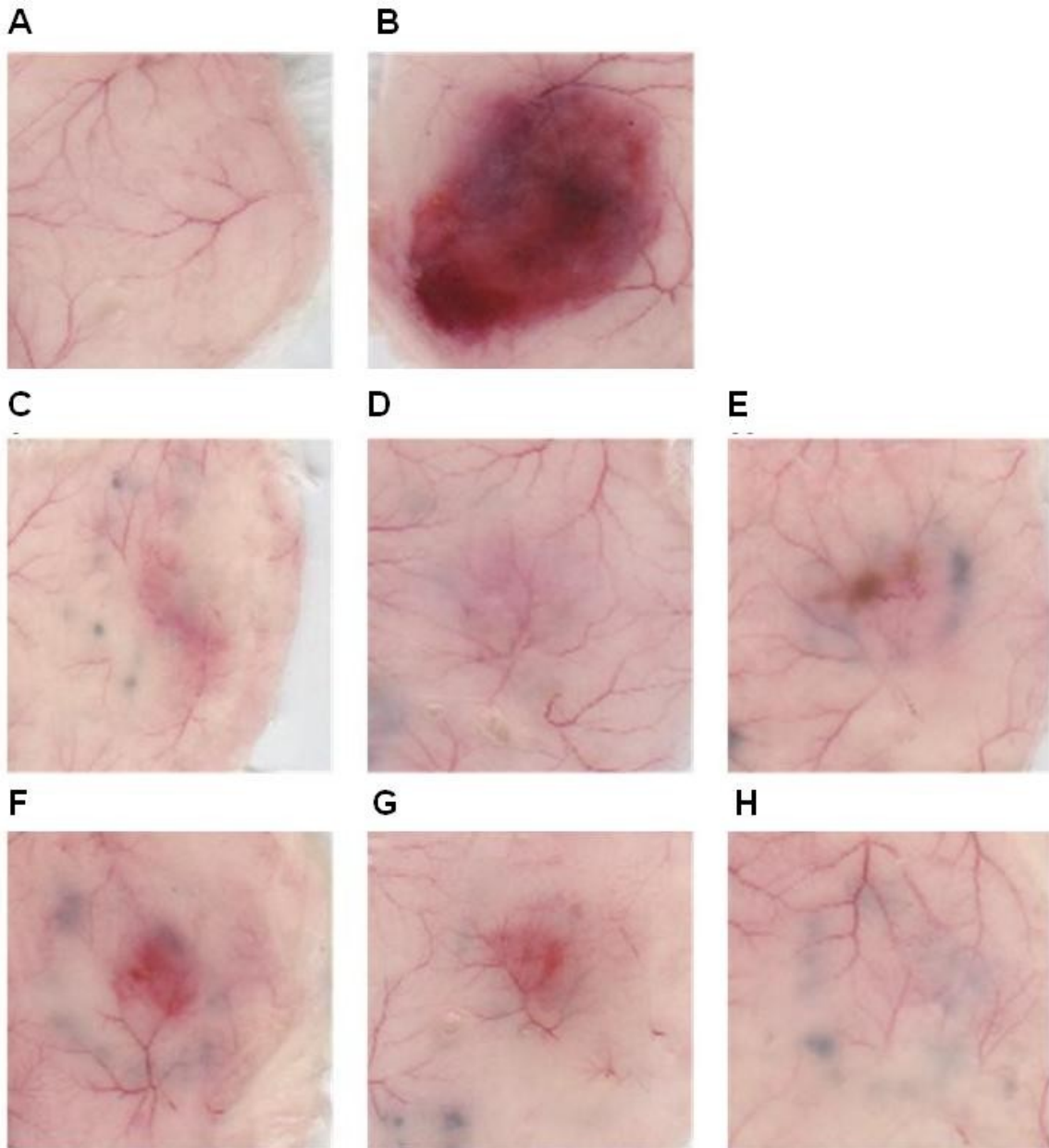


Figura 5: Neutralização da atividade hemorrágica do veneno *B. atrox* pelas frações de *A. muricata*. Grupos de animais (n=3) receberam 15µg via s.c. de veneno pré-incubados ou não com 500µg das frações GS, GSS ou GSP a 37°C por 30min. Como controle, os mesmos grupos foram injetados com frações incubadas na ausência de veneno. Após 2h, os animais foram sacrificados e a pele de suas regiões dorsais retirada. As lesões foram extraídas, fragmentadas e imersas em salina 0,9% por 48h a 4°C, em seguida as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. A hemoglobina liberada das lesões foi quantificada conforme o método descrito.



Painel 1: Neutralização da atividade hemorrágica *in vivo* pelas frações aquosas de *A. muricata*. Dorsos de camundongos Suíços albinos (n=3) foram inoculados, via s.c., com 15µg de veneno de *B. atrox* previamente incubado com 500µg de cada fração de *A. muricata* por 30min a 37°C. Após 2h os animais foram sacrificados e a região dorsal da pele foi retirada para análise. A) Controle, animal recebeu salina; B) controle positivo, animal recebeu veneno C) camundongo inoculado com fração GS; D) animal inoculado fração com GSS; E) camundongo inoculado com a fração com GSP. F) camundongo inoculado com veneno previamente incubado com GS; G) animal inoculado com veneno previamente incubado com GSS; H) animal inoculado com veneno previamente incubado com GSP.

4.2.4. Neutralização da Atividade Fosfolipásica do veneno de *B. atrox* *in vivo*

A atividade fosfolipásica foi avaliada por meio da miotoxicidade provocada pelo veneno de *B. atrox* em camundongos Suíços albinos. A atividade miotóxica foi medida através dos níveis séricos da enzima creatina quinase. Assim, para analisar a neutralização da miotoxicidade, 240µg das frações GS, GSS e GSP foram previamente incubados com 40µg de veneno bruto por 30min a 37°C, em seguida, foram injetados nos animais via i.m. no músculo gastrocnêmio da pata traseira esquerda de camundongos Suíços albinos. Após 2h os animais foram sacrificados, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro foi obtido por centrifugação. A figura 6 mostra que todas as frações foram capazes de neutralizar parcialmente a ação miotóxica do veneno de *B. atrox*.

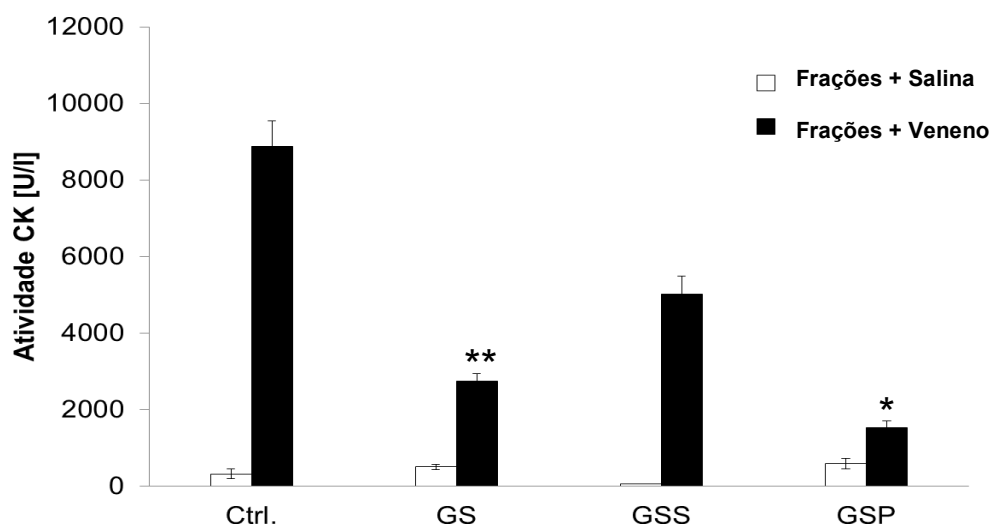


Figura 6: Inibição da atividade miotóxica *in vivo* pelas frações aquosas de *A. muricata*. Grupos (n=3) de camundongos Suíços Albinos adultos receberam 240µg de cada fração de *A. muricata* previamente incubada ou não com 40µg com veneno de *B. atrox* por 30min a 37°C. As misturas foram inoculadas via i.m., no músculo gastrocnemius esquerdo, após 2h os animais foram sacrificados e o sangue coletado por meio de punção cardíaca. A atividade miotóxica foi dosada indiretamente através dos níveis séricos da enzima CK nos soros dos animais. Resultado representativo de dois experimentos independentes. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. * P<0,05 e ** P<0,001.

4.2.5. Neutralização da atividade proteolítica do veneno de *B. atrox in vitro*

A atividade proteolítica do veneno de *B. atrox* foi analisada empregando azocaseína como substrato. Na figura 7A mostra a cinética realizada para a escolha da concentração de veneno que foi empregada no ensaio de neutralização. Assim, diferentes doses de veneno bruto (1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0 e 100 μ g) foram incubadas com tampão de reação contendo 5mg/mL de azocaseína e após 30min a 37°C, a proteólise do substrato foi quantificada. O gráfico mostra uma atividade proteolítica dose dependente e a quantidade de veneno escolhida para ser empregada nos ensaios de neutralização foi de 25 μ g (0,25mg/mL).

Após o ajuste da dose, quantidades variadas (62,5; 125 e 250 μ g) das frações GS, GSS e GSP foram incubadas com concentrações fixas de veneno de *B. atrox* por 30min a 37°C. Em seguida, a capacidade de neutralização da atividade proteolítica pelas frações de *A. muricata* foi avaliada. Como controle, as frações foram incubadas na ausência de veneno e para comparação, foi utilizado o quelante divalente EGTA (Sigma-Aldrich, Brasil) como inibidor. Embora as frações GS, GSS e GSP inibam a atividade hemorrágica (figura 5), podemos observar na figura 7B que nenhuma das amostras foi capaz de inibir a atividade proteolítica do veneno de *B. atrox in vitro* quando comparadas com inibidor.

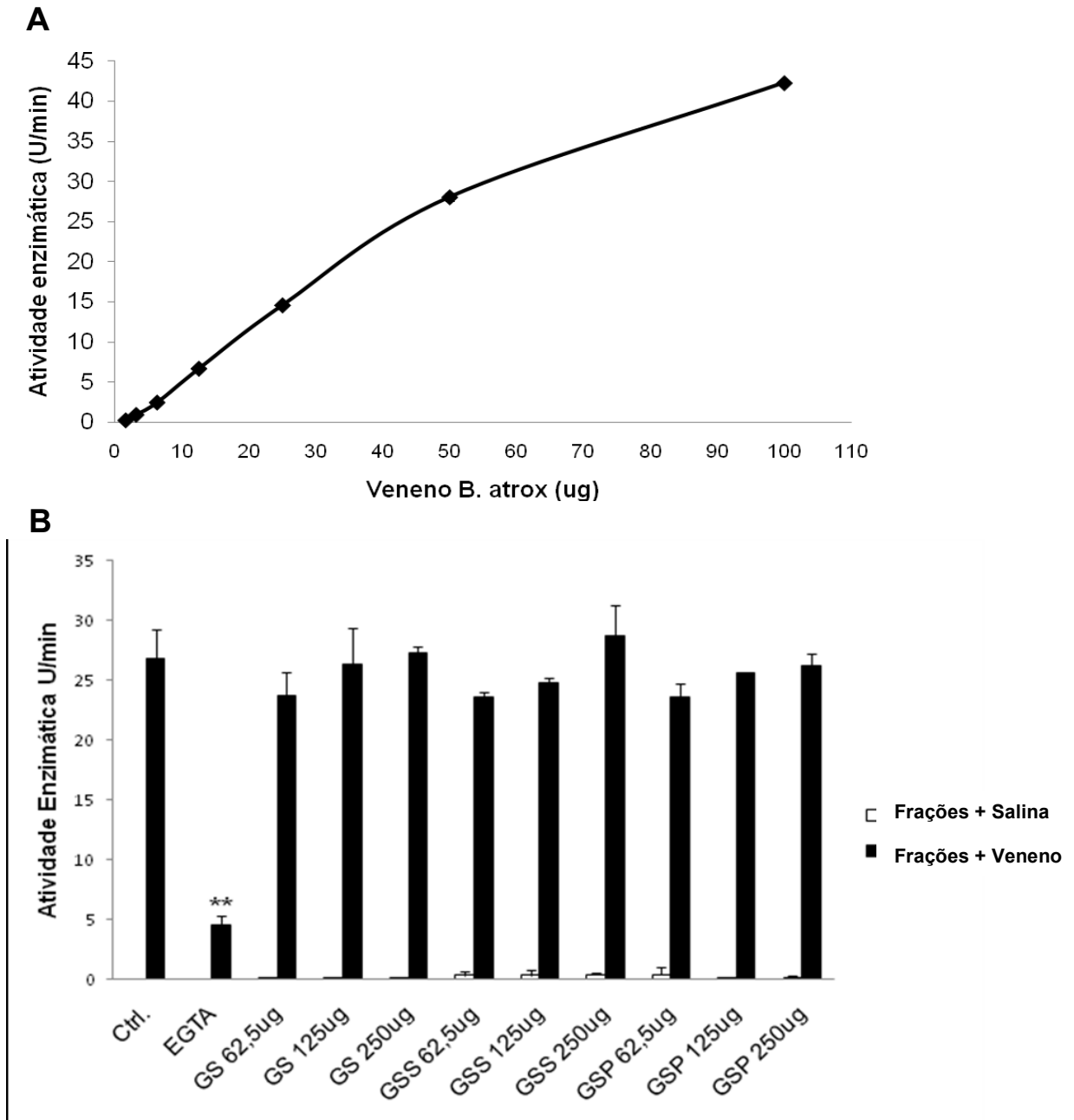


Figura 7: Ensaio de neutralização da atividade proteolítica do veneno de *B. atrox*. A) Cinética da atividade proteolítica do veneno de *B. atrox*: 1,25, 3,1, 6,2, 12,5, 25,0, 50,0 e 100µg de veneno foram incubados com tampão de reação contendo 5mg/mL azocaseína por 30min a 37°C. Em seguida, a proteólise do substrato foi quantificada. B) Ensaio de neutralização com as frações de *A. muricata*: 62,5, 125 e 250µg das frações GS, GSS e GSP foram pré-incubadas com 25µg de veneno bruto por 30min a 37°C. Depois, a capacidade de inibição da atividade proteolítica foi analisada. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. ** P<0,001.

4.2.6. Neutralização da atividade serinoproteásica do veneno de *B. atrox* *in vitro*

O efeito das frações de *A. muricata* sobre a atividade serinoproteásica do veneno de *B. atrox* foi avaliado utilizando BapNa como substrato. Assim, 500µg das frações GS, GSS e GSP foram pré-incubados com 15µg de veneno por 30min. a 37°C. Na figura 8 podemos constatar que nenhuma das frações foi capaz de inibir a atividade serinoproteásica do veneno. Surpreendentemente, nosso resultado mostra que as frações GS, GSS e GSP aumentaram em torno de 30% a atividade do veneno quando comparadas com o controle positivo. A fração GS, quando incubada na ausência de veneno, apresentou atividade sobre o substrato BapNa semelhante à apresentada pelo veneno sozinho. As demais frações também apresentaram atividade, porém, menores que a da fração GS.

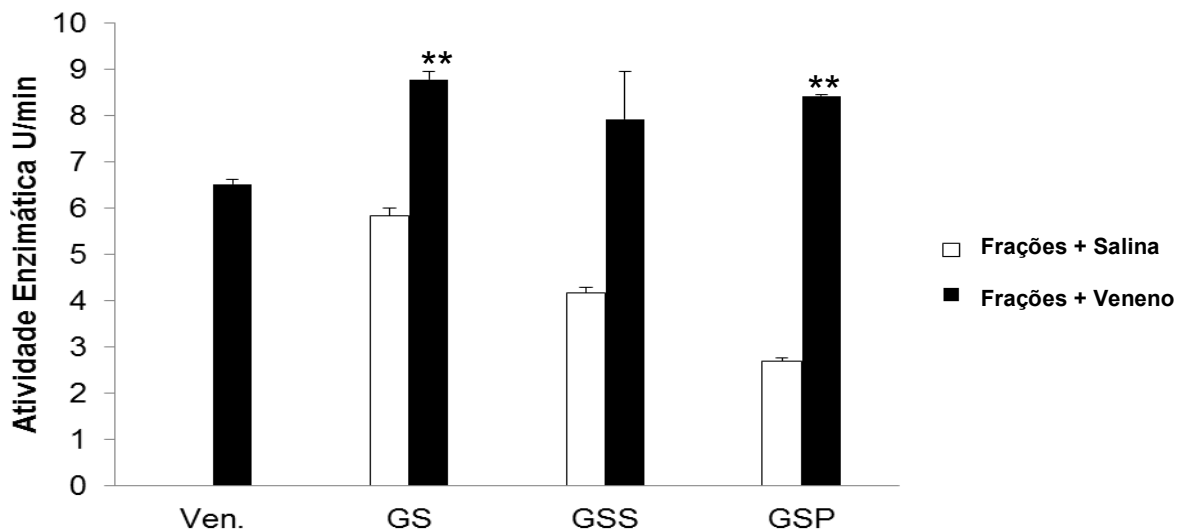


Figura 8: Avaliação da atividade serinoproteásica *in vitro*. Quinhentos microgramas das frações de *A. muricata* foram incubados com 15µg de veneno de *B. atrox* por 30min a 37°C. Em seguida foram testadas quanto à capacidade de neutralização da atividade serinoproteásica empregando o substrato BapNa 0,3mM. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. ** P<0,001.

4.2.7. Neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de *B. atrox in vitro*

A análise da atividade fosfolipásica *in vitro* foi analisada empregando fosfatidilcolina como substrato. Assim, para o ajuste da dose empregada no ensaio, 0,16, 0,32, 0,64, 1,25, 2,5 e 5,0 μ g de veneno foram incubados com o substrato e a atividade enzimática foi medida. Na figura 9A vemos que a dose de 1,25 μ g apresentou 50% da atividade enzimática da dose máxima, por isso, essa foi escolhida como a quantidade ideal. Depois, realizamos uma cinética de inibição para a escolha da concentração de inibidor utilizado no ensaio como parâmetro. No experimento utilizamos o inibidor brometo de para-bromofenacil (*p*-BPB) (Sigma-Aldrich, Brasil), dessa forma, concentrações variadas de *p*-BPB foram diluídas em tampão e pré-incubadas com veneno por 30min a 37°C, em seguida a inibição da taxa de reação foi analisada. Na figura 9B podemos observar que para as condições do experimento, a concentração de 0,001mg/mL de *p*-BPB foi a mais eficaz.

Após o ajuste do ensaio, foi realizado o ensaio com a fração GSS de *A. muricata* para avaliar a capacidade de inibição da atividade fosfolipásica *in vitro*. A concentração variadas (500, 100, 20 e 4 μ g/mL) da fração GSS foram incubadas com 1,25 μ g de veneno bruto por 30min a 37°C, em seguida as amostras foram adicionadas ao tampão de reação contendo substrato e a taxa de reação foi quantificada. Na figura 10 podemos observar que, nas condições do ensaio, nenhuma das concentrações testadas de GSS foi capaz de neutralizar da atividade fosfolipásica do veneno.

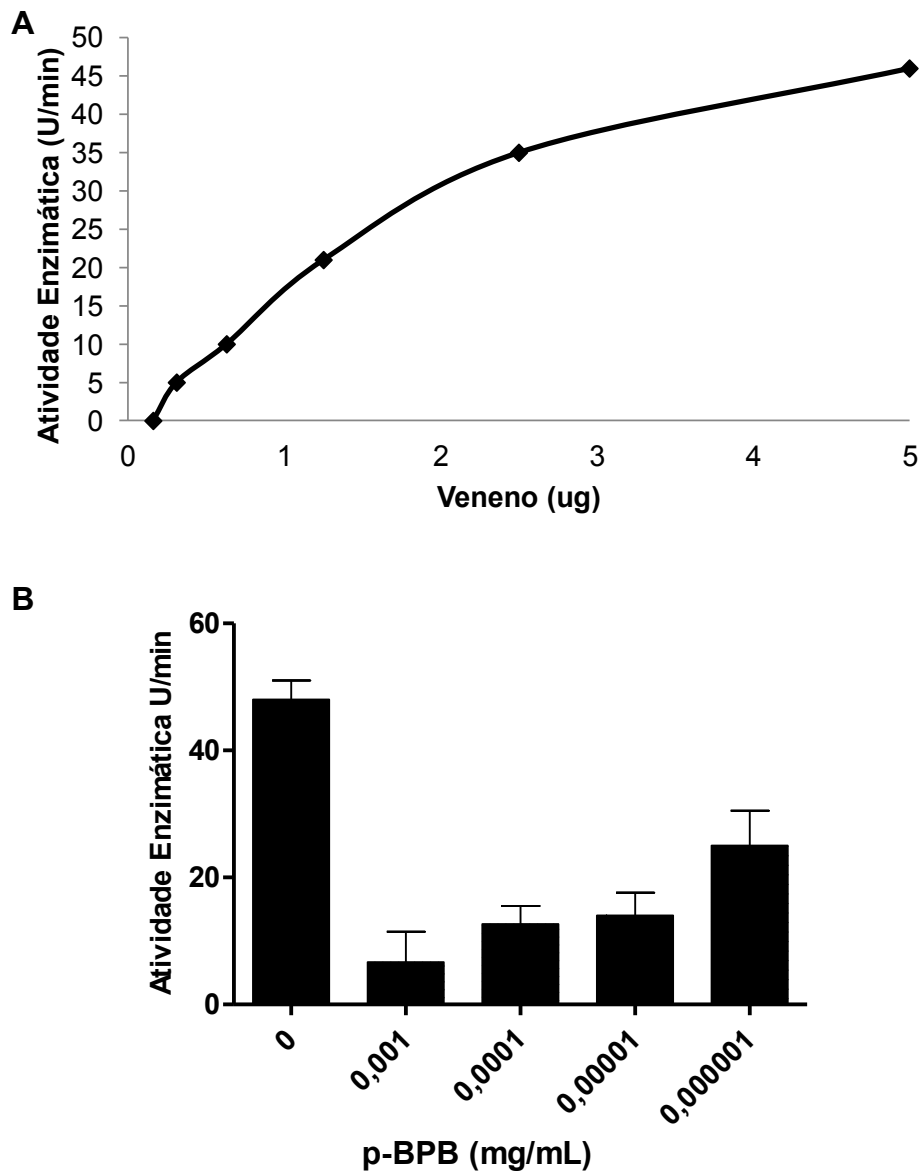


Figura 9: Análise da atividade fosfolipásica do veneno de *B. atrox in vitro*: A) Cinética da dose de veneno sobre o substrato fosfatidilcolina, 0,16, 0,31, 0,62, 1,25, 2,5 e 5µg de veneno foram incubados com substrato e a taxa de reação foi medida. **B)** Cinética de inibição da taxa atividade PLA₂ pelo p-BPB, concentrações variadas do inibidor foram incubadas com 1,25µg de veneno a 37°C por 30min, em seguida a inibição da taxa de reação foi avaliada.

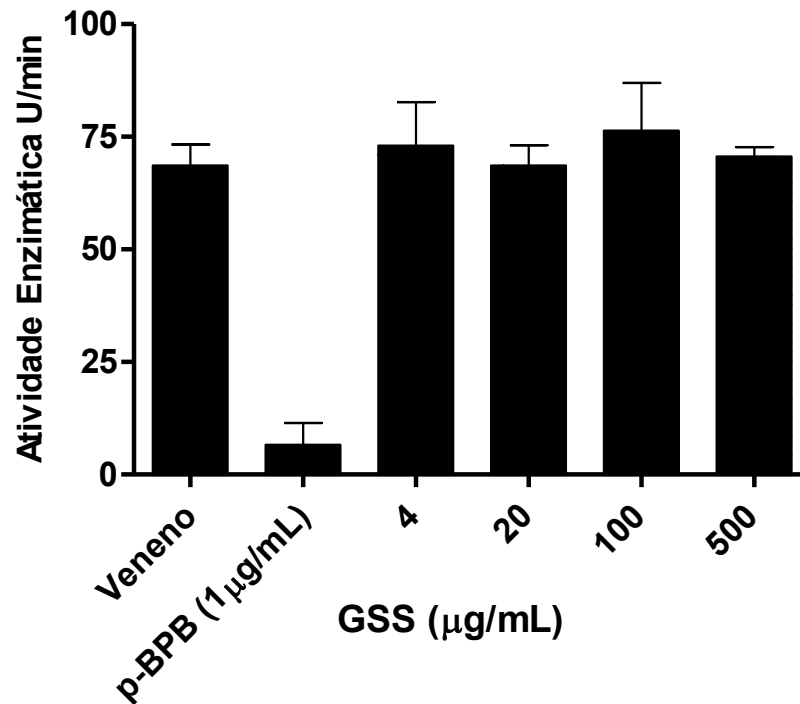
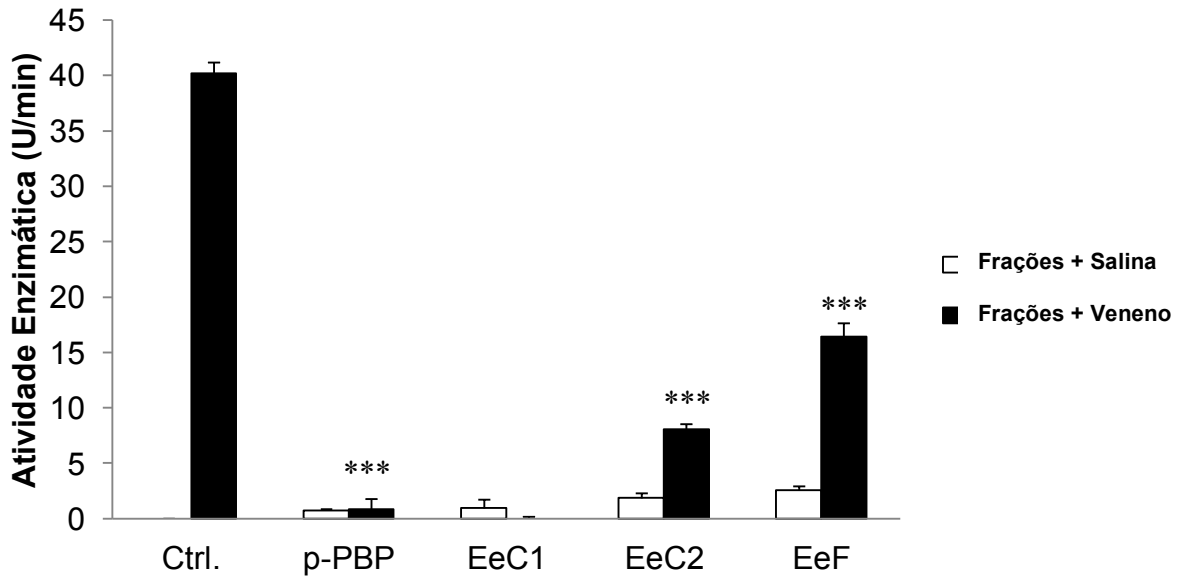


Figura 10: Ensaio de Neutralização da Atividade PLA₂ do veneno *B. atrox* pela fração GSS de *A. muricata*. Concentrações variadas da fração GSS foram incubadas com 1,25µg de veneno bruto, depois a inibição da taxa de reação sobre o substrato foi quantificada.

Os extratos etanólicos também foram testados quanto à capacidade de neutralização da atividade PLA₂. Quinhentos microgramas do extrato foliar e dos suplementos alimentares de *A. muricata* foram incubados com 1,25µg de veneno de *B. atrox*, em seguida a capacidade de neutralização da hidrólise do substrato fosfatidilcolina foi quantificada. Na figura 11 podemos observar que todos os extratos (EeC1, EeC2 e EeF) foram capazes de neutralizar eficientemente a atividade PLA₂, sendo que EeC1 inibiu completamente a atividade.



Fig

Figura 11: Inibição da atividade PLA₂ pelos extratos etanólicos de *A. muricata in vitro*. Cento e sessenta microgramas de cada extrato etanólico foram incubados com 1,25µg de veneno bruto por 30min a 37°C, em seguida a inibição da hidrólise do substrato fosfatidilcolina foi avaliada. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. *** P<0,0001.

4.2.8. Caracterização biológica da fração purificada do sumo do fruto de *A. muricata* frente à toxinas isoladas do veneno de *B. atrox*

Através do método de purificação do sumo de frutos de *A. muricata* realizado por Nunes (2011), obteve-se a fração semipurificada F100%B que em seguida foi submetida a uma CLAE. O cromatograma apresentou dois picos que foram identificados como CR1 e CR2 (dados não mostrados). Os picos foram coletados e encaminhados para serem analisados por técnicas de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas. Os resultados obtidos por Nunes (2011) demonstraram que não foi possível identificar a amostra CR2, mais tarde foi constatado que o sinal característico da amostra CR2 foi produzido por um artefato (dados não mostrados). Já as análises da amostra CR1 mostraram que esta era constituída pela molécula di-heptil-ftalato (Figura 12), um contaminante presente em solventes, que mais tarde foi nomeada como G1. Para a caracterização biológica de G1, a amostra foi diluída em solução constituída por salina 0,9% suplementada com 8% de DMSO. Após a diluição a amostra foi estocada em a -20°C.

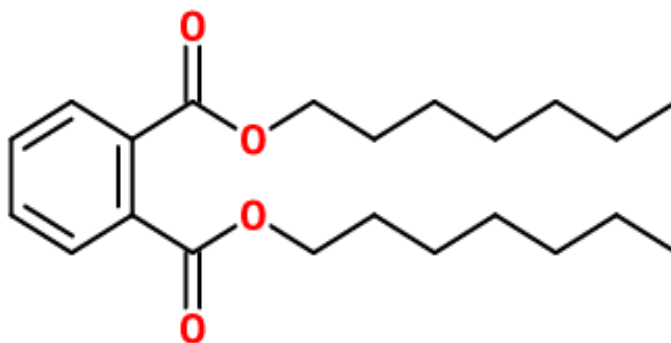


Figura 12: Amostra G1 (di-heptil-ftalato). Molécula obtida a partir da purificação do sumo de frutos de *A. muricata*.

4.2.9. Efeito da fração G1 sobre a atividade edematogênica da PLA₂ P4

A fração G1 foi testada quanto à capacidade de neutralização da atividade edematogênica promovida pela PLA₂. Utilizou-se uma amostra de PLA₂ P4 com alta atividade catalítica purificada por Frauches (2005). A amostra foi isolada conforme método descrito por Kanashiro *et al.* (2002). Primeiramente foi realizada uma cinética para ajustar a dose de PLA₂ que foi utilizada no ensaio. Sendo assim, doses diversas de PLA₂ P4 foram incubadas durante 30min. a 37°C e depois inoculadas na região subplantar das patas traseiras esquerda de camundongos. Os animais foram observados por 24 horas e em tempos predeterminados, a espessura das patas foi medida com um paquímetro digital e comparada com a espessura das patas controles, que receberam solução salina somente. Após 30min de análise, foi observado edema pronunciado nos animais que receberam as maiores as doses (3 e 5µg), nesses animais o distúrbio foi detectado até 12 horas e encontrava-se totalmente reduzido após 24 horas após o início do ensaio (dados não mostrados). A partir desses dados, empregamos uma dose intermediária de 4µg de PLA₂ P4 por animal nos ensaios de inibição.

No ensaio de neutralização, quantidades variadas de G1 foram pré-incubados com 4µg de PLA₂ P4 por 30min. a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram injetadas na região subplantar da pata traseira esquerda de camundongos Suíços albinos (n=6). Como controle, as doses de G1, na ausência de PLA₂ foram inoculadas na pata traseira direita. O grupo controle recebeu na pata esquerda PLA₂ P4 somente, enquanto que na pata direita foi inoculada com solução salina 0,9%

com 8% de DMSO (solução utilizada para a diluição de G1). A análise da neutralização do edema foi obtida pela diferença de espessura entre a pata tratada e a pata oposta que recebeu a fração somente. O edema foi expresso em porcentagem. Com isso, podemos observar na figura 13 que a fração G1 não inibe o edema nos tempos iniciais, porém, a partir de 4 horas de análise, a fração G1 foi capaz de reduzir significativamente ($P=0,012$ para $1\mu\text{g}$ e $P<0,0001$ para $4\mu\text{g}$ de G1) o edema causado pela PLA₂ P4 e de forma dose-dependente (figura 13B e C). Além disso, com os dados obtidos foi possível calcular uma IC₅₀ de $1,87\mu\text{g}$ de G1.

A fração GSS, de onde a fração G1 foi isolada, também foi testada quanto à capacidade de redução de edema. O ensaio foi repetido sob mesmas condições, porém com grupos reduzidos ($n=2$), assim doses variadas de GSS foram pré-incubadas com PLA₂. Após o período de incubação, as amostras foram injetadas nas patas dos camundongos. Na figura 14 podemos constatar que nenhuma dose de GSS testada reduziu o edema provocado pela PLA₂ P4.

Paralelamente, testou-se a fração GSS na redução de edema induzido pelo veneno bruto *B. atrox*. Assim as mesmas doses empregadas no ensaio anterior de GSS foram pré-incubadas com veneno, e novamente o ensaio foi conduzido sob mesmas condições e com quatro animais por grupo. Após as 24 horas de análise, surpreendentemente constatou-se que os grupos tratados com as doses mais altas GSS tiveram aumento significativo ($P=0,0089$ para $100\mu\text{g}$ e $P=0,163$ para $500\mu\text{g}$ de GSS) do edema provocado pelo veneno de *B. atrox* (Figura 15B e C).

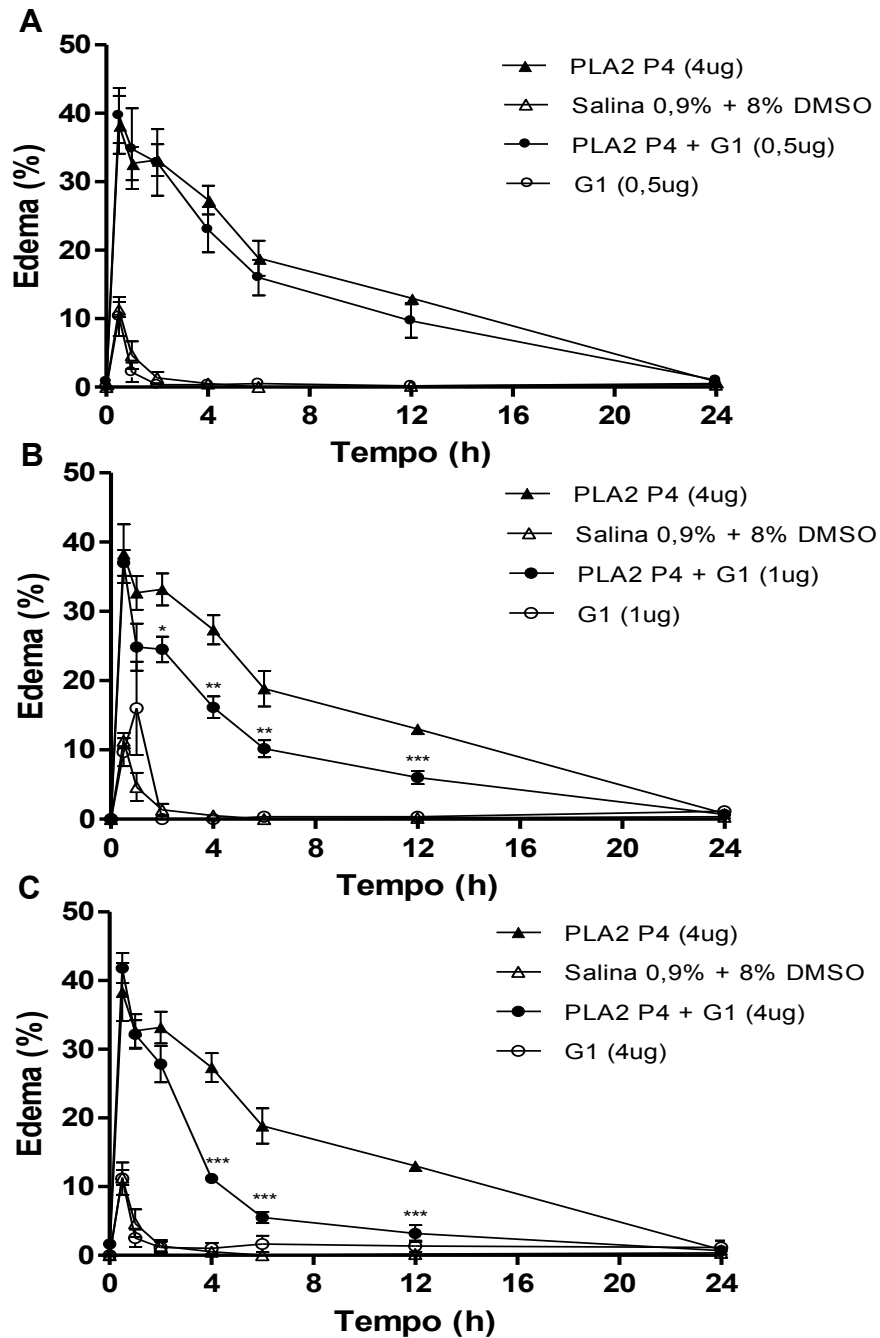


Figura 13: Inibição da atividade edematogênica da PLA₂ P4 pela fração purificada G1. Camundongos Suíços Albinos (n=6) receberam 0,5, 1 e 4µg da fração de G1 previamente incubada com 4µg de PLA₂ P4, por 30min a 37°C. Em tempos de predeterminados, a espessura das patas traseiras dos animais era medida. O edema foi obtido subtraindo-se das patas tratadas, a espessura das utilizadas como controle. Nas patas controle, o edema foi analisado subtraindo-se das patas a espessura do tempo inicial, antes da injeção das soluções. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. * P<0,05, ** P<0,001 e *** P<0,0001.

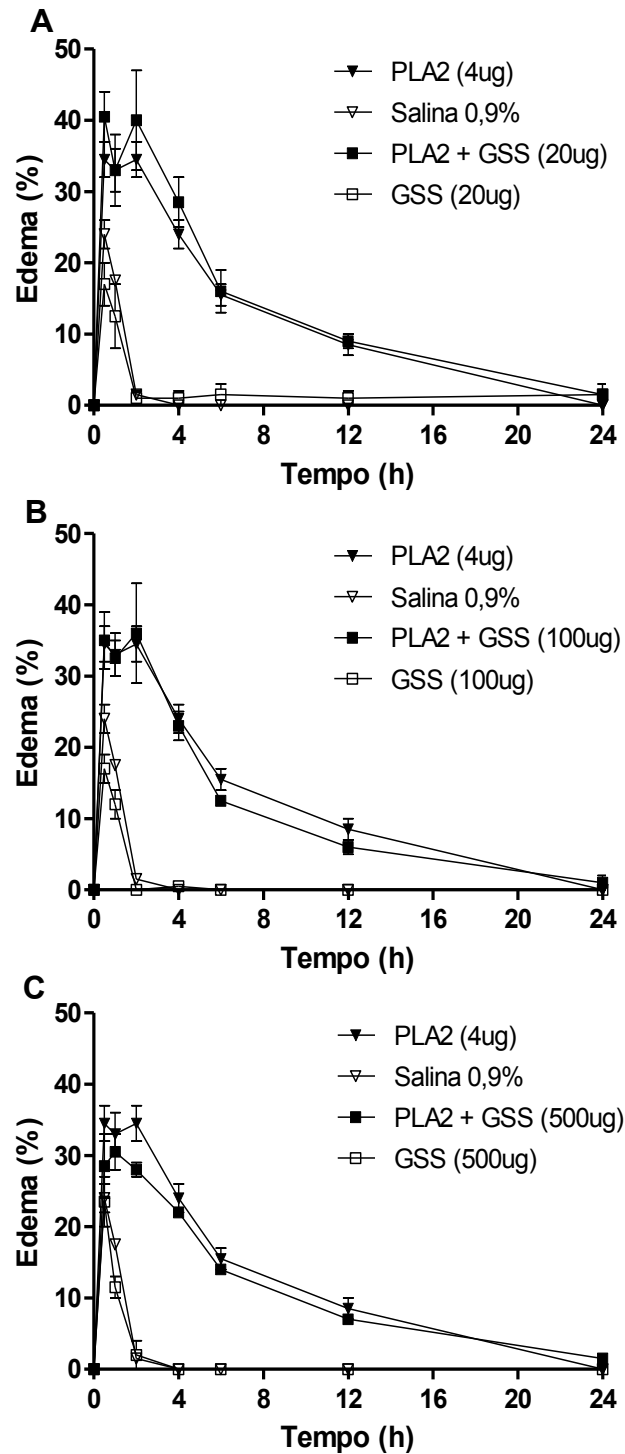


Figura 14: Inibição da atividade edematogênica da PLA₂ P4 pela fração GSS. Camundongos Suíços Albinos (n=2) receberam 20, 100 e 500µg da fração de GSS previamente incubada com 4µg de PLA₂ P4, por 30min a 37°C. Em tempos de predeterminados, a espessura das patas traseiras dos animais era medida. O edema foi obtido subtraindo-se das patas tratadas, a espessura das mesmas utilizadas como controle. Nas patas controle, o edema foi analisado subtraindo-se das patas a espessura do tempo inicial, antes da injeção das soluções.

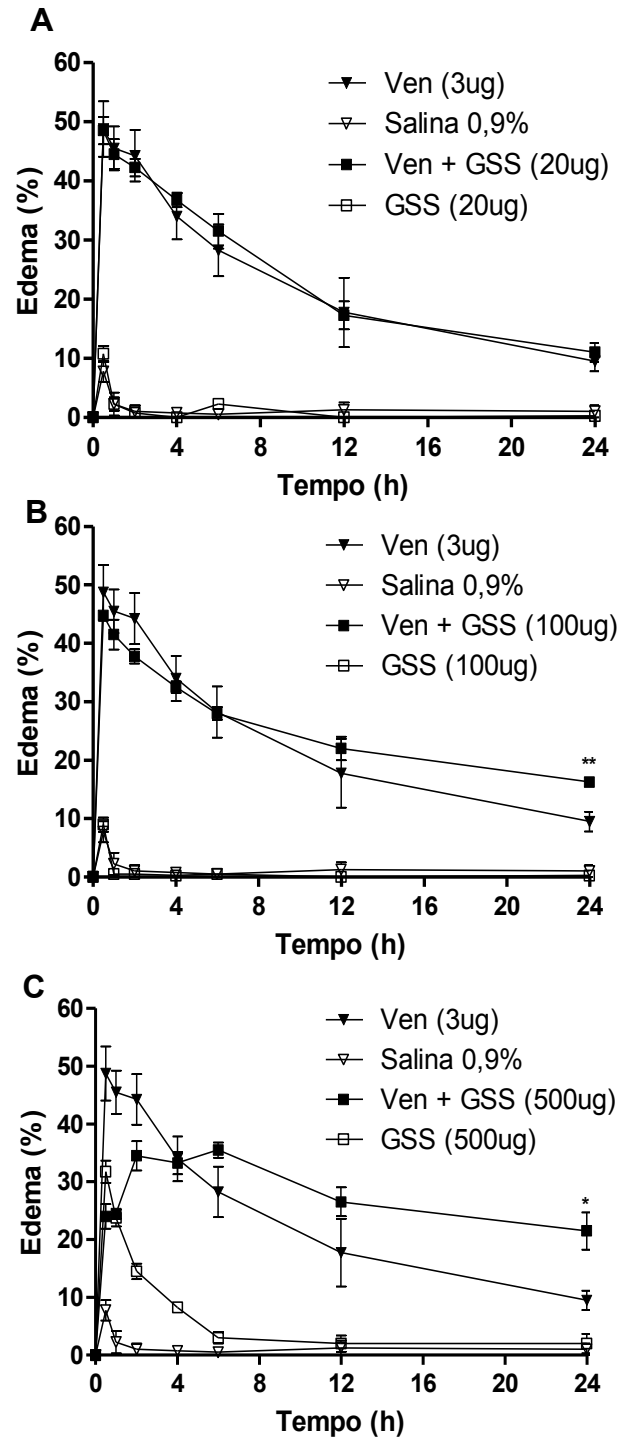


Figura 15: Inibição da atividade edematogênica do veneno de *B. atrox* pela fração GSS. Camundongos Suíços Albinos (n=4) receberam 20, 100 e 500µg da fração de GSS incubada com 3µg de veneno de *B. atrox*, por 30min a 37°C. Em tempos de determinados, a espessura das patas traseiras dos animais foi medida. O edema foi obtido subtraindo-se das patas tratadas, a espessura das utilizadas como controle. Nas patas controle, o edema foi analisado subtraindo-se das patas a espessura do tempo inicial, antes da injeção das soluções. P<0,05 foi considerado indicativo de significância. * P<0,05 e ** P<0,001.

4.2.10. Neutralização da Atividade Fosfolipásica pela amostra G1 *in vitro*

A capacidade de neutralização da atividade PLA₂ pela fração G1 foi avaliada conforme ensaios preliminares. Para ajustar a EC₅₀ de PLA₂ a ser utilizada, diluições seriadas da enzima purificada do veneno de *B. atrox* foram realizadas. No experimento 0,005, 0,015, 0,046, 0,139, 0,417 e 1,25µg de PLA₂ P4 foram incubados com substrato fosfatidilcolina e logo a seguir a atividade das soluções foi medida. Na figura 16 podemos observar que todas as doses testadas apresentaram atividade, sendo que atividade máxima foi alcançada com 0,417µg de enzima. A partir dos dados obtidos conseguimos calcular uma EC₅₀ de 80ng/poço de enzima, a uma concentração final de 0,4µg/mL.

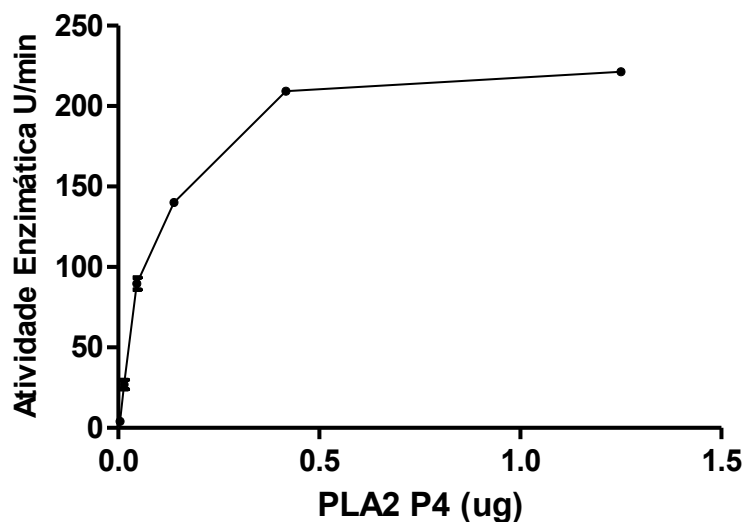


Figura 16: Análise da atividade fosfolipásica da PLA₂ P4 purificada do veneno de *B. atrox*. Cinética da atividade enzimática da PLA₂ P4 sobre o substrato fosfatidilcolina. As doses 0,005, 0,015, 0,046, 0,139, 0,417 e 1,25µg de PLA₂ P4 foram diluídas em tampão de amostra e incubadas a 37°C por 30min. Em seguida, tampão de reação com substrato foi adicionado e a taxa de reação foi medida em espectrofotômetro de placas com comprimento de onda 620nm.

A seguir, investigamos o efeito de diferentes concentrações do inibidor ρ -BPB sobre a atividade catalítica da PLA₂ P4. Diluições seriadas do inibidor foram realizadas e pré-incubadas com 0,4 μ g/mL de PLA₂ P4 por 30min. a 37°C. Em seguida, a atividade das amostras sobre o substrato foi avaliada. A figura 17 mostra que a PLA₂ P4, de alta atividade catalítica, foi fortemente reduzida pelo tratamento com ρ -BPB. A dose mínima necessária para inibir a atividade enzimática foi 0,16 μ g de inibidor, sendo que a partir da dose de 4,4 μ g houve redução drástica da atividade da enzima. Com esses dados conseguimos calcular uma IC₅₀ de 0,8 μ g de ρ -BPB (R^2 0,9790) numa concentração final de 4 μ g/mL. Para o ensaio de neutralização com a fração G1, adotamos uma concentração 1,8M de ρ -BPB como inibidor padrão.

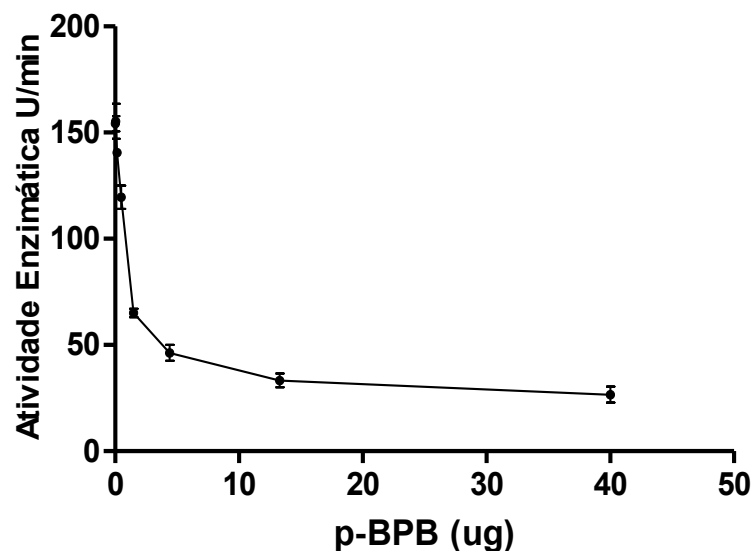


Figura 17: Efeito de diferentes doses de ρ -BPB na atividade fosfolipásica da PLA₂ P4. Oitenta nanogramas de PLA₂ P4 foram pré-incubadas com 0,054, 0,160, 0,490, 1,48, 4,40, 13,3 e 40,0 μ g de ρ -BPB por 30min. a 37°C. Em seguida, a atividade das amostras sobre o substrato fosfatidilcolina foi analisada em espectrofotômetro de placas com comprimento de onda 620nm.

Com todos os parâmetros ajustados, prosseguimos com o ensaio de neutralização da atividade fosfolipásica com a fração G1. Sendo assim, diferentes concentrações da fração G1 foram pré-incubadas com 80ng de PLA₂ P4 por 30min. a 37°C. Após o período de incubação, tampão contendo 5mM de fosfatidilcolina foi adicionado às amostras e a reação foi monitorada. Na figura 18 podemos constatar que nenhuma das concentrações de G1 testadas foi capaz de inibir a atividade catalítica da PLA₂ P4.

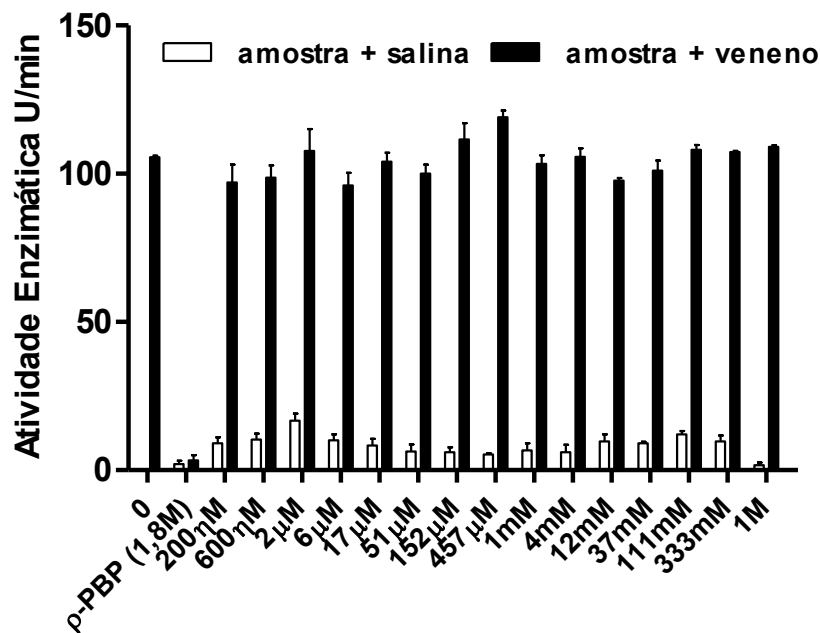


Figura 18: Efeito da fração G1 sobre a atividade fosfolipásica da PLA₂ P4. Oitenta nanogramas de PLA₂ P4 foram incubados com diferentes concentrações da fração purificada G1 por 30min. a 37°C. Em seguida, 180µL de tampão de reação com 5mM de fosfatidilcolina foi adicionado às amostras. A reação foi monitorada por 5min. sendo a D.O. medida a cada minuto em espectrofotômetro de placas sob comprimento de onda de 620nm.

4.2.11. Ensaios de neutralização de citotoxicidade *in vitro*

Ensaios de citotoxicidade foram realizados com o intuito de avaliar se a fração G1 poderia ser eficaz na redução da mitotoxicidade provocada pela PLA₂ P4. Assim, diferentes concentrações de G1 foram pré-incubadas com PLA₂ P4, diluídas em meio de cultura e adicionadas às culturas diferenciadas de células musculares murinas C2C12. Após 3h de incubação, a citotoxicidade foi analisada indiretamente através dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes das culturas.

Primeiramente, a concentração de PLA₂ P4 utilizada no ensaio de neutralização foi obtida acrescentando concentrações variadas de PLA₂ P4 aos sobrenadantes das culturas diferenciadas de C2C12. Na figura 19A constatamos que, de forma dose dependente, todas as concentrações de PLA₂ testadas foram tóxicas à cultura, em todas as amostras havia atividade da enzima LDH. No ensaio de neutralização empregamos uma concentração de 20µg/mL de PLA₂ (3µg/poço). A toxicidade da fração G1 bem como o inibidor p-BPB também foram analisadas, para isso, as amostras foram diluídas em meio e adicionados à cultura. Das concentrações avaliadas, observamos que 100µM de p-BPB foram tóxicos para a cultura (Figura 19B). Na mesma figura ainda pode-se notar que a maior concentração de G1 empregada no experimento não foi tóxica para as células C2C12.

Assim, diversas concentrações da fração G1 foram pré-incubadas com 20µg/mL de PLA₂ P4. Em seguida adicionados aos poços das culturas de células C2C12. Após o período de incubação, o sobrenadante das culturas foi coletado e os níveis de LDH dosados. Na figura 19C podemos notar que a fração G1 não foi eficaz em reduzir os níveis de LDH das culturas. Além disso, dez micromolares de p-BPB aboliram completamente a toxicidade provocada pela PLA₂ P4.

A fração GSS, da qual se isolou G1, também foi testada quanto à capacidade de neutralização da citotoxicidade promovida pelo veneno bruto e *B. atrox*. Na figura 20B podemos ver que GSS não foi tóxica as células em nenhuma das concentrações testadas. Além disso, das concentrações de veneno testadas nas culturas, escolhemos a de 50µg/mL (Figura 20A). Porém ao se pré-incubar GSS com veneno, não se obteve qualquer redução significativa da liberação da enzima LDH (Figura 20C).

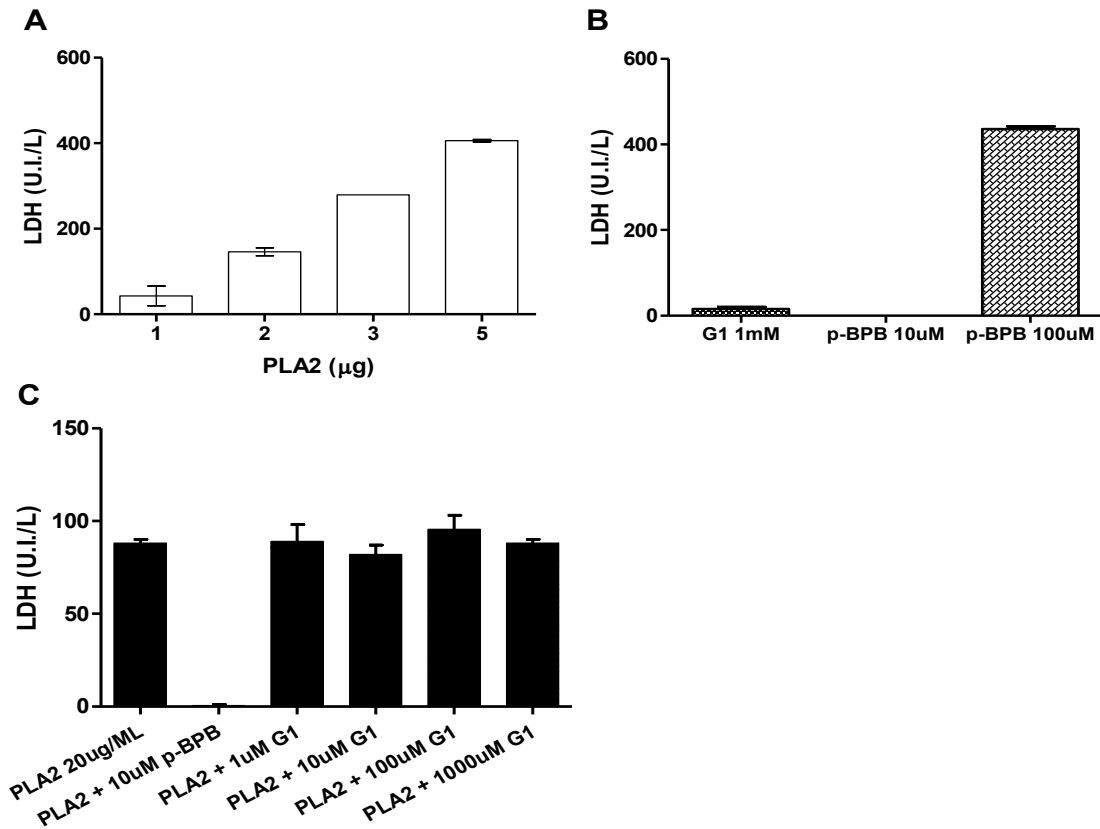


Figura 19: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células C2C12. A) Curva dose resposta da PLA₂ P4: 1, 2, 3 e 5µg de PLA₂ foram adicionados aos poços das culturas. B) G1 e p-BPB: um milimolar de G1 bem 10 e 100µM de p-BPB. C) Ensaio de neutralização da miotoxicidade: 1, 10, 100 e 1000µM de G1 foram pré-incubados com 20µg/mL de PLA₂ P4. Amostras foram diluídas em meio de cultura DMEM – High Glucose + 1% SFB e adicionadas às culturas de células C2C12 diferenciadas. Após 3 horas, os sobrenadantes foram coletados e a atividade da enzima LDH foi dosada.

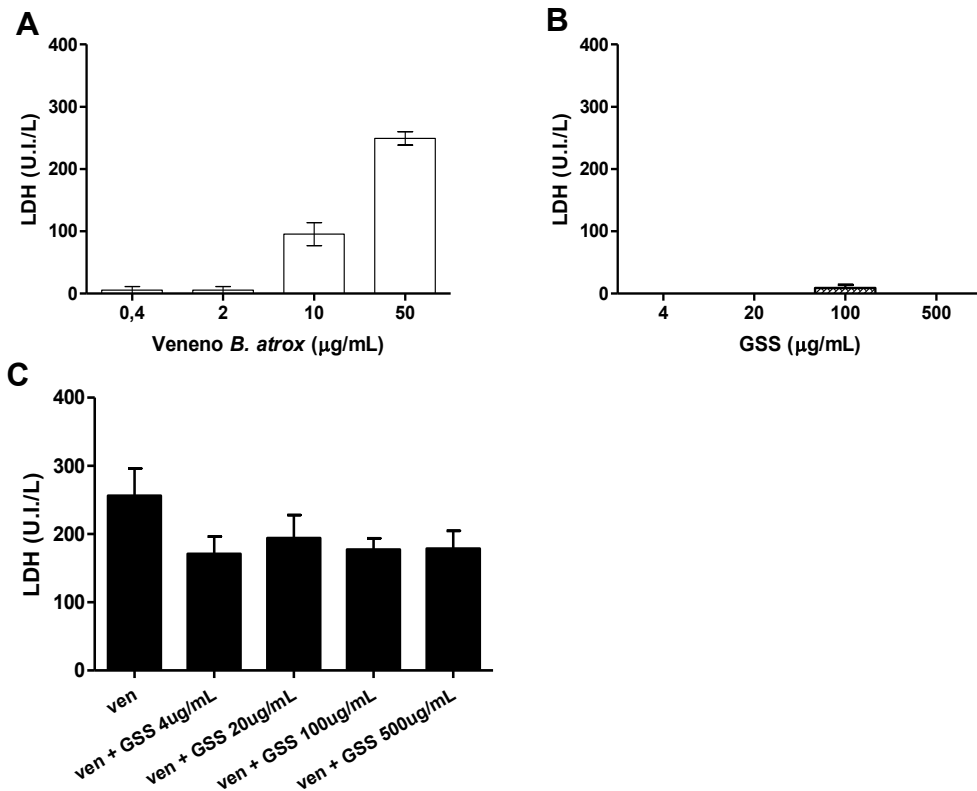


Figura 20: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células C2C12. A) Curva dose resposta da veneno bruto: 0,4, 2, 10 e 50µg/mL de veneno de *B. atrox*. B) Curva dose resposta GSS: 4, 20, 100 e 500µg/mL de GSS. C) Ensaio de neutralização da miotoxicidade: 4, 20, 100 e 500µg/mL de GSS foram pré-incubados com 50µg/mL de veneno. Amostras foram diluídas em meio de cultura DMEM – High Glucose + 1% SFB e adicionadas às culturas de células C2C12 diferenciadas. Após 3 horas, os sobrenadantes foram coletados e a atividade da enzima LDH foi dosada.

Ensaio de citotoxicidade também foram realizados com culturas de macrófagos RAW 264.7. A fim de identificar o mecanismo de inibição de G1, macrófagos foram incubados com LPS na presença ou não de concentrações variadas de G1 (0,0032, 0,016, 0,08, 0,4 e 2mM), após 24 horas de incubação os sobrenadantes das culturas foram coletados para análise tanto de liberação de LDH como por MTT. Na figura 21 podemos observar que nenhuma concentração testada de G1 foi capaz de inibir a toxicidade provocada pelo LPS, além disso, foi constatado que 16µM G1 quando incubados com LPS foram capazes de aumentar significativamente a citotoxicidade promovida pelo LPS em ambas as análises, LDH ($P=0,0104$) e MTT ($P=0,0329$).

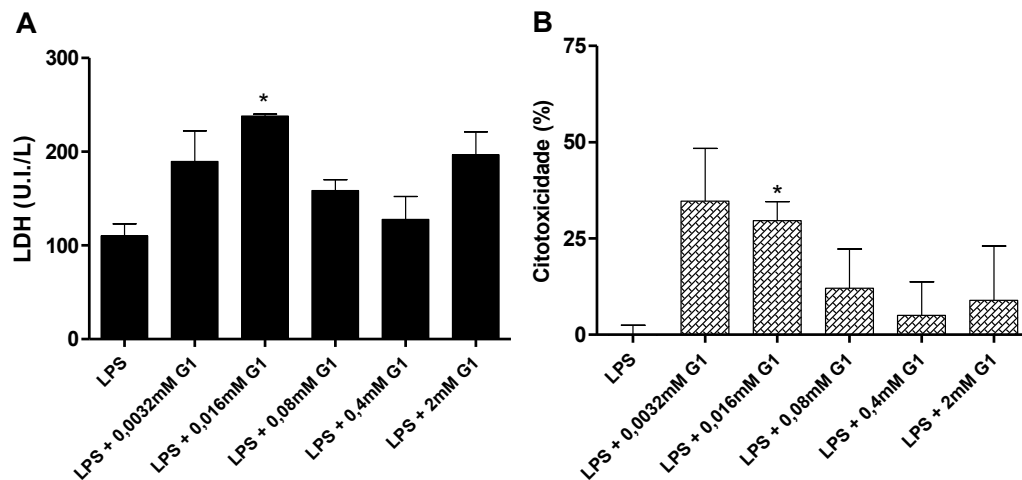


Figura 21: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células RAW 264.7. Macrófagos peritoneais (5×10^5 células/mL) foram cultivados na presença de $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS pré-incubados ou não com concentrações variadas de G1 (0,0032, 0,016, 0,08, 0,4 e 2mM) por 24h. Em seguida o sobrenadante das culturas foi coletado e utilizado para a realização dos ensaios de citotoxicidade. **A)** Ensaio de citotoxicidade avaliado pela dosagem de LDH. **B)** Ensaio de citotoxicidade avaliado por MTT. * Valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância por Teste *t-student* não pareado.

4.2.12. Ensaio de Neutralização da produção de óxido nítrico (NO) em Culturas RAW 264.7

Com o objetivo de elucidar o efeito anti-inflamatório de G1, a capacidade de inibição da via do NO também foi avaliada. Assim, concentrações variadas de G1 (0,0032, 0,016, 0,08, 0,4 e 2mM) foram diluídas em meio contendo $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS e adicionadas às culturas de macrófagos murinos. Após 24 horas em incubação, os níveis NO nos sobrenadantes das culturas foram dosados. Podemos observar na figura 22 que as menores concentrações 3,2 ($P=0,0017$) e $16 \mu\text{M}$ ($P=0,0253$) de G1 foram capazes de promover uma ligeira redução nos níveis de NO quando comparadas com os níveis da amostra controle, incubada na presença de LPS somente. Como esperado, o inibidor LNMMA, utilizado como referência, foi eficiente na redução dos níveis de NO ($P < 0,0001$).

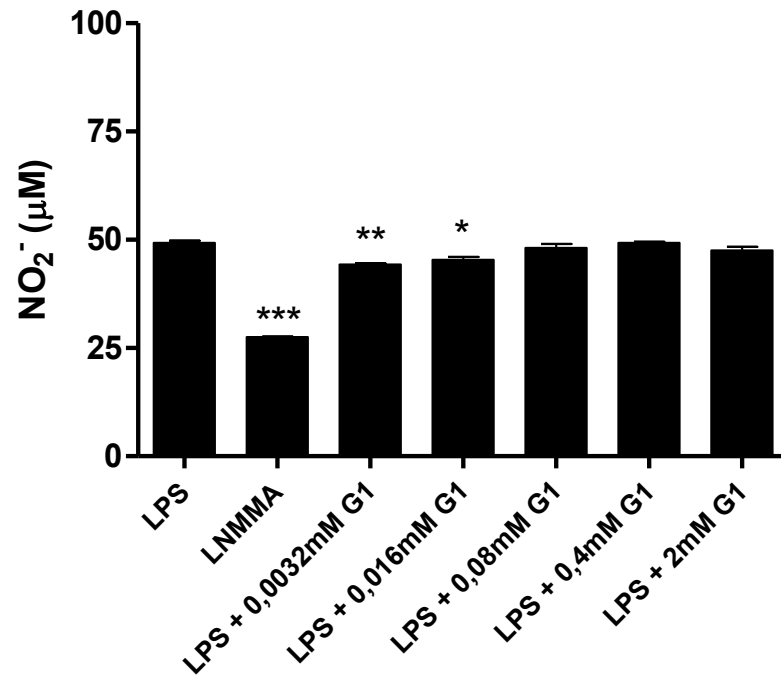


Figura 22: Ensaio de liberação de NO em culturas RAW 264.7. Macrófagos peritoneais (5×10^5 células/mL) foram cultivados na presença de $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS pré-incubados ou não com concentrações variadas de G1 (0,0032, 0,016, 0,08, 0,4 e 2mM) por 24h. Em seguida, os níveis de NO foram dosados no sobrenadante das culturas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância por Teste *t-student* não pareado, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$.

4.2.13. Análises de Docking

A atividade miotóxica promovida pelas PLA₂ de veneno de serpente independe da atividade catalítica da enzima, uma vez que a isoforma PLA₂ K49 apresenta atividade catalítica drasticamente reduzida e ainda assim, é potente indutora de miotoxicidade. Então, para estudar os possíveis mecanismos de interação da molécula G1 com a PLA₂ K49 de *B. atrox*, o modelo da estrutura tridimensional foi construído (figura 23A). A PLA₂ K49 de *B. atrox* não possui estrutura cristalizada depositada em banco de dados. Por isso, a partir da sequência de aminoácidos da PLA₂ K49 de *B. atrox*, foi construído um modelo de tridimensional (figura 23B) baseado na estrutura cristalina da molécula de PLA₂ de referência. A estrutura de referência de maior similaridade encontrada no banco de dados foi a PLA₂ K49 de *B. moojeni* com 91% de similaridade, depositada com código de entrada 1XXS (figura 24).

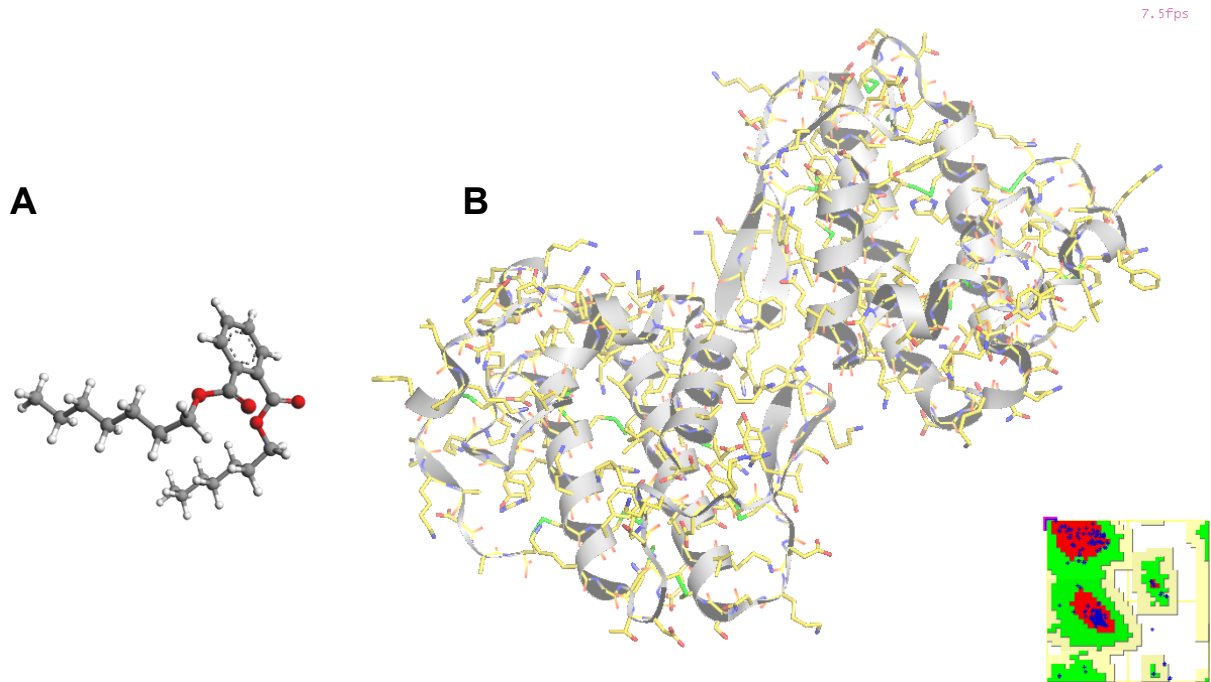


Figura 23: Modelos tridimensionais para o estudo da interação G1/PLA₂: A) Modelo do ligante G1. B) Modelo do dímero de PLA₂ K49 de *B. atrox*. Cadeias A e B em evidência. Caixa da direita representa o Gráfico de Ramachandran evidenciando o posicionamento dos aminoácidos dentro do modelo.

```

          10      20      30      40      50      60
B.moojeni_A  1  .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
B.atrox_A    1  ~~~~~~SLFELGKMILQETGKNPAKSYGVYGCNCGVGGRGKPKDATDRCC 44
          70      80      90     100     110     120
B.moojeni_A 45  YVHKCCYKKL TGC DPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENLDTYN 104
B.atrox_A   61  YVHKCCYK KMTDC DPKKDRYSYSWKDKTIVCGEKN SCLKELCECDKAVAICLRENLDTYN 120

          130
B.moojeni_A 105 .....*.....|.....*.....
B.atrox_A   121 .....*.....|.....*.....

```

Figura 24: Alinhamento entre as sequências das cadeias A de PLA₂ K49 de *B. moojeni* e *B. atrox*. Alinhamento realizado por meio da ferramenta de alinhamento de sequências proteicas do BLAST-NCBI. A similaridade entre as sequências é de 91%, aminoácidos em cinza representam as diferenças entre as sequências.

A sobreposição entre as estruturas do modelo de PLA₂ K49 e a de referência mostra que o desvio máximo dos resíduos laterais dos aminoácidos foi de aproximadamente 1.2 angstroms para a cadeia principal A e 1.1 angstrom para a cadeia principal B em relação aos resíduos das cadeias de referência (figura 25).

Nas análises de *Docking*, utilizamos a cadeia A do dímero de PLA₂ (figura 26A e B). O mapa do *grid* foi construído com o objetivo de envolver toda a enzima, como pode ser observados na figura 25, dessa forma, o ligante teve total liberdade para explorar todos os domínios possíveis do nosso modelo.

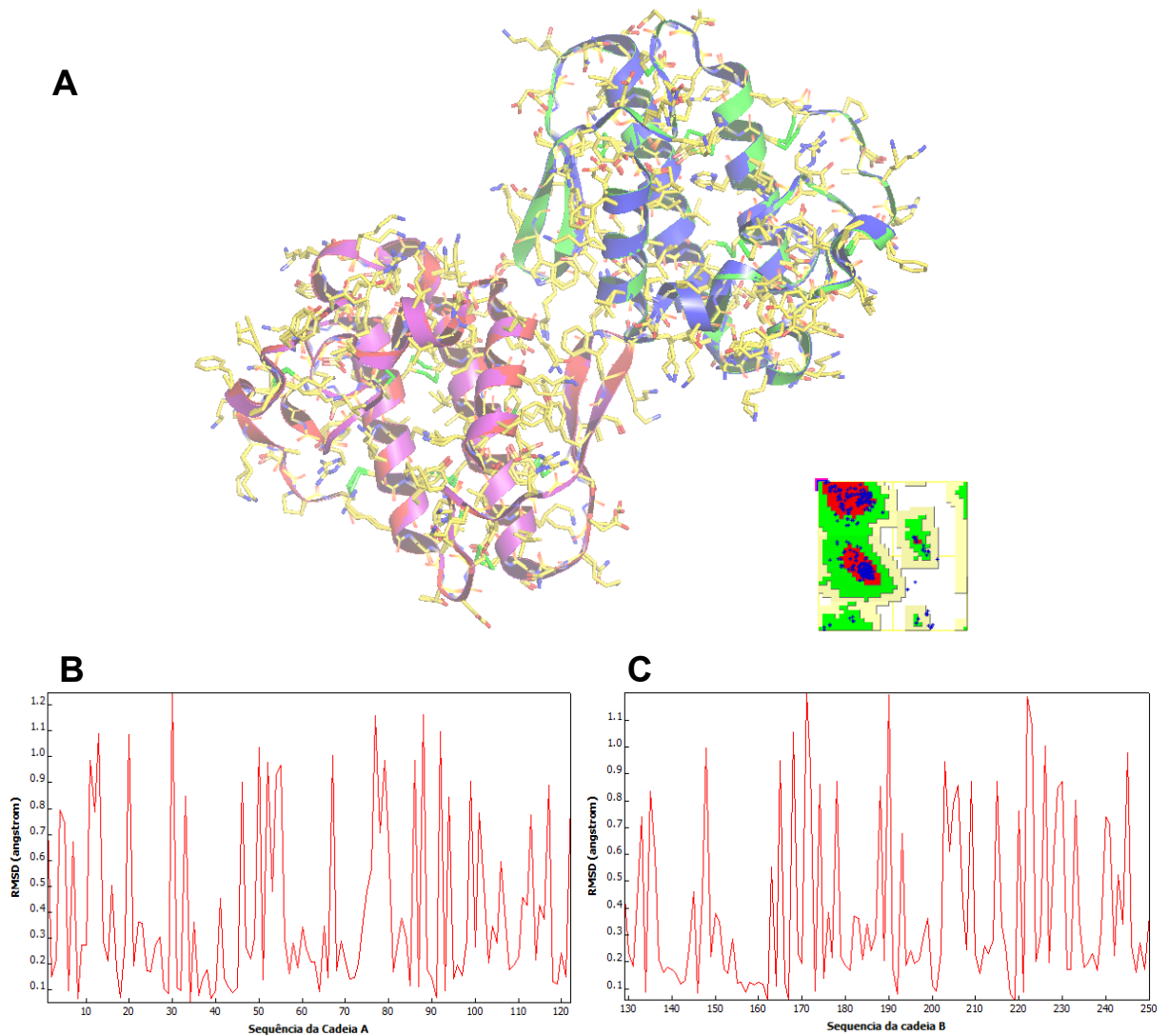


Figura 25: Comparação das estruturas diméricas tridimensionais dos modelos de PLA₂. **A)** Sobreposição das estruturas dos modelos PLA₂ K49 de *B. atrox* e PLA₂ K49 de *B. atrox*: cadeias principais em verde e vermelho representam as cadeias A e B da PLA₂ K49 de *B. atrox*, respectivamente; cadeias principais em azul e púrpura representam, respectivamente, as cadeias A e B da PLA₂ K49 de *B. moojeni*. Caixa da direita representa o posicionamento dos aminoácidos de ambos os modelos dentro do Gráfico de Ramachandran. **B e C)** RMSD dos resíduos laterais dos aminoácidos das cadeias principais A e B da PLA₂ K49 de *B. atrox* em relação à PLA₂ K49 de *B. moojeni*, desvio expresso em angstroms.

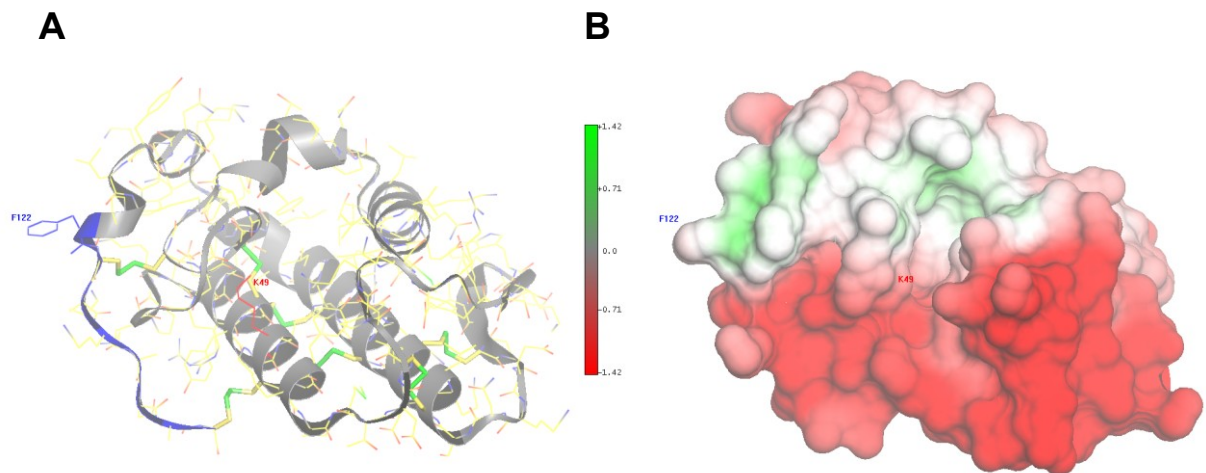


Figura 26: Monômeros da cadeia A de PLA₂ K49 de *B. atrox*. **A)** Cadeia principal e seus resíduos laterais do modelo PLA₂ K49, aminoácido assinalado em vermelho representa o aminoácido característico lisina da posição 48, porção da molécula em azul representa a porção C-terminal da molécula evidenciando o aminoácido fenilalanina na posição 122. **B)** Superfície hidrofóbica do modelo PLA₂ K49, regiões em verde e branco demonstram a intensidade da força hidrofóbica.

As simulações geraram 50 possíveis posições de interação. Essas interações foram agrupadas de acordo com o domínio onde elas interagem. Assim, foi observado que a maioria das possibilidades de interação se concentrou no sítio catalítico da enzima (Figura 28A e B), do total de posições geradas nas simulações, 45 se acomodaram no sítio catalítico, com constantes de inibição virtual (K_{iV}) variando de 8,06 a 235,98 μ M, além disso, duas posições foram excluídas por apresentarem K_{iV} superiores a 1mM. As três posições restantes se acomodaram na superfície da enzima com K_{iV} variando de 1,73 a 19,84mM. O posicionamento de menor K_i virtual foi de 8,06 μ M (Figura 28C). Outro fato observado foi que G1 não teve a capacidade de interagir com a porção C-terminal da PLA₂ K49, um domínio importante para a atividade farmacológica da enzima.

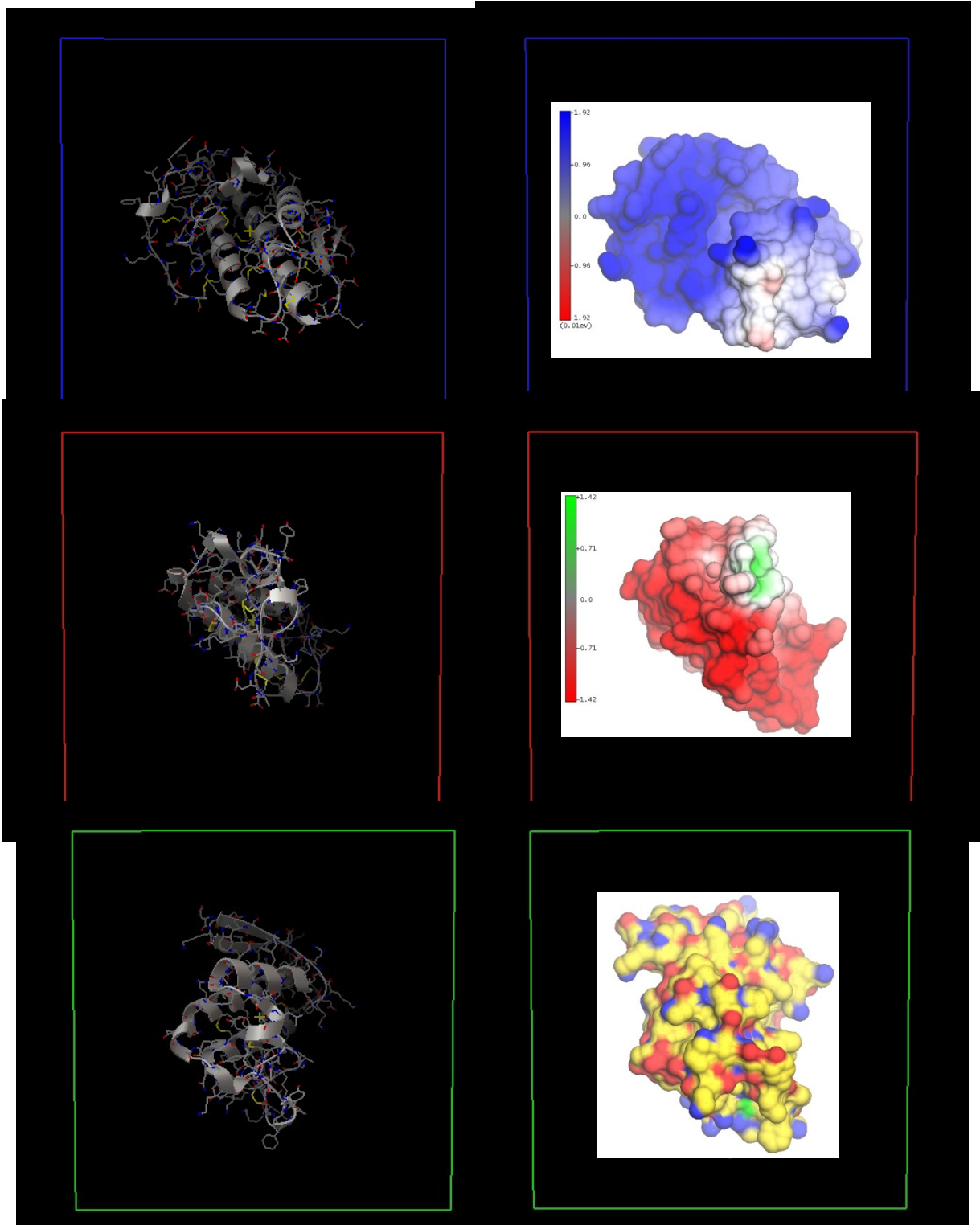


Figura 27: Mapa do *grid* para o modelo PLA₂ K49 de *B. atrox* . Os quadrados representam os limites determinados para o *docking* do ligante G1. **A e B)** Quadrado azul representa o eixo x. **C e D)** Quadrado vermelho representa o eixo y. **E e F)** Quadrado verde representa o eixo z. **B)** as cores azul, vermelho e branco representam superfícies positivas, negativas e neutras, respectivamente. **D)** as cores verde, branco e vermelho representam intensidades hidrofóbicas. **F)** as cores amarelo, vermelho, azul e verde representam os átomos hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, respectivamente.

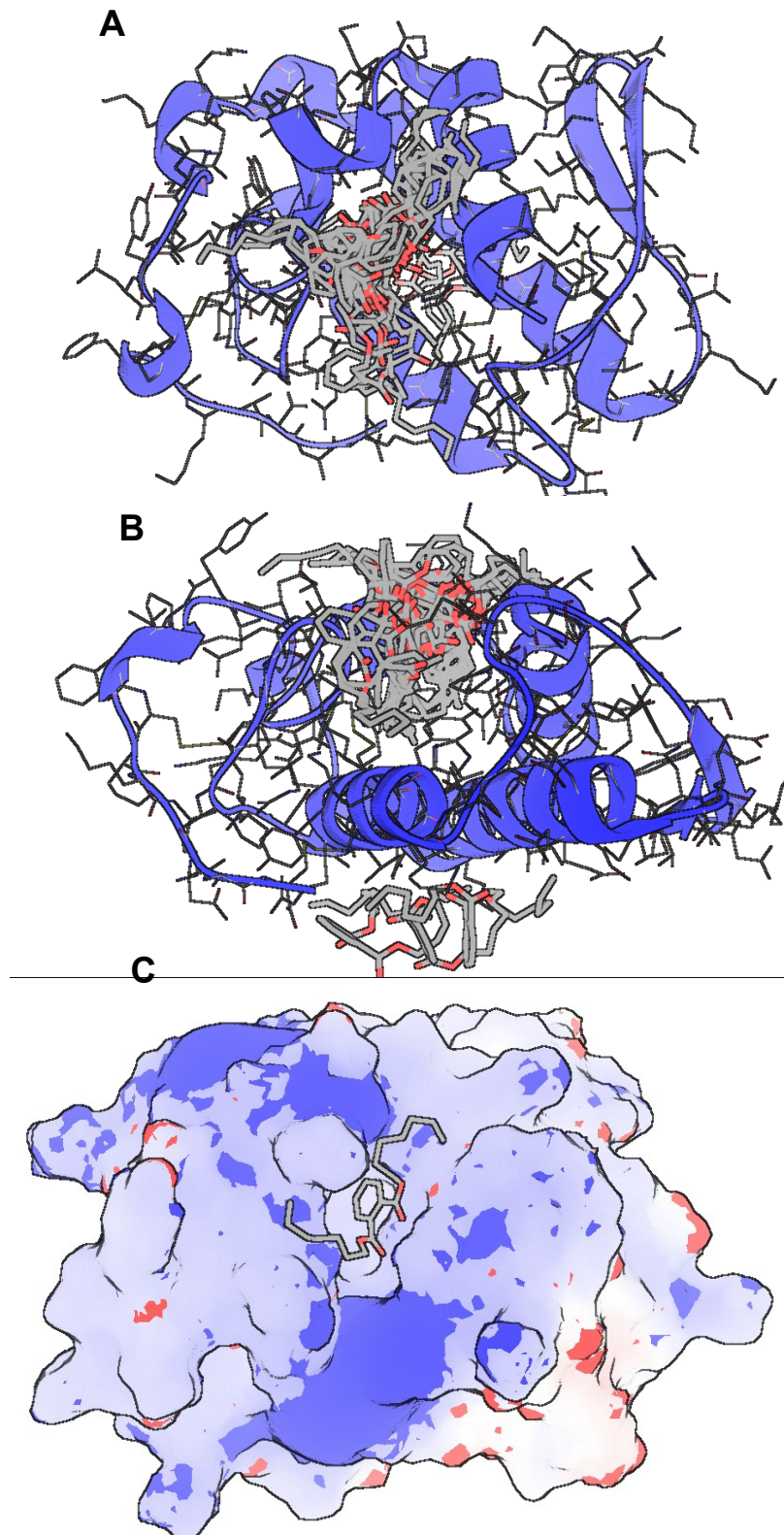


Figura 28: Posições de interação do ligante G1 com o modelo de PLA₂ K49 de *B. atrox*. **A e B)** Agrupamento de todas as posições de interação do ligante G1 com a PLA₂. **C)** Posição de G1 que apresentou menor K_i virtual, 8,06 μ M. Em C, regiões da superfície em azul e vermelho representam domínios com carga positiva e negativa, respectivamente. Regiões claras representam domínios hidrofóbicos.

5. Discussão

Acidentes ofídicos ocorrem frequentemente no Brasil, com uma incidência anual de 20.000 casos reportados, sendo que o acidente botrópico corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país, responsável por cerca de 90% dos envenenamentos (FUNASA, 2001). Na região amazônica, a espécie *Bothrops atrox* é responsável por 90% dos acidentes, que apresenta baixa letalidade, porém esses envenenamentos promovem uma variedade de manifestações patofisiológicas, que incluem danos locais graves nos tecidos, acompanhados de mionecrose, edema e hemorragia, que podem resultar em danos irreversíveis e em casos extremos, a amputação do membro acometido (OTERO *et al.*, 2002).

A gravidade dos acidentes ofídicos deve-se à complexidade dos venenos das serpentes, que contêm misturas complexas de centenas de moléculas farmacologicamente ativas, incluindo componentes orgânicos e minerais (histamina e outros alérgenos, poliaminas, alcalóides...), pequenos peptídeos e proteínas (FRY, 1999; MARKLAND, 1998). Os efeitos biológicos são complexos porque componentes diferentes possuem ações distintas e devem, sinergicamente, agir com outras moléculas do veneno (CALVETE *et al.*, 2005).

A administração de antivenenos, baseados em anticorpos heterólogos, permanece como único tratamento contra picadas de serpentes (BON, 1996). A soroterapia é comprovadamente eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos provocados pelos venenos, porém é ineficaz na redução dos efeitos locais (NISHIJIMA *et al.*, 2009). Somado a isso, administração de soros heterólogos em pacientes induz reações alérgicas que podem ser iniciais ou tardias, sendo as EARs (*early antivenom reactions*) o principal problema associado à soroterapia (OTERO-PATIÑO *et al.*, 1998). Outro agravante é que soros antibotrópicos poliespecíficos produzidos no Brasil não são eficientes na neutralização dos efeitos do veneno de algumas espécies de *Bothrops* da floresta amazônica, principalmente *B. atrox* (MUNIZ *et al.*, 2000). Por isso, a busca por tratamentos alternativos que possam diminuir os efeitos tóxicos locais provocados pelos venenos de serpente, se torna cada vez mais importante.

Avaliamos a neutralização da letalidade por anticorpos monoclonais contra os três principais componentes tóxicos (PLA₂, metaloproteinases e trombina-simile) do

veneno de *B. atrox* com o intuito de produzir antivenenos mais eficazes e que induzem efeitos adversos reduzidos.

A sobrevivência de camundongos tratados com a mistura de mAbs foi de 100%. Em contraste, o grupo de animais que foram injetados com veneno apresentou 80% de letalidade. Embora a concentração de proteínas injetada neste experimento seja alta, a preparação apresentava uma proporção de 55 a 63% de impurezas (FRAUCHES *et al.*, 2013). De acordo com seus dados, do total de proteínas que constituíam o preparado de mAbs, menos de 40% poderiam ser consideradas anticorpos propriamente ditos. Experimento similar foi realizado por da Silva *et al.* (2007) utilizando antivenenos polivalentes, foi demonstrada eficiência reduzida quando antivenenos eram administrados antes do desafio com veneno, comparada com a eficiência a antivenenos pré-incubados com veneno e inoculados via i.p. em camundongos. A nossa proposição é de que a administração de antivenenos via i.p. ou i.v. e o desafio realizado pela via s.c. sejam mais próximos do acidente ofídico naturalmente como ele ocorre. Resultados semelhantes foram observados em ensaios de letalidade em que veneno e mAbs foram pré-incubados e inoculando-os via i.p. em camundongos (FRAUCHES, 2007).

As alterações histológicas observadas nos tecidos e órgãos peritoneais provavelmente ocorreram devido ao contato direto entre mAbs e veneno injetados na cavidade. Pancreatite aguda também foi observada por Camargo *et al.* (2005) ao injetar por PLA₂ de veneno de *Bothrops* em ratos. Embora a letalidade por envenenamentos de serpentes do gênero *Bothrops* seja associada à falha aguda renal (MILANI JR. *et al.*, 1997), nenhuma alteração renal foi observada nas análises histológicas. Além do mais, muitos estudos analisaram alterações causadas por envenenamento botrópico por meio de injeções i.v. ou por perfusões renais *ex vivo* (BOER-LIMA *et al.*, 1999; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009), e isto pode explicar a falta de alterações nas amostras de rins neste estudo.

Neste trabalho, analisamos a capacidade de inibição dos efeitos tóxicos provocados pelo veneno de *B. atrox*, pelos extratos aquosos e uma substância isolada no processo de purificação do fruto de *A. muricata*. Os dados produzidos por este trabalho demonstram pela primeira vez, o potencial desses extratos e da substância isolada como antídotos naturais do veneno desta serpente.

Plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos capazes de ajudar diretamente no tratamento de acidentes ofídicos, ou

indiretamente, como suplemento à soroterapia (SOARES *et al.*, 2005). Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram o potencial de extratos etanólicos de folhas de *Annona muricata* na inibição de efeitos tóxicos provocado pelo veneno de *B. atrox* (COZENDEY, 2007). Os dados levantados por este trabalho nos encorajaram a averiguar se outras partes da planta poderiam apresentar os mesmos efeitos farmacológicos.

As metaloproteinases são as grandes responsáveis pela síndrome hemorrágica, uma das principais consequências graves do envenenamento por serpentes pertencentes à família Viperidae (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Nossos resultados mostraram que as frações aquosas GS, GSS, GSP, extraídas da polpa do fruto de *Annona muricata*, quando previamente incubadas com veneno de *B. atrox*, inibiram completamente a formação de lesões hemorrágicas. Estes dados confirmam que os extratos aquosos de *A. muricata* são extremamente eficientes na inibição da atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox in vivo*.

A inibição da atividade hemorrágica por extratos vegetais já foi observada por outros autores. Silva *et al.* (2005) estudando o efeito de *Pentaclethra macrobla* sobre o veneno de *B. atrox*, observaram o mesmo poder de inibição alcançado neste trabalho, posteriormente, eles conseguiram isolar o princípio ativo responsável pela inibição, uma saponina triterpenoide (SILVA *et al.*, 2007). A inibição de metaloproteinases do gênero *Bothrops* por terpenóides já tinha sido observada por Januário *et al.* (2004), ao conseguir isolar o neo-clerodane, um diterpenoide extraído de *Baccharis trimera*. Além dos terpenóides, outros inibidores de metaloproteinase já foram isolados de extratos vegetais, como ácido rosmarínico, extraído de *Argusia argentea* é extremamente eficaz em inibir metaloproteinases do veneno de *Trimeressurus flavoidis* (AUNG *et al.*, 2010).

Outra classe de moléculas que têm chamado muita atenção são os flavonoides. Essas moléculas estão relacionadas à inibição de inúmeros efeitos farmacológicos, essa versatilidade é devido a sua imensa afinidade por peptídeos, enzimas e seus substratos, e metais divalentes (MORS *et al.*, 2000). Dentre os flavonoides, a quercetina está presente na maioria das plantas utilizadas pela medicina popular no tratamento de acidentes ofídicos. De fato, a quercetina é responsável pela inibição da atividade hemorrágica provocada pelo veneno de *B. jararaca* (NISHIJIMA *et al.*, 2009).

Paralelamente ao nosso trabalho, Nunes (2011) constatou a presença de flavonoides na fração FAcet (derivada da fração GSS), principalmente quercetina. Isto pode explicar a inibição da hemorragia observada em nosso trabalho. Com base em experimentos realizados neste trabalho, podemos hipotetizar que o mecanismo de inibição apresentado por essa molécula seja a formação de complexos com a metaloproteinase do veneno, já que os extratos aquosos, quando previamente incubados com veneno de *B. atrox*, são incapazes de inibir a proteólise sobre a caseína *in vitro*. Este fenômeno já foi observado por nosso grupo, ao trabalharmos com anticorpos monoclonais antimetaloproteinase, vimos que os mesmos inibiam a atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox in vivo*, porém, não inibiam atividade catalítica *in vitro* (FRAUCHES, 2007; FRAUCHES *et al.*, 2013; PETRETSKI; KANASHIRO, M. M.; *et al.*, 2000). Esses achados reforçam que a quercetina e outros flavonoides, presente nos extratos aquosos do fruto de *A. muricata*, não esteja interagindo com o sítio catalítico da enzima, mas com outra região da molécula que seja responsável pelo acoplamento da metaloproteinase ao substrato, o domínio desintegrina e o domínio rico em cisteína (TANJONI *et al.*, 2003).

Outro componente de grande importância na toxicidade provocada pelo veneno de Viperidae é a PLA₂, que possui a capacidade de induzir diversos efeitos farmacológicos, como edema, hemorragia e inibição plaquetária, bem como efeitos neurotóxicos, anticoagulante e miotóxico (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995). Nos últimos anos, vários autores reportaram o potencial de extratos vegetais na inibição do edema (BADILLA *et al.*, 2006; NATARAJU *et al.*, 2007), da agregação plaquetária (TOYAMA *et al.*, 2011), dos efeitos neurotóxicos (CAVALCANTE *et al.*, 2007), e miotóxico (VERONESE *et al.*, 2005), além da neutralização da toxicidade renal provocado por essas enzimas (BARBOSA *et al.*, 2006). Inclusive, relatos de extratos com poder de inibir mais de um dos efeitos tóxicos, como edema e miotoxicidade (BORGES *et al.*, 2000; DIOGO *et al.*, 2009; NÚÑEZ *et al.*, 2005).

Mionecrose é uma complicação médica importante nos acidentes ofídicos (LOMONTE *et al.*, 2003). A miotoxicidade descrita em envenenamentos por estas serpentes é atribuída principalmente às PLA₂ (TEIXEIRA, *et al.*, 2003). Nossos resultados mostram claramente que os extratos aquosos derivados da polpa do fruto de foram capazes de inibir a atividade miotóxica do veneno de *B. atrox*. As frações GS e GSP foram as que apresentaram maior poder de inibição. Nunes (2011) constatou a presença de taninos condensados na fração GS, enquanto que em GSS

se apresentavam indetectáveis. Como GSP e GSS se derivaram de GS, podemos pressupor que taninos também estão presentes na fração GSP. A literatura mostra que taninos podem precipitar proteínas e formar complexos insolúveis com íons de metais, sendo assim, são capazes de neutralizar venenos ofídicos (BORGES *et al.*, 2005). Com isso, a inibição da atividade miotóxica do veneno de *B. atrox*, pelas frações GS e GSP, em parte pode ser atribuída à ação dos taninos.

Essas moléculas também podem estar envolvidas no mecanismo de inibição da atividade PLA₂ *in vitro* pelos extratos etanólicos de folhas de *A. muricata*, já que taninos também estão presentes em maior concentração nas folhas e caules das plantas (MORS *et al.*, 2000). Anteriormente, Cozendey (2007) já havia observado o poder de inibição da atividade catalítica da PLA₂ de *B. atrox*, também observaram que esses extratos inibiam a miotoxicidade *in vivo*. Além dos taninos, não podemos excluir a participação dos flavonoides no mecanismo de inibição, uma vez que já se comprovou a presença destes em extratos oriundos de folhas de *A. muricata* (ADEWOLE & OJEWOLE, 2008). Portanto, extratos obtidos de folhas de *A. muricata* constituem uma potencial fonte de moléculas inibidoras de PLA₂.

Flavonoides também podem ter participação do mecanismo de inibição da atividade miotóxica apresentada pela fração GSS. Conforme discutido anteriormente, foi comprovada a existência dessas moléculas nessa fração (NUNES, 2011), além de quercetina, os autores conseguiram dosar o flavonoide rutina na fração FAcet derivada de GSS e já se sabe que ambas moléculas são potentes inibidoras de PLA₂ de veneno de serpente (MORS *et al.*, 2000; IGLESIAS *et al.*, 2005; NANDA *et al.*, 2007). O mecanismo inibitório envolvido no efeito miotóxico parece ser semelhante ao observado anteriormente com metaloproteinases que ocorre pela formação de complexos com a superfície da enzima, impedindo dessa forma o acoplamento da PLA₂ à membrana plasmática. Podemos excluir também ação quelante apresentada por essas moléculas (NANDA *et al.*, 2007), uma vez que a fração GSS não foi capaz de inibir a atividade catalítica da PLA₂ *in vitro*. As frações GS e GSP também não foram capazes de inibir a atividade PLA₂ *in vitro* (resultados não mostrados).

Diversos inibidores naturais de PLA₂ já foram isolados de animais (LIZANO *et al.*, 2003), de organismos marinhos (NANDA *et al.*, 2007), e de plantas (MORS *et al.*, 2000). Recentemente, Nunes (2011) isolou a molécula diheptil ftalato (G1), foi a primeira descrição desta molécula em frutos de *A. muricata*. Nossos trabalhos

focaram na elucidação do potencial dessa molécula como inibidor natural de PLA₂ de serpentes. As análises de G1 foram direcionadas para a inibição de PLA₂, porque essa molécula apresenta duas características desejáveis num inibidor de PLA₂, a primeira delas é a presença de um anel benzênico e a outra, dois radicais hidrofóbicos (CHANDRA *et al.*, 2002; NÚÑEZ *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

A atividade inflamatória das PLA₂ é a grande responsável pela formação do edema, o qual é caracterizado por duas fases, a fase precoce do edema é parcialmente devido à histamina e/ou serotonina enquanto que a fase tardia desta resposta é pertencente às prostaglandinas e leucotrienos (CHAVES *et al.*, 1995, 1998). A molécula G1, quando pré-incubada com PLA₂ cataliticamente ativa, foi capaz de inibir o edema induzido em camundongos 4 horas após a sua inoculação, o mesmo foi observado por (BADILLA *et al.*, 2006) ao estudar o efeito de extratos vegetais sobre a atividade inflamatória do veneno de *B. asper*. Mostrando dessa forma, que G1 possa estar envolvido na inibição da fase tardia do edema, ou seja, atuando na inibição da via de síntese de prostaglandina e leucotrienos. Além disso, os nossos resultados mostraram que GSS foi incapaz de inibir edema, indicando que a concentração de G1 na fração não foi suficiente para a inibição.

Apesar da inibição da atividade inflamatória, G1 foi incapaz de inibir a atividade catalítica da enzima *in vitro*. O brometo de *p*-bromofenacil (*p*-BPB) é sabidamente conhecido por ocupar o sítio catalítico da PLA₂ e interagir covalentemente com o aminoácido His 48, provocando uma mudança conformacional na região, prejudicando a coordenação do Ca⁺² pelo aminoácido Asp49 (MELO & OWNBY, 1999). Ao comparar o comportamento de G1 e *p*-BPB na inibição da atividade PLA₂ foi possível afirmar que G1 não era capaz de interagir com o sítio catalítico com força necessária para inibir a atividade catalítica da PLA₂.

Embora a atividade catalítica seja importante na ação tóxica de algumas isoformas de PLA₂, em outras, como a isoforma PLA₂ K49 (caracterizada por ser cataliticamente inativa), há a evidência de que a toxicidade não depende somente da atividade catalítica, por isso, tem-se sugerido que uma região molecular diferente do sítio catalítico, localizada na região C-terminal seja responsável pela penetração e desestabilização da membrana plasmática (CHAVES *et al.*, 1998). Posteriormente, foi comprovado que essa região é responsável pela desestabilização da membrana e aporte de Ca⁺² para o citoplasma (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010), e a interação de inibidores com esse domínio é preponderante para a redução da

miotoxicidade (MURAKAMI *et al.*, 2008; TOYAMA *et al.*, 2011). A região C-terminal é caracterizada por ser hidrofóbica (AMBROSIO *et al.*, 2005), por isso, era esperado que os radicais hidrofóbicos de G1 pudessem interagir com a região C-terminal da enzima, assim, impedindo a inserção da enzima na membrana plasmática. De fato, a presença de uma cauda hidrofóbica parece ser importante para inibição da PLA₂, a vitamina E (α -tocoferol) é capaz de inibir PLA₂ e possui uma longa cauda alifática saturada que interage com a região C-terminal (CHANDRA *et al.*, 2002). Porém, ao analisar a interação de G1 com a PLA₂ por *docking*, foi constatado que G1 tem grande afinidade pelo sítio catalítico da enzima e foi incapaz de interagir com o domínio C-terminal.

A inibição do edema provocado pela PLA₂ por G1 parece não ser de forma direta, uma vez que G1 não foi capaz de inibir a miotoxicidade promovida pela PLA₂ em culturas de células C2C12. Os dados também mostraram que GSS foi capaz de inibir a atividade da PLA₂ de forma muito discreta, porém não significativa. Um dado contraditório, uma vez que GSS foi capaz de inibir a atividade miotóxica *in vivo*. Este fato pode ser explicado pelo emprego de amostras obtidas de lotes de purificação diferentes. Apesar de os dois lotes serem da mesma fonte, e terem passado pelos mesmos protocolos de purificação, podem gerar amostras com atividades diferentes (MAVAR-MANGA *et al.*, 2008).

Ftalatos são ésteres produzidos e utilizados pela indústria química, dentre outras aplicações, para impor flexibilidade a cloretos de polivinila (PVC). Devido ao grande uso dos ftalatos, eles se tornaram muito presentes no meio ambiente e pessoas estão constantemente expostas a eles (RAKKESTAD *et al.*, 2010). Nos últimos anos, devido ao amplo uso dos ftalatos, grande atenção tem sido dada ao seu potencial tóxico.

De fato, os ftalatos agem de forma distinta em diferentes órgãos interferindo no metabolismo de lipídeos (BELL, 1982). Os efeitos diferem também conforme a idade do indivíduo, sendo neonatos os mais sensíveis (VETRANO *et al.*, 2010). Além disso, essas moléculas prejudicam o desenvolvimento embrionário em seus estágios iniciais (GROSSMAN *et al.*, 2012), com o avanço da gestação, os ftalatos atravessam a placenta e prejudicam o desenvolvimento das gônadas diminuindo a produção de testosterona (DRAKE *et al.*, 2009; XI *et al.*, 2011). Outros efeitos têm sido descritos como a participação dessas moléculas em processos de

tumorogênese (WANG *et al.*, 2012), obesidade (HAO *et al.*, 2012) e asma (GUO *et al.*, 2012).

O ftalato mais empregado pela indústria é dietil hexano ftalato (DEHP) e quando são absorvidos pelo organismo, são metabolizados por lipases gerando um metabólito primário, o monoetil hexano ftalato (MEHP), e o segundo produto, o 2-etil hexanol (CARTER *et al.*, 1974). Isso pode explicar a afinidade de G1 pelo sítio catalítico da PLA₂ de *B. atrox*, como observado em nossas simulações de *docking*. Outro dado que reforça essa hipótese é que doses muito altas de G1 (1M) não foram capazes de inibir a atividade da PLA₂ *in vitro*, doses dessa magnitude são capazes de inibir atividade enzimática, mesmo que a afinidade do ligante com o sítio catalítico seja baixa (Prof. Jorge Hernandez Fernandes, comunicação pessoal).

O MEHP é o metabólito que é gerado com mais frequência (RAKKESTAD *et al.*, 2010). Depois de metabolizado, os ftalatos atuam como sinalizadores em diversas vias dependendo do tipo de célula e tecido, por exemplo, MEHP produzido a partir do metabolismo de DEHP atua como mimetizante de prostaglandina e tromboxanos nos pulmões, assim disparando resposta inflamatória nesses órgãos (OIE *et al.*, 1997). Os principais mecanismos pelos quais os ftalatos exercem seu efeito tóxico são através da promoção de estresse oxidativo (FERGUSON *et al.*, 2012) e indução de respostas inflamatórias que variam conforme o tecido ou órgão afetado (NISHIOKA *et al.*, 2012).

Nos pulmões, os ftalatos podem atuar como adjuvante, isso é possível porque ftalatos ficam em suspensão no ar como partículas e ao serem aspiradas se alojam na superfície da mucosa dos pulmões e desencadeiam processos inflamatórios (GUO *et al.*, 2012). Na mucosa, MEHP estimula a produção de TNF-alfa em macrófagos alveolares de ratos através da ativação da via p38/AP-1 MAPK (RAKKESTAD *et al.*, 2010). A ativação da via p38/AP-1 MAPK ativa a produção de lipoxigenases, principalmente LOX-5, que aumentam os níveis de LTB₄, além disso, a ativação desta via aumenta também a expressão de COX-2, IL-4 e IgE (OH & LIM, 2011; OIE *et al.*, 1997; RAKKESTAD *et al.*, 2010).

No sangue, DEHP são capazes de aumentar a expressão de CD11b em neutrófilos (GOURLAY *et al.*, 2003). Quando introduzido em culturas celulares, são capazes de induzir a expressão de IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF-a em células THP-1 (NISHIOKA *et al.*, 2012). Em células HUVEC, além das citocinas inflamatórias,

DEHP induz a expressão de ICAM-1 através da ativação da via JNK (WANG *et al.*, 2012).

Nos testículos, DEHP induzem a expressão de fosfolipase D (PLD) em testículos de rato, através da ativação da via ERK1/2, que por sua vez é ativada por espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEE *et al.*, 2011). Kim *et al.* (2004) observaram que DEHP inibem a atividade de PLA₂ citosólicas (PLA₂c) e aumentam a expressão LOX-12 e citocromo P450 4A1 (CYP4A1) que juntas promovem o metabolismo do ácido aracônico (AA), o resultado final é o decréscimo na produção de testosterona. CYP4A1 é produto da ativação de genes regulados por receptores alfa de ativação da proliferação de peroxissomo (PPAR-alfa) e já foi demonstrado que ftalatos como DEHP e MEHP atuam como ligantes desses receptores (LOVEKAMP-SWAN *et al.*, 2003; MALONEY & WAXMAN, 1999; VENKATA *et al.*, 2006). Esses receptores geralmente são ativados em processos de resolução de atividades inflamatórias, ao impedir a translocação de NF-κB para o núcleo, portanto apresentando características anti-inflamatórias (RAKKESTAD *et al.*, 2010).

Interessantemente, ftalatos nas suas mais diversas formas têm sido isolados de extratos de plantas (AZIZ-UR-REHMAN *et al.*, 2004; CAKIR *et al.*, 2003; RADONIĆ *et al.*, 2011; SRINIVASAN *et al.*, 2008). O papel dessas moléculas na planta ainda é desconhecido, porém especula-se que a presença delas seja através de sua absorção do meio ambiente, seja da atmosfera, do solo ou da irrigação (MAVAR-MANGA *et al.*, 2008). Porém não se podem descartar contaminações durante o processo de purificação, que pode ocorrer por meio da utilização de solventes, recipientes e sacos plásticos para estocagem da amostra, uma vez que ftalatos estão presentes na constituição de todos esses objetos (DRAKE *et al.*, 2009).

Apesar de todos os feitos tóxicos induzidos pelos ftalatos que foram discutidos até aqui, essas moléculas quando extraídas de plantas apresentaram atividade de interesse farmacológico, como atividade antiviral e bactericida (RAMESHTHANGAM e RAMASAMY, 2007), atividade microbiana (RIZWAN *et al.*, 2012; ZELLAGUI *et al.*, 2012), e inibição de melanogênese em células B16F10 (NGUYEN *et al.*, 2007).

Atividade anti-inflamatória induzida por ftalatos isolados de plantas também têm sido demonstrada (LI *et al.*, 2012; MAVAR-MANGA *et al.*, 2008; SHIMIZU; TOMOO, 1994). Tsukahara *et al.* (2005) observaram que ftalatos exercem seu efeito

anti-inflamatório ao inibirem a produção de PGE_4 por meio da inativação da atividade de IL-1b em fibroblastos da derme. Uma característica dos envenenamentos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* é o aumento de citocinas inflamatórias no local da injeção do veneno (CHAVES *et al.*, 2005). Além disso, PLA_2 quando injetadas via i.m. também são capazes de induzir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, TNF- α e principalmente IL-1b em células satélites e inflamatórias no local da injeção (OLIVEIRA *et al.*, 2009; RUCAVADO *et al.*, 2002). No envenenamento por *B. atrox* também há aumento dos níveis de IL-1b e demais citocinas pró inflamatórias e suas modulações são altamente dependentes da ação de neutrófilos (ESCOCARD *et al.*, 2006). Assim, podemos hipotetizar que o mecanismo pelo qual G1 reduz o edema provocado pelas PLA_2 de *B. atrox* seja através da redução dos níveis de PGE_4 induzidos por IL-1b. Esta afirmativa é reforçada pelo fato de G1 inibir a fase tardia do edema, justamente a fase em que prostaglandinas estão em atividade (MELO e OWNBY, 1999). Ensaio complementares serão necessários para comprovar essa hipótese.

Nosso trabalho mostra pela primeira vez o potencial de ftalatos como inibidores do efeito inflamatório induzido por PLA_2 de *B. atrox*. Além disso, abre a possibilidade do emprego dessas moléculas na síntese de inibidores, pois o acréscimo de radicais ftálicos potencializa a atividade apresentada por determinadas moléculas extraídas de produtos naturais (TSUKAHARA *et al.*, 2005; XU e HE, 2010). Outra característica promissora é a afinidade de G1 pelo sítio catalítico da PLA_2 , assim, modificações na estrutura de G1 podem aumentar ainda mais a afinidade não pelo sítio catalítico, como por outros domínios de interesse farmacológico da PLA_2 , como a região C-terminal. Já foi demonstrado que a presença de pelo menos uma hidroxila no anel benzênico é suficiente para formar pontes de hidrogênio com os aminoácidos His 48 e Asp 49 e assim, prejudicar a coordenação do cálcio (CHANDRA; JASTI; KAUR; SRINIVASAN; *et al.*, 2002; SILVA, DA *et al.*, 2009). Realmente, a síntese de novas substâncias baseadas em moléculas naturais pode ser uma promessa para a produção de inibidores mais eficazes (KHANUM *et al.*, 2005).

A investigação do efeito anti-inflamatório de G1 foi estendida para outras vias. Inibidores naturais já foram isolados com a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) (PUNTUREE *et al.*, 2004; PASSOS *et al.*, 2007; BAWA, 2009). Foi

observado que G1 consegue inibir a produção de NO de forma muito discreta, porém ensaios complementares serão necessários para confirmar o observado.

Todos os extratos derivados da polpa de *A. muricata* avaliados nesse trabalho apresentaram baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Porém ao analisarmos a atividade dos extratos aquosos sobre a atividade serinoproteásica, deparamos com um efeito inesperado. Aparentemente, os extratos GS, GSS e GSP potencializaram o efeito do veneno *in vitro*. Além disso, GSS prolongou o edema produzido pelo veneno em camundongos. A ação coagulante, também conhecida como síndrome da defibrinação, é resultante da propriedade que o veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* têm de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina (CASTRO *et al.*, 2004). A enzima responsável pela formação do coágulo na fase final da coagulação sanguínea é a trombina-símile (PETRETSKI *et al.*, 2000b). Essas toxinas acabam atuando em sinergismo com as metaloproteinases, potencializando assim, o efeito hemorrágico do envenenamento (LORÍA *et al.*, 2003). Na literatura, há poucos relatos de extratos vegetais atuando na inibição direta das trombinas-símiles (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Alguns inibidores têm sido isolados, porém atuam sobre a agregação plaquetária (MORI *et al.*, 2010; SATAKE *et al.*, 2007). Os nossos dados apresentam um aspecto preocupante, pois o edema produzido pelo envenenamento botrópico pode resultar em compressão do tecido e choque (BADILLA *et al.*, 2006; OTERO *et al.*, 2002). Por outro lado, o estudo da provável interação trombina-símile/componentes do extrato pode gerar aplicabilidades futuras, principalmente no tratamento de distúrbios hematológicos. Porém mais abordagens são necessárias para comprovar essa provável interação.

Em suma, os resultados produzidos aqui evidenciam a potencialidade dos extratos aquosos de *A. muricata* como fonte de inibidores de toxinas ofídicas. Além disso, a molécula G1 demonstrou potencial anti-inflamatório ao inibir o edema provocado pela PLA₂. Tudo isso mostra que o uso de extratos de plantas e/ou substâncias isoladas a partir deles, como antídotos contra venenos de serpentes, constitui uma alternativa para muitas comunidades onde falta o pronto acesso à soroterapia. Pois dependendo do tempo decorrido entre o acidente e o tratamento, a habilidade de neutralização dos efeitos locais produzidos pelo envenenamento poderá ser parcial ou inexistente. Portanto, extratos vegetais tornam-se uma alternativa promissora para tratamentos emergenciais e como complemento à soroterapia (TICLI *et al.*, 2005).

6. Conclusões

Os resultados produzidos por esta tese nos permite chegar as seguintes conclusões:

Parte I

- Anticorpos monoclonais contra toxinas do veneno de serpentes constituem uma alternativa promissora na produção de antivenenos mais eficazes na neutralização do veneno de *B. atrox*.

Parte II

- Os extratos aquosos GS, GSS e GSP de *Annona muricata* foram eficazes na inibição da hemorragia provocada pelo veneno de *Bothrops atrox*, mas não foram capazes de inibir a atividade catalítica da enzima;
- Os extratos aquosos GS, GSS e GSP foram eficientes em inibir a atividade miotóxica e edematogênica do veneno de *B. atrox in vivo*, mas não inibiram a atividade PLA₂ da enzima;
- A substância isolada di-heptil ftalato foi capaz de inibir o edema provocado pela PLA₂ cataliticamente ativa purificada do veneno de *B. atrox* de maneira dose dependente, mas não foi capaz de inibir a atividade catalítica da enzima.
- O extrato GSS não foi capaz de inibir o edema provocado pela PLA₂, por outro lado, GSS prolongou o edema provocado pelo veneno de *B. atrox*;
- Modelagens moleculares mostraram que di-heptil ftalato é capaz de interagir com o sítio catalítico da PLA₂.

7. Referências Bibliográficas

- ABBO, E.S.; OLURIN, T. O. ; ODEYEMI, G. (2006) Studies on the storage stability of soursop (*Annona muricata* L.) juice. *African Journal Of Biotechnology*, 5: 1808-1812.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, v. 6, n. 1, p. 30-41, jan 2008.
- AMORIN, MF, de Melo, RF, Saliba, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Instit. Butantan*, 23: 63-108. 1951.
- AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S. DE; *et al.* A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. *The Journal of biological chemistry*, v. 280, n. 8, p. 7326-35, 25 fev 2005.
- ANDRIÃO-ESCARSO, SH, Soares, AM, Rodrigues, VM, Angulo, Y, Diaz, C Lomonte, B, Gutiérrez, JM, Giglio, JR. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*, 82: 755-763. 2000.
- ALVES, R. E.; LIMA, M. A. C.; FILGUEIRAS, H. A. C.; TAVORA, F. J. A. F. (2002) Compostos fenólicos e enzimas oxidativas de graviola (*Annona muricata* L.) durante a maturação. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Belém. 1: 1.
- ARAÚJO, FAA, Santalúcia, M, Cabral, RF. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In *Animais Peçonhentos do Brasil*. 1 ed. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003. p. 6
- ARBAISAH, S.M.; ASBI, B.A.; JUNAINAH, A.H. ; JAMILAH, B. (1997) Purification and properties of pectinesterase from soursop (*Anona muricata*) pulp. *Food Chemistry*, 59 (1): 33-40
- 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, n. 4, p. 482-6, out 2010.

- AVANZI, CLAUDIA J; ALEIXO, A. M.; BAPTISTELLA, L. H. B. (2006) Identificação e Caracterização dos compostos ativos dos extratos vegetais das folhas da graviola (*Annona muricata*) e dos Extratos Vegetais da Casca do Pau D'arco (*Tabebuia avellaneda*). In: *58ª Reunião Anual da SBPC*, Forianópolis. 58ª Reunião Anual da SBPC.
- AZEVEDO-MARQUES, MM, Hering, SE, Cupo, P. Acidente Crotálico. In *Animais Peçonhentos do Brasil*. 1 ed. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003. p. 91
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 6, n. 1, p. 30–41, jan 2008.
- AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S. DE; *et al.* A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 8, p. 7326–35, 25 fev 2005.
- 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, n. 4, p. 482–6, out 2010.
- AZIZ-UR-REHMAN, A.-U.-R.; MALIK, A.; RIAZ, N.; *et al.* Lipxygenase inhibitory constituents from *Periploca aphylla*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 9, p. 1450–4, set 2004.
- BADILLA, B.; CHAVES, F.; MORA, G.; POVEDA, L. J. Edema induced by *Bothrops asper* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plant extracts. **Revista de biología tropical**, v. 54, n. 2, p. 245–52, jun 2006.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; ALVES, R. S.; *et al.* The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 8, p. 831–7, 15 jun 2006.
- BAWA, A. S.; KHANUM, F. Anti-inflammatory activity of *Rhodiola rosea*--“a second-generation adaptogen”. **Phytotherapy research : PTR**, v. 23, n. 8, p. 1099–102, ago 2009.
- BELL, F. P. Effects of phthalate esters on lipid metabolism in various tissues, cells and organelles in mammals. **Environmental health perspectives**, v. 45, n. 44, p.

- 41–50, nov 1982.
- BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; CRUZ-HÖFLING, M. A DA. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 5, p. 698–706, nov 1999.
- BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; *et al.* Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 21–9, 8 abr 2005.
- BORGES, M. H.; SOARES, A M.; RODRIGUES, V. M.; *et al.* Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 127, n. 1, p. 21–30, set 2000.
- CAKIR, A.; MAVI, A.; YILDIRIM, A.; *et al.* Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 73–83, jul 2003.
- CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1063–74, 15 jun 2005.
- CAMARGO, E. A.; ESQUISATTO, L. C. M.; ESQUISATTO, M. A.; *et al.* Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A2 in rats. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 8, p. 921–6, 15 dez 2005.
- CARTER, J. E.; ROLL, D. B.; PETERSEN, R. V. The in vitro hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by rat tissues. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 2, n. 4, p. 341–4, 1974.
- CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 7-8, p. 843–56, abr 2004.
- CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; *et al.* Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of**

- ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490–7, 25 jul 2007.
- CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; BETZEL, C.; *et al.* First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 320, n. 2, p. 215–22, 5 jul 2002.
- CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; *et al.* Structural basis of phospholipase A2 inhibition for the synthesis of prostaglandins by the plant alkaloid aristolochic acid from a 1.7 Å crystal structure. **Biochemistry**, v. 41, n. 36, p. 10914–9, 10 set 2002.
- CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 33, n. 1, p. 31–9, jan 1995.
- CHAVES, F.; LEÓN, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 12, p. 1861–9, dez 1998.
- CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 2, p. 171–8, fev 2005.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ANGULO, Y.; *et al.* The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 2-3, p. 590–6, 2010.
- DIOGO, L. C.; FERNANDES, R. S.; MARCUSSI, S.; *et al.* Inhibition of snake venoms and phospholipases A(2) by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 104, n. 4, p. 293–9, abr 2009.
- DRAKE, A. J.; DRIESCHE, S. VAN DEN; SCOTT, H. M.; *et al.* Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 5055–64, nov 2009.

- ESCOCARD, R. D. C. M.; KANASHIRO, M. M.; PETRETSKI, J. H.; *et al.* Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 37–46, jan 2006.
- ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v. 12, n. 8, p. 570–576, ago 2005.
- ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; *et al.* Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 2, p. Unit 2.9, nov 2007.
- FERGUSON, K. K.; LOCH-CARUSO, R.; MEEKER, J. D. Exploration of oxidative stress and inflammatory markers in relation to urinary phthalate metabolites: NHANES 1999-2006. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 1, p. 477–85, 3 jan 2012.
- FRAUCHES, T. S. **DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA IDENTIFICAR ISOFORMAS DE FOSFOLIPASE A2 DO VENENO DE BOTHROPS ATROX**. [S.l.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2005.
- FRAUCHES, T. S. **Anticorpos Monoclonais contra as Principais Toxinas do Veneno de Bothrops atrox: uma perspectiva para o uso terapêutico**. [S.l.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2007.
- FRAUCHES, T. S.; PETRETSKI, J. H.; ARNHOLDT, A. C. V; *et al.* Bothropic antivenom based on monoclonal antibodies, is it possible? **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 71, p. 49–56, set 2013.
- FRY, B. G. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 1, p. 11–32, jan 1999.
- FUNASA. **Manual de Diagnóstico e tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2a ed. ed. Brasília: [s.n.], 2001. p. 120
- GOURLAY, T.; SAMARTZIS, I.; STEFANOU, D.; TAYLOR, K. Inflammatory response of rat and human neutrophils exposed to di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-plasticized polyvinyl chloride. **Artificial organs**, v. 27, n. 3, p. 256–60, mar 2003.

- GROSSMAN, D.; KALO, D.; GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Cell biology and toxicology**, v. 28, n. 6, p. 383–96, dez 2012.
- GUO, J.; HAN, B.; QIN, L.; *et al.* Pulmonary toxicity and adjuvant effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate in ovalbumin-immunized BALB/c mice. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39008, jan 2012.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 976–87, 1 dez 2009.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 33, n. 11, p. 1405–24, nov 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 15 jun 2005.
- HAO, C.; CHENG, X.; XIA, H.; MA, X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Bioscience reports**, v. 32, n. 6, p. 619–29, 1 dez 2012.
- IGLESIAS, C. V.; APARICIO, R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; *et al.* Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 7, p. 751–8, 1 dez 2005.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from Baccharis trimera (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-biological interactions**, v. 150, n. 3, p. 243–51, 7 dez 2004.
- KANASHIRO, M. M.; CÁSSIA M ESCOCARD, R. DE; PETRETSKI, J. H.; *et al.* Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from Bothrops atrox snake venom. **Biochemical pharmacology**, v. 64, n. 7, p. 1179–86, 1 out 2002.
- KHANUM, S. A.; MURARI, S. K.; VISHWANTH, B. S.; SHASHIKANTH, S. Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 18,

- p. 4100–4, 15 set 2005.
- KIM, H.-S.; ISHIZUKA, M.; KAZUSAKA, A.; FUJITA, S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 66, n. 9, p. 1119–24, set 2004.
- LEE, Y. J.; AHN, M. Y.; KIM, H. S.; *et al.* Role of phospholipase D in regulation of testicular Leydig cell hyperplasia in Sprague-Dawley rats treated with di(2-ethylhexyl) phthalate. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 8, p. 975–85, ago 2011.
- LI, X.; ZHANG, J.; GAO, W.; WANG, H. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 10, p. 3673–9, out 2012.
- LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 963–77, 15 dez 2003.
- 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 : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 885–901, 15 dez 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; *et al.* Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 1, p. 145–58, jan 1999.
- LORÍA, G. D.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A. S.; *et al.* Characterization of “basparin A,” a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 418, n. 1, p. 13–24, out 2003.
- LOVEKAMP-SWAN, T.; JETTEN, A. M.; DAVIS, B. J. Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 201, n. 1-2, p. 133–41, 28 mar 2003.
- MALONEY, E. K.; WAXMAN, D. J. trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma

- by structurally diverse environmental chemicals. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 161, n. 2, p. 209–18, 1 dez 1999.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 12, p. 1749–800, dez 1998.
- MAVAR-MANGA, H.; HADDAD, M.; PIETERS, L.; *et al.* Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 25–9, 4 jan 2008.
- MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 1, p. 199–215, jan 1999.
- MILANI JÚNIOR, R.; JORGE, M. T.; CAMPOS, F. P. DE; *et al.* Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 90, n. 5, p. 323–34, maio 1997.
- MORAES, T. M. DA S.; ARAÚJO, M. H. DE; BERNARDES, N. R.; *et al.* Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta medica**, v. 77, n. 9, p. 964–70, jun 2011.
- MORI, K.; KIKUCHI, H.; OBARA, Y.; *et al.* Inhibitory effect of hericenone B from *Heridium erinaceus* on collagen-induced platelet aggregation. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 14, p. 1082–5, 1 dez 2010.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–42, nov 2000.
- MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; BUHRNHEIM, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antiothropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 12, p. 1859–63, dez 2000.
- MURAKAMI, M. T.; KUCH, U.; BETZEL, C.; MEBS, D.; ARNI, R. K. Crystal structure

- of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A2 homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom: insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 51, n. 5, p. 723–35, abr 2008.
- NANDA, B. L.; NATARAJU, A; RAJESH, R.; *et al.* PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants--a new role as anti-inflammatory molecule. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 765–77, jan 2007.
- NATARAJU, A; RAGHAVENDRA GOWDA, C. D.; RAJESH, R.; VISHWANATH, B. S. Group IIA secretory PLA2 inhibition by ursolic acid: a potent anti-inflammatory molecule. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 801–9, jan 2007.
- NGUYEN, D. T. M.; NGUYEN, D. H.; LYUN, H.-L.; *et al.* Inhibition of melanogenesis by dioctyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1585–90, out 2007.
- NISHIJIMA, C. M. N.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; *et al.* Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 3, p. 1072–80, jan 2009.
- NISHIOKA, J.; IWAHARA, C.; KAWASAKI, M.; *et al.* Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 61, n. 1, p. 69–78, jan 2012.
- NUNES, C. DOS R. **Annona muricata L. : Análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. [S.l.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2011.
- NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 1, p. 91–101, jul 2004.
- NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; *et al.* 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, n. 9, p. 1017–25, maio 2005.
- OH, P.-S.; LIM, K.-T. IgE, COX-2, and IL-4 are expressed by DEHP through p38 MAPK and suppressed by plant glycoprotein (75 kDa) in ICR mice. **Inflammation**,

- v. 34, n. 5, p. 326–34, out 2011.
- OIE, L.; HERSOUG, L. G.; MADSEN, J. O. Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. **Environmental health perspectives**, v. 105, n. 9, p. 972–8, set 1997.
- OLIVEIRA, C. D. F.; LOPES, D. D. S.; MENDES, M. M.; *et al.* Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 5, p. 560–9, abr 2009.
- OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; *et al.* Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 213–6, 8 abr 2005.
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M.; *et al.* Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 8, p. 1107–114, ago 2002.
- OTERO-PATIÑO, R.; CARDOSO, J. L.; HIGASHI, H. G.; *et al.* A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 2, p. 183–9, fev 1998.
- PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M. DA; *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–33, 21 mar 2007.
- PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M. M.; RODRIGUES, F. R.; *et al.* Edema induction by the disintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, n. 1, p. 29–34, 16 set 2000.
- PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E. W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 33, n. 11, p. 1293–300, nov 2000.

- PRICE, J. A. A colorimetric assay for measuring phospholipase A2 degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 3, p. 441–4, 10 abr 2007.
- PUNTUREE, K.; WILD, C. P.; VINITKETKUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in J774.2 mouse macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 183–9, dez 2004.
- RADONIĆ, A.; BLAŽEVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Cardaria draba* (L.) Desv. volatiles. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 6, p. 1170–81, jun 2011.
- RAKKESTAD, K. E.; HOLME, J. A; PAULSEN, R. E.; SCHWARZE, P. E.; BECHER, R. Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces both pro- and anti-inflammatory responses in rat alveolar macrophages through crosstalk between p38, the lipoxygenase pathway and PPARalpha. **Inhalation toxicology**, v. 22, n. 2, p. 140–50, fev 2010.
- RAMESHTHANGAM, P.; RAMASAMY, P. Antiviral activity of bis(2-methylheptyl)phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White Spot Syndrome Virus of *Penaeus monodon* Fabricius. **Virus research**, v. 126, n. 1-2, p. 38–44, jun 2007.
- RASO, G. M.; MELI, R.; CARLO, G. DI; PACILIO, M.; CARLO, R. DI. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life sciences**, v. 68, n. 8, p. 921–31, 12 jan 2001.
- RIZWAN, K.; ZUBAIR, M.; RASOOL, N.; *et al.* Phytochemical and Biological Studies of *Agave attenuata*. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 5, p. 6440–51, jan 2012.
- RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; *et al.* Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 2, p. 121–8, abr 2002.
- SATAKE, T.; KAMIYA, K.; AN, Y.; OISHI NEE TAKA, T.; YAMAMOTO, J. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 5, p. 935–40, maio 2007.
- SHIMIZU, M.; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 17, n. 5, p. 665–7, maio 1994.

- SILVA, J. O. DA; COPPEDE, J. S.; FERNANDES, V. C.; *et al.* Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 145–52, 22 ago 2005.
- SILVA, J. O. DA; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; *et al.* Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 2, p. 283–91, ago 2007.
- SILVA, N. M. V DA; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L. B.; *et al.* Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 2, p. 196–205, ago 2007.
- SILVA, S. L. DA; CALGAROTTO, A K.; MASO, V.; *et al.* Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 1, p. 312–21, jan 2009.
- SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; *et al.* Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2625–41, jan 2005.
- SRINIVASAN, G. V.; RANJITH, C.; VIJAYAN, K. K. Identification of chemical compounds from the leaves of *Leea indica*. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 58, n. 2, p. 207–14, jun 2008.
- TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; *et al.* Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801–808, dez 2003.
- TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 947–62, 15 dez 2003.
- TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; *et al.* Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 3, p. 318–27, 1 set 2005.
- TOYAMA, D. D. O.; DIZ FILHO, E. B. D. S.; CAVADA, B. S.; *et al.* Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a

- phospholipase A(2) isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 57, n. 6, p. 851–60, maio 2011.
- TSUKAHARA, M.; NISHINO, T.; FURUHASHI, I.; *et al.* Synthesis and inhibitory effect of novel glycyrrhetic acid derivatives on IL-1 beta-induced prostaglandin E(2) production in normal human dermal fibroblasts. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1103–10, set 2005.
- VENKATA, N. G.; ROBINSON, J. A.; CABOT, P. J.; *et al.* Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast. **Toxicology letters**, v. 163, n. 3, p. 224–34, 1 jun 2006.
- VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; TROMBONE, A. P. F.; *et al.* Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 123–130, jan 2005.
- VETRANO, A. M.; LASKIN, D. L.; ARCHER, F.; *et al.* Inflammatory effects of phthalates in neonatal neutrophils. **Pediatric research**, v. 68, n. 2, p. 134–9, ago 2010.
- WANG, J.; LIAO, Y.; FAN, J.; *et al.* Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. **Inflammation**, v. 35, n. 4, p. 1466–76, ago 2012.
- WANG, Y.-C.; CHEN, H.-S.; LONG, C.-Y.; *et al.* Possible mechanism of phthalates-induced tumorigenesis. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 28, n. 7 Suppl, p. S22–7, jul 2012.
- XI, W.; WAN, H. T.; ZHAO, Y. G.; *et al.* Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. **Environmental science and pollution research international**, v. 19, n. 7, p. 2515–27, ago 2011.
- XU, H.; HE, X.-Q. Natural products-based insecticidal agents 6. Design, semisynthesis, and insecticidal activity of novel monomethyl phthalate derivatives of podophyllotoxin against *Mythimna separata* Walker in vivo. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 15, p. 4503–6, 1 ago 2010.
- ZELLAGUI, A.; GHERRAF, N.; LADJEL, S.; HAMEURLAINE, S. Chemical

composition and antibacterial activity of the essential oils from *Launaea resedifolia*
L. **Organic and medicinal chemistry letters**, v. 2, n. 1, p. 2, jan 2012.

8. Anexo