



ANDRÉA PATRÍCIA DA SILVA POMPOSO BASTOS

**PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS EM
EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
CAFEEIRO**

**LAVRAS – MG
2019**

ANDRÉA PATRÍCIA DA SILVA POMPOSO BASTOS

**PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS EM EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Laura Cristina Jardim Porto Pimenta
Orientador(a)
Prof(a). Dr(a). Patrícia Gomes Cardoso
Coorientador(a)

**LAVRAS - MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Bastos, Andréa Patrícia da Silva Pomposo.

Prospecção de moduladores enzimáticos em extratos de fungos
endofíticos isolados de cafeeiro / Andréa Patrícia da Silva Pomposo
Bastos. - 2019.

57 p.

Orientador(a): Laura Cristina Jardim Porto.

Coorientador(a): Patrícia Gomes Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Hemostasia. 2. Fungos endofíticos. 3. Metabólitos
secundários. I. Porto, Laura Cristina Jardim. II. Cardoso, Patrícia
Gomes. III. Título.

ANDRÉA PATRÍCIA DA SILVA POMPOSO BASTOS

**PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS EM EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE CAFEIEIRO
PROSPECTING ENZYMATIC MODULATORS IN EXTRACTS OF ENDOPHYTIC
FUNGUS ISOLATED FROM COFFEE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de dezembro de 2019
Dra. Laura Cristina Jardim Porto Pimenta UFLA
Dr. Clayton Zambeli Oliveira UFPB
Dr. Pedro Henrique Souza Cezar UFLA

Prof(a). Dr(a). Laura Cristina Jardim Porto Pimenta
Orientador(a)
Prof(a). Dr(a). Patrícia Gomes Cardoso
Coorientador(a)

**LAVRAS - MG
2019**

*À minha família e amigos, em especial Ítalo Férrer,
meu marido e melhor amigo, pelo apoio e carinho em todas as etapas.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Nutrição e ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS), pela oportunidade.

Aos professores, pela orientação, paciência e disposição para ajudar.

Aos amigos e colegas do PPGNS, pelo companheirismo e momentos compartilhados.

Aos meus pais, Sueli e Nivaldo, pelo amor, apoio incondicional e exemplos de vida, e à minha irmã Sueli.

A Ítalo, pelo companheirismo, amor, incentivo e apoio em todos os momentos.

“Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas”.
(Confúcio)

RESUMO

Microrganismos endofíticos vivem ao menos parte do seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais, sem causar dano aparente ao hospedeiro. Espécies endofíticas do gênero *Muscodor* são relatados como endofíticos produtores de metabólitos bioativos com potencial para aplicação na indústria farmacêutica. No presente trabalho, extratos da cultura de fungos endofíticos, isolados de cafeeiro, pertencentes ao gênero *Muscodor*, *M. coffeanum* (CML 4009, CML 4010 e CML 4020) e *M. yucatanensis* (CML 4016), foram estudados quanto aos efeitos moduladores que exercem sobre a atividade de enzimas que atuam na hemostase. Os sobrenadantes foram obtidos após cultivo dos fungos em caldo ME (Extrato de Malte) e separação do micélio por filtração. Este, foi adicionado ao solvente acetato de etila na proporção de 1:0,5 (sobrenadante/acetato de etila) seguido de rotoevaporação para obtenção do extrato fúngico. Os extratos foram diluídos em Dimetilsulfóxido P.A. 99,9% (DMSO) e utilizados para avaliar atividade fosfolipásica, coagulação sobre plasma humano citratado, trombolítica, citotóxica sobre eritrócito humanos e proteolítica utilizando a caseína como substrato. Como fonte de fosfolipases A₂ e ferramenta indutora de coagulação foi utilizada peçonha de serpente da espécie *Bothrops atrox* nas proporções: 1:0,01; 1:0,25; 1:0,5 e 1:1 (peçonha: extrato; massa: massa). Os extratos de todos os fungos endofíticos avaliados promoveram um aumento significativo no tempo de coagulação induzida pela peçonha, principalmente, quando incubados previamente com o plasma sanguíneo. A atividade de fosfolipases A₂ não sofreu alterações significativas, quando avaliada após incubação das enzimas com os extratos fúngicos, sugerindo a presença de mecanismos de interação específicos entre moléculas presentes nos extratos e proteases da peçonha avaliada.

Palavras-chave: *Muscodor coffeanum*. Metabólitos secundários. Inibidores de proteases. Coagulação sanguínea.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms live at least part of their life cycle inside plant tissues, without causing apparent damage to the host. Endophytic species of the genus *Muscodor* are reported as endophytic producers of bioactive metabolites with potential for application in the pharmaceutical industry. Thus, in the present work, extracts from the culture of endophytic fungi isolated from coffee plants, *M. coffeanum* (CML 4009, CML 4010, and CML 4020) and *M. yucatanensis* (CML 4016), were prospected in enzyme modulation tests that act in human hemostasis. The fungi were grown in ME broth (Malt Extract), the mycelium separated by filtration, and the supernatant added to ethyl acetate in the proportion of 1: 0.5 (supernatant/ethyl acetate) to extract the compounds by rotary evaporation. The dry extracts were diluted in Dimethylsulfoxide P.A., 99.9% (DMSO) and then tested, in which *Bothrops atrox* venom was used as an enzyme source and tool to induce the activities. Prior to the evaluation of the activities, incubations of the extracts with the venom were performed in the proportions 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; mass: mass). The extracts of all fungi promoted a significant increase in the clotting time induced by the venom, especially when incubated with blood plasma. The activity of phospholipases A₂ did not change significantly when evaluated in the presence of fungal extracts. Thus, it is possible to suggest the presence of specific interactions between molecules present in extracts and venom proteases.

Keywords: *Muscodor coffeanum*. Secondary metabolites. Protease inhibitors. Blood clotting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Locais de atuação de serinoproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea. Fonte: Cesar, 2016, adaptado de Serrano, 2013.....	6
Figura 2 - Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea. Fonte: Cesar (2016), adaptado de Serrano (2013) e Markland Jr e Swenson (2013).....	7
Figura 3 - Novo modelo da cascata de coagulação sanguínea. Fonte: Adaptado de Hoffman e Monroe (2001).....	11

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	1
1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO MUSCODOR.....	2
2.2	PEÇONHAS DE SERPENTES E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	3
2.3	MODULADORES ENZIMÁTICOS DE ORIGEM NATURAL	8
2.4	HEMÓSTASE VASCULAR E PROTEASES.....	9
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	12
	REFERÊNCIAS	13
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	19
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO: ELABORADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY (QUALIS B1).....	19
	ARTIGO 1 – PROSPECTION OF ENZYMATIC MODULATORS IN ENDOPHYTIC FUNGAL EXTRACTS ISOLATED FROM COFFEE PLANTS	22

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem ao menos parte do seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais, sem causar dano aparente ao hospedeiro. Por sua quantidade de metabólitos bioativos descritos, sendo mais de 20.000, os microrganismos têm recebido muita atenção na área farmacológica. Alguns exemplos de classes desses compostos são peptídeos, alcaloides, esteroides, fenólicos, terpenóides, lignanas e eugenol, com ações que variam de antimicrobiana, antiviral, antifúngica, citotóxica, imunossupressora até antiparasitária. Fungos endofíticos do gênero *Muscodor*, por exemplo, são relatados com potencial para aplicação na agricultura, como no controle biológico de doenças de plantas. Porém, seus metabólitos podem conter, também, moléculas relevantes para a produção de novos produtos farmacêuticos.

A peçonha das serpentes é uma mistura de moléculas que variam de forma estrutural, bioquímica e funcional de acordo com a espécie da serpente e fatores ambientais. Para estudos que visem à análise de moduladores enzimáticos sobre a ação de enzimas que atuam em processos relacionados à hemostase humana, as peçonhas de serpentes são ferramentas laboratoriais amplamente utilizadas, uma vez que grande parte de sua composição é constituída por serinoproteases, metaloproteases e fosfolipases A₂, que atuam nos processos de coagulação, resposta inflamatória, agregação de plaquetas, fibrinólise e dissolução de trombos.

As coagulotoxinas, em especial, têm como alvo a cascata de coagulação, e podem agir tanto como anticoagulantes e assim causar hemorragias, quanto como pró-coagulantes e gerar trombos e coágulos que podem causar embolias. Algumas dessas toxinas degradam fator de *Von Willebrand*, impedindo a agregação de plaquetas, outras degradam fibrinogênio, agindo de forma similar à trombina e, ainda, outras degradam fosfolipídeos, liberando ácido araquidônico e iniciando as vias de produção de eicosanóides (lipídios bioativos envolvidos na resposta inflamatória, coagulação sanguínea e diversos outros processos fisiológicos).

Considerando o contexto apresentado, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença de moduladores enzimáticos em extratos de fungos do gênero *Muscodor*, com potencial de ação sobre parâmetros que auxiliem a manutenção da hemostase humana, uma vez que as enzimas de peçonha, utilizadas como ferramenta de indução dos efeitos, possuem alta homologia estrutural e funcional com enzimas humanas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos endofíticos do gênero *Muscodor*

A relação entre os microrganismos endofíticos e as plantas hospedeiras é íntima, pois a planta fornece nutrientes para o endófito e, em contrapartida, o mesmo pode sintetizar metabólitos benéficos para a planta (OWNLEY, GWINN e VEGA, 2010). Dentre os metabólitos produzidos por endofíticos, descritos em literatura, destacam-se peptídeos, alcaloides, esteroides, fenólicos, terpenoides, lignanas e eugenol, que podem apresentar atividades biológicas, tais como antimicrobiana (TANAPICHATSAKUL et al., 2019), antiviral (ALI et al., 2017), antifúngica, citotóxica, imunossupressora, antiparasitária (DEMAIN e SANCHEZ, 2009), antioxidante (HAM et al., 2013) e anti-inflamatória (KIM et al., 2013).

Espécies de *Muscodor* têm despertado interesse por sua capacidade de sintetizar compostos bioativos. Tal gênero foi descoberto no final na década de 1990 em Honduras, isolado da árvore *Cinnamomum zeylanicum* (WORAPONG et al., 2001). O fungo recebeu o nome de *Muscodor albus*, devido à característica branca e cotonosa de suas hifas. A partir da identificação do *Muscodor albus*, foram observadas algumas características que se tornaram padrão para outras 23 espécies descritas para esse gênero, tais como hifas estéreis, com enrolamento, e esbranquiçadas (STROBEL, 2011) (KAPOOR; GAMBHIR e SAXENA, 2018; CHEN et al., 2019). O isolamento destas espécies foi realizado em florestas tropicais e subtropicais na Austrália, América do Sul, América Central, China, Tailândia e Índia (STROBEL, 2011; 2015), tendo sido isolada e identificada uma nova espécie, *M. coffeanum*, em cafeeiro no sudeste do Brasil (HONGSANAN et al., 2015).

Fungos *Muscodor* são descritos como produtores de uma mistura de compostos orgânicos voláteis extremamente bioativos contra patógenos de plantas e humanos (STROBEL, 2011; GUPTA e MESHRAM, 2018). Um fungo endofítico representante do gênero *Xylaria* (*Xylaria curta*), pertencente a mesma família do gênero *Muscodor*, foi descrito como produtor da enzima xilarinase, uma metaloprotease fibrinolítica, extraída do filtrado da cultura, que pode ser usada como uma nova enzima anticoagulante (MESHRAM; SAXENA e PAUL, 2016). Esse trabalho mostrou que a xilarinase prolonga o tempo de ativação parcial da tromboplastina e da protrombina. Outros fungos endofíticos também são relatados com potencial fibrinolítico, como *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (MESHRAM e SAXENA, 2016), *Verticillum* sp. (LI et al.,

2007) e *Fusarium* sp. (WU et al., 2009a). Portanto, espécies fúngicas do gênero *Muscodor* podem ser fontes de novas moléculas bioativas com potencial de aplicação na indústria farmacêutica.

O potencial de fungos do gênero *Muscodor*, em função dos voláteis antimicrobianos pertencentes a cinco classes gerais de substâncias orgânicas (ácidos, álcoois, ésteres e lipídeos), é relatado, principalmente, para a agricultura no controle biológico de fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Veticillum dahliae*, etc.) e pragas (*Phthorimaea operculella* ou traça-da-batata, por exemplo) (STROBEL, 2001; STROBEL et al., 2006; STROBEL et al., 2011; MONTEIRO et al., 2017), para a produção de enzimas tais como fosfatase (ALVES et al., 2016) e para a produção de biocombustíveis (NAIK, 2018). Porém, seus metabólitos compreendem, também, outras moléculas como lipopeptídeos e glicolipídeos, relevantes para as indústrias microbiológicas (STROBEL et al., 2004) e para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (TANAPICHATSAKUL et al., 2019; GUPTA e MESHAM, 2018; KAPOOR, N. e SAXENA, S., 2016). No entanto, exceto para seus metabólitos voláteis com atividade antimicrobiana, outras classes de metabólitos ainda não foram devidamente explorados (KAPOOR, N. e SAXENA, S., 2016), como moléculas solúveis produzidas durante o crescimento e liberadas no meio. Boparai et al. (2015) reportaram a atividade antimicrobiana de extratos de cultura de fungo *M. indica* contra importantes patógenos humanos como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Em estudos realizados sobre o desenvolvimento de alternativas para o controle da hiperuricemia (gota) e doenças relacionadas ao estresse oxidativo, outro extrato de *M. indica* apresentou uma potente atividade antioxidante, e o extrato de *M. darjeelingensis*, apresentou ação inibidora sobre a xantina oxidase, principal enzima responsável pela produção de ácido úrico (KAPOOR e SAXENA, 2016).

2.2 Peçonhas de serpentes e atividades enzimáticas

As serpentes são animais vertebrados que compõem a ordem Squamata, subordem Ofidia, e Classe Reptilia. Algumas serpentes são consideradas peçonhentas, pois possuem glândulas secretoras de veneno localizadas de cada lado da cabeça as quais, através de presas, são capazes de inoculador veneno. A peçonha das serpentes é uma mistura de moléculas com variadas características estruturais, funcionais e bioquímicas (KANG et al., 2011). De modo geral, essas peçonhas são constituídas de neurotoxinas, cardiotoxinas (citotoxinas), miotoxinas e fatores que

alteram a hemostase (MENDEZ e RIET-CORREA, 1995), sendo estes efeitos principalmente associados à serinoproteases, metaloproteases e fosfolipases A₂, que compõe a maior porcentagem do peso seco destas peçonhas.

Devido a sua natureza majoritariamente proteica/enzimática, a peçonha interfere bruscamente na hemostase das vítimas de serpentes, podendo trazer comprometimento neuronal, cardíaco e vascular, o que acarreta em óbito em alguns casos (DAVID, 2010) ou amputação de membros. As fosfolipases A₂ são capazes de promover uma intensa atividade tóxica (DENNIS et al., 2011) resultante principalmente de sua atividade catalítica sobre fosfolipídeos de membranas, levando a um desarranjo estrutural, alteração no fluxo de íons através das membranas, ativação de fosfolipases endógenas das células ou mesmo morte celular. Em adição, a quebra de fosfolipídeos pode resultar na liberação de ácido araquidônico, que por sua vez é precursor de eicosanóides pelas vias das cicloxigenases e lipoxigenases, causando alterações na hemostase e resposta inflamatória (MARCUSI et al., 2011).

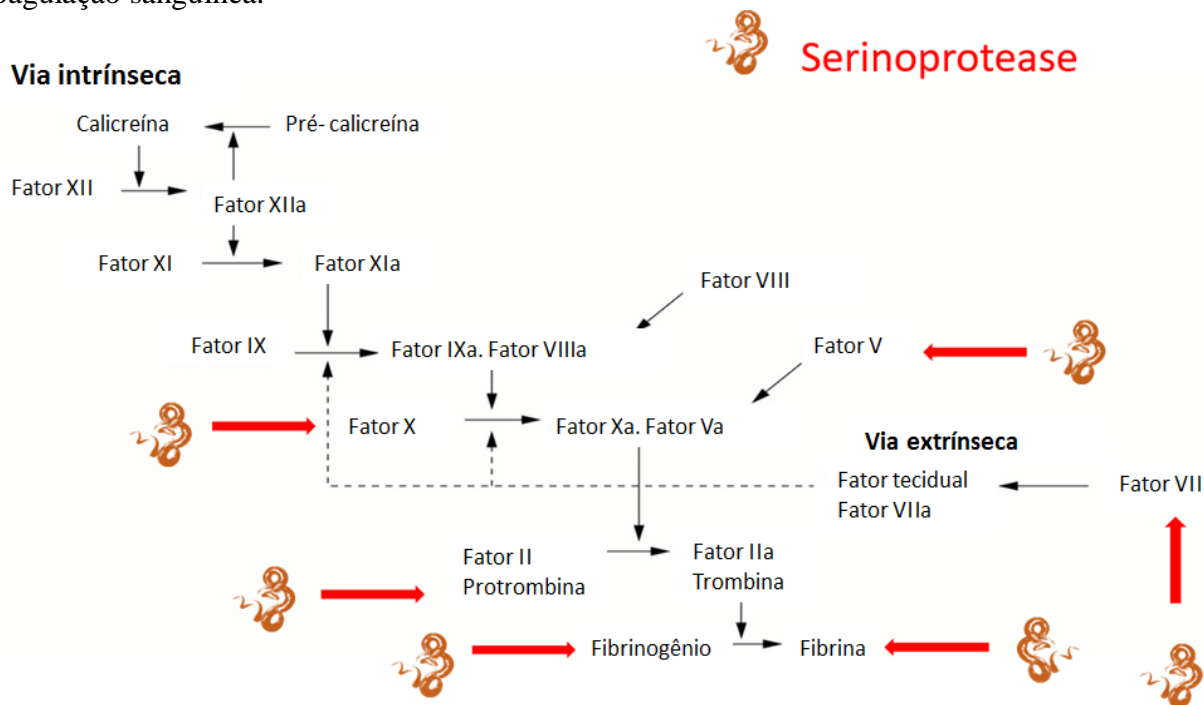
As vias de cicloxigenase e lipoxigenase são as duas principais vias enzimáticas na conversão do ácido araquidônico em lipídeos bioativos. Em condições normais, esses lipídeos desempenham papéis importantes na função sináptica, regulação do fluxo sanguíneo cerebral, apoptose, angiogênese e expressão gênica, além de atuarem como hormônios em inúmeros processos fisiológicos. Porém em concentrações elevadas podem acarretar uma série de condições patológicas, tais como isquemia, epilepsia, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, além de produzirem neuroinflamação envolvendo vasodilatação e vasoconstrição, agregação plaquetária e estresse oxidativo (PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006). O principal papel dos eicosanóides é amplificar ou reduzir a inflamação, coordenando o recrutamento de leucócitos, citocinas e produção de quimiocinas, formação de anticorpos, proliferação e migração e apresentação de antígenos (CHIURCHIU; MACCARRONE, 2016).

Atividades catalíticas elevadas de fosfolipases foram encontradas no líquido sinovial de pacientes que sofreram com artrite reumatoide, osteoartrite e artrite associada à presença de cristais. Quantidades subnormais persistentes da atividade e concentração de fosfolipases têm sido relatadas em pacientes com esclerose sistêmica (NEVALAINEN, 1993; STEFANSKI et al., 1986). Além do seu papel bem estabelecido na inflamação, os eicosanóides também têm funções homeostáticas que variam desde a regulação do extravasamento vascular e formação de barreiras, até a integridade da mucosa (CHIURCHIU; MACCARRON, 2016).

Já as proteases são responsáveis por alguns efeitos locais e sistêmicos do envenenamento, sendo capazes de promover a hidrólise das proteínas fibrinogênio e fibrina, o que resulta na incoagulabilidade do sangue e na fibrinólise, respectivamente (COSTA et al., 2010). Essas enzimas também podem atuar sobre diversos substratos proteicos exercendo ação sobre componentes de membranas celulares, proteínas sanguíneas, teciduais e aquelas que compõem a lâmina basal (ex: laminina, fibronectina e colágeno) (BALDO et al., 2010; MARKLAND JR; SWENSON, 2013). Entre as proteases destacam-se as serinoproteases que atuam de forma seletiva sobre fatores da cascata de coagulação, com efeito na agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação, e as metaloproteases, que são responsáveis por hemorragias, mionecrose e danos teciduais contribuindo para a perda de função ou amputação do membro atingido e inflamação local (GUTIÉRREZ et al., 2010).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes são amplamente caracterizadas quanto às suas ações sobre o sistema hemostático. Possuem massa molecular entre 26-67 kDa que varia de acordo com o conteúdo de carboidratos associados a ela (SERRANO, 2005). Essas enzimas apresentam um perfil farmacológico altamente diversificado, o que inclui ações sobre as proteínas da cascata de coagulação, tais como a atividade do tipo trombina sobre o fibrinogênio, a ativação do fator V e da proteína C, a fibrinogénólise, a ativação do plasminogênio e a indução da agregação plaquetária. Por atuarem diretamente na conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem o envolvimento da trombina endógena, as serinoproteases são geralmente conhecidas como trombina símile ou thrombin-like (MARKLAND, 1998; SERRANO, 2005). Na figura 1 estão apresentados os locais de ação das serinoproteases, descritos em literatura.

Figura 1 - Locais de atuação de serinoproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.

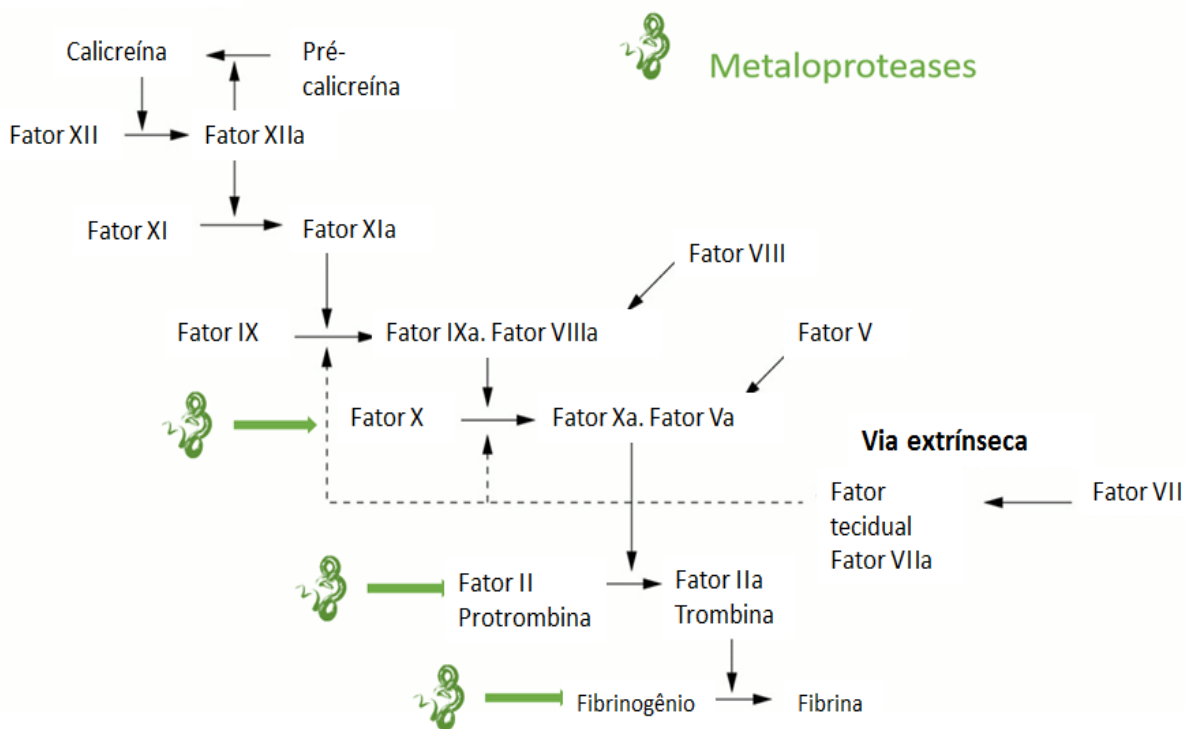


Fonte: Cesar, 2016, adaptado de Serrano, 2013.

As metaloproteases de peçonhas de serpentes participam do processo hemorrágico pela degradação de componentes da membrana basal da microvasculatura envolvida na manutenção da estrutura e integridade capilar, levando a ruptura de redes capilares, edema e hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2010; KINI; KOH, 2016). Possuem dois locais característicos de ação no sistema hemostático. O primeiro é sobre o Fator X, o qual é prontamente convertido em Fator Xa (forma ativada), promovendo uma ação coagulante. O segundo local é sobre a protrombina, convertendo-a em sua forma ativada, a trombina (Figura 2).

Figura 2 - Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.

Via intrínseca



Fonte: Cesar (2016), adaptado de Serrano (2013) e Markland Jr e Swenson (2013).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos (Zn^{2+}) para exercerem sua função catalítica. Dividem-se em três classes principais (P-I a III) de acordo com a presença de diferentes domínios, sendo que a classe P-I apresenta apenas um domínio metaloprotease, P-II apresenta domínio metaloprotease e desintegrina, P-III possui domínio metaloprotease, desintegrina e outro rico em cisteína. Possuem massas moleculares que variam de 25 kDa à valores um pouco maiores que 100 kDa (FOX; SERRANO, 2008; GUTIÉRREZ et al., 2010). Essas enzimas apresentam atividade fibrinogenolítica, dessa forma, são susceptíveis a serem utilizadas no tratamento da trombose, uma vez que diminuem o fibrinogênio e solubilizam os coágulos de fibrina, além de serem promissoras ao tratamento de doenças cardiovasculares, que é a maior causa de mortalidade no mundo (COSTA et al., 2010; JACOB-FERREIRA et al., 2016; MARCUSSI et al., 2007). Medicamentos a base de moléculas sintetizadas de peçonhas de serpentes já foram descritos, sendo alguns muito utilizados na atualidade. Entre tais medicamentos estão o Viprinex (Ancrod), um anticoagulante, isolado da serpente *Agkistrodon*

rhodostoma (NOLAN, HALL e BARLOW, 1976); o Captopril, um dos anti-hipertensivo mais usados no Brasil, que é isolado do veneno da *Bothrops jararaca* (ONDETTI et. al. 1971).

Em adição, proteases presentes nas peçonhas de serpentes apresentam funções enzimáticas similares às proteases endógenas humanas, principalmente as atuantes nos processos de coagulação e agregação de plaquetas. Assim, diversos trabalhos relatam a ação dessas enzimas sobre células e moléculas que compõem o sistema hemostático (BERNARDONI et al., 2014, BRAUD; BON; WISNER, 2000, GAY et al., 2005; KINI; KOH et al., 2016), alterando a coagulação sanguínea e conseqüentemente interferindo na hemostasia (SERRANO, 2005; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

Dessa forma, a alta seletividade destas proteínas atuando sobre os fatores individuais da coagulação sanguínea, as destaca como ferramentas potencialmente úteis para estudar os mecanismos de ação, a regulação e as relações estrutura-função dos fatores de coagulação na presença de diferentes compostos, possibilitando a caracterização de compostos aplicáveis na terapêutica de doenças humanas.

2.3 Moduladores enzimáticos de origem natural

O conceito biológico de modulador enzimático diz respeito à substância que é capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou acelerando o processo ou a especificidade biológica de uma dada reação (PALMER, 1991). Assim, em diferentes contextos patológicos, podem ser observadas supressão de genes ou superexpressão de genes, colocando os moduladores enzimáticos como controladores de sinais, sintomas, regressão e até mesmo cura de diversas doenças.

Diversos inibidores naturais de proteases já foram isolados de plantas e animais, a fim de serem utilizados no controle de processos patológicos específicos, tais como trombose, hemorragia e câncer (MARQUES et al., 2019), porém os mecanismos de interações entre enzimas e compostos naturais são pouco descritos. A maioria dos moduladores enzimáticos naturais descritos em literatura atuam de forma reversível, por meio de interações transientes, como, por exemplo, interações de hidrogênio e hidrofóbicas, que podem ocorrer entre o modulador e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima ou de outras regiões da enzima, alterando sua conformação espacial e interferindo nas interações com o substrato (MARCUSSE et al., 2019). Alguns inibidores atuam como quelantes de metais, sequestrando ou formando

complexos com íons que são cofatores essenciais para a atividade catalítica das enzimas, podendo também interferir em outras atividades biológicas dependentes da atividade catalítica (MARQUES et al., 2019; CESAR et al., 2019; CARDODO et al., 2019)

Outra classe amplamente explorada de inibidores enzimáticos são os de fosfolipases A_2 , pois, quando em condições patológicas, essas enzimas aumentam os níveis de ácidos graxos e lisofosfolipídeos, como resultado de sua ação catalítica (ONG et al., 2015), alimentando as vias de produção de moléculas pró-inflamatórias. Os primeiros inibidores descritos, fosfolipídeos análogos aos usados por cada grupo de fosfolipase A_2 , foram isolados de produtos marinhos (DENNIS, 1987). No decorrer dos anos, inibidores de amida, indol e ultimamente a Varespladibe metila ou A-002, tem sido alvo de pesquisas a fim de encontrar um inibidor mais específico para cada família de fosfolipase A_2 . Os vegetais correspondem a maior, e mais explorada cientificamente, fonte de inibidores de fosfolipases, sendo descritos alguns metabólitos primários, e diversas classes de metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos, entre eles: flavonóides, cumestanos e alcalóides, esteróides, terpenóides e polifenóis (CARVALHO et al., 2013).

Uma maneira de explorar possíveis novos inibidores enzimáticos é por pesquisas realizadas através do uso de peçonha de serpentes como substrato. Devido à variedade de efeitos tóxico-farmacológicos que as enzimas de peçonhas de serpentes induzem, e ao alto grau de homologia estrutural e funcional que muitas delas apresentam em relação às enzimas humanas, associadas a processos fisiopatológicos, em especial nos parâmetros hemostáticos, as peçonhas de serpentes configuram valiosas ferramentas de pesquisa para a caracterização de moduladores enzimáticos, auxiliando na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos.

2.4 Hemostase vascular e proteases

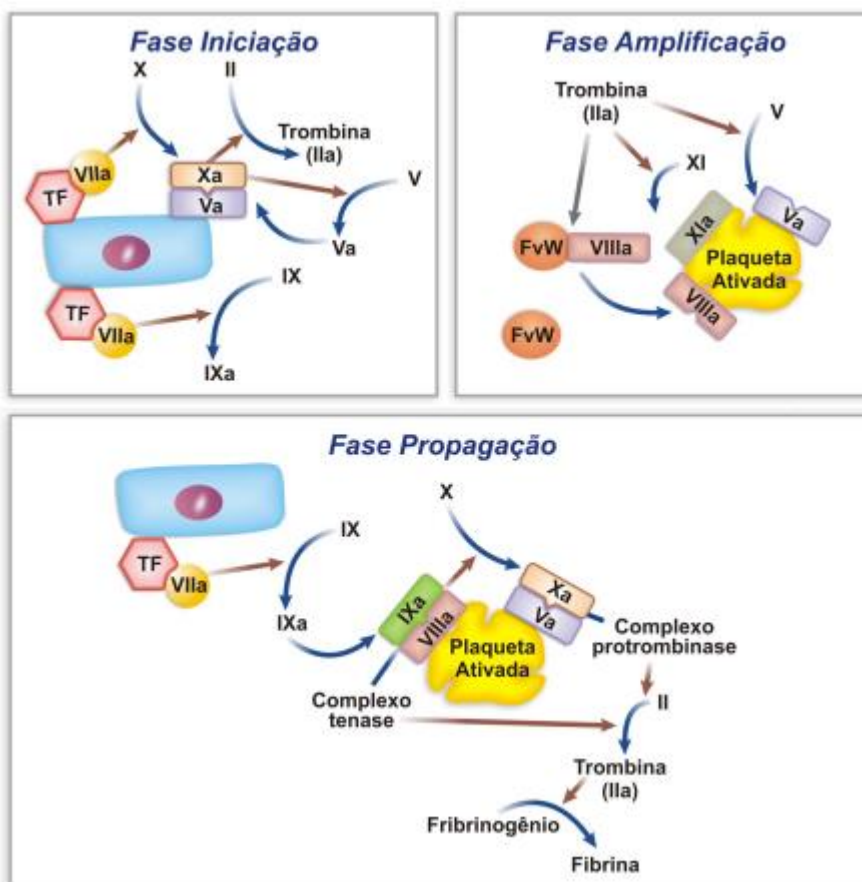
Distúrbios do sistema cardiovascular são uma das principais causas de morbidades e mortalidade das últimas décadas, sendo responsáveis pela morte de milhões de pessoas anualmente (LOZANO et al. 2012). Assim, a manutenção da hemostase vascular torna-se um importante aliado para a continuidade de uma boa saúde e qualidade de vida. Doenças cardíacas como infarto do miocárdio, hipertensão arterial e isquemia cardíaca estão frequentemente relacionadas a perturbações da hemostase (LU et al. , 2007), reforçando sua importância.

Dos elementos que mantêm a regularidade vascular, as plaquetas e a cascata de coagulação ganham destaque. Eles gerenciam a hemostase por meio da formação e dissolução de coágulos, evitando assim a perda de sangue e mantendo seu fluxo para o organismo, no caso da formação dos coágulos, e evitando embolias e infartos quando se trata da dissolução deles (ENGELMANN e MASSBERG, 2013). É a hemostase que mantém a integridade do sistema circulatório quando há avarias, porém, se esse mecanismo é ativado de forma exacerbada, doenças como trombozes e embolias podem vir a acontecer (ESMON, 2009).

O metabolismo animal possui defesas para a não formação de trombos, quando os mesmo não são necessários, através dos chamados trombo-reguladores, sendo eles: óxido nítrico e prostaciclina (IGNARRO, 1987). Contudo, quando há lesão na parede do vaso e o endotélio perde sua integridade, o colágeno e o fator tecidual (cofator do fator VII) que estavam na matriz subendotelial são expostos ao fluxo sanguíneo, o que dispara a cascata de coagulação. O colágeno atuará na indução de agregação plaquetária, enquanto que o fator tecidual atuará na geração de trombina, resultando na conversão de fibrinogênio em fibrina insolúvel e recrutamento de mais plaquetas, dando assim, estabilidade ao coágulo (FURIE e FURIE, 2008). A cascata de coagulação também pode ser ativada por componentes intravasculares, nesse caso o fator tecidual não participa, iniciando então no fator XII (FRANCO, 2001). No entanto, embora as vias de ativação da cascata de coagulação se iniciem em pontos diferentes, ambas convergem na ativação do fator X da cascata, culminando no mesmo resultado.

O modelo da cascata de coagulação sanguínea foi proposto inicialmente em 1964, dividindo as reações enzimáticas em dois sistemas distintos, a via intrínseca e extrínseca. Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca de coagulação são mediadas por diversas proteases (COLMAN et al., 2001). Essas enzimas tem a capacidade de converter seus respectivos substratos em cofatores da cascata de coagulação, colaborando assim para o prosseguimento dela até a formação do trombo. Porém, esse modelo foi atualmente substituído por um novo modelo (Figura 3) para esclarecer melhor a hemostasia (HOFFMAN; MONROE, 2001).

Figura 3 - Novo modelo da cascata de coagulação sanguínea.



Fonte: Adaptado de Hoffman e Monroe (2001).

O último estágio da hemostase é a dissolução dos trombos e coágulos, e isso acontece através do sistema fibrinolítico. A fibrinólise funciona com base em transformar o plasminogênio em plasmina, e essa plasmina ativa quebrará a fibrina e ativará as metaloproteínas, dissolvendo o produto final da cascata de coagulação (FRANCO, 2001), e para isso é necessário à presença de enzimas séricas e inibitórias. Para que haja a conversão de plasminogênio em plasmina, os ativadores de plasminogênio, tanto do tipo tecidual quanto do tipo uroquinase, precisam hidrolisar uma parte específica da proteína, dando origem a seriprotease ativa (plasmina). Contudo, a plasmina tem a capacidade de degradar não só a fibrina, mas também o fibrinogênio, o fator V e o fator VII da cascata de coagulação, mas, em condições fisiológicas normais não é comum que esses outros alvos sejam afetados.

Serinoproteases e metaloproteases atuam na cascata, podendo agir durante a ativação da cascata, mas também no final dela, dissolvendo trombos, coágulos e redes de fibrinas (FRANCO,

2001). Devido ao seu poder regulatório e essencial para a formação e dissolução dos coágulos e trombos, substâncias que modulam as proteases são frequentemente utilizadas como medicamentos antitrombóticos e anticoagulantes (CHOI et al., 2013). Como exemplo tem-se medicamentos de primeira geração de fibrinolíticos a base de uroquinases e estreptoquinases, nos quais as proteases são utilizadas como ferramentas proteolíticas para a quebra das redes de fibrinas e redução dos trombos, agindo como ativadoras do plasminogênio (ELLIS e BRENER, 2004). Tais medicamentos de primeira geração ativam não só o plasminogênio circulante, mas também os ligados à fibrina, não sendo fibrino-específico, acarretando em mais efeitos colaterais (BARUZZI, STEFANINI e MANZO, 2018).

Também é possível encontrar medicamentos a base de anistreplases e alteplases, que também agem como fibrinolíticos semelhantes aos citados anteriormente, porém, estes são considerados agentes de segunda geração, induzindo menos efeitos adversos por seu uso (ELLIS e BRENER, 2004), pois além de ser fibrino-específico, a molécula sintetizada tem a mesma estrutura da encontrada no endotélio humano (BARUZZI, STEFANINI e MANZO, 2018). Assim, é possível reforçar a importância dos estudos sobre os diversos tipos de proteases, assim como de seus mecanismos de ação, considerando o poder regulatório que elas exercem sobre a hemostasia e o grande interesse farmacêutico sobre sua modulação. Atualmente, também é possível encontrar fibrinolíticos de terceira geração, os quais derivam de alterações nos de segunda geração, aumentando sua meia-vida e especificidade (BARUZZI, STEFANINI e MANZO, 2018).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as fontes naturais para obtenção de moduladores enzimáticos, os microrganismos se destacam, pois os metabólitos produzidos por estes podem ser obtidos em grandes quantidades, de forma mais fácil e rápida, quando comparados a fontes vegetais, além de serem passíveis de manipulação genética para agregação de genes de interesse farmacêutico (MANDER et al., 2011). Dessa forma, estudos que envolvam microrganismos produtores de compostos bioativos com capacidades anticoagulante, fibrinolítica e trombolítica são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Em adição, o potencial modulador exercido por muitos

desses compostos sobre enzimas, configura várias linhas de pesquisa com possibilidade de desenvolvimento de produtos agropecuários, cosméticos e farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

- ALI, L. et al. Sorokiniol: a new enzymes inhibitory metabolite from fungal endophyte *Bipolaris sorokiniana* LK12. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 103, 2016.
- ALVES, N. M. et al. Production and partial characterization of an extracellular phytase produced by *Muscodor* sp. under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 23-32, 2016.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.
- BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis.
- BARUZZI, A. C. do; STEFANINI, E.; MANZO, G. Fibrinolíticos: indicações e tratamento das complicações hemorrágicas. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 421-427, 2018.
- BERNARDONI, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109651, 2014.
- BOPARAI, J. K.; SAXENA, S.; MESHAM, V. *In vitro* antimicrobial potential of Indian *Muscodor* species. **Journal of Basic and Applied Mycology**, v. 11, p. 22-25, 2015.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.
- CARDOSO, M. G. B. et al. *Lecanicillium aphanocladii*: snake venom phospholipases A2 and proteases as tools to prospect enzymatic inhibitors. **Letters in applied microbiology**, v. 69, n. 2, p. 88-95, 2019.
- CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- CESAR, P. H. S et al. Molecular interactions between p-coumaric acid and snake venom toxins. **Journal of cellular biochemistry**, 2019.

- CHEN, J. J.; FENG, X. X.; XIA, C. Y. et al. Confirming the phylogenetic position of the genus *Muscodor* and the description of a new *Muscodor* species. **Mycosphere**, v. 10, n. 1, p. 187-201, 2019.
- CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M.. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Current opinion in pharmacology*, v. 29, p. 54-62, 2016.
- CHOI, Bong-Suk et al. Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 609-622, 2013.
- COLMAN. R.W.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N.; HIRSH, J. & MARDERV, J. Overview of hemostasis. In: COLMAN RW; HIRSH J;MARDER VJ; CLOWES AW & GEORGE JN, eds. Hemostasis and thrombosis. **Basic principles and clinical practice**,4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3-16, 2001.
- COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DEARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.
- DAVID, W. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5, 2009.
- DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.
- DENNIS, E. A. Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. **Bio/technology**, v. 5, n. 12, p. 1294, 1987.
- ELLIS, K.; BRENER, S. New fibrinolytic agents for MI: as effective as current agents, but easier to administer. **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 71, n. 1, p. 20-39, 2004.
- ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 34, 2013.
- ESMON, C. T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. **Blood reviews**, v. 23, n. 5, p. 225-229, 2009.

- ESMON, C. T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. **Blood reviews**, v. 23, n. 5, p. 225-229, 2009.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 34, n. 3/4, p. 229-237, 2001.
- FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 9, p. 938-949, 2008.
- GAY, C. C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 546-554, 2005.
- GUPTA, M.; MESHAM, V. **The biological promises of endophytic *Muscodor* species**. In: Fungi and their role in sustainable development: current perspectives. Springer, Singapore, 2018. pp. 51-74.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective?. **Toxicon**, v. 55, p. 166-170, 2010.
- HAM, J-J; BAO, L.; HE, L-W et al. Phaeolschidins A–E, five hispidin derivatives with antioxidant activity from the fruiting body of *Phaeolus schweinitzii* collected in the Tibetan plateau. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1448–1453, 2013.
- HOFFMAN, M.; MONROE III, Dougald, M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 85, n. 06, p. 958-965, 2001.
- HONGSANAN, et al. Fungal Biodiversity Profiles 11-20. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 36, p. 355-380, 2015.
- IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.
- JACOB-FERREIRA, A. L. et al. Evaluation of the in vivo thrombolytic activity of a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom using a model of venous thrombosis. **Toxicon**, v. 109, p. 18-25, 2016.

- KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS journal**, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.
- KAPOOR, N. & SAXENA, S. Xanthine oxidase inhibitory and antioxidant potential of Indian *Muscodor* species. **3 Biotech**, v. 6, p. 248, 2016.
- KAPOOR, N.; GAMBHIR, L.; SAXENA, S. Secondary structure prediction of ITS rRNA region and molecular phylogeny: an integrated approach for the precise speciation of *Muscodor* species. **Annals of microbiology**, v. 68, n. 11, p. 763-772, 2018.
- KIM, K.S.; CUI, X.; LEE, D. S. et al. Anti-inflammatory effect of neoechinulin A from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the suppression of NF- κ B and p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13245–13259, 2013.
- KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 284, 2016.
- LI, Y.; SHUANG, J. L.; YUAN, W. W.; HUANG, W. Y.; TAN, R. X. Verticase: a fibrinolytic enzyme produced by *Verticillium* sp. Tj33, an endophyte of *Trachelospermum jasminoides*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 11, p. 1548–1554, 2007.
- LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, 2012.
- LU, F. et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. **Current microbiology**, v. 54, n. 6, p. 435, 2007.
- MANDER, P. et al. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. *Process biochemistry*, v. 46, n. 7, p. 1449-1455, 2011.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- MARQUES, T. R. et al. Jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) skin extracts as inhibitors of phospholipases A₂ and proteases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, 2019.
- MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, 2011.

- MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Snakebite in sheep. **Veterinary and human toxicology**, v. 37, n. 1, p. 62-63, 1995.
- MESHARAM, V.; SAXENA, S. Potential fibrinolytic activity of an endophytic *Lasiodiplodia pseudotheobromae* species. **3 Biotech**, v. 6, p. 114, 2016.
- MESHARAM, V.; SAXENA, S.; PAUL, K. Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1502-1511, 2016.
- MONTEIRO, M. C. P. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 2, 2017.
- NAIK, B. S. Volatile hydrocarbons from endophytic fungi and their efficacy in fuel production and disease control. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 69, 2018.
- NEVALAINEN, T. J. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2453-2459, 1993.
- NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. H. [17] Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. In: Methods in Enzymology. **Academic Press**, 1976. p. 205-213.
- ONDETTI, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, n. 22, p. 4033-4039, 1971.
- ONG, W-Y. et al. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A₂: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. **ACS chemical neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 814-831, 2015.
- OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 113-128, 2010.
- PALMER, J. D. Plastid chromosomes: structure and evolution. **The molecular biology of plastids**, v. 7, p. 5-53, 1991.
- PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain research reviews**, v. 52, n. 2, p. 201-243, 2006.

- SERRANO, S. M.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C.; FOX, J. W.; A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, V. 5, p. 501-510, 2005.
- STEFANSKI, E. et al. Purification of a soluble phospholipase A₂ from synovial fluid in rheumatoid arthritis. **The Journal of Biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1297-1303, 1986.
- STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- STROBEL, G. *Muscodor Albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 514, 2006.
- STROBEL, G. *Muscodor* species – Endophytes with biological promise. **Phytochemistry**, v. 10, n. 2, pp. 165-172, 2011.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.
- TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.
- TANAPICHATSAKUL, C. et al. Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. **PeerJ**, v. 7, p. e6427, 2019.
- WORAPONG, J.; STROBEL, G.; FORD, E. J.; LI, J. Y.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, v. 79, p. 67-79, 2001.
- WU, B.; WU, L.; RUAN, L.; GEI, M.; CHEN, D. Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPCC480097. **Current Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 522-527, 2009.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade biológica de extratos de fungos endofíticos

Pesquisador: Patricia Gomes Cardoso

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60767417.0.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.442.278

Apresentação do Projeto:

Os fungos filamentosos têm atraído interesse de grupos de pesquisadores e indústrias devido ao seu potencial para produção de moléculas com aplicações biotecnológicas. Fungos endofíticos habitam interior de vegetais sem causar danos, podendo conferir proteção contra insetos-pragas, outros microrganismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Também podem produzir diversas enzimas, toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico. Alguns fungos podem inibir atividade de determinadas enzimas como fosfolipases e proteases. As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas de interesse médico científico e são componentes essenciais de alguns fármacos. Elas desempenham importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Já as proteases ou peptidases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, esse processo é chamado de clivagem proteolítica, um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvido principalmente na digestão e na coagulação sanguínea. Neste contexto, pesquisas que visam avaliar a ação dos metabólitos secundários de fungos endofíticos sobre a ação de enzimas de interesse humano, são de grande relevância na busca de modelos para novos agentes biotecnológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica* selvagem, quanto a

Endereço: Campus Universitário Cx. Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufes.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 2.442.275

suas potenciais atividades fosfolipásica, hemolítica, trombolítica e proteolítica assim como avaliar sua ação inibidora sobre estas atividades, com foco na inibição de fosfolipases A2 e proteases que compõem algumas peçonhas ofídicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue poderá causar algumas pequenas manifestações no local da injeção, como um pequeno inchaço, vermelhidão ou formação de mancha roxa, ou seja, sinais comuns em coletas rotineiras de sangue e de baixo risco à saúde do doador.

Benefícios:

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes à dissertação do aluno Mauro Guilherme Barros Cardoso, no qual se pretende obter informações sobre as atividades exercidas por compostos fúngicos sobre células e moléculas presentes em sangue humano assim como sobre diferentes enzimas com atividades que simulam as existentes no organismo humano. Assim, de forma indireta poderão ser beneficiados pela geração de conhecimento científico sobre a funcionalidade de compostos fúngicos que poderão futuramente ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos e/ou cosméticos de utilização humana.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa da área básica, relevante e metodologicamente bem estruturada. Os benefícios, em termos de geração de conhecimento, superam os riscos de coleta de sangue em um pequeno número de voluntários. A pesquisa será conduzida *in vitro* e não *in vivo*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados e adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e efeitos adversos quando houver.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRPICOEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3820-5182

E-mail: cep@nintec.ufes.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 2.442.278

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1042855.pdf	05/12/2017 14:31:48		Aceito
Outros	Comentarios.doc	05/12/2017 14:31:25	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	05/12/2017 14:30:38	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao.jpg	01/12/2017 14:56:50	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao.doc	01/12/2017 14:56:15	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMauro.docx	01/12/2017 14:49:54	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	01/12/2017 14:49:42	Patricia Gomes Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Mauro2017.doc	01/12/2017 14:49:28	Patricia Gomes Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LAVRAS, 15 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Glancarta Aparecida Botelho Santos
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Cx. Postal 3037

Bairro: PRPYCOEP

CEP: 37.200-000

UF: MG Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufes.br

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO: ELABORADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA
REVISTA LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY (QUALIS B1) – (versão
preliminar)**

Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial do periódico poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

ARTIGO 1

ENZYMATIC MODULATORS PRODUCED BY *Muscodor* spp. FUNGI

Significance and Impact of the Study: In this study, secondary metabolites synthesized by *Muscodor* spp. endophytic fungi, isolated from coffee plants, demonstrated modulating action on proteases and phospholipases A₂ present in snake venoms of the *Bothrops atrox*, widely used as tools for the study of pathophysiology processes related to haemostasis and inflammation. The results suggest the possibility of future applications for these metabolites in the study of processes related to hemostasis and inflammation and in development of pharmaceuticals of medical scientific interest.

ABSTRACT

In the present work, extracts from the culture of endophytic fungi isolated from coffee, *M. coffeanum* and *M. yucatanensis*, were prospected in enzyme modulation tests that act in human hemostasis. The dry extracts of fungi were diluted in Dimethylsulfoxide p.a., 99.9% (DMSO) and then tested, in which *Bothrops atrox* venom was used as an enzyme source and tool to induce the activities. Prior to the evaluation of the activities, incubations of the extracts with the venom were performed in the proportions 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; mass: mass). The extracts of all fungi promoted a significant increase in the clotting time induced by the venom. The activity of phospholipases A₂ did not change significantly when evaluated in the presence of

fungal extracts. However, the inhibition of proteases by the evaluated extracts was observed in the thrombolytic and caseinolytic tests, with percentages of inhibition of up to 73% and 30%, respectively. In addition, the extracts did not induce cytotoxicity on erythrocytes. Thus, it is possible to suggest the presence of specific interactions between molecules present in extracts and venom proteases, highlighting the extracts as promising sources of compounds of medical and scientific interest.

Keywords: Endophytic fungi, *Muscodor yucatanensis*, *Muscodor coffeanum*, secondary metabolites, protease inhibitors, blood clotting.

Introduction

Metabolites produced by endophytic fungi with applications in the agriculture and pharmaceutical industry have been widely explored. Peptides, alkaloids, steroids, phenolics, terpenoids, lignans and eugenol stand out as the most important synthesized metabolites already described in the literature. They may have biological activities such as antimicrobial (Tanapichatsakul *et al.* 2019), antiviral (Ali *et al.* 2017), antifungal, cytotoxic, immunosuppressive, antiparasitic (Demain and Sanchez 2009), antioxidant (Ham *et al.* 2013), and anti-inflammatory (Kim *et al.* 2013).

The endophytic fungi from the genus *Muscodor* have aroused interest for their potential of synthesis of bioactive compounds. Due to the volatile antimicrobials belonging to five general classes of organic substances (acids, alcohols, esters and lipids), the potential of these fungi is reported in agriculture (Strobel 2001; Strobel *et al.* 2011; Monteiro *et al.* 2017), in the production of enzymes (Alves *et al.* 2016), and in the production of biofuels (Naik, 2018). However, its

metabolites also comprise other relevant molecules such as lipopeptides and glycolipids for the manufacture of pharmaceutical products (Tanapichatsakul *et al.* 2019, Gupta and Meshram 2018; Kapoor and Saxena 2016). Kapoor and Saxena (2016) described a potent antioxidant activity for the extract obtained from *Muscodor indica* and the inhibitory action on xanthine oxidase (main enzyme responsible for the production of uric acid) of an extract obtained from the fungus *Muscodor darjeelingensis* to development of alternatives for the control of hyperuricemia and diseases related to oxidative stress.

The endophytic fungus *Xylaria curta* belongs to the same family of the genus *Muscodor*. It has been described as producer of the enzyme xilarinase, a fibrinolytic metalloprotease extracted from the culture filtrate, which can be used as a new anticoagulant enzyme (Meshram, Saxena and Paul 2016). Other endophytic fungi also have fibrinolytic potential, such as *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Meshram and Saxena, 2016), *Verticillum* sp. (Li *et al.* 2007), and *Fusarium* sp. (Wu *et al.* 2009a). Therefore, species of the genus *Muscodor* can be sources of new bioactive molecules with potential application in the pharmaceutical industry.

Protease inhibitors can be found as one of the molecules present in fungal extracts. Proteases, especially serine proteases and metalloproteases, help in hemostasis by acting during the activation and at the end (dissolving thrombi, clots, and fibrin networks) of blood's coagulation cascade (Franco, 2001). Due to its regulatory activity in the formation and dissolution of clots and thrombi, substances that modulate proteases are often used as antithrombotic and anticoagulant drugs (Choi *et al.* 2013).

Phospholipase A₂ inhibitors, which also may be present in fungal extracts, are molecules of great importance in hemostatic modulation. This is because phospholipases A₂ are capable of promoting an intense toxic activity (Dennis *et al.* 2011), resulting mainly from their catalytic activity on membrane phospholipids, which leads to structural breakdown, alteration in the flow

of ions behind the membranes, activation of endogenous phospholipases of cells, or even cell death. In addition, the breakdown of phospholipids can result in the release of arachidonic acid, which is a precursor to eicosanoids via cyclooxygenase and lipoxygenase pathways and, therefore, causing changes in hemostasis and inflammatory responses (Marcussi *et al.* 2011).

Several natural inhibitors of proteases and phospholipases A₂ have already been isolated from plants and animals to be used in the control of various pathological processes, such as thrombosis, hemorrhage, and cancer (Marques *et al.* 2019). The extract produced by a fungus isolated from caves in Brazil, *Lecanicillium aphanocladii*, promoted an increase in plasma clotting time, induced by snake venom (Cardoso *et al.* 2019). Most of the natural enzymatic modulators described in literature act reversibly through transient interactions, such as hydrogen and hydrophobic interactions (Marcussi *et al.* 2019). Other inhibitors act as metal chelators, sequestering or forming complexes with ions, which are essential cofactors for the catalytic activity of enzymes. They may also interfere with other biological activities that depend on the catalytic activity (Marques *et al.* 2019; Cesar *et al.* 2019; Cardoso *et al.* 2019).

However, with the exception of volatile metabolites with antimicrobial activity, other classes of metabolites have not been properly explored yet (Kapoor and Saxena, 2016). Soluble molecules produced during growth of the fungus, that are released into the environment, for example, constitute an important source of compounds with pharmacological properties and, therefore, are promising for the development of pharmaceutical products. Thus, in the present study was investigated the presence of enzymatic modulators in extracts of *Muscodor* spp. that may have potential activity on parameters that assist in the maintenance of human hemostasis. For this purpose, snake venom enzymes were used to induct the effects and evaluate the action potential of fungal compounds in the human body, since these enzymes have high structural and functional homology with human enzymes.

Results and Discussion

Evaluation of fungal extracts effects on the coagulation of citrated human plasma induced by enzymes present in the snake venom (previous incubation of the extracts with the venom)

Metabolites present in the extracts of the fungi *M. coffeanum* (CML 4009, CML 4010 e CML 4020) and *M. yucatanensis* (CML 4016) increased the clotting time of the citrated plasma when previously incubated with the venom, in most proportions evaluated (Table 1). However, the extract of the fungus CML 4020, in the proportion 1: 0.1, showed a pro-coagulant activity by reducing the observed clotting time by half when compared to the positive control (6 µg of snake venom). This same extract, however, was also the one that demonstrated the greatest inhibition effect of venom-induced clotting, prolonging the clotting time by 105 seconds when evaluated in the proportion of 1: 0.5.

Considering the presence of several bioactive components in fungal extracts (Ali *et al.* 2016; Kapor and Saxena 2016), the data obtained in our work suggest that the increase in plasma coagulation time, as well as the pro-coagulant action, may be resulting of weak and reversible interactions of compounds present in the extracts with the coagulant proteases present in the venom. In addition, at some point they may have enhanced the action of hemorrhagic proteases. As these are mixtures containing varied molecular structures and in unknown quantities, the molar ratios that can interact and change the evaluated activity may be random between the doses evaluated; this is well observed in the effect variation (inhibition or potentiation) resulting from the evaluation of the CML 4020 extract.

Table 1 Coagulation activity induced by *Bothrops atrox* venom with previous incubation of the fungal extracts with the venom and fungal extracts with citrated plasma

Samples	Clotting time (seconds)				
	Without extract	venom: fungal extract (w: w) ratio			
		(1:1)	(1:0.5)	(1:0.25)	(1:0.1)
Control	55±1	-	-	-	-
<i>M. coffeanum</i> CML 4009	-	88±1*	148±7*	88±2*	88±3*
<i>M. coffeanum</i> CML 4010	-	95±1*	91±2*	77±1*	76±3*
<i>M. yucatanensis</i> CML 4016	-	111±1*	100±1*	84±2*	86±2*
<i>M. coffeanum</i> CML 4020	-	111±5*	160±7*	115±11*	35±1
Samples	Without extract	venom: fungal extract with citrated plasma (w: w) ratio			
		(1:1)	(1:0.5)	(1:0.25)	(1:0.1)
Control	51±4	-	-	-	-
<i>M. coffeanum</i> CML 4009	-	219±9*	152±6*	131±3*	86±0*
<i>M. coffeanum</i> CML 4010	-	600±0*	385±2*	279±4*	146±5*
<i>M. yucatanensis</i> CML 4016	-	342±23*	173±1*	166±26*	104±8*
<i>M. coffeanum</i> CML 4020	-	482±1*	296±1*	165±2*	150±6*

Data correspond to the means and standard deviation. The tests were performed in triplicate with samples containing different proportions of venom: fungal extract (w:w). (*)Different from positive control by increasing clotting time. Because of the activation time of some factors of the coagulation cascade (e.g., the prothrombin activation time is between 10 to 14 seconds), values equal to or greater than 10 seconds in relation to the control were considered statistically significant. Control: 6 µg of *Bothrops atrox* venom.

Natural enzyme inhibitors have been widely described with inhibition mechanisms based on weak (hydrogen and/ or hydrophobic interactions) and transients interactions in different regions of the enzyme structures (e.g., active site and cofactor binding site) (Marcussi *et al.* 2019). Considering that the fungi of the genus *Muscodor* have also been reported as producers of

compounds with bioactive action (Strobel *et al.* 2004), it is likely that metabolites produced by these fungi have mechanisms of action similar to those already described for some natural compounds. The extract produced by a fungus isolated from Brazilian caves, *Lecanicillium aphanocladii*, also promoted an increase in plasma clotting time, induced by snake venom (Cardoso *et al.* 2019). Based on literature, the authors of this work suggest that the action of the molecules present in the fungus extract is through the hydrophobic interactions with the aromatic rings that make up the structure of amino acid residues present in the active site of proteases, or in other regions. Links in different regions of the active site can result in conformational changes in enzymes, with a consequent reduction in catalytic activity (Dunaevsky *et al.* 2014; Saavedra *et al.* 2018).

Evaluation of the effects of fungal extracts on the coagulation of citrated human plasma induced by enzymes present in the venom (previous incubation of the extracts with plasma)

The previous incubation of the extracts with the plasma resulted in an increase in the clotting time, induced by the venom, in comparison to the data obtained after incubation of the extracts with the venom (Table 1). This result may have occurred because the bioactive molecules of the evaluated fungi have a greater number of interactions with plasma proteins than with proteases present in the venom, making it difficult for proteolytic enzymes to access the cascade factors and, thus, delaying their activation.

In addition to the possible interactions of fungal bioactive compounds with the components of the coagulation cascade, which are made up of enzymes and proteins, it is also necessary to consider interactions of fungal compounds with anticoagulation regulators present in

the plasma, such as capture and/or formation of complexes with ions that are cofactors of the coagulation cascade and venom enzymes.

It should be noted that the possible effects of fungal extracts on the coagulation cascade depend not only on the proportion of chemical compounds present in relation to the enzymes present in the venom, but also on the type and quantity of molecules present in the different extracts, on the composition of the plasma, the incubation time of the samples, and other reaction conditions, such as pH and temperature.

Thrombin inhibitors correspond to a class of drugs that are prominent in the treatment of bleeding, in which they act on the coagulation cascade. Such inhibitors may inhibit some metalloproteases, preventing the transformation of prothrombin (Factor II) into thrombin. Thus, they reduce the action of this enzyme in fibrinogen proteolysis for the formation of fibrins, and, consequently, decrease the formation of clots and thrombi (Mehta, Jin, and Desai, 2014). To be an ideal thrombin inhibitor, it must be effective, selectively, and have an extended half-life (Sixma and De Groot, 1992).

Our results suggest a modulation of enzymes exerted by the evaluated extracts and that the compounds present in the extracts act selectively on the different classes of enzymes present in the *B. atrox* venom. Although the venom-induced effects are attributed to several enzymes that act by different mechanisms, a class of enzyme can be highlighted in each test carried out. The coagulation of citrated plasma is mainly attributed to serine proteases, which have an action similar to thrombin (Marcussi *et al.* 2019; Marques *et al.* 2019). Thus, the inhibitory action of fungal extracts on these enzymes and on the activation of prothrombin present in the plasma can be suggested, which results in the observed increases in clotting time.

Phospholipase A₂ activity

The fungal extracts, under the conditions evaluated and except for the extract of the fungus *M. coffeanum* CML4020, did not have a statistically significant inhibitory effect on phospholipases A₂ activity (Figure 1). The highest percentages of inhibition observed were 5.4%, 7.2%, and 5.4% for the *M. coffeanum* CML 4020 extract evaluated in the proportions 1: 1, 1: 0.5, and 1: 0.1, respectively.

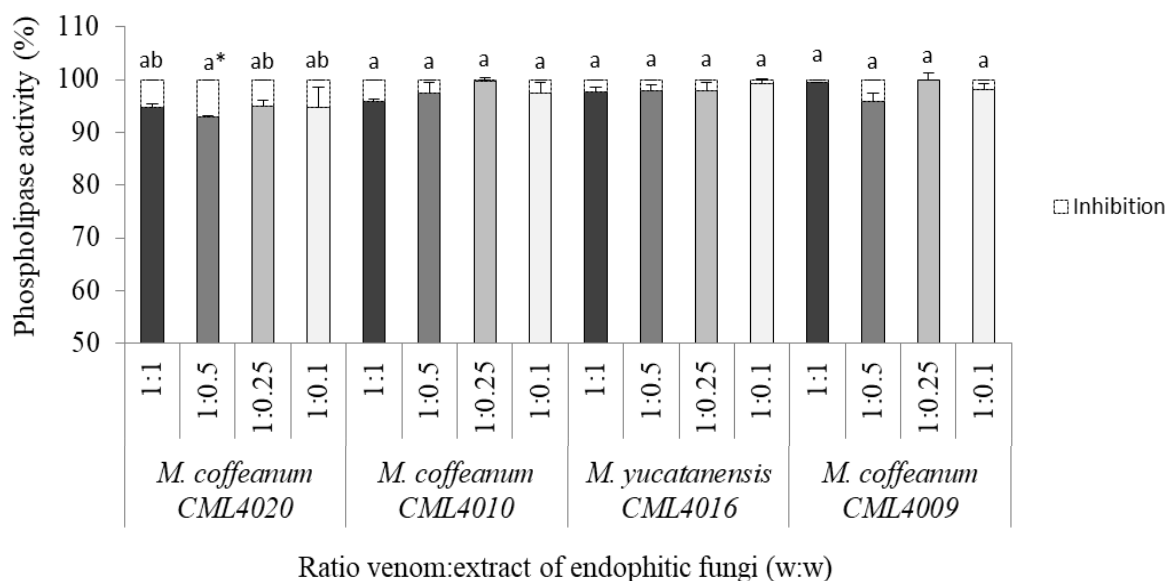


Figure 1 Phospholipase A₂ activity induced by *Bothrops atrox* venom, after the incubation with extracts from the endophytic fungi of the genus *Muscodor*. Controls containing only venom (10 µg) were considered as 100% activity. The results correspond to the average of the data obtained for each proportion (venom: extract, w: w) in triplicate, and the upper vertical bars represent the standard deviation of the samples. * The means statistically differ from the respective control. Different letters indicate that the means of the different proportions differ from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

Phospholipases A₂ comprise one of the most common classes of toxins in the composition of snake venoms, along with the various classes of proteases. They are enzymes capable of

promoting an intense catalytic activity on phospholipids, affecting the transport across biological membranes, blood clotting, inflammatory response, and hemostasis (Dennis *et al.* 2011). In addition, they may have genotoxic and mutagenic activities (Marcussi *et al.* 2011). Thus, phospholipase A₂ inhibitors are also promising molecules for the development of therapeutic agents, with possible use in the prevention, control, and treatment of pathologies associated with exacerbated inflammation. The present work highlights a potential future application for the extract of the fungus *M. coffeanum* CML4020.

Cytotoxicity test on human erythrocytes

The fungal extracts did not induce cytotoxic action on human erythrocytes, under the evaluated conditions (data not shown). Statistically significant inhibition on the cytotoxic activity exerted by the venom was only observed in the extract of *M. coffeanum* CML 4020 in the proportion of 1: 0.1, *M. coffeanum* CML 4010 in the proportion of 1: 1, and *M. coffeanum* CML 4009 in the proportions 1: 0.5, 1: 0.25, and 1: 0.1. The most prominent effect regarding the potentiation of the venom-induced hemolytic activity was observed for the extracts of *M. yucatanensis* (CML 4016) in the proportion of 1: 0.5 (62.6%) and *M. coffeanum* (CML 4009) in 1: 1 (57.6%) (Figure 2).

In the cytotoxicity test we have a more complex reaction context. Cells can undergo the action of peptides that bind to membrane-carrying proteins and thus, changing the influx of ions and the membrane potential. It can also go through the action of proteases that degrade protein membrane components, activating endogenous proteases, and phospholipase A₂ proteins that degrade membrane phospholipids. In addition, other molecules present in lesser amounts in the venom composition may also exert activities, such as biogenic amines (Costa *et al.* 2010).

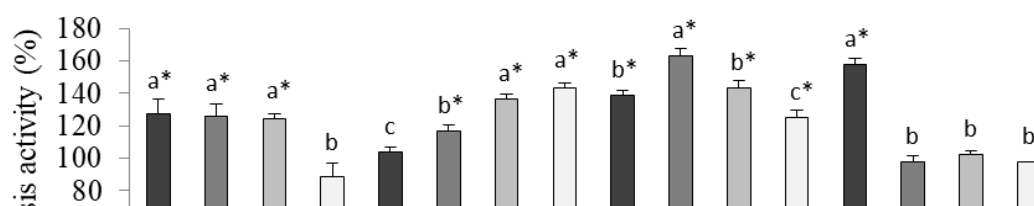


Figure 2 Hemolytic activity induced by *Bothrops atrox* venom, after the incubation with extracts from the endophytic fungi of the genus *Muscodor*. Controls containing only venom (20 µg) were considered as 100% activity. The results correspond to the average of the data obtained for each proportion (venom: extract, w: w) in triplicate, and the upper vertical bars represent the standard deviation of the samples. * The means statistically differ from the respective control. Different letters indicate that the means of the different proportions differ from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

In this context, the potentiation of the cytotoxic activity can be attributed to a variety of molecular interactions whose mechanisms are still unknown. The importance of the results obtained is in the fact that the extracts have had modulating effects on the activities induced by the venom, and have not induced activity on the molecules and cells when evaluated in the absence of the venom.

Thrombolytic test

All extracts in all proportions (except the extract of *M. coffeanum* CML 4020 at the 1: 0.25 ratio) showed a statistically significant reduction in the venom-induced thrombolytic activity (Figure 3). The extract of the fungus *M. coffeanum* CML 4009 presented the most promising result with a

73.6% inhibition in the proportion 1: 0.5. This same extract induced 25.4% of thrombolytic activity (data not shown), when evaluated in the absence of venom, demonstrating, once again (already observed in the coagulant test), the presence of interactions between compounds present in the extract and blood components, resulting in the destabilization of thrombi.

Figure 3 Thrombolytic activity induced by *Bothrops atrox* venom, after the incubation with extracts from the endophytic fungi of the genus *Muscodor*. Controls containing only venom (20 µg) were considered as 100% activity. The results correspond to the average of the data obtained for each proportion (venom: extract, w: w) in triplicate, and the upper vertical bars represent the standard deviation of the samples. * The means statistically differ from the respective control. Different letters indicate that the means of the different proportions differ from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

Thrombi dissolution mechanisms are related to fibrin degradation by the fibrinolytic system (Franco 2001). Thus, considering the results obtained, we can suggest the presence of plasminogen-activating molecules, for their conversion into plasmin, in some extracts. Fungal extracts also increased the dissolution of venom-induced thrombi. Therefore, they characterize

the action of molecules that exert positive modulation on metalloproteases, especially fibrinogenolytic, fibrinolytic, hemorrhagic, and hemolytic, in which contains disintegrating domain in its structure, according to Gutiérrez et al. (2010). This demonstrates that the selected microorganisms have a wide range of bioactive compounds, capable of acting both in the coagulation cascade (probably as protease inhibitors or through interactions with cofactors) and in the clot and thrombus dissolution system (degrading the final product of the cascade).

Proteolytic test using casein as substrate

Except for the extracts of *M. coffeanum* CML4010 and CML4009 in the ratio 1: 1, and *M. yucatanensis* CML4016 and *M. coffeanum* CML4009 in the ratio 1: 0.1, all the others showed inhibitory activity on the breakdown of casein induced by proteases present in the venom (Figure 4).

Casein represents a random protein substrate, since it is not related to the context of hemostasis. Thus, it was possible to observe that the fungal extracts are also able to inhibit proteases that act in the extracellular context, for example, in digestive and defense processes of the organism.

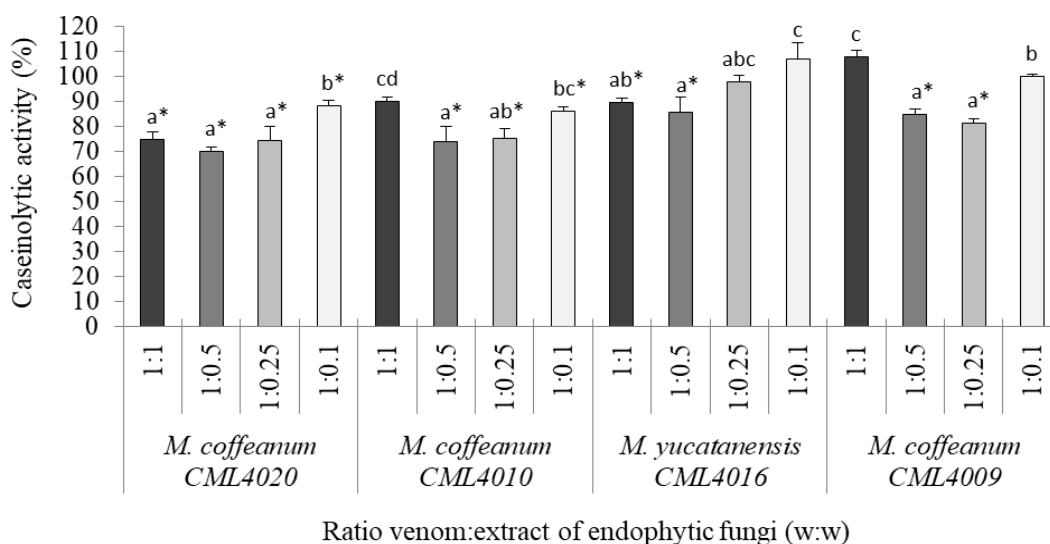


Figure 4 Caseinolytic activity induced by *Bothrops atrox* venom, after the incubation with extracts from the endophytic fungi of the genus *Muscodor*. Controls containing only venom (20µg) were considered as 100% activity. The results correspond to the average of the data obtained for each proportion (venom: extract, w: w) in triplicate, and the upper vertical bars represent the standard deviation of the samples. * The means statistically differ from the respective control. Different letters indicate that the means of the different proportions differ from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

It can be concluded by the results presented in this work that the extracts of the endophytic fungi of the genus *Muscodor* have molecules that exert modulating activity on the blood coagulation process. In addition, there is a possible mechanism of interaction with the components of the coagulation cascade and with coagulant/fibrinolytic proteases present in the *Bothrops atrox* venom. Although the inhibitory effect of fungal extracts was less on the enzymatic activity of phospholipases A₂, the data indicate the presence of inhibitory molecules, mainly in the extract of *M. coffeanum* CML 4020.

It is possible to suggest that the protease modulators present in the fungal extracts can be widely explored for future pharmaceutical applications, once they were tested using snake venoms as controls and activity-inducing substances. The various classes of proteases in the *B. atrox* venom act in processes closely related to a variety of human pathologies, such as inducing or inhibiting blood clotting and platelet aggregation, degradation of intra and extracellular components (apoptosis, cell replacement, debridement, and tissue regeneration), and activation of the inflammatory response (Gutiérrez *et al.* 2010; Kini and Koh 2016).

The extracts of the endophytic fungi *M. coffeanum* (CML 4009, CML 4010 and CML 4020) and *M. yucatanensis* (CML 4016) evaluated in this study demonstrated modulating activity on the blood coagulation process, acting as inhibitors or potentiators of the catalytic activity exerted by different classes of proteases (hemorrhagic or fibrinogenolytic serine proteases and metalloproteases - mainly from classes P-II and P-III).

The intrinsic variations in the production of metabolites, existing in each microorganism, are responsible for the various applications attributed to them (Strobel *et al.* 2004). However, the fungi whose extracts were evaluated in the present study correspond to species little explored in the pharmaceutical and clinical area. Thus, future studies are necessary to enable a greater understanding of the classes of molecules produced by them, as well as their identification and wide characterization (pharmacological and toxicological).

Materials and methods

Human biological material

Human blood was used for the *in vitro* evaluation of the action of the fungal extracts on the cytotoxicity on erythrocytes, plasma coagulation, and thrombolytic activities. Blood samples (10 mL) from 2 volunteers (aged over 18 and healthy) - for each test - were collected by venipuncture in tubes for vacuum collection in the median cubital vein. The tests were carried out after approval by the Human Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Lavras (COEP - UFLA), with a project registered under the number CAAE/53409315.0.000.5148.

Obtaining the fungal extracts

Extracts were obtained from four fungi belonging to the collection of the BIOGEN Laboratory of the Universidade Federal de Lavras, and then deposited in the mycological collection of Lavras (CML) - *Muscodor coffeanum* (CML 4009, CML 4010, CML 4020) and *Muscodor yucatanensis* (CML 4016). All fungi were isolated from the interior of coffee plant tissues. To obtain the extracts, the fungi were grown in plates containing the medium PDA (Potato Dextrose Agar) for seven days at 25 °C. After growth, six mycelial discs of approximately 5 mm in diameter were transferred to 1000 mL of ME broth (Malt Extract), and they remained under agitation at 125 RPM at 25 °C for 12 days.

The supernatants from the fungal cultures were separated from the mycelia by filtration. The extraction was carried out with the addition of ethyl acetate to the supernatants, in the proportion of 1: 0.5 (supernatant/ ethyl acetate), followed by removal of the solvent by rotary evaporation process. The extracts were then dissolved in Dimethylsulfoxide p.a. 99.9% (DMSO) at a concentration of 10 mg mL⁻¹.

Snake venom

The *Bothrops atrox* venom, used as a tool to induce activities, was bought from the Bio-Agents serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil). The venom was weighed and dissolved in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) at a concentration of 10mg mL⁻¹, and stored at -20 °C. Screening tests were carried out to define the minimum inducing doses for each activity (Marques *et al.* 2019). The use of venom in our research was registered at Sisgen under the number ADF95EA.

Evaluation of fungal extracts effects on the coagulation of citrated human plasma induced by enzymes present in the snake venom (previous incubation of the extracts with the venom)

The extracts were previously incubated with the *Bothrops atrox* venom (6 µg) in the proportions of 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; weight: weight) for 10 minutes at 37 °C. The samples were then added to tubes containing citrated plasma (200 µL), and then timed until a hard clot was formed. Controls containing only the venom were also performed. The minimum coagulant dose used in the tests was previously defined, which was the minimum amount of venom capable of inducing plasma coagulation (6 µg) in an interval between 50 and 70 seconds.

Evaluation of the effects of fungal extracts on the coagulation of citrated human plasma induced by enzymes present in the venom (previous incubation of the extracts with plasma)

The effects exerted by the extracts of endophytic fungi on plasma coagulation were evaluated as in the previous test. However, the extracts were incubated with citrated plasma (200 µL) for 10 minutes at 37 °C and then the *B. atrox* venom (6 µg) was added at the same proportions 1:0.01, 1:0.25, 1:0.5, and 1:1 (venom: extract; w: w). Controls containing only the venom (6 µg) or containing only the fungal extracts were also performed.

Phospholipase A₂ activity

The phospholipase activity was evaluated on agar gel according to the method described by Gutiérrez et al. (1988). The gel was made with 0.01M CaCl₂, egg yolk as a source of phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine, and phosphatidylethanolamine), 1: 3 v/

v of PBS pH 7.2, 1% bacteriological agar, and 0.005% sodium azide. The medium was then poured into Petri dishes at 45 to 50 °C. The samples were previously incubated for 30 minutes at 37 °C in the proportions of 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; w: w), and then applied to holes made in the gel. After that, they were placed into a cell culture chamber for 12 hours at 37 °C. The formation of a translucent halo around the hole is an indicative of phospholipase activity. The halos were measured in millimeters by a digital caliper to quantify the activity and its inhibition. The values were then converted into a percentage, considering the positive control (*B. atrox* venom at 10 µg) as 100% activity.

Cytotoxicity test on human erythrocytes

This activity was evaluated using the methodology described by Gutiérrez et al. (1989), with adaptations referring to the replacement of the phospholipid substrate by human erythrocytes. A human blood sample (5 mL) was collected and diluted in PBS (25 mL). The blood was then washed twice, using centrifugation at 1200 RPM for 10 minutes each and the supernatant removed and replaced with PBS at each centrifugation step. The red blood cell concentrate obtained was adjusted to a hematocrit of approximately 1% in the gel composition. The amount of venom (20 µg) considered as the minimum hemolytic dose, was determined in a pilot test and corresponded to the dose responsible for the formation of a halo in the gel with a diameter between 15 and 18 mm. The tests were performed with venom, fungal extracts, and both previously incubated in the proportions of 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; w: w) for 30 minutes at 37 °C, and then applied to the holes in the gels. The gels remained in a cell culture chamber at 37 °C for 24 hours. The cytotoxic activity and its inhibition were quantified by

measuring the translucent halos formed by the samples. The values obtained were converted into a percentage, considering the values of the venom alone as 100% activity.

Thrombolytic test

Thrombolytic activity was evaluated on blood clots formed *in vitro*, in 96-well plates, according to the methodology described by Cintra et al. (2012). Samples of fungal extracts were evaluated separately. Its modulating action on enzymes present in venoms was also evaluated, after previous incubations of the extract with venom in different proportions (1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 - venom: extract; w: w) for 30 minutes at 37 °C. Controls containing only PBS or venom were also performed. The samples were applied, in triplicate, to the clots and the plates remained in a cell culture chamber for 48 hours at 37 °C. The thrombolytic activity was quantified by the volume of liquid released by the thrombi, being subtracted from all treatments the average of the sample volumes (controls with PBS) and considered as 100% of lysis the average of the volumes released by the thrombi in the positive controls (*B. atrox* venom at 20 µg).

Proteolytic test using casein as substrate

This activity was evaluated using the methodology described by Gutiérrez et al. (1989), with adaptations referring to the replacement of the phospholipid substrate by casein. Casein was used at a concentration previously described by Wang, Shih, and Huang (2004) in a liquid caseinolytic test. A casein solution of 5 mg mL⁻¹ in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was used for the preparation of the gel.

The *B. atrox* venom (20 µg) and the extracts were previously incubated in the proportions of 1: 0.01, 1: 0.25, 1: 0.5, and 1: 1 (venom: extract; w: w), for 30 minutes at 37 °C. Subsequently, they were applied to the holes made in the gel and incubated for 48 hours at 37 °C in a cell culture chamber. Controls containing only venom or extracts were also evaluated.

The gel was stained with 1% black starch solution and destained in 10% acetic acid solution. The quantification of the activity was performed by measuring the diameters of the translucent halos, formed around the holes. The results were expressed in percentage, in which the controls containing only venom corresponded to 100% of proteolytic activity.

Statistical analysis

The results were presented as the mean of the triplicates \pm standard deviation. The significance between the means was determined by analysis of variance, followed by the Tukey's test when the treatments were compared with the control ($P < 0.05$).

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest in this work.

References

- Ali, L., Khan, A.L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Waqas, M., Kang, S.M., Al-Rawahi, A., Lee, I.J. and ALI, L. (2016) Sorokinol: a new enzymes inhibitory metabolite from fungal endophyte *Bipolaris sorokiniana* LK12. *BMC microbiology* **16**, 103.
- Alves, N.M., Guimarães, L.H.S., Piccoli, R.H. and Cardoso, P.G. (2016) Production and partial characterization of an extracellular phytase produced by *Muscodor* sp. under submerged fermentation. *Advances in Microbiology* **6**, 23-32.
- Cardoso, M.G.B., Trento, M.V.C., Reis, C.H., Marcussi, S. and Cardoso, P.G. (2019) *Lecanicillium aphanocladii*: snake venom phospholipases A2 and proteases as tools to prospect enzymatic inhibitors. *Letters in Applied Microbiology* **69**, 88-95.
- Cesar, P.H.S., Trento, M.V.C., Sales, T.A., Marques, T.R., Braga, M.A., Ramalho, T.C. and Marcussi, S. (2019) Molecular interactions between *p*-coumaric acid and snake venom toxins. *Journal of cellular biochemistry* **120**, 14594-14603.
- Cintra, A.C.O., De Toni, L.G.B., Sartim, M.A., Franco, J.J., Caetano, R.C., Murakami, M.T. and Sampaio, S.V. (2012) Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* **60**, 70-82.
- Choi, B.S., Sapkota K., Choi, J.H., Shin, C., Kim S. and Kim, S.J. (2013) Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. *Applied biochemistry and biotechnology* **170**, 609-622.
- Costa, J.O., Fonseca, K.C., Mamede, C.C.N., Beletti, M.E., Santos-filho, N.A., Soares, A.M., Arantes, E.C., Hirayama, S.N.S., Selistre-Dearaujo, H.S., Fonseca, F., Henrique-Silva, F., Penha-Silva, N. and Oliveira, F. (2010) Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon* **55**, 1365-1377.

Demain, A.L. and Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* **62**, 5.

Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V. and Kokotos, G. (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* **111**, 6130-6185.

Dunaevsky, Y.E., Popova, V.V., Semenova, T.A., Beliakova, G.A. and Belozersky, M.A. (2014) Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie* **101**, 10-20.

Franco, R.F. (2001) Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)* **34**, 229-237.

Gupta, M. and Meshram, V. (2018) The biological promises of endophytic *Muscodor* species. In: Fungi and their role in sustainable development: current perspectives. *Springer, Singapore*, 51-74.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Gené, J.A., Lomonte, B., Camacho, Z. and Schosinsky, K. (1989) Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* **27**, 735- 745.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Lomonte, B. and Ângulo, Y. (2010) Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective?. *Toxicon* **55**, 166-170.

Ham, J-J., Bao, L., He, L-W., Zhang, X.Q, Yang, X.L., Li, S.J., Yao, Y.J. and Liu, H.W. (2013) Phaseolschidins A–E, five hispidin derivatives with antioxidant activity from the fruiting body of *Phaseolus schweinitzii* collected in the Tibetan plateau. *Journal of Natural Products* **76**, 1448–1453.

- Kapoor, N. and Saxena, S. (2016) Xanthine oxidase inhibitory and antioxidant potential of Indian *Muscodor* species. *3 Biotech* **6**, 248.
- Kim, K.S., Cui, X., Lee, D.S., Sohn, J.H., Yim, J.H., Kim, Y.C. and Oh, H. (2013) Anti-inflammatory effect of neoechinulin A from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the suppression of NF- κ B and p38 MAPK pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Molecules* **18**, 13245–13259.
- Kini, R.M and Kho, C.Y. (2016) Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins* **8**, 284.
- Li, Y., Shuang, J.L., Yuan, W.W., Huang, W.Y. and Tan, R.X. (2007) Verticase: a fibrinolytic enzyme produced by *Verticillium* sp. Tj33, an endophyte of *Trachelospermum jasminoides*. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 1548–1554.
- Marques, T.R., Braga, M.A., Cesar, P.H.S., Marcussi, S. and Corrêa, A. D. (2019) Jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) skin extracts as inhibitors of phospholipases A2 and proteases. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **91**, 16.
- Marcussi, S., Santos, P.R.S., Menaldo, D.L., Silveira, L.B., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., Da Silva, S.L., Stábeli, R.G., Antunes, L.M.G and Soares, A.M. (2011) Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **724**, 59-63.
- Mehta, A.Y., Jin, Y. and Desai, U. R. (2014) An update on recent patents on thrombin inhibitors (2010–2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **24**, 47-67.

- Meshram, V., Saxena, S. and Paul, K. (2016) Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **31**, 1502-1511.
- Saavedra, S.L., Avila, L., Giudicessi, S.L., Albericio, F., Camperi, S.A., Cascone, O. and Martinez-Ceron, M.C. (2018) Natural snake venom inhibitors and their pharmaceutical uses: challenges and possibilities. *Current Pharmaceutical Design* **24**, 1737-1747.
- Serrano, S.M., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C., Fox, J.W. (2005) A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* **5**, 501-510.
- Silva, L.F., Braga, M.A., Espósito, M.A., Cesar, P.H.S., and Marcussi, S. (2019) Inhibition by essential oils of *Mentha viridis* and *Mentha pulegium* (Lamiaceae) in proteolysis, fibrinogenolysis and coagulation caused by venomous snakes. *Revista de Biología Tropical* **67**, 999-1009.
- Sixma, J.J. and De Groot, P.G. (1992) The ideal anti-thrombotic drug. *Thrombosis research* **67**, 305-311.
- Strobel, G. (2011) *Muscodor* species – Endophytes with biological promise. *Phytochemistry* **10**, 65-172.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products* **67**, 257-268.
- Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J. and Markworth, C. (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **147**, 2943-2950.
- Monteiro, M.C.P., Alves, N.M., Queiroz, M.V., Pinho, D.B., Pereira, O.L., Souza, S.M.C., Cardoso, P.G. (2017) Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *Bioscience Journal* **33**, 381-389.

Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S. and Pripdeevech, P. (2019) Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. *PeerJ* **7**, e6427.

Wu, B., Wu, L., Ruan, L., Gei, M. and Chen, D. (2009) Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPCC480097. *Current Microbiology* **58**, 522-527.