

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DO LITORAL PAULISTA SÃO
VICENTE

Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus*.

Caroline Ramos da Cruz Costa

São Vicente-SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DO LITORAL PAULISTA SÃO
VICENTE

Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus*.

Mestrando: Caroline Ramos da Cruz Costa

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Litoral Paulista, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Biodiversidade
Aquática

São Vicente-SP

2018

615.32 Costa, Caroline Ramos da Cruz

R618 Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus* / Caroline Ramos da Cruz Costa. - São Vicente, 2018.

69 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientador: Marcos Hikari Toyama

1. Farmacologia. 2. *Laguncularia racemosa*. 3. *Crotalus durissus terrificus*. 4. Foslipase A2. 5. Serino Protease. 6. Estresse oxidativo. 7. Extratos vegetais. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP

Campus do Litoral Paulista

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de compostos polifenólicos da *Laguncularia racemosa* sobre a atividade enzimática e farmacológica de serino proteases de *Crotalus durissus terrificus*.

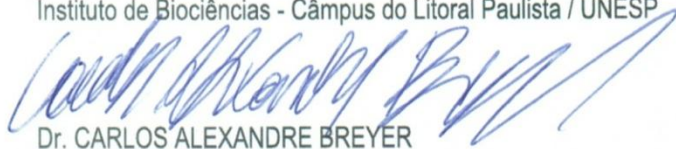
AUTORA: CAROLINE RAMOS DA CRUZ COSTA

ORIENTADOR: MARCOS HIKARI TOYAMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, área: BIODIVERSIDADE pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS HIKARI TOYAMA
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Dr. CARLOS ALEXANDRE BREYER
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP



Prof. Dr. LUIZ FELIPE DOMINGUES PASSERO
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

São Vicente, 22 de fevereiro de 2018

*Dedico este
trabalho a minha família,
em especial ao meu
esposo, que me apoiou
durante todo o tempo:
Jaime sem seu apoio
tudo seria muito mais
difícil!*

"Aprenda como se você fosse viver para sempre, viva como se você fosse morrer amanhã".(Santo Isidoro de Sevilla)

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a Deus por ter me concedido saúde suficiente para concluir este trabalho. Quero agradecer ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, por toda estrutura fornecida para o desenvolvimento e conclusão deste projeto, mas quero agradecer também, sua atenção, paciência, dedicação e orientação, não há palavras para descrever minha admiração pelo profissional que você é, muito obrigada por tudo!

Quero agradecer também aos professores Doutores que compõem esta banca, muito obrigado por terem aceitado este convite, e fazerem parte desta fase tão importante da minha vida.

Quero agradecer aos meus colegas e amigos do BIOMOLPEP, Ms. Mariana Novo Belchor, Ms. Caroline Fabri Rogues, Ms. Henrique Gaeta, Bruna Ortolan, Daniele Novaes e Adeilso Bispo Jr, obrigada a todos por cada conselho, dica, auxílio, correção, por cada minuto, vocês são os melhores; Mas meu agradecimento mais especial dentre todos vai para a Ms. Mariana Belchor (Alfa), Obrigada por absolutamente tudo, por cada minuto!

LISTA DE ABREVIATURAS

ARA	Quercetina-3- O -arabinoside
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Cdtsp2	<i>Crotalus durissus terrificus serinoprotease 2</i>
COX-2	Cicloxygenase-2
cPLA	Fosfolipase A citossólica
Dexa	Dexametasona
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography)
HPx	Hidroperóxidos
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate
LPS	Lipopolissacarídeos
MDA	Malondialdeído
NO	Oxido Nitrico
$\cdot$ OH	Radical hidroxila
PDB	Protein Data Bank
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	Proteína Quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RHAM	Quercetina-3- O -rhamnoside
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
sPLA2	Fosfolipase A ₂ secretória
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano

Resumo:

A giroxina é a principal serino protease encontrada no veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. As serino proteases de veneno de serpentes são proteínas que apresentam uma grande similaridade estrutural com a trombina humana incluindo a alta conservação do sítio catalítico. Os resultados já obtidos pelo nosso grupo revelaram a capacidade dos flavonoides glicosilados de *Laguncularia racemosa* em reduzir de forma significativa a atividade enzimática das trombins humanas. A identificação destas moléculas revelou que dois flavonoides glicosilados (quercetina-3-O-arabinosídeo (QAra) e quercetina-3-O-ramnosídeo (QRham)) respondem pela inibição da trombina (Rodrigues et al., 2015). Sabe-se que a soroterapia antiveneno não consegue neutralizar de forma eficiente a ação farmacológica das serino proteases e consequentemente não é capaz de neutralizar os danos homeostáticos e teciduais. Neste trabalho, uma nova serino protease foi isolada do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (cdtsp-2) através de quatro etapas de separação, usando a Superdex 75 com uma fase móvel de bicarbonato de amônia pH 8, a cdtsp-2. Estas duas frações foram então fracionadas em coluna de troca iônica em DEAE para separação das principais frações e posteriormente fracionadas em CLAE de fase reversa para confirmar o grau de homologia molecular e em todas as etapas cromatográfica foram acompanhadas pelos ensaios enzimáticos em BApNA. A nova serino protease denominada como Cdtsp-2 (*Crotalus durissus terrificus* serino protease 2) é uma proteína inédita, tem massa molecular de 27 kDa e sua sequência N-terminal mostrou diferenças estruturais quando comparada a giroxina de *Crotalus durissus terrificus* e os resultados mostram que a *Crotalus durissus terrificus* possui uma concentração relativa de serino proteases maior do que a sugerida na literatura. As atividades edematogênicas e miotóxicas foram padronizadas e comparadas com grupos tratados com QAra, QRham, inibidores de PKC, PLCs, Dexametasona e antagonistas para receptores ativados por protease (PAR) e solução salina (controle negativo). Durante o edema e os testes miotóxicos também detectamos malondialdeído, PGE2 e COX-2. Nossos resultados mostraram que o edema induzido por Cdtsp2 não pode ser inibido pelos flavonóides de *Laguncularia racemosa* e envolve níveis significativamente aumentados de peroxidação lipídica e metabolismo do ácido araquidônico e ambos foram significativamente diminuídos pelo antagonista de PAR, PKC e inibidor de PLC e praticamente abolidos na presença de Dexametasona. Conclusão: nossos resultados mostraram que as atividades farmacológicas induzidas por Cdtsp2 envolvem presença de antagonistas de PAR 1, 2, ativação de PLC, PKC para mobilização de ácido araquidônico e aumento do estresse oxidativo.

Palavras chaves: Cdtsp2 serino protease; *Crotalus durissus terrificus* (Cdt); secretória PLA2 (sPLA2); edema; inflamação; estresse oxidativo, receptor ativado por protease, COX-2 e MDA.

Abstract:

Gyroxin is the major serine protease present in *Crotalus durissus terrificus* venom. Serine proteases from snake venom are proteins, which exhibit a great structural similarity to hμMan thrombin including the catalytic site conservation. The results already obtained by our group revealed the glycosylated flavonoids ability of *Laguncularia racemosa* significantly reduce the enzymatic activity of hμMan thrombins. The molecules identification reveals two glycosylated flavonoids (quercetin-3-O-arabinosidiμM (QAra) and quercetin-3-O-rhamnosidiμM(QRham)), which inhibit thrombin (Rodrigues et al., 2015). Antivenomserotherapy can not efficiently neutralize the serine proteases pharmacological action and is not able to neutralize homeostatic and tissue damage. In this work, a new serine protease was isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (cdtsp-2) by through four separation stages, using superdex 75 with a mobile phase of ammoniμM bicarbonate pH 8. These two fractions were fractionated on ion exchange colμMn in DEAE for separation of the major fractions and subsequently fractionated in reverse phase CLAE to confirm the degree of molecular homology. All chromatographic steps were monitored by the enzymatic assays in BApNA. The new serine protease called cdtsp-2 (*Crotalus durissus terrificus* serine protease 2) is an unpublished protein, with a molecular mass of 27 kDa and its N-terminal sequence showed structural differences when compared to the gyroxin of *Crotalus durissus terrificus*. Results reveal that in this venom has a higher relative concentration of serine proteases than suggested in the literature. The edematogenic and myotoxic activities were standardized and compared to groups treated with QAra, QRham, PKC inhibitors, PLCs, Dexamethasone and protease (PAR) and saline (negative control) activated receptor antagonists. During edema and myotoxic assay we also detection of malondealdehyde, PGE2 and COX-2. Results reveals Cdtsp2 -induced edema no can be inhibited by the flavonoids of *Laguncularia racemosa* involves significantly increased levels of lipid peroxidation and arachidonic acid metabolism and both were significantly decreased by the PAR antagonist, PKC and PLC inhibitor and virtually abolished in the presence of Dexamethasone. Conclusion: The pharmacological activities induced by Cdtsp2 involves the presence of PAR 1, 2 antagonists, PLC activation, PKC to mobilize arachidonic acid and increase oxidative stress.

Keywords: Cdtsp2; serine protease; *Crotalus durissus terrificus* (Cdt); secretory PLA2 (sPLA2); edema; inflammation; oxidative stress, protease activated receptor, COX-2 and MDA

SuMário

CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL	12
Objetivos:	15
Objetivo específico: Capítulo 1:	15
Objetivo específico: Capítulo 2:	15
Objetivo específico: Capítulo 3:	15
CAPÍTULO 1- PURIFICAÇÃO DA SERINO PROTEASE (Cdtp2).	16
1.Introdução: Serino-proteases de venenos.	16
2. Materiais e Metodos:	18
2.1. Cromatografia de exclusão molecular em CLAE	18
2.2. Cromatografia de Troca iônica em coluna Protein Pack DEAE 5PW.	19
2.3. Cromatografia de fase reversa.	19
2.4. Análise do grau de pureza da toxina.	20
2.5. Eletroforese em PAGE-SDS.	20
2.6. Eletroforese Bidimensional.	20
2.7. Avaliação do Tempo de trombina.	21
2.8. Atividade Fibrinogenolítica.	21
2.9. Dicroísmo Circular.	21
2.10. Determinação da Estrutura Primária.	22
2.11. Modelagem através de homologia.	22
3. Resultados e Discussão	22
CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-MIOTÓXICA DA LANGUNCMLARIA RACEMOSA.	32
1. Introdução:Laguncularia racemosa	32
2. Material e Método:	34
2.1. Coleta e identificação do material vegetal	34
2.2. Obtenção dos extratos metanólico e hidroalcoólico	34
2.3. Obtenção das fases de partição do extrato hidroalcoólico bruto	35
2.4. Isolamento e Caracterização Estrutural de Flavonóides Glicosilados	35
2.5. Ensaio enzimático de inibição da Cdtp2.	37
2.6. Avaliação do edema de pata protocolo de pós tratamento.	38
2.7. Atividade miotóxica	38
2.8. Análise estatística.	38
3. Resultados e Discussão:	39
CAPÍTULO 3-INFLAMAÇÃO E MECANISMO	43
Artigo científico – Toxins	43
CONCLUSÕES:	57
1. Conclusão capítulo 1.	57
2. Conclusão Capítulo 2	57
3. Conclusão Capítulo 3 - Artigo Toxins	57
REFERÊNCIAS:	58

CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL

Os acidentes ofídicos têm sido considerados um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A grande maioria dos acidentes ocorre nos países localizados em regiões tropicais e subtropicais (Kasturiratne et al., 2008; Warrell, 2010; Willians et al., 2010; Adukauskienė et al., 2011). Os envenenamentos ofídicos atingem aproximadamente 420.000 mil a 2.280.000 milhões de pessoas por ano, sendo que dessas, cerca de 20.000 a 125.000 evoluem para o óbito (Kasturiratne et al. 2008; Warrell, 2010; Willians et al., 2010; Huancahure et al., 2011). Porém não é apenas devido à frequência em que ocorrem, mas também à morbidade e mortalidade que ocasionam, desta forma, historicamente constituem um problema crônico de saúde pública.

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior incidência de acidentes ofídicos, sendo que as regiões Nordeste e Norte lideram em número de casos (Lima et al., 2009; Nadur-Andrade et al., 2012). De acordo com os dados publicados pelo Ministério da Saúde do Governo Federal, apresentados na tabela 1, os estados mais afetados em número de mortes por acidentes com ofídicos são Norte e Nordeste.

Tabela 1. Os dados da tabela abaixo são referentes ao ano de 2016 (Ministério da Saúde- Governo Federal.)

Região	Incidência a cada 100.000 habitantes.	Casos de acidentes com ofídios.	Números de óbitos
Norte	48,8	8.638	38
Nordeste	12,4	7.034	39
Sudeste	6,2	5.339	19
Sul	8,1	2.385	05
Centro oeste	18,2	2.848	15
Brasil (Geral)	12,7	26.244	116

Entretanto, esses dados não demonstram a realidade, pois a subnotificação é frequente entre os moradores de áreas rurais que têm dificuldade no acesso aos serviços de saúde (Calvete et al., 2009; Warrell, 2010; Willians et al., 2010; Bernade; Gomes, 2011). Por isso, no ano de 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a

considerar esse agravo de saúde como Doença Tropical Negligenciada (DTN) tendo como objetivo garantir uma maior visibilidade e, conseqüentemente, estimular a elaboração de políticas públicas visando diminuir os problemas decorrentes do envenenamento causado pelas serpentes (Gutiérrez et al., 2010)

Segundo a secretaria da saúde, os efeitos do envenenamento por serpentes crotálicas são: edemas agudos, dor reduzida, miotoxidade e neurotoxidade e acometimento renal, causando insuficiência renal aguda, a qual é a principal complicação e causa de óbito. Clinicamente, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* não costuma causar efeitos no local da mordida e é geralmente indolor. (FURTADO; SANTOS; KAMIGUTI, 2003; RÁDIS-BAPTISTA; KERKIS, 2011; YONAMINE et al., 2012). O veneno total de *Crotalus durissus spp.* é uma mistura complexa de substâncias, tais como crotamina, giroxina, crotoxina (um complexo formado pela fosfolipase A2 e crotapotina), peptídeos com atividade calicreína-símile, serino proteases tipo trombina-símile, fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, L-aminoácido-oxidase, convulxina, e peptídeos biologicamente ativos (MAGRO et al., 2001). Por outro lado, o veneno é pouco imunogênico apesar de ser claramente tóxico e potencialmente letal. Além disso, o prejuízo sofrido pelos animais após a injeção de veneno bruto contribui para a baixa produtividade do antídoto específico para o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (FERREIRA JUNIOR et al., 2005).

Até o presente momento o único tratamento eficaz para o envenenamento do ponto de vista sistêmico é a administração de soro antiofídico específico ou antiveneno policlonal anti-botropico ou anti-crotálico (Hifumi et al., 2015). No entanto, danos já instalados causados devido a ação enzimática de determinadas proteínas como por exemplo as serino proteases não são revertidas e/ou neutralizadas pelo soro antiofídico. Sendo assim, se faz necessário a procura de novos métodos coadjuvantes para neutralizar a ação farmacológica induzida a nível celular por determinadas proteínas, como forma de auxiliar o tratamento do envenenamento (Picolo et al 2002).

Durante todo o processo de evolução humana, as plantas tem sido importantes fontes de agentes terapêuticos . Produtos naturais advindos de microorganismos, algas e plantas constituem cerca de 50% dos farmacos existentes (Gurib-Fakim 2006). A investigação sobre as possíveis aplicações destes produtos naturais sobre determinados

tipos de doenças está condicionado aos resultados de uma bateria de ensaios realizados tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” (Toyama *et al.*, 2009).

Li e colaboradores em 2009; Miles e colaboradores em 1999; Sharaf e colaboradores em 2000 e Wu e colaboradores em 2008, mostram em seus estudos que as plantas do mangue sintetizam compostos bioativos que podem ser utilizados na área médica, agrônômica, cosmética e outras relacionadas na forma de sais, ácidos orgânicos, carboidratos, hidrocarbonetos, benzoquinonas, naftofuranos, sesquiterpenos, triterpenos, alcalóides, flavonóides, polímeros, derivados sulfurosos e taninos.

Estudos farmacológicos e biológicos, demonstraram atividades diversas por parte de extratos de espécies presentes em manguezais, como: antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006; Berenguer *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2009), cicatrizante (Fernandez *et al.*, 2002), antibacteriano (Melchor *et al.*, 2001; Rotimi *et al.*, 1988; Abeysinghe e Wanigatunge, 2006; Ravikumar *et al.*, 2010), antiinflamatório (Kapil *et al.*, 1994), antitumoral (Loder e Russell, 1969) e antiulceroso (de Faria *et al.* 2012)

Rodrigues CF e colaboradores em 2015 em seu estudo mostraram a capacidade de flavonóides reduzirem significativamente a atividade enzimática da Trombina, devido a estes resultados o nosso grupo acreditou ser capaz de obtermos os resultados similares a estes com outras proteínas tipo trombina-símile e desta forma encontrarmos uma alternativa secundária ao tratamento anti-ofídico.

Objetivos:

Objetivo específico: Capítulo 1:

Caracterização bioquímica e estrutural da Cdtsp-2 purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Objetivo específico: Capítulo 2:

Avaliar o efeito da serino protease Cdtsp-2 no aumento do estresse oxidativo celular e o efeito da suplementação de compostos polifenólicos de *Laguncularia racemosa* o efeito edematogênico e mionecrótico induzido por esta nova serino protease do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Objetivo específico: Capítulo 3:

Caracterização da atividade pró-inflamatória e miotóxica da serino proteases Cdtsp-2, identificando a via de sinalização envolvida no processo inflamatória, investigando o envolvimento de receptores de PAR(s), ativação da proteína G, Fosfolipase C e Proteína quinase C.

CAPÍTULO 1- PURIFICAÇÃO DA SERINO PROTEASE (Cdtsp2).

1.Introdução:Serino-proteases de venenos.

O veneno crotálico é considerado uma das peçonhas mais tóxicas entre as serpentes brasileiras, com relatos de letalidade de até 72% em casos não tratados. Além disso, o veneno da *Crotalus durissus terrificus* não produz grandes lesões no local da mordida, mas suas ações sistêmicas são severas, envolvendo as serino proteases, as miotoxinas básicas de baixo peso molecular (crotamina) e a crotoxina.

As serino proteases, bem como as metaloproteases do veneno de serpentes, têm mostrado serem capazes de alterar a homeostase sangüínea. Várias delas atuam degradando fatores de coagulação ou células do endotélio. Contudo, em outros casos, estas proteases ativam fatores específicos da cascata de coagulação sangüínea ou na fibrinólise e atuam seletivamente como as enzimas fisiologicamente envolvidas no processo de controle da homeostase (Oshima-Franco et al., 1999).

As proteínas classificadas como serino proteases são enzimas que utilizam serina no seu sítio catalítico e formam uma grande subfamília das peptidases. São encontradas em eucariontes, bactérias e vírus (Rawlings e Barrett,1993). Essas enzimas apresentam atividades de exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e omega-peptidases (Rawlings e Barrett,1993). Possuem diferentes estruturas tridimensionais, por terem diferentes origens evolutivas. No entanto, suas reações proteolíticas são muito similares, sendo que a quimotripsina, a subtilisina e a carboxipeptidase C tem sua zona catalítica formada por serina, ácido aspártico e histidina.

De acordo com os seus efeitos sobre o sistema hemostático apresentado na figura1, serino proteases podem ser classificadas como enzimas calicreína-símile, as quais reduzem a pressão sangüínea, liberando bradiquinina, ou enzimas do gênero trombina, que se assemelham a atividade da trombina sobre o fibrinogênio e formam fibrina por clivagem do α cadeias e / ou β fibrinopeptídeos, liberando α e / ou β . Os monômeros de fibrina gerados por estes enzimas sofrem polimerização limitada, uma vez que normalmente apenas um peptídeo de fibrina é clivado e não há nenhuma ativação do fator XIII, o qual, na sua forma ativada (XIIIa), catalisa a união dos monômeros e desta forma ocasionando a formação de coágulos. Estas enzimas quando proveniente de veneno de serpentes como a giroxina de *Crotalus durissus terrificus* são

geralmente moléculas de cadeia única, com exceção da toxina de *Cerastes cerastes*, que consiste de um homodímero ligadas por pontes dissulfeto.

A giroxina, além de sua capacidade de afetar o sistema homeostático celular, também pode, experimentalmente, quando injetada em camundongos por via intravenosa ou intracerebroventricular, provocar episódios temporários de rotação do animal ao redor de seu eixo longitudinal, sendo este efeito denominado síndrome do rolamento em barril. Nos experimentos relacionados com a síndrome do rolamento em barril, alguns ratos morrem, em geral por dificuldades respiratórias, enquanto outros ficam completamente assintomáticos em aproximadamente 1 hora. Esta síndrome promovida pela giroxina e por outras serino proteases provavelmente envolve a sua capacidade de promover lesões no sistema central pela sua ação proteolítica (Camilo et al., 2001).

Estudos recentes com serino proteases de venenos mostram que estas enzimas podem atuar sobre os receptores PAR (Protease activated receptor). As PARs são membros de receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs) e a ativação destes receptores pela clivagem proteolítica da porção N-terminal do receptor PARs resultam na mobilização dos estoques de cálcio intracelular via ativação das PLC-delta, consequente quebra do fosfolipídeos de membrana, geração do IP3 (Yonamine et al., 2013). A giroxina, como outras serino proteases, promovem a agregação de plaquetas através do seu envolvimento com PAR 1 e 4 e que pode ser inibido pelos seus inibidores (PAR-1[SCH79797] e PAR-4 [TCY-NH2]). O inibidor da PAR-1 foi eficaz a uma concentração de cerca de duas ordens de grandeza abaixo do que a requerida para a PAR-4, e a combinação destes dois inibidores não foram capazes de inibir completamente a agregação de plaquetas induzida por giroxina (Falcão et al 2013) e (Mamede et al 2016).

Alguns estudos já foram feitos mostrando que serino protease de veneno de *Bothropssp* podem atuar como agente pró-inflamatórios porém de forma moderada, porém no caso das serino proteases de *Bothropssp*, estas toxinas enzimáticas não seriam capazes de induzir miotoxicidade (Menaldo et al 2013)

Recentemente, através de técnicas proteômicas e venonômicas, foram identificadas cinco novas sequências de isoformas de giroxina a partir da glândula de veneno (Yonamine et al., 2009). Estas sequências foram analisadas e comparadas com a sequência da giroxina caracterizada parcialmente por Da Silva et al., 1989 e com outras serino proteases de venenos. Estas análises mostraram uma homologia superior a 80%

ou seja, a giroxina, bem como outras serino proteases de venenos, tem uma estrutura molecular semelhante (Yonamine, 2009).

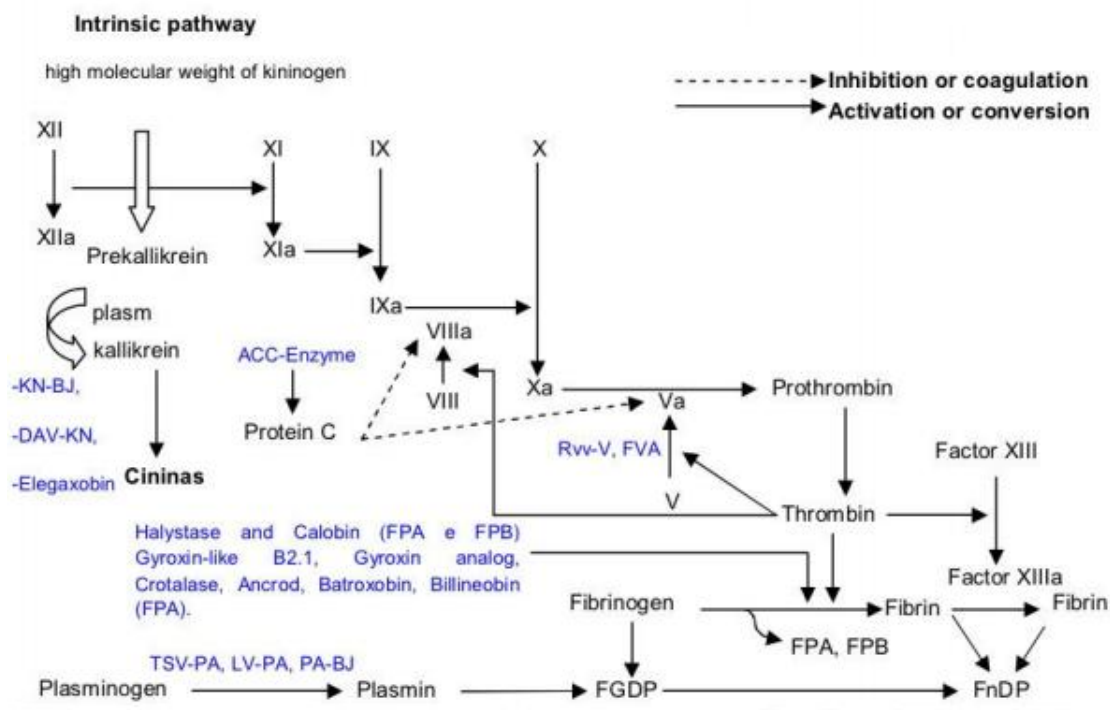


Figura 1: Principais vias de coagulação. A trombina participa na conversão de fibrinogênio para fibrina, formando uma "malha" que é os primeiros passos do processo de coagulação (Yonamine et al 2013)

As serino proteases de veneno de serpentes atualmente constituem um alvo molecular atraente para a concepção e desenvolvimento de novos inibidores para esta classe de enzimas, uma vez que estão envolvidas no curso de várias doenças incluindo pancreatite, síndrome respiratória aguda, artrite reumatóide, aterosclerose, efisema pulmonae e fibrose cística (Pochet et al 2004).

2. Materiais e Metodos:

2.1. Cromatografia de exclusão molecular em CLAE

20 mg do veneno total foi homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9 até a sua completa dissolução. Esta solução de veneno foi então centrifugada a 2500g por 5 minutos para clarificação. O sobrenadante obtido foi então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular com resina Superdex 75. O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com o tampão bicarbonato de amônio 0,1 MpH 7,9 , 60 minutos antes da aplicação da amostra. A eluição do material foi realizada a um fluxo constante de 0,2mL/min e monitorada a uma absorbância de

280 nm. As frações coletadas em um coletor de frações automático Foxy 200 foram liofilizadas e guardadas a -20°C. As frações foram coletas a intervalos regulares de 2 minutos e cada pico (100µl) foi testado em relação a sua atividade serino protease e Fosfolipásica A2 usando substratos cromogênicos específicos para grupo de enzimas ou coagulometria. O pool de serino protease foi agrupado e posteriormente liofilizado.

2.2. Cromatografia de Troca iônica em coluna Protein Pack DEAE 5PW.

As amostras proveniente da purificação do veneno, que apresentaram atividades serino proteásicas e menores tempos de cogulação do plasma (Cdt2 e Cdt4), foram repurificadas em uma coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5PW (Supelco) e o fracionamento foi feito em uma coluna previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônia 0,05M pH 7,8. A eluição das amostras foi realizada usando um gradiente linear com Bicarbonato de Amônia 1,0M pH 7,9. As frações foram monitoradas a 280 nm.

2.2.1. Atividade Enzimática.

As frações foram coletadas e cada pico foi testado em relação a sua atividade serino protease e Fosfolipásica A2, as amostras são utilizadas apresentam concentração de 1mg/ml, usando substratos cromogênicos específicos para grupo de enzimas BapNa (serino protease) e Noba(Fosfolipásica) ambos em concentração de 2mg/ml, ou seja, (1:2) ou através de coagulometria utilizando placas de Elisa em leitura de 405 e 425 nm respectivamente. O pool de serino protease foi agrupado e posteriormente liofilizado e estocados a -20 °C.

2.3. Cromatografia de fase reversa.

O pico representando a fração de interesse (Cdt4) foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C4 analítica (3.9 mm X 150 mm, 1/pkg). A coluna cromatográfica foi equilibrada durante 10 minutos, usando uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA, 0,1%) previamente filtrado em filtro 0,22mm. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em 250µl de TFA 0,1%, que foi então centrifugada a 4500g por 5 minutos, o sobrenadante obtido foi então aplicado na coluna cromatográfica. Para eluição da fração foi usado um gradiente linear contínuo do solvente B (Acetonitrila 66% em solvente A). O registro da corrida cromatográfica foi realizado a A280nm.

2.4. Análise do grau de pureza da toxina.

O grau de homogeneidade molecular em CLAE de fase reversa, usando uma coluna C18 analítica (0,39 x 30 cm, Phenomenex). A coluna cromatográfica foi equilibrada durante 10 minutos, usando uma solução de TFA 0,1% previamente filtrado em filtro 0,22mm. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em 250µl de TFA 0,1%, que foi então centrifugada a 4500g por 5 minutos, o sobrenadante obtido foi então aplicado na coluna cromatográfica. Para eluição da fração foi usado um gradiente linear contínuo do solvente B (Acetonitrila 66% em solvente A). O registro da corrida cromatográfica foi realizado a 280nm.

2.5. Eletroforese em PAGE-SDS.

A eletroforese em gel de poliacrilamida, também utilizado para avaliar o grau de pureza da amostra, é realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (30%T, 0,8%C). O gel de concentração 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de acrilamida 12% foi feito utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 MightySmall II (HoeferScientificInstruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de Glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os géis foram corados com solução de Comassie Blue 0,05% a 37°C, seu excesso foi removido em ácido acético 7%. Também foram utilizadas para a análise do grau de homogeneidade molecular das amostras as eletroforeses em gel de PAGE-SDS-Tricina, de acordo com o método descrito por Schägger and Von Jagow (1987), usando um sistema de eletroforese descontínuo e um gel de corrida a 10%.

2.6. Eletroforese Bidimensional.

A eletroforese do gel bidimensional foi utilizada para a análise das proteínas de acordo com sua massa molecular e seu ponto isoelétrico (pI) (O'FARRELL 1975). Os strips (7cm, pH3-10), em temperatura ambiente, os foram equilibrados com tris 50mM contendo ditioneol (DTT) 0,26mM. A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA. Os

strips foram colocados sobre o gel de poliacrilamida 12%, juntamente com o padrão de massa molecular, de acordo com o item 2.1.5. Após este processo os géis foram corados com Coomassie blue G.

2.7. Avaliação do Tempo de trombina.

A avaliação do tempo de trombina foi realizada por teste de turbidimetria em um fotômetro apropriado (HumanClotjunior). A trombina, ao catalisar a conversão do fibrinogênio em fibrina no final da cascata de coagulação resultará num aumento na turbidez da amostra, o que foi detectado pelo aparelho. Tal detecção foi iniciada manualmente, quando o reagente foi adicionado à solução. O tempo entre o início da detecção e o “turning point” é o resultado, cuja unidade é segundos. Foram utilizados os seguintes tratamentos: Control: 45µL plasma humano comercial, (10µg) 45µL Giroxina (Hemostaticthrombin time), (10 µg) 45µL Cdtsp2 (Hemostaticthrombin time) e 10µL salina. A leitura foi realizada em 400 nm e os dados posteriormente tratados por análise da variância ($p < 0,005$). A trombina bovina foi o nosso controle positivo.

2.8. Atividade Fibrinogenolítica.

A atividade fibrinogenolítica foi determinada pela incubação de 0,1 ml de fibrinogênio (0,2%) comercial, em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) com 0,1 ml de amostra a ser testada) e estas alíquotas foram retiradas em intervalos de 15, 45 e 90 min e separadas por SDS PAGE para verificar a clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina e desta forma pudemos classificá-la como µMa proteína trombina-símile.

2.9. Dicroísmo Circular.

A proteína purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi encontrada na fração F202 do Pico Cdt4, desta forma a nomeamos como Cdtsp2(*Crotalus durissus terrificus* 2), foi coletada da corrida cromatográfica em CLAE, estando em solução de Acetonitrila (ACN) e TFA. A amostra foi transferida para µMa cubeta de quartzo de 0,1cm. O espectro de dicroísmo circular foi medido no intervalo de comprimento de onda 190-260nm em µM J-715 espectropolaroide (Jasco Corp., Japan) com fenda de 1nm e µM tempo de resposta de 4 segundos. A coleta de dados foi realizada a temperatura ambiente, com velocidade de 60nm/min. Foram realizadas oito convoluções e o espectro foi corrigido pelo tampão branco. Os dados foram analisados

pelo software Spectra manager e as porcentagens de estruturas secundárias obtidas.

2.10. Determinação da Estrutura Primária.

Para a determinação da estrutura primária foi utilizada a reação do aminoácido N-terminal da proteína com fenil-isotiocianato (PITC). A proteína modificada foi submetida à hidrólise ácida, liberando o aminoácido N-terminal modificado, e este foi identificado por cromatografia, utilizando-se um sequenciador PPSQ-23 A. Para determinação da estrutura primária total da proteína, a serino protease foi digerida com duas enzimas uma que é a tripsina gold (promega) e a protease V8(ROCHE), sendo o protocolo de digestão foi feita de acordo com o fabricante e os peptídeos foram separados por cromatografia de fase reversa. Os peptídeos foram então fracionados e liofilizados para posterior sequenciamento (Life Technologies SOLiD 4 / 5500XL Genetic Analyser). As sequências obtidas foram então comparadas usando ferramentas de análise de sequências como o proteinBlast e depois de montada a sequência total da proteína, esta foi analisada usando o programa Clustal.

2.11. Modelagem através de homologia.

Os modelos das estruturas terciárias/quaternárias foram obtidos utilizando coordenadas de serino proteases presentes no protein data bank (PDB) que apresentaram maior identidade/similaridade com as identificadas em *Crotalus durissus terrificus*. Para construção dos modelos foi utilizado o pacote Swiss-Model (Arnold et al., 2006) após a escolha da molécula mais próxima e com coordenadas moleculares previamente depositadas. A serinoprotease da *Agkistrodon halys* (código PDB = 4E7N) foi a que apresentou maior homologia e baseada nessas coordenadas foi construída o modelo da Cdtsp2. O modelo estrutural da Cdtsp2 de *Crotalus durissus terrificus* foi gerado usando o UniProt com parâmetros de minimização de energia (Biasini et al., 2014). As representações moleculares foram geradas usando o software PyMOL (DeLano, 2015).

3. Resultados e Discussão

O fracionamento de moléculas presentes no veneno de serpentes exige técnicas padronizadas, para que ao final de todos os processos necessários as moléculas de

interesse se mantenham com suas atividades biológicas ativas. Para obtenção da Giroxina, vários métodos e técnicas cromatográficas estão descritas como: Sekiet al., em 1979 , que utilizaram quatro etapas cromatograficas de purificação (Sephadex G-75, Sephadex G-75, CM SephadexC-50 e Sephadex G-75), enquanto Alexander e colaboradores (1988) isolaram a giroxina utilizando um processo resultante de apenas duas etapas (Sephadex G-75 e Benzamidina-Sepharose 6B). Já no presente trabalho o fracionamento é feito através de um processo cromatográfico com três etapas cromatográficas.

Durante o fracionamento do veneno total e teste de atividade fosfolipásica e coagulante, foi mostrada a presença de dois grupos de serino proteases, um correspondente a giroxina previamente já descrita por Seki e colaboradores(1979) e Raw e colaboradores(1986) e um segundo grupo encontrado junto com a fração crotoxiníca, que poderia em parte explicar as propriedades coagulantes e agregador de plaquetas induzida pela crotoxina *in vitro* (Fonseca et al. 2006) (Figura 1).

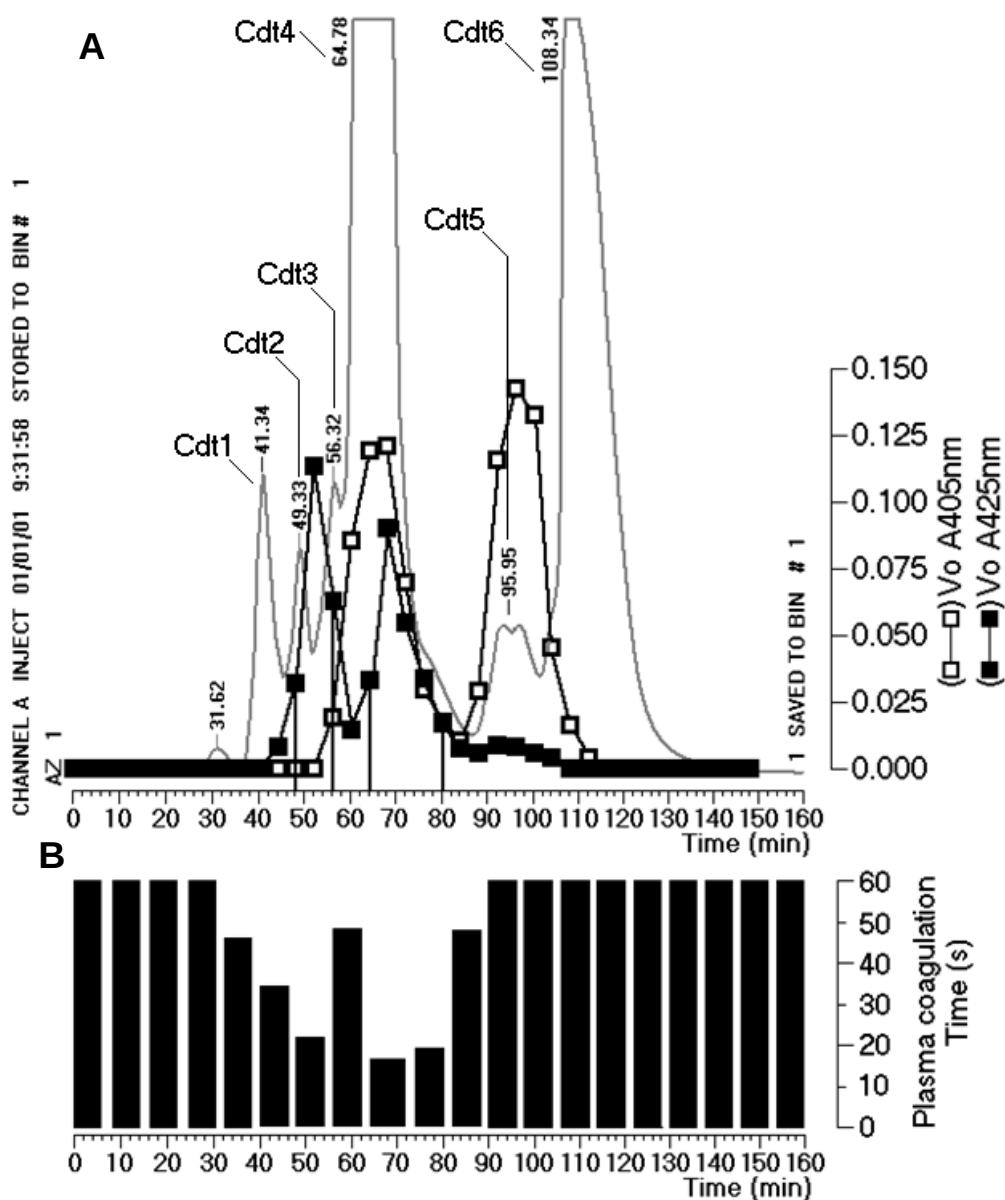


Figura 2. A) Fracionamento do veneno em μ Ma coluna cromatográfica Superdex G75 pré-empacotado em uma coluna para CLAE (1.6 x 60 cm) previamente equilibrada com dois volumes de coluna com tampão bicarbonato de amônia (0.1M, pH 7.9) e o fluxo isocrático mantido a 0.2 mL/ min, com as frações coletadas a intervalos de 2min e o monitoramento feito em absorvância 280nm. As frações foram testadas em relação à atividade fosfolipásica (405 e 425 nm) e coagulação. As frações com atividades foram então agrupadas. A fração Cdt2 corresponde a giroxina já descrita previamente enquanto que a fração Cdt4 corresponde ao pico cuja proteína de interesse e que foi submetida a próximas purificações foi isolada. B) Tempo de Coagulação de Plasma foi feito utilizando Hemostatic thrombin time, para verificar a capacidade de formação de coagulo (1:1 p/p).

As duas frações Cdt2 e Cdt4 foram então fracionadas novamente, porém em uma coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5PW (Supelco). A fração Cdt2, que corresponde a giroxina já descrita, elui de forma mais rápida quando comparada a

fração Cdt4. A fração Cdt4, em relação ao tempo de coagulação, também apresentou diferenças quando comparada com a fração Cdt2, demonstrando possivelmente a presença de uma serino protease na fração Cdt4 (figura 2). Alexander e colaboradores(1988), utilizando o fracionamento convencional do veneno total, observaram dois picos, no entanto apenas um dos picos encontrados apresentou atividade serinoproteásica, no presente trabalho foi possível verificar duas frações com atividades coagulante.

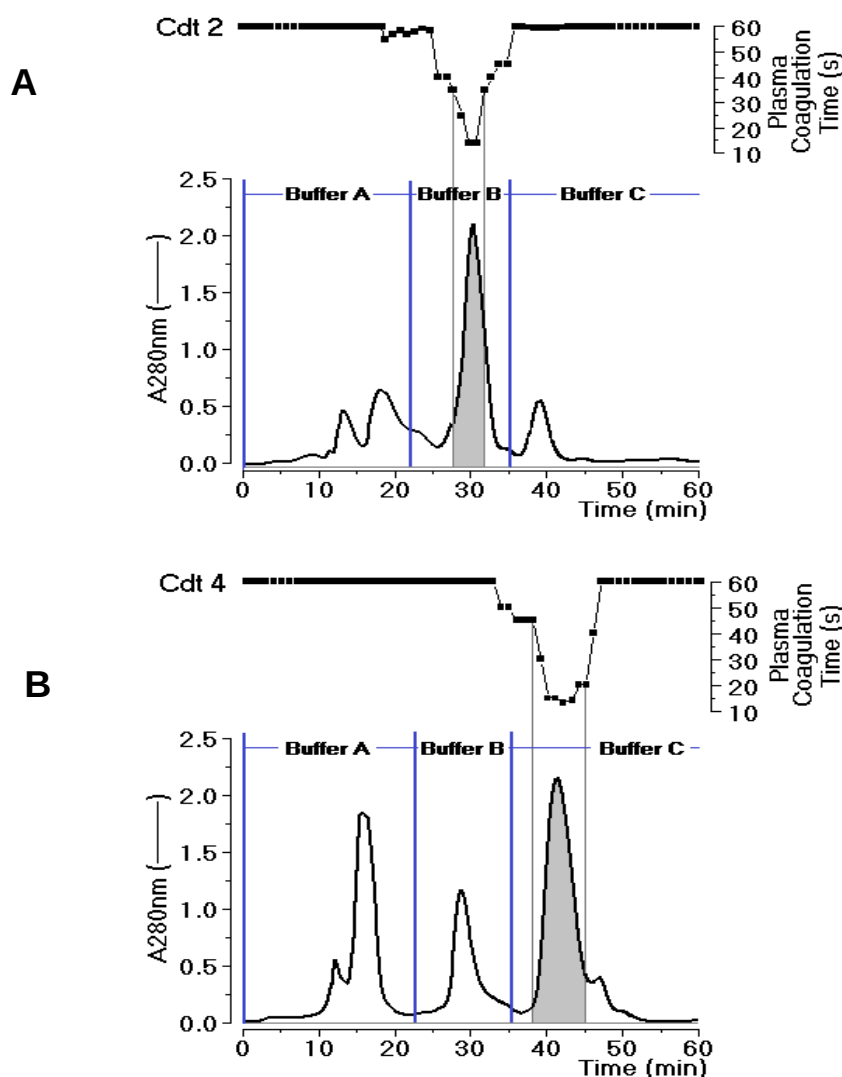


Figura 3. A amostra proveniente da purificação do veneno total foi repurificada em uma coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5PW (Supelco) e o fracionamento foi feito em uma coluna previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônia 0,05M, pH 7,9. Figura 2A: Eluição e atividade coagulante da serino protease presente na fração cdt2, correspondente a giroxina. Figura 2B: análise de atividade coagulante de um pico presente na fração cdt4, não correspondente a giroxina, sugerindo uma nova serino protease.

O pico com atividade coagulante proveniente do fracionamento da Cdt4 foi então dessalinizada usando uma coluna de fase reversa C4, sendo o monitoramento a

A280nm. Durante este processo de fracionamento, a fração Cdt4 apresentou três frações marjoritárias: F201, F202 e F203 (figura 4A) fração F202, que apresentou a atividade fibrigenolítica, foi então coletada e por fim esta amostra foi liofilizada e submetida a uma nova etapa cromatográfica de fase reversa usando uma coluna C18, para averiguação do grau de pureza da amostra (figura 4B).

Na figura 4B é possível observar ação fibrigenolítica da F202 (Cdtsp2) por meio de eletroforese PAGE-SDS, onde monitoramos as quebras das cadeias, confirmando que a Cdtsp2 é uma proteína trombina-símile, como anteriormente descrito por SANO-MARTINS e colaboradores (2001) e uma eletroforese de duas dimensões onde foi possível estimar sua massa molecular de 27 kDa e seu ponto isoelétrico 4,5. Já a giroxina descrita anteriormente, tem sido estimada por vários autores em 29 kDa (Alexander et al 1988), 33 kDa (Seki et al 1980, Ruiz de Torrent RM, et al 2007), 34 kDa (Raw et al 1986) e 36kDa (Camilo et al 2001) e apresenta pI entorno de 5,5 a 8. O grau de pureza também foi atestado por SDS-Page. Estas diferenças sugerem que estamos diante de uma proteína diferente da Giroxina citada por (Seki et al 1980, Raw et al 1986, Yanomine et al, 2009).

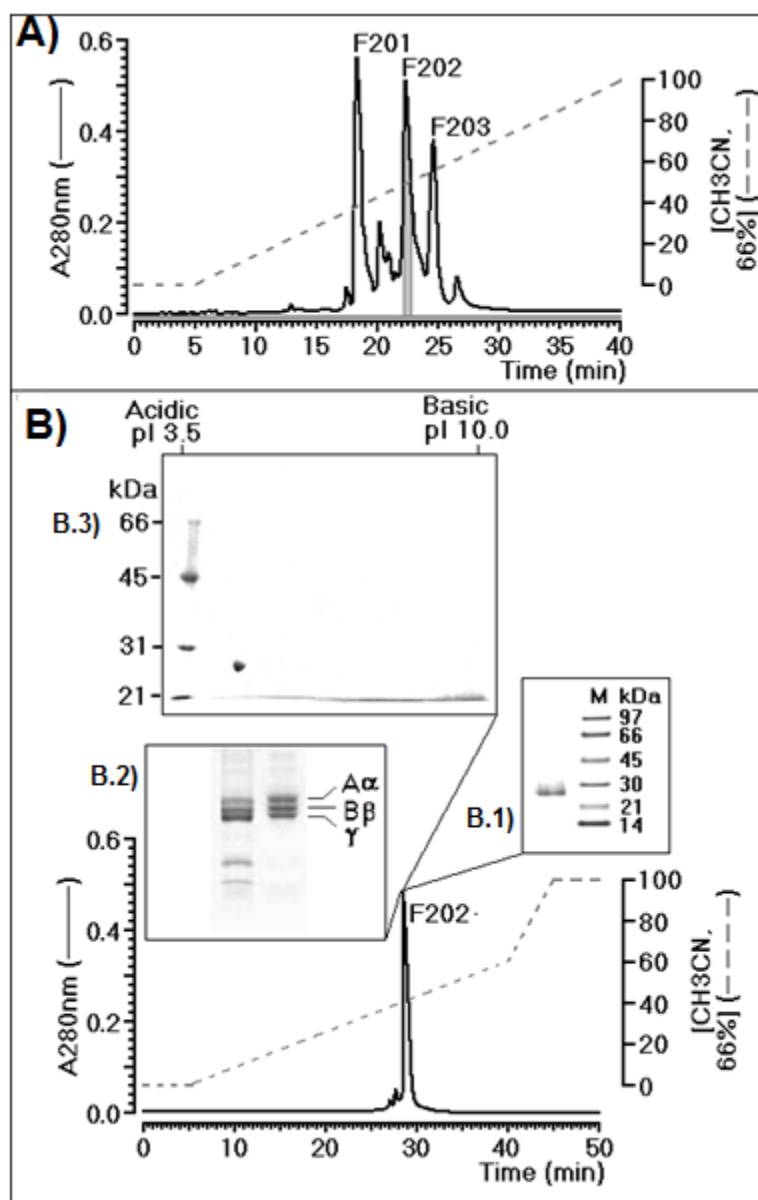


Figura 4A: Cromatografia de fase reversa C4, utilizando gradiente de solução A (TFA 0.05%) durante 10 minutos para retirada dos sais e seguida por um gradiente em stepwise com 100% de solução B (Acetonitrila 66% em solução A) e o fracionamento foi realizado a um fluxo de 2 mL / min e o monitoramento da eluição foi feito a A_{280nm}, desta forma a fração em questão foi separada em três frações majoritárias: F201, F202 e F203. Figura 3B: O perfil cromatográfico da purificação da F202 de Cdt4, cromatografia de fase reversa C18. B.3) SDS-Page bidimensional confirmou o grau de pureza da amostra apresentando uma única banda de massa molecular estimada aproximadamente 27kDa e pI aproximado de 4,5, já o B.2) SDS- Page convencional mostrou que a F202 tem atividade fibrinogenolítica, possuindo características de trombina-símile.

No fracionamento do veneno total a partir da cromatografia de exclusão molecular foi possível a identificação e isolamento de uma nova serino protease que encontra-se coeluída com a fração crotoxínica (Figura 5A). O ensaio de atividade

fosfolipásica apresentou os resultados já esperados na porção majoritária do fracionamento como descrito anteriormente por Sekie colaboradores(1979) e Rawe colaboradores(1986), não apresentando atividades na região onde há a eluição da giroxina já descrita (Figura 5B). No entanto, o ensaio de atividade serinoproteásica e coagulante apresentou atividades tanto na fração comumente encontrada a giroxina como também na fração majoritária, resultado este não descrito anteriormente (Figura 5C). É possível verificar através do ensaio de coagulação do plasma (Figura 5D), que a F202 apresenta tempo de agregação plaquetária semelhante ao tempo de agregação da Giroxina já descrita anteriormente.

A fração F202 foi então sequenciada, apresentando diferenças em seu N-terminal quando comparada à giroxina, comprovando então se tratar de uma proteína homóloga. A serino-protease então foi denominada de Cdtsp2 (*Crotalus durissus terrificus* serino protease 2). Os ensaios Lineweaver-Burk ou double-reciprocalplot (Figura 5E e F), é possível observar V_{max} e K_m das frações em questão, o K_m da giroxina é de 0,76 mM e sua V_{max} é de 8.33 μ M, enquanto que da porção Cdtsp2 apresenta K_m 0,58mM e V_{max} 5,26 μ M, ou seja, apesar da Cdtsp2 ter uma maior afinidade pelo substrato quando comparada a giroxina a velocidade da giroxina de degradação do substrato é maior. A Cdtsp2 apresenta diferenças visíveis na sua região n-terminal, quando comparada com o sequenciamento da giroxina descrito por Andriao-Escarso et al 1997, (Figura 5G).

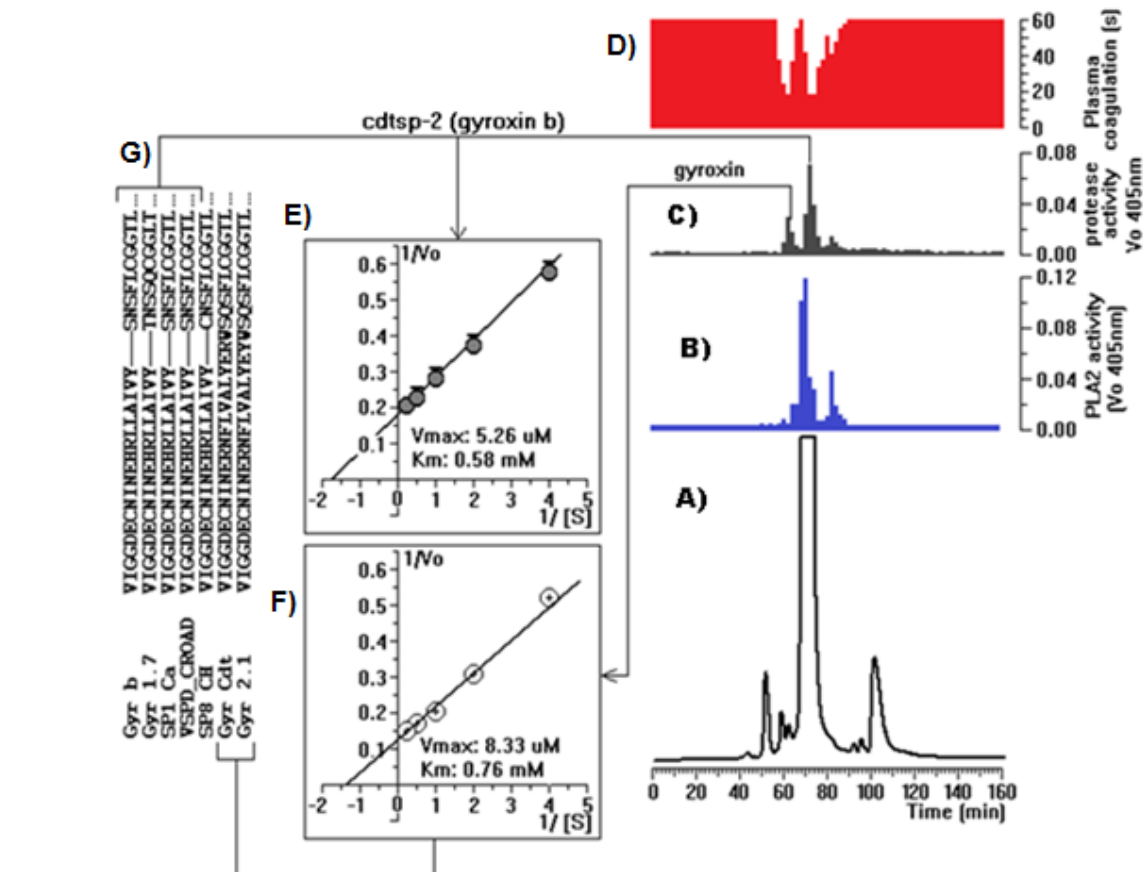


Figura 5:A: Gráfico do perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* com foi feita uma coluna de exclusão molecular superdex 75. Nela é possível identificar a fração giroxina e cdtp-2, que foi coeluída com a crotoxina. B: Testes enzimáticos de atividade fosfolipásica . C: Testes enzimáticos de atividade serinoproteásica. D: Testes de atividade coagulante. E parâmetros cinéticos de V_{max} e K_m da cdtp-2 em equação de Lineweaver-Burk. F Parâmetros cinéticos da giroxina em equação de Lineweaver-Burk. Foi apresentado diferentes características para giroxina e cdtp-2 . G: Sequenciamento da porção N-terminal das proteínas. É possível verificar diferenças na sequencias das Serinoproteases supracitadas.

O sequenciamento das proteínas Gyr b (Cdtsp2), Gyr Cdt (giroxina descrita anteriormente na literatura) comparadas a outras serino proteases de venenos de serpentes, mostraram diversas diferenças na porção n-terminal, no entanto, a grande similaridade das proteínas em questão pode ser observada pela preservação de diversos aminoácidos, mostrando que sua estruturas secundárias e suas funções são semelhantes e preservadas. Tentar entender e elucidar as estruturas secundárias e terciárias de uma proteína é primordial para compreender de forma efetiva suas funções fisiológicas. Desta forma foi feito o ensaio de Dicroísmo Circular com a fração Cdtsp2. Após o fracionamento em fase reversa na coluna C18, a proteína pura foi submetida ao ensaio

de dicroísmo circular, estima-se que sua concentração final após o fracionamento era de 0,02 mg/ml. Este ensaio nos permite estimar que 17,84% da estrutura está organizada em alfa-helices; 21,16% em folhas beta e demais aminoácidos estão em estruturas ao acaso (Randon coil) cerca de 61% da estrutura (Figura 6). Estes resultados encontrados pelo nosso grupo através do dicroísmo circular corrobora com as estruturas encontradas em estudos conduzidos pelo (Zhu et al 2005, Oliverira et al, 2009, Vitorino-Cardoso et al, 2006).

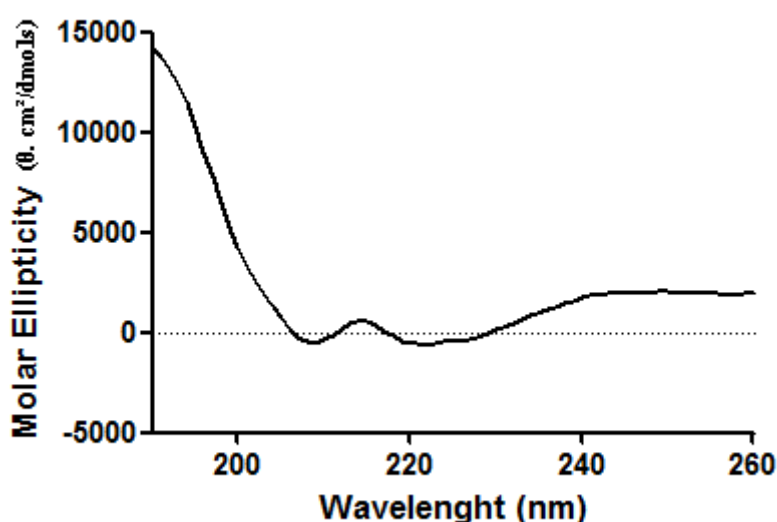


Figura 6. Análises em dicroísmo circular de bancada, Jasco, com monitoramento em 190 a 260nm em tampão 0,1%TFA e 66% ACN e a proteína com concentração 0,02 mg/ml. A análise do perfil (registro da absorção diferenciada da luz polarizada) foi dada pelo programa Spectra manager: “Randon coil” cerca de 61% da estrutura, 17,84% da estrutura está organizada em alfa-helices; 21,16% em folha.

A partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento, e do ensaio de Dicroísmo circular foi possível estimar a estrutura terciária através de homologias. A serino que apresentou maior homologia foi a de *Agkistrodon halys*, (coordenadas PDB 4e7n), uma víbora que apresenta em seu veneno fortes efeitos anticoagulantes, estes efeitos foram observados por Zhang Ye colaboradores (1998), através da capacidade de ativação de fatores de coagulação. Portanto, através de tal modelo, a estrutura terciária foi estimada, apresentando consonância com os dados de dicroísmo circular (Figura 7).

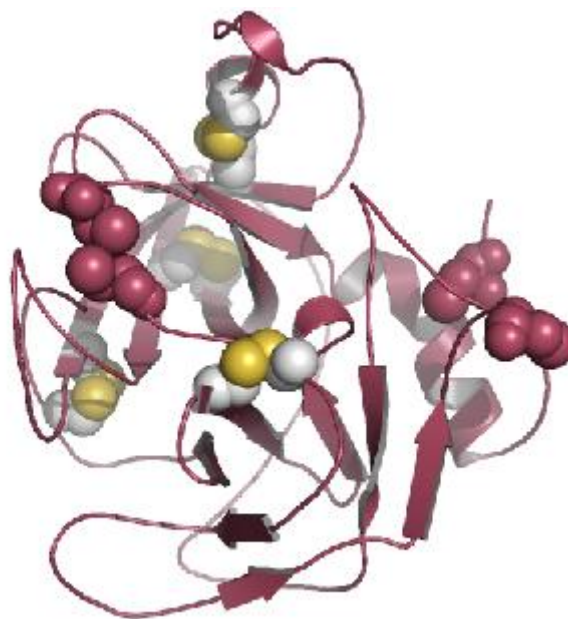


Figura 7. Comparação estrutural da enzima trombina-símile da *Agkistrodonhalys* e o modelo da Cdtsp2 da *Crotalus durissus terrificus*. O modelo teórico da Cdtsp2 da *Crotalus durissus terrificus* e coordenadas da enzima trombina-símile da *Agkistrodonhalys* (identity 72.77%) (pdbcoordinates 4e7n). A representação da enzima é representada em desenho e as pontes dissulfeto e resíduos de cisteína são representados por esferas. Para os dissulfetos, os átomos de carbono são representados em branco e os átomos de enxofre em amarelo. Os resíduos de cisteína da *Crotalus durissus terrificus* são representados por esferas coloridas em vinho. As estruturas representadas são foram geradas usando PyMOL. É possível verificar as estruturas estimadas por dicroísmo, cujo random coil é a mais expressiva.

O modelo da Cdtsp2 gerado por homologia corroboram com o sequenciamento e o ensaio de dicroísmo circular, que mostram uma predominância da estrutura secundária random coil, apresentando assim diferenças com a serinoprotease já descrita para o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Dessa forma, a porcentagem de serino proteases no veneno passa de 2,5% como já descrito anteriormente, para cerca de 7% do total, aumentando a problemática do soro antiofídico, uma vez que as serino proteases não são totalmente neutralizadas em sua atividade enzimática e farmacológica pelo soro antiveneno (Kuniyoshiet al., 2012), fator que pode ser decorrente da variação intraespecífica e da própria quantidade relativa destas proteínas no próprio veneno, demonstradas no presente trabalho superiores ao previsto na literatura (Queiroz et al., 2008).

CAPITULO 2- CARACTERIZAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-MIOTÓXICA DA *LAGUNCULARIA RACEMOSA*.

1. Introdução: *Laguncularia racemosa*

Bandaranauake e colaboradores 2002 relatam em seu estudo que os manguezais são encontrados principalmente em climas tropicais, por dependerem de climas quentes para sua manutenção e desenvolvimento. O manguezal é um ecossistema úmido formado por uma associação de animais e plantas próxima a estuários e áreas costeiras, que sofrem ação de marés e diferentes condições de salinidade e chuva, funcionando muitas vezes como um local de reprodução, o que os transforma num dos ecossistemas mais produtivos do mundo (Spalding et al., 2010; Giriet.al. 2010).

Existe uma considerável área de manguezais ao longo da zona costeira de todo o mundo. De acordo com o Atlas de Manguezais (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997), esse ecossistema representa 8% de toda a linha de costa do planeta e um quarto da linha de costa da zona tropical, perfazendo um total de 181.077 km², sendo o Brasil o segundo maior país em extensão de áreas de manguezal (13.400 km²), ficando atrás apenas da Indonésia. A *Laguncularia racemosa*, conhecida como mangue branco e presente na América e África (Berlyn, 1986; Prance; Tomlinson, 1987; Spalding; Blasco; Field, 1997) e sul da Ásia, juntamente com a *Avicennia sp.* e *Rizophora mangle* são as espécies mais presentes no manguezal (Espinosa et al., 2004).

Os manguezais fornecem uma enorme variedade de produtos para os moradores de região próxima. Extratos e produtos químicos de mangues fazem parte da medicina popular, sendo utilizados como inseticidas, pesticidas, adstringente, tônicos, remédio contra afta, desinteria e febre. Porém, a extração de novos compostos provenientes de mangue, além dos já conhecidos da população e indústrias farmacêuticas, ainda permanece aberta a novas investigações (Bandaranayake, 1998; Knox & Miyabara, 1984; FAO, 2007).

O processo de adaptação que estas plantas desenvolveram como proteção contra herbívoros, microorganismos e excesso de salinidade levou a uma evolução química do vegetal, levando assim o desenvolvimento de metabólitos especiais, principal fonte de descoberta de novos fármacos (Santos-Mendonça et al., 2009). Portanto, as plantas de manguezais são um reservatório de compostos naturais em potencial e muitos deles

ainda não foram explorados na sua extensão. Estes estudos irão contribuir para a compreensão do potencial farmacológico dessas plantas

Metabólitos secundários de plantas são moléculas que estão envolvidas na adaptação da planta com o meio, e participam dos processos bioquímicos, do crescimento celular e da reprodução. Eles são classificados dependendo das vias biossintéticas em que atuam, podendo ser compostos fenólicos, terpenos, esteroides, alcaloides, entre outros. Algumas das funções destes metabólitos correspondem à defesa de herbívoros e patógenos, regulação da simbiose, controle de germinação de sementes e alelopatia (Calixto, 2005).

Os flavonóis e os terpenos são os compostos químicos mais abundantes em plantas do mangue e são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos (Emerenciano et al., 2001; Shilpi et al., 2012), pela especificidade em algumas espécies, abundância em quase todo o reino vegetal, facilidade de identificação e relativa estabilidade (Harborne; Williams, 2000; Nussmeier; Whelton, 2005).

Neste contexto, é bem sabido que flavonoides podem apresentar ação antioxidante e podem ser importantes no combate ao processo inflamatório (Berenger et al 2006; Wang et al 2014). Portanto uma abordagem valiosa reside na utilização de extratos e moléculas purificadas para avaliar seu impacto no processo inflamatório ocasionado pela administração de toxinas pró-inflamatórias e que neste caso será a Cdtsp2.



Figura 2 – *Laguncularia racemosa* popularmente conhecida como mangue branco (Tomlinson, 1986).

2. Material e Método:

2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn. utilizadas no estudo fitoquímico foram coletadas por Msc. Henrique Gaeta e Msc. Camila Lehnhardt Pires em uma área impactada de São Vicente, São Paulo e identificadas pela Dra. Selma Dzimidas Rodrigues, no dia 09 de fevereiro de 2012. Está depositada no herbário da faculdade UNISANTA sob o número 8256.

2.2. Obtenção dos extratos metanólico e hidroalcoólico

No primeiro momento, o material coletado foi lavado com água para retirar o material particulado impregnado e cerca de duas horas depois, foi congelado com nitrogênio líquido, o qual posteriormente passou pelo processo de liofilização. No dia seguinte foi triturado, resultando em 39,4g de massa total.

O pó das partes aéreas de *L. racemosa* foi submetido à extração exaustiva com hexano e após remoção do solvente a pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo,

obteve-se 29,37g de extrato hexânico. A seguir, a torta resultante foi dividida em duas partes, a primeira para obtenção do extrato metanólico e a segunda para a obtenção do extrato hidroalcoólico.

Para a obtenção do extrato metanólico foi utilizado metanol P.A. enquanto o extrato hidroalcoólico foi obtido através de uma mistura de água destilada:metanol na proporção 4:6. Após obtenção de ambos os extratos e remoção do solvente utilizando evaporador rotativo obtivemos 3,97g de massa de extrato metanólico bruto e 4,22g de massa de extrato hidroalcoólico bruto.

2.3. Obtenção das fases de partição do extrato hidroalcoólico bruto

O procedimento de partição deste extrato é semelhante ao utilizado no particionamento do extrato metanólico bruto. Sendo assim, todo o conteúdo (4,22g) do extrato hidroalcoólico bruto foi solubilizado em 100mL de água destilada e então com o auxílio de um funil de separação e de solventes em escala crescente de polaridade foram obtidas as fases de partição em hexano (0,8mg), em diclorometano (6,5mg), em acetato de etila (330mg) e em n-butanol (456mg). A fase aquosa foi submetida a liofilização onde obtivemos 1,112g. As fases em diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa do extrato hidroalcoólico foram analisadas em CLAE-UV para realizar o monitoramento do perfil químico. Com estas fases, também foram realizados testes *in vivo* usando modelo de pata e miotoxicidade. Assim apenas os extratos polares foram utilizados neste estudo.

2.4. Isolamento e Caracterização Estrutural de Flavonóides Glicosilados

Os flavonóides foram identificados nas fases EtOAc e BuOH do extrato de MeOH por CLAE-MS / MS. Os picos cromatográficos a 14,8 min e 15,1 min apresentaram m/z 433 e m/z 447, respectivamente, com picos de base nos espectros de massa do modo de ionização negativa e espectro UV característicos dos glicosilflavonóides (UV max: λ 227, 262 e 355 nm). Em conjunto, esses dados indicaram a ligação de derivados de quercetina a diferentes açúcares. Os espectros de íons do produto obtidos a partir do íon negativo MS / MS para os íons precursores (m/z 433 e m/z 447) foram os mesmos e ambos os compostos mostraram m/z 301 como o pico de base. Portanto, a presença de quercetina aglicona nas suas estruturas e as perdas de suas porções arabinosilo e rhamnosilo, respectivamente, foram confirmadas. Assim, as estruturas foram designadas como QAra e QRham.

Estes compostos foram isolados da fase BuOH-MeOH do extrato bruto de MeOH por CLAE semi-preparativa. O gradiente de eluição seguinte foi utilizado a uma taxa de fluxo de 4,1 mL / min: solvente A = ácido acético aquoso, 0,1% (v / v); solvente B = MeOH; perfil de eluição: 0-35 min, 30% -100% B (gradiente linear). MM detector UV-DAD foi configurado para registrar entre 210 e 600 nm, e os cromatogramas UV foram registrados a 275 nm. As estruturas de ambos os compostos isolados foram examinadas por RMN.

A quercetina-3- O -arabinoside: ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 6,41 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6), δ 6,23 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), δ 7,51 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ 6,85 (d, $J = 8,3$ Hz, H-5'), δ 7,25 (dd, $J = 8,3$ Hz e 2,0 Hz, H-6'), δ 5,27 (d, $J = 5,1$ Hz, H-1''), δ 3,23-3,62 (H-2'' -H-5''); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD) 156,1 (C-2), 133,5 (C-3), 177,3 (C-4), 161,1 (C-5), 98,5 (C-6), 164,3 (C-7), 93,4 (C-8), 155,9 (C-9), 103,5 (C-10), 120,3 (C-1'), 115,3 (C-2'), 145,3 (C-3'), 148,7 (C-4'), 115,7 (C-5'), 123,0 (C-6'), 100,9 (C-1''), 70,5 (C-2''), 71,4 (C-3''), 65,5 (C-4''), 63,6 (C-5'') [Mendez et al 1995 ; Toyama et al 2014].

A quercetina-3- O -rhamnoside (quercitrina): ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 6,37 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6), δ 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), δ 7,34 (d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,94 (d, $J = 8,7$ Hz, H-5'), δ 7,30 (dd, $J = 8,4$ Hz e 2,1 Hz, H-6'), δ 5,34 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1''), δ 4,23 (dd, $J = 3,0$ Hz e 1,8 Hz, H-2''), δ 3,75 (dd, $J = 9,0$ Hz e 3,3 Hz, H-3''), δ 3,32 (dd, $J = 9,3$ Hz e 3,3 Hz, H-4''), δ 3,41 (d, $J = 6,0$ Hz, H-5''), δ 0,94 (d, $J = 6,0$ Hz, H-6''); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD) 159,2 (C-2), 136,5 (C-3), 179,7 (C-4), 163,1 (C-5), 99,8 (C-6), 165,8 (C-7), 94,9 (C-8), 158,8 (C-9), 106,2 (C-10), 123,1 (C-1'), 117,3 (C-2'), 146,7 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,7 (C-5'), 123,3 (C-6'), 103,5 (C-1''), 72,2 (C-2''), 72,1 (C-3''), 73,4 (C-4''), 72,0 (C-5''), 17,7 (C-6'') [Mendez et al 1995 ; Toyama et al 2014].

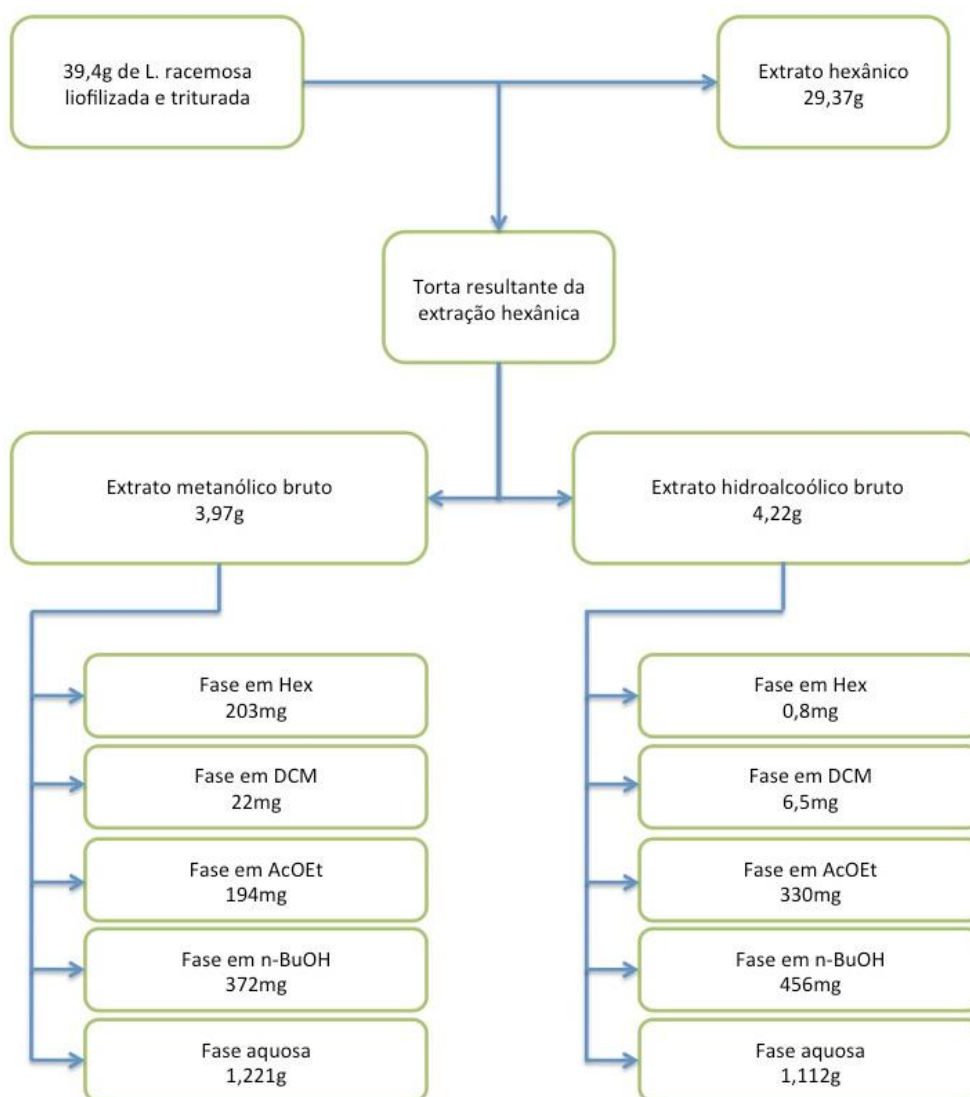


Figura 3 – Fluxograma para a obtenção dos extratos e fases de partição.

2.5. Ensaio enzimático de inibição da *Cdtsp2*.

O potencial de inibição dos compostos puros ARA (A quercetina-3- O -arabinoside) e RHAM (quercetina-3- O -rhamnoside), também foi verificado em relação à *Cdtsp2*. A enzima foi dissolvida em solução salina NaCl a 0,9%, com concentração final de 1mg/mL, as amostras foram incubadas com os compostos puros por 20 minutos em temperatura ambiente, posteriormente tal solução foi incubada em microplaca juntamente com o substrato BapNa, solubilizado em água a 37°C e tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, além de um controle (branco – substrato + salina + tampão) e controle positivo. As mostras foram lidas em intervalos sequenciais (5 minutos, com tempo total de 90 minutos) em um espectrofotômetro para leitura ($\lambda=405\text{ nm}$)(adaptado de Prasa et al., 1997).

2.6. Avaliação do edema de pata protocolo de pós tratamento.

Para a avaliação do potencial antiveneno dos compostos puros, QAra e QRham, foi utilizado o protocolo de edema de pata pós-tratamento. Os compostos puros foram injetados 10 minutos após a inoculação da Cdtsp2(1mg/ml), para averiguação da possível ação antiveneno dos mesmos. Para os controles foi utilizada solução salina (NaCl 0,9%) e Cdtsp2 isolada(10µg) para controle positivo. As concentrações dos compostos utilizados foram iguais (1:1 p/p). O monitoramento volume do edema foi através de hidropleistiomômetro durante 4h com intervalos de 30 minutos entre as medições ou até a diminuição da inflamação do controle (NaCl 0,9%) chegar a 20% da inicial. Após os testes, os camundongos foram anestesiados com halotano e sacrificados via deslocamento cervical.

2.7. Atividade miotóxica

Foram injetados no músculo *gastrocnemius* direito 50 µg/µL compostos puros QAra e QRham previamente incubados por 30 minutos com Cdtsp2 (1:1 p/p) (n=5). Após 30 minutos em média, o sangue dos animais foi colhido da cauda em tubo heparinizado, o qual foi centrifugado e congelado para posterior teste. Os animais controle (n=5) foram submetidos ao mesmo procedimento dos animais tratados, somente inoculados com salina e extratos. Após os testes, os camundongos foram anestesiados e sacrificados via deslocamento cervical. Com o soro separado foi utilizado kit comercial para a determinação da quebra da creatina quinase.

2.8. Análise estatística.

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média para n animais. Os resultados foram analisados por análise da variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste *a posteriori* Dunett ou Bonferroni. Valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos. Para o ensaio enzimático, foi realizada uma regressão linear, cuja angulação da reta foi utilizada para encontrar a porcentagem de inibição, e seu erro os pontos de porcentagem.

3. Resultados e Discussão:

Os compostos puros foram submetidos ao ensaio enzimático em espectrofotômetro para a investigação sobre a possível diminuição da atividade da proteína Cdtsp2 quando em contato com os compostos puros. No entanto, os compostos não foram capazes de diminuir a atividade enzimática. (FIGURA 4).

Este resultado não corrobora aos resultados encontrados por Rodrigues CFB e colaboradores 2015, estudo no qual foi possível observar a inibição significativa da atividade enzimática da trombina humana quando em contato com os extratos e compostos puros da *Laguncularia racemosa*. A Cdtsp2 é uma proteína que apresenta grande similaridade com a Giroxina e com a trombina humana, tendo seus sítios ativos altamente preservados (Yonamine et al 2013), logo a proteína em questão apresenta a capacidade de atuação na cascata de coagulação e quebra de fibrinogenio em monomeros de fibrina. No entanto, não foi possível observar sua inibição pelos compostos avaliados, além disso, a Cdtsp2 não apresenta tantas glicosilações como a Giroxina. Portanto, é possível que as glicosilações da proteína sejam essenciais na sua função e na sua inibição contra atividade dos compostos. Outra grande diferença apresentada pela Trombina e a Cdtsp2 quando comparadas é a formação do tipo de coagulo, a primeira forma coagulos firmes, enquanto que a segunda forma apenas coagulos frouxos.

A inibição encontrada por Rodrigues C.F. e colaboradores 2015, foi descrita como sendo associada a alterações estruturais da proteína, sugerindo que a mudança na sua atividade ocorreu, provavelmente devido a uma alteração no seu local catalítico ou regiões alostéricas, o que aparentemente não ocorreu com a Cdtsp2, possivelmente devido sua ausência de glicosilações.

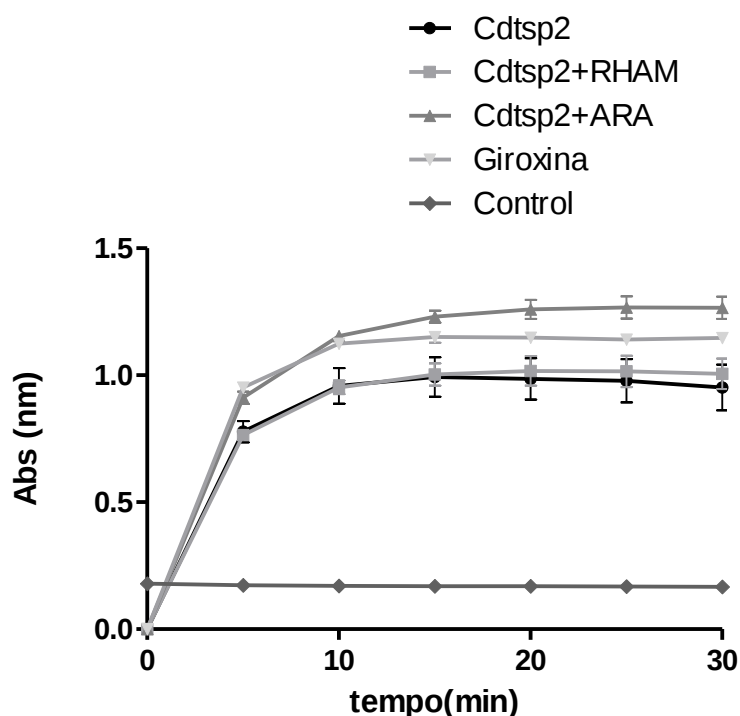


Figura 4. Gráfico do ensaio enzimático da Cdtsp2 incubada com os extratos (absorbância x tempo) hidroalcoólicos. Foi utilizado o protocolo de Prasa et al. 1997, onde o comprimento de onda pra detecção foi 405 nm, o tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl e o substrato proteico BapNa. Os tratamentos foram o branco, com apenas o substrato, a Cdtsp2 incubada com o substrato, os compostos puros com o substrato e a trombina e os extratos incubados juntamente com o substrato, que foram pipetados em microplaca, incubados a 37°C. As leituras foram realizadas no SPECTRA MAX (Molecular Devices, CA) Observa-se que não houve diminuição da atividade enzimática da proteína quando em contato com os compostos puros.

No entanto testes posteriores foram feitos para conhecermos as características farmacológicas que a proteína Cdtsp2 e suas possíveis ações em testes *in vivo*. Por se tratar de uma serino protease inédita, pouco se sabe sobre suas atividades, para os estudos *in vivo* foram feitos com camundongos fêmeas da espécie *Swiss*. Para o estudo foi usado o modelo de pata como descrito por DI ROSA, 1972, foi injetada 10µg na pata direta da proteína Cdtsp2 e 10 minutos após a aplicação da proteína foi injetado salina (0,9% NaCl), na região intraperitoneal, mimetizando um tratamento parenteral.

O ensaio de edema de pata revelou que a serino protease Cdtsp2 não apenas era capaz de induzir danos na cascata de coagulação como uma trombina-símile, mas também era capaz de produzir um edema significativo, ou seja, a proteína em questão também desencadeia, o processo inflamatório. Este resultado apresentado na figura 5, corrobora com Menaldo e colaboradores 2013 que apresentou uma serino protease

purificada do veneno de serpente do genero *Bothrops*, que também apresenta a capacidade de induzir a formação de edema.

Sabe-se que plantas do mangue apresentam características anti-oxidantes e por isso uma importante capacidade anti-inflamatória (Berenger et al 2006; Wang et al 2014). Sendo assim o teste de edema de pata foi repetido utilizando extratos n-butanólico (BuOH), Acetato de etila (AcOet) e compostos puros (ARA e Rham) de *Laguncularia racemosa*.

Os resultados apresentados na figura 5, mostram que tanto os extratos quanto os compostos puros são eficientes para a mitigação do processo inflamatório induzido pela Cdtsp2. Em especial os compostos puros mostraram uma capacidade significativa na redução do edema. Neste contexto, é bem sabido que flavonoides podem apresentar ação antioxidante e podem ser importantes no combate ao processo inflamatório (Berenguer B. et al 2006; Wang J et al 2014).

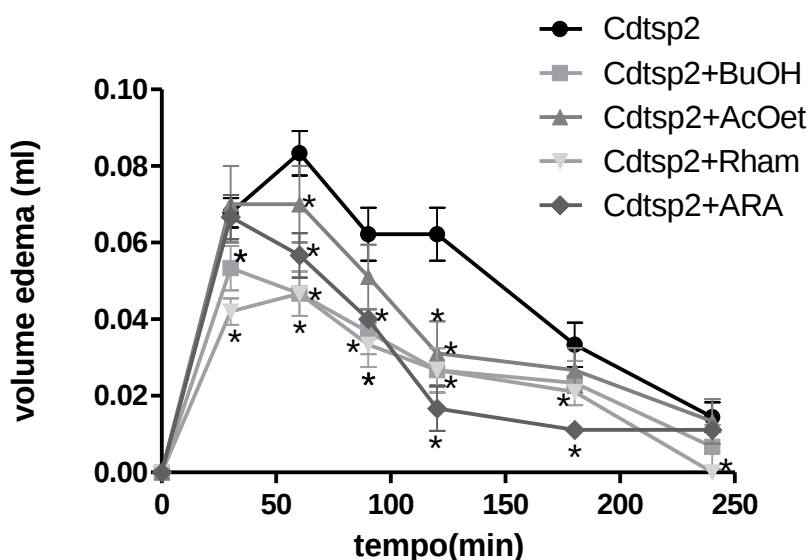


Figura 5. Gráfico do volume do Edema da pata (μ L) de camundongos Swiss no decorrer da inflamação, induzido pela presença do veneno de (*Cdts2*) ou quando os compostos puros de *Laguncularia racemosa* foram injetados 10 minutos depois da aplicação da proteína. Foram utilizados 10 μ g de proteína, 50 μ g de extrato. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=5), e os tratamentos com diferença significativa marcados com (*) (ANOVA de duas vias, com Bonferroni como teste *a posteriori*, F=150,0 e p<0,001).

A Cdtsp2, realmente apresenta a capacidade de causar a mionecrose, como podemos observar na figura 6. O que indica que sua capacidade de induzir edema e a mionecrose é muito particular a ela, quando em comparação com enzimas de sua classe, porem muito semelhante aos efeitos induzidos pela sPLA2, já conhecidos na literatura (Yadav S.K et al 2016). No entanto os resultados apresentados no teste de

Creatina Quinase C (CK), não foram satisfatórios, quando relacionados aos extratos e compostos puros de *Languncularia racemosa*, apesar da diminuição da miotoxidade quando em contato em especial com o composto puro Rham, ainda assim a miotoxidade não foi reduzida a um nível significativo quando comparada a miotoxidade da proteína, sem receber os tratamentos.

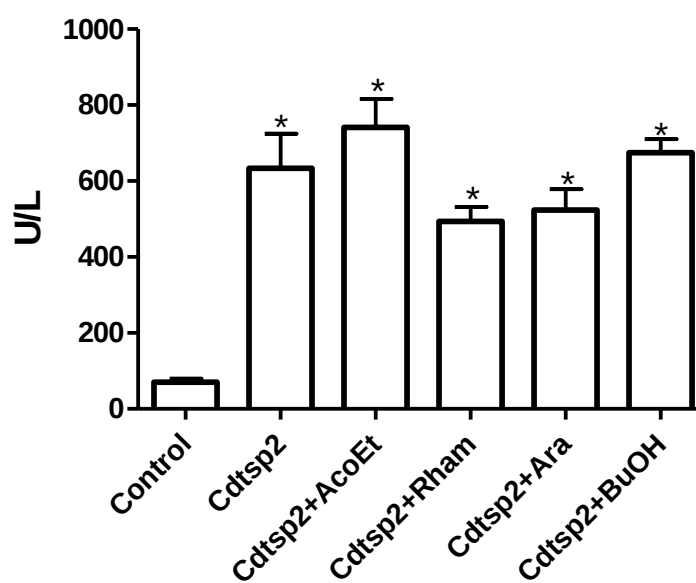


Figura 6. Ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e foi utilizado ANOVA como teste estatístico, com Dunnet como teste *a posteriori*, $F=9,797$, $p=0,0017$. É possível verificar que não houve uma diminuição significativa na miotoxidade da proteína quando o mesmo foi aplicado 10 minutos após o veneno com os compostos puros.

A indução a mionecrose pela Cdtsp2 se mostrou muito semelhante as mionecroses apresentadas por outras classes de proteínas, enquanto que os extratos por sua vez, não apresentaram capacidade antioxidantes suficientes para combater o processo necrotico sofrido pelo músculo.

Devido aos resultados encontrados, optamos por não continuarmos os estudos com os extratos e compostos puros de *Laguncularia racemosa*. Porém os estudos se voltaram para a investigação do mecanismo de ação da proteína Cdtsp2, que mostrou ações não comuns a classe de proteínas a qual pertence.

CAPITULO 3-INFLAMAÇÃO E MECANISMO

Artigo científico – Toxins

Status: Em processo de submissão

Este artigo descreve o mecanismo inflamatório e miotóxico de uma serino protease inédita (Cdtsp2) do veneno de Cdt. Este artigo está em processo de submissão na revista Toxins com fator de impacto 3.450.

Article

Serine Protease From *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) Can Induce Arachidonic Acid Metabolism by Activation of PKC and PLC

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Background: Snake venom serine proteases are an essential group of enzymatic toxins which are involved in several pathophysiological processes related to blood homeostasis. In this article, we characterize the pro-inflammatory effect of a new serine protease from *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venom (Cdtsp2). **Methods:** This novel serine protease (Cdtsp2) was purified and characterized biochemically following the methods described in recent 4-step chromatographic studies and showed significant structural similarity with other snake venom serine proteases. Edematogenic activity were standardized and compared to groups treated with Protein kinase C (PKC) inhibitors, Phospholipase C (PLC), Dexamethasone, antagonists for protease-activated receptors (PAR), and saline (negative control). During the edema and myotoxic trials, we also used specific kits for malonaldehyde, Prostaglandin E2 (PGE2), and Cyclooxygenase-2 (COX-2) detection. **Results:** Our results showed that edema induced by Cdtsp2 involve significantly increased levels of lipid peroxidation and arachidonic acid metabolism, both of which were significantly diminished by a PAR antagonist, PKC, and a PLC inhibitor, and virtually abolished in the presence of Dexamethasone. **Conclusion:** Our results showed that pharmacological activities induced by Cdtsp2 involve the presence of PAR 1 and 2 activation of PLC, PKC for mobilization of arachidonic acid, and increased oxidative stress.

Keywords: snake venom serine protease; *Crotalus durissus terrificus* (Cdt); edema; inflammation; oxidative stress; protease activated receptor; COX-2; MDA.

Key Contribution: Cdtsp2 showed great similarity with other snake venom serine proteases and human thrombin, and this study reveals the serine protease's function in blood homeostasis which may play a significant role in inflammatory process.

1. Introduction

Serine proteases are proteins with great ability to modulate blood homeostasis and several works reveals the potential therapeutic use, including their clinical prospection for treatment of

blood coagulopathy [1,2,3]. Notwithstanding, some studies reveals that serine proteases may play an essential role during pathophysiological action induced by venom. The serine proteases BpirSP27 and BpirSP41 purified from *Bothropsirajais* how to induce edema, under experimental conditions and were significantly inhibited by non-steroidal anti-inflammatory drugs [4]. According to Mamede et al. [5], there are several evidences revealing the essential role of secretory Phospholipases A2 and metalloproteinases from snake venom as agents responsible for myonecrosis and inflammation. This study reveals that serine proteases have been described as pro-inflammatory or edematogenic agents, however, the results with *Bothropsalternatus* and *Bothropsmooeni* serine protease strongly suggest this protein would be an essential pro-inflammatory as well as myotoxic. The related literature about the edematogenic effect induced by snake venom serine protease is limited, however Nikai et al., [6] showed that a serine protease kin in-releasing purified from the total venom *Trimeresuruselegans* was also able to induce edema. Jerdonase is other kin in-releasing serine protease isolated from *Trimeresurusjerdonni* venom which shows a kin in release besides the fibrigenolytic and edematogenic activities.

Despite the presence of serine proteases and phospholipases A2 in the *Bohtropsjararaca* venom, metalloproteasins are the most important toxins responsible to the inflammatory process induced by this venom[7]. In this study, two novel serine proteases were purified using size exclusion and reverse phase chromatography and these proteins are able to hydrolyse the chromogenic substrate BapNa, besides reveal an inflammatory activity [8]. Actually, literature reveals that the results suggest that serine protease has an edematogenic activity, however, this action is still not understood. In addition, the mechanisms involved in the edematogenic process induced by serine protease from venom were not investigated.

In the case of sPLA2, the metabolism of Arachidonic Acid (AA) is well described, and several studies show phospholipase calcium dependent (cPLA2) is considered a central enzyme in the production of eicosanoids and may play a key role in inflammatory disease due to its high selectivity to AA [8,9,10]. Eicosanoids derived from AA exert a complex control, besides that, their production is considerably increased during inflammation and their products are involved in the pathogenesis related to inflammatory process. Cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1 and COX-2) stimulate the prostaglandins (PGs), prostacyclins (PGIs) and thromboxanes (TXs) production [11,12,13]. cPLA2 is regulated by increasing intracellular levels of Ca^{2+} and by phosphorylation in response to various cellular stimuli. cPLA2 enzyme contains several crucial phosphorylation sites, including Ser505, Ser727 and Ser515 and these sites are phosphorylated by mitogen-activated protein kinases. Other calcium dependent cPLA2 also includes diacylglycerol (DAG) which is involved in activation of protein kinase C (PKC) and phospholipase C (PLC) which is responsible for the production of IP3 and DAG [14,15,16]. On the other hand, PKC and PLC are also key elements for pathway signaling mediated by the protease-activated receptor (PAR). PARs are a unique family of G-protein coupled receptors and play critical roles in homeostasis, thrombosis and inflammation. These receptors are activated by numerous proteases [17,18]. Moreover, stimulation of cPLA2 generate two important compounds, lysophospholipids and AA, which are substrate for cyclooxygenases and lipoxygenases and the mostly stable product from arachidonic pathway is prostaglandin E2 (PGE2).

Link to cell surface receptors is another essential feature of cPLA2 that stimulate signaling pathways associated with activation of protein kinases and production of reactive oxygen species (ROS) [5,13,14]. During inflammation, the AA metabolism itself may induce oxidative stress and lipid peroxidation, resulting in an increase in the generation of products such as malondialdehyde, thus generating neo-own epitopes capable of inducing potentially undesirable biological responses [19,20]. These data suggest that the serine proteases' role is not restricted to their thymine function and is an important modulating agent for blood homeostasis. These enzymatic toxins could also play a crucial role in AA mobilization and may in fact induce an inflammatory process, generating prostaglandins. Thus, in this work we

showed the edematogenic and myotoxic effects of new serine protease from *Crotalus durissus terrificus* (Cdt); snake venom (Cdtsp2) and investigated PAR receptors role and a possible pathway involved for acute inflammation induced by Cdtsp2.

2. Results

2.1. Structural Characterization

2.1.1. Amino Acid Sequence and Phylogenetic Analysis

Figure 1 shows the amino acid analysis of Cdtsp2, which was obtained and characterized according to Fonseca et al., [2], with the amino acids sequence confirmed by the Center for Research Support Facility (CEFAP) of the Institute of Biomedical Sciences (ICB/USP). Cdtsp2 serine proteases show a homology of about 80% with other snake venom serine proteases. Figure 1A shows Cdtsp2 has a nearly 90% sequence homology with the Cdt VSP 17 toxin and the serine protease from *Crotalus adamantus*. When the Cdtsp2 amino acid sequence is compared to other serine proteases from Cdt its homology drops to 80% on average. Cdtsp2 is a typical serine protease of snake venom with the catalytic triad H43, D92, and S188 conserved. In addition, Cdtsp2 reveals the presence of the complement factor binding sites D182, S203, and G205. This protein does not show the glycosylation site found in other serine proteases of *Crotalus durissus*, as observed in VSP 17 CRODU, VSP_CROADAM. In the case of Cdtsp2, the N83 residue is replaced by R83. Cdtsp2 together with VSP17 CROADAM may form a distinct group of serine proteases that are phylogenetically divergent from the already characterized serine proteases of the venom of Cdt. Thus, phylogeny analyses show Cdt serine proteases could comprise two groups: the gyroxin A and the Cdtsp2 group present in the gyroxin B group.

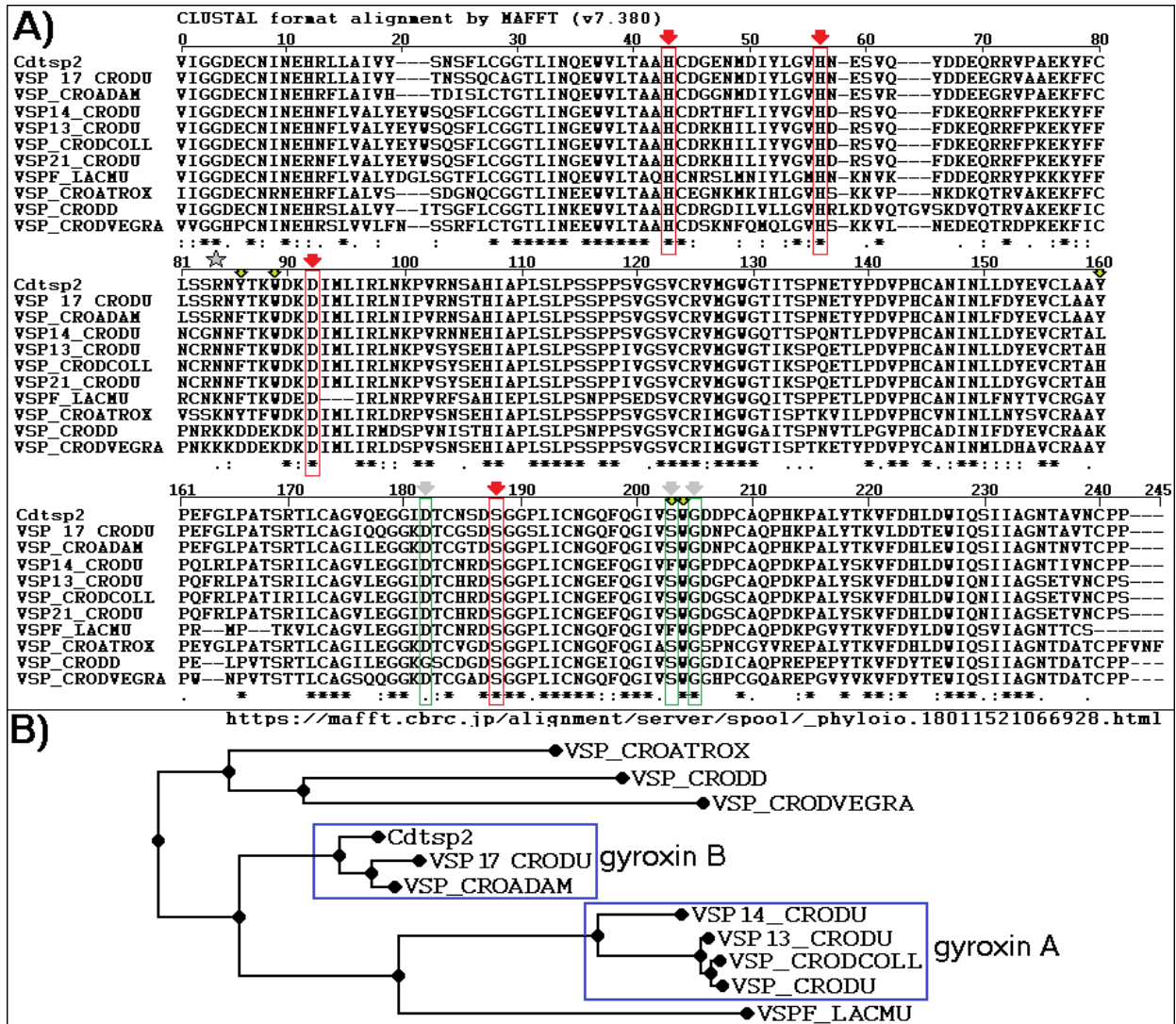


Figure1. Amino acid alignment of Cdtsp2 and the phylogenetic tree of snake venom serine proteases. Amino acid alignment of Cdtsp2 from *C. d. terrificus* and other gyroxin isoform (VSP17_CRODU, VSP13_CRODU, VSP14_CRODU, VSP_CRODCOLL) compared with other snake venom serine proteases from *Crotalus adamanteus* (VSP_CROADAM), *C.d. durissus* (VSP_CRODD). (B) shows the phylogenetic tree of snake venom serine proteases, such as the serine protease from *Lachesis mutamuta* (VSPF_LACMU), *Crotalusatrox* (VSP_CROATROX), and *C.d. vegrandis* (VSP_CRODVEGRA).

2.1.2 Circular Dichroism and the Three-Dimensional Model

Circular dichroism (CD) analysis showed 60% in Random coil, 18% in alpha propeller, and 22% in beta sheet structure. The three-dimensional model of Cdtsp2 was generated from the crystallographic structure of the serine protease of *Agkistrodonhalyspallas*, (PDB 4e7n accession code), revealing an abundance of random coils, two large beta-leaf domains, and few structures in alpha helix. The serine protease Cdtsp2 model also shows two N-terminal and C-terminal lobes. Thus, CD data as well as modeling data show Cdtsp2 has all the conventionally described structural elements for the serine proteases of snake venom.

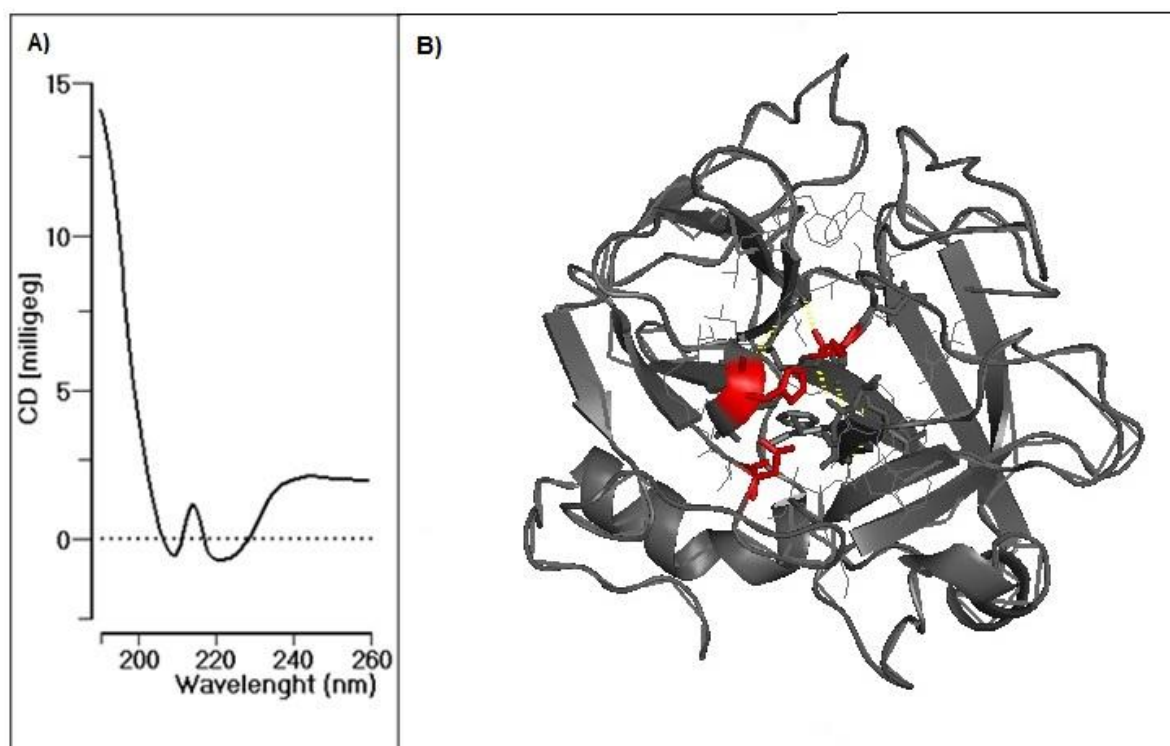


Figure 2. CD spectra and cartoon representation of Cdtsp2.(A)shows the results of CD spectra from native Cdtsp2. Data from 190–280 nm are expressed in theta machine units in millidegrees. (B)shows a cartoon representation of Cdtsp2 revealing two major N-terminal and C-terminal lobules.

2.3. Pharmacological Characterization

2.3.1 Edema Assay and Biochemical Determinations

The edema assay reveals that Cdtsp2 induces a peak of $92 \pm 6\mu\text{L}$ ($n=5$ animals) at 30 minutes after the injection of purified Cdtsp2 from Cdt venom (Figure 3A). Biochemical analyses showed that Cdtsp2 was able to induce an expressive increase of COX-2, shown in Figure 3B. Biochemical analyses show that the serine protease Cdtsp2 was able to induce an increase in plasma concentration of PGE2 four times higher than that of animals receiving saline (Figure 3C). Thus, the results of COX-2 and PGE2 show that Cdtsp2 can induce significant metabolism of arachidonic acid and prostaglandins.

A significant increase in malondialdehyde was observed in animals treated with Cdtsp2 when compared with saline-treated animals. (Figure 3D)which is the result of lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids. These data suggest an increase in oxidative stress. This stems from the fact that this compound is a reactive aldehyde and is one of many reactive electrophilic species that cause toxic stress in cells and form covalent protein fertilizers, the end-products of advanced lipoxidation.

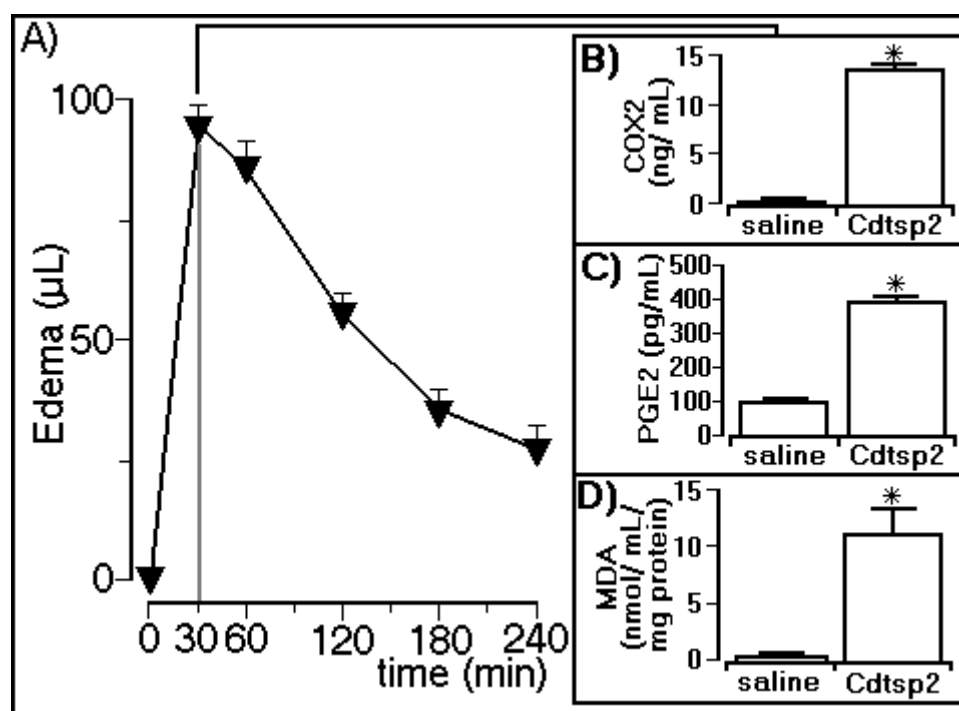


Figure 3. Paw edema induced by Cdtsp2, COX-2 expression, PGE2 concentration and MDA values. (A) shows the values of edema induced by the serine protease of Cdt. Figures (B–D), respectively, show the results of expression of COX-2, PGE2 concentration, and malondialdehyde (MDA). The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 5$). A significant difference is marked with (*). (Two-way ANOVA, with Bonferroni as a posteriori test, $F=150.0$ and $p<0.001$).

2.3.2 Edema Assay in the Presence of PLC, PKC, cPLA2 Inhibitor, and PAR1-2 Antagonist

In Figure 4A we show the effects of PAR1 and PAR2 antagonists injected into animals 30 minutes before the Cdtsp2 injection. Figure 4A shows the PAR1 inhibitor decreased the edema peak of $92 \pm 6 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals) to $71 \pm 8 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals), and in the case of the PAR2 inhibitors the edema peak was $52 \pm 9 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals) after 30 minutes following the Cdtsp2 injection. In addition, Figure 4A shows that the edema values induced by Cdtsp2 in animals treated with the antagonists of PAR1 and PAR2 were also decreased in all edema time courses. PLC and PKC inhibitors' results are shown in Figure 4B, revealing that the PKC enzyme inhibitor significantly reduced peak edema values from $92 \pm 6 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals) to $58 \pm 9 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals), while the PLC inhibitor reduced peak edema to $46 \pm 9 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals) after 30 minutes following the Cdtsp2 injection. Figure 4B also shows that the PLC inhibitor practically abolished the proinflammatory effects induced by Cdtsp2 throughout the whole edema experiment, whereas the PKC enzyme inhibitor reduced the Cdtsp2-induced edema at 30 minutes and 60 minutes. Figure 4C shows the effect of Dexamethasone (Dexa) on the edema induced by Cdtsp2. The peak of the edema induced by Cdtsp2 in animals treated with Dexa was $25 \pm 8 \mu\text{L}$ ($n = 5$ animals). Figure 4C also shows that animals treated with Dexa 30 minutes before the injection of Cdtsp2 abolished the edema induced by the serine protease Cdtsp2. Figure 4C further shows Dexa's anti-inflammatory effect on Cdtsp2-induced edema. The drug was applied to animals 10 minutes after the serine protease injection and we observed that under these experimental conditions, Dexa virtually abolished Cdtsp2-induced edema. Thus, these data clearly show that Cdtsp2 induces a significant proinflammatory effect and is mediated by arachidonic acid mobilization.

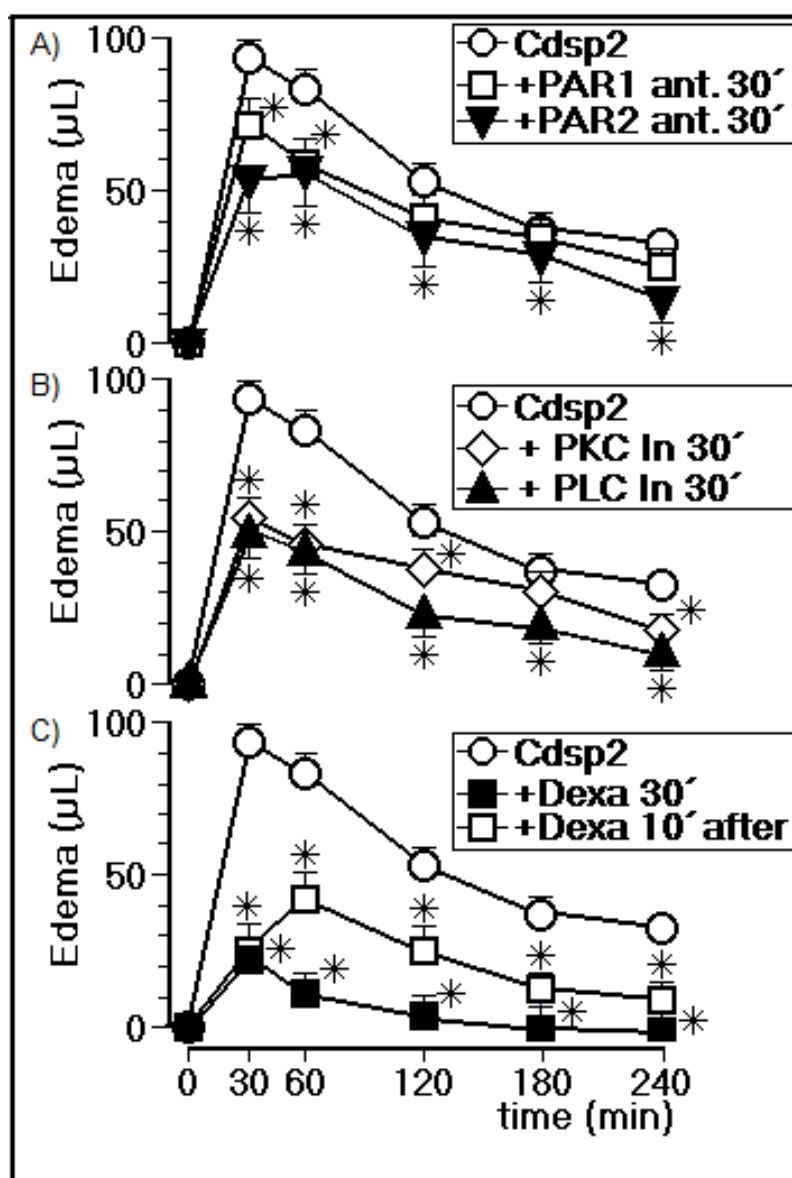


Figure 4. Paw edema assay in presence of PLC, PKC, cPLA2 inhibitor and PAR1-2 antagonist. (A) Edema induced by Cdsp2 in the presence of selective PAR1 and PAR2 antagonists injected 30 minutes before the application of the protein. (B) Edema induced by Cdsp2 in the presence of selective inhibitors of PKC and PLC injected 30 minutes prior to application of the protein. (C) Evaluation of paw edema treated with Dexamethasone were injected 30 minutes before application of Cdsp2 and 10 minutes after application of the protein. 10 μg of protein and 50 μg of selective inhibitors were used. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 5$). Significant differences are marked with (*). (Two-way ANOVA, with Bonferroni as a posteriori test, $F = 150.0$ and $p < 0.001$).

3. Discussion

3.1. Structural Analysis

In this article we report a three-dimensional model of Cdsp2 based in the results of circular dichroism (Figure 2A) and on a homologous protein of known 3D structures and its 3D model. These results suggest that Cdsp2 has a high degree of structural similarities to other snake venom serine proteases, including a hydrophobic cavity on its surface and the presence of crucial amino acid residues involved in the catalysis of snake venom serine proteases such as

H43, H56, D92, and S188 (Figure 1A) [19,20]. Amino acid residues are loaded between both the N-terminal and C-terminal lobules, which include a hydrophobic cavity of major serine proteases, containing the catalytic triad residues and other substances involved in the nucleophilic substrate attack [1,3,19,20] (Figure 1A, Figure 2B).

Studies with serine proteases of *Lachesis muta* reveal that the residues F86, W89, Y160, F203, and W204 have an essential hydrophobic cavity, which are involved in fibrinopeptide A binding and chromogenic substrates [19]. Our results show that Cdtsp2 also includes S86, W89, Y160, S203, and W204 residues, which are structurally equivalent to residues found in the serine protease of *Lachesis muta* and in human thrombin [19]. Serine proteases from *Crotalus durissus collilineatus*, as well as other Cdt that form a gyroxin also reveals these characteristics.

The subgroups shown in Figure 1B reveal that Y160 is replaced by H160; Y160 is present in the new Cdt serine protease VSP17 CRODU and in *Lachesis muta* (which is an aromatic hydrophobic amino acid). This amino acid in the serine protease subgroup gyroxin A is replaced by H160, which is a positively charged amino acid imidazole functional group.

In addition, Figure 1A also shows another very important feature, according to the data available in the Pubmed database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Data reveals that the cloned serine protease of Cdt has the N83 residue, an important glycosylation site of the serine protease. Serine protease N-glycosylation may account for up to 30% of the total serine protease mass and can contribute to increased molecular stability, in addition to significantly influencing its pharmacological capacity without changing its enzymatic activities [21,22]. The analyses of Figure 1A show that Cdtsp2 shows the substitution of N83 for R83, which suggests that this protein lacks the same glycosylation found for other isoforms of Cdt. Our results clearly show that Cdtsp2 is the first serine protease isolated from Cdt, by means of 4 chromatographic steps, molecular exclusion chromatography, (Figure S1), ion exchange chromatography (Figure S2) and reverse phase chromatography, the latter being done with two different columns (Figures S3A and S3B), which reveals a clear and evident edematogenic activity lower than edema induced by sPLA2 or metalloproteases of *Bothropsssp*, for example. The results also suggest that this activity is dependent on the ability of this enzyme to act on protein substrates and that the mode of action of Cdtsp2 could use the same structural features present in human thrombin (Figure S4 and S5).

Summarily, arachidonic acid is a component of membrane phospholipids which may be released in a one-step process following the action of PLA2, or a two-step process following phospholipase C and DAG lipase actions. However, other studies have shown that certain kinases would play a key role in the activation of cPLA2 via enzyme phosphorylation. Arachidonic acid is then metabolized by cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase, resulting in the synthesis of prostaglandins and leukotrienes, respectively. During the inflammatory process, for example, arachidonic acid is oxygenated by this two-way route. On the other hand, cyclooxygenase is an enzyme that transforms arachidonic acid into endoperoxides, which are used to synthesize prostaglandins, prostacyclins, or thromboxanes. Drugs such as aspirin and indomethacin inhibit cyclooxygenase and block the synthesis of prostaglandins and thromboxanes. The COX-2 enzyme catalyzes the conversion of arachidonic acid to different prostaglandins such as PGE2, which has been associated with increased synthesis of proinflammatory TNF- α and IL-1 β . Furthermore, these mediators are formed after the hydrolytic action of PLA2 on cell membrane phospholipids release arachidonic acid, and can also produce other metabolites such as 8-isoprostanes from arachidonic acid that can undergo non-enzymatic peroxidation by intermediates reactive oxygen species [23–33].

Our results suggest that edema, lipid peroxidation and arachidonic acid metabolism induced by Cdtsp2 during acute edema are interrelated and that these pharmacological and metabolic activities are also triggered by a common signaling pathway. According to some studies, arachidonic acid metabolism itself may be a significant source of reactive oxygen species, such as as induced by sPLA2 and PLC. Its metabolites, DAG and IP3, together with

PKC, are involved in the molecular simulation pathway for mobilization of AA by Cdtsp2. In addition, edema results showed that Cdtsp2 was able to trigger cytosolic PLA2, which plays a key role without Cdtsp2-induced edema, as it is a measure of potent inhibitor of cytosolic PLA2 [34]. Further, our results clearly demonstrate a molecular link between the PAR1 and PAR2 receptors as a key element for the edema induced by this serine protease since PAR1 and PAR2 receptors are involved in the inflammatory process modulation and are constitutively expressed in mast cells, whereas PAR3 and PAR4 are involved in PAR4 activation and modulation of platelet activity [35]. On the other hand, PAR1 is generally recognized by several coagulation factors other than thrombin itself [36]. In addition, acute edema assays demonstrate that Cdtsp2 is a pro-inflammatory agent, so a choice of inhibitors for PAR1 and PAR2 was based on an extensive review of the literature, [37]. Studies reveal that gyroscope is capable of acting at PAR1, PAR2, PAR3 and PAR4 receptors, PAR1 and PAR2 being expressed in mast cells, which play a crucial role in modulating the inflammatory process, since in the case of human thrombin it is well established that PAR receptors play an important role for the biological action of thrombin involving an activation of PKC and PLC and its main metabolites, IP3 and DAG [38-41]. In summary, we have observed that the acute edema induced by Cdtsp2 in our experimental conditions involves a G-protein signaling pathway coupled to PAR type receptors. Studies have shown that the administration of specific concentrations of PAR receptor agonists may not only decrease inflammation but may also induce an effect of hyperalgesia [42].

Finally, even in inducing small edema compared to the edema induced by the myotoxic sPLA2 of *Bothropssp*, or even in inducing edema through low molecular weight myotoxins such as crotamine, our results clearly suggest the edema induced by this protein leads an increase of oxidative stress as shown by the increased concentration of malondialdehyde (MDA). Several studies reveal an association between increased AA metabolism and the oxidative cellular stress increase caused by an increase of reactive oxygen species (such as hydrogen peroxide) [47,48]. Other studies suggest that this increase in cellular oxidative stress may be due to the increase of NADPH oxidase, which is a key molecule for increasing cellular oxidative stress [48]. Thus, the edema induced by Cdtsp2, in addition to mobilizing and leading to the metabolism of AA, can also induce a slight increase in cellular oxidative stress.

4. Conclusions

Enzymatic toxins such as snake venom serine protease or secretory snake venom phospholipase A2 induce inflammation and arachidonic acid (AA) mobilization. This event involves an indirect mobilization of cPLA2 and COX-2, besides increase the oxidative stress.

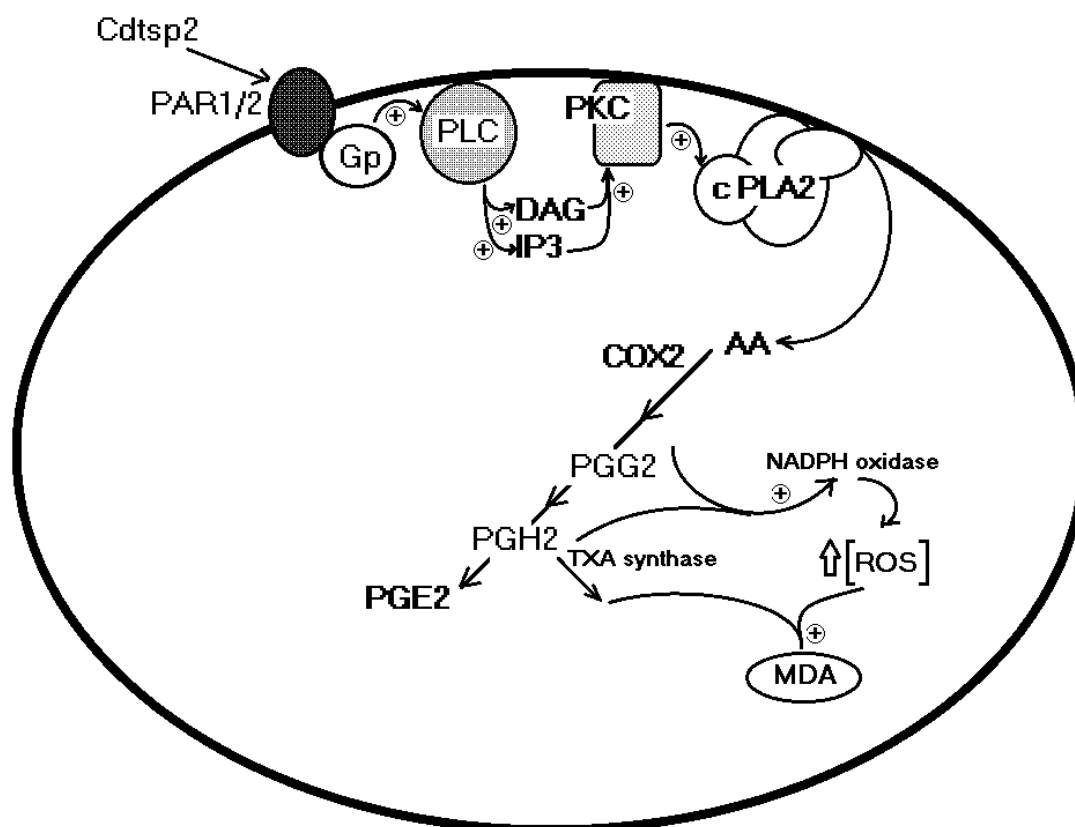


Figure 5. In summarize the pro-inflammatory effect pathway. Cdtsp2 induces edema by enzymatic cleavage of the PAR1 and PAR2 receptors, coupled with protein G which causes activation of PLC and PKC that in turn trigger an increase of cPLA2 activity by increasing the AA metabolism and its interplay with oxidative stress.

5. Materials and Methods

5.1. Primary Structure Determination

This new serine protease was purified from Cdt snake venom following the method described by Fonseca et al. [2]. Amino acid sequence characterization of this new serine protease was made using tryptic digestion and purification of peptide fragments, and determination of the primary structure of the protein was made using other serine proteases from Cdt as prime sequences for the overlapping of tryptic peptides. The determination of the primary structure of Cdtsp2 was also performed through protein sequencing undertaken by the Research Support Facility Center (CEFAP) at the Biomedical Sciences Institute (ICB) of the University of São Paulo (USP).

5.2. Circular Dichroism

Polarized light is used in the distal ultraviolet (UV) range (from 180–260 nm). This technique allows the evaluation of the structural integrity of proteins, conformational changes, and processes of denaturation (unfolding) and renaturation (folding), making it possible to estimate the composition of the elements in the secondary structure of this macromolecule. The circular dichroism analysis was performed with 0.02 mg/mL of Cdtsp2 monitored using wavelengths of 190–260 nm. The analysis was performed to 8 convolutions, and data were treated by Spectra manager.

5.3. Modeling through Homology

The models of the tertiary/quaternary structures were obtained using coordinates of serine proteases present in the protein data bank (PDB) which presented greater similarities with those identified in Cdt. For the models' construction, the Swiss-Model package [49] was used after the choice of the nearest molecule and with previously deposited molecular coordinates. The serine protease of *Agkistrodonhalys* (code PDB = 4E7N) has the highest homology and, based on these coordinates, the Cdtsp2 model was constructed. The structural model of Cdtsp2 was generated using uniprot with energy minimization parameters [49]. Molecular representations were generated using Pymol software [50].

5.4. Quantification of Enzymes

Animals' serums were used for enzymes quantification with commercial kits Blood was collected with heparin and centrifuged, and the plasma was separated and stored at -80°C for the COX-2 (Cyclooxygenase 2) and MDA (Lipid Peroxidation) assays from Abcam. The right gastrocnemius muscle was collected and stored at -80°C for quantification of PGE2 (Prostaglandin E2).

5.4.1.ab210574UsingaCOX-2 Sample Step Kit Abcam

COX-2 levels were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ab210574, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) according to the guidelines of the manufacturer.

5.4.2. ab133021 Using a Prostaglandin E2 Elisa Kit Abcam

Prostaglandin E2 (PGE2) levels were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ab133021, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) according to the guidelines of the manufacturer.

5.4.3.ab118970Using aLipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) Abcam

MDA levels were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ab118970, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) according to the guidelines of the manufacturer.

5.5. Evaluation of Paw Edema

In vivo experimental models were performed to evaluate inhibition of acute inflammation caused by purified Cdtsp2 using randomly chosen swiss mice (~25 g, n=5). These assays were performed only after in vitro investigation of inhibition or interaction of the compounds with the enzymes used in this work. Animals were treated with 50 μl (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ per animal/10 μg per animal) of the compounds via peritoneal or intravenous injection. A saline solution (0.9% NaCl) was used for the controls. There were 14 groups: Saline, Cdtsp2, Cdtsp2: PKC, Cdtsp2: PLC, Cdtsp2: PAR1 antagonist, Cdtsp2: Antagonist PAR2, PKC, PLC, PAR1 antagonist, PAR2 antagonist, two Dexamethasone groups, and two Cdtsp2 groups: Dexamethasone. Edema volume monitoring was achieved using a Digital Plethysmometer about four hours. After the tests, the mice were anaesthetized and sacrificed via cervical dislocation. In vivo experiments were performed according to the institutional rules and were approved by the ethics committee from UNESP, number 014-CEUA.

5.5.1. ML161-PAR1 Antagonist and SML 1039 Antagonist PAR2

A total of 100 μL (50 μg) of PAR 1 antagonist ML161 (Sigma) ($\text{IC}_{50} = 0.026 \text{ } \mu\text{M}$, dissolved in 0.5% DMSO) was injected intraperitoneally 30 minutes before applying 20 μl (10 μg) of the Cdtsp2 protein on the right paw. A total of 100 μl (50 μg) of PAR 2 antagonist SML 1039 (Sigma) ($\text{IC}_{50} = 1.2 \text{ mM}$, dissolved in saline) was injected intraperitoneally 30 minutes before applying 20 μl (10 μl) of the Cdtsp2 protein in the right paw.

5.5.2. U73122 PLC Inhibitor

A total of 20 μ L (50 μ g) of U73122 (Tocris) PLC inhibitor (30 mg/kg, dissolved in 0.5% DMSO) was injected intravenously with PLC inhibitor 30 minutes before 20 μ L (10 μ g) of Cdtsp2 protein was applied in the right paw.

5.5.3. GF109203X PKC Inhibitor

A total of 20 μ L (50 μ g) of PKC inhibitor GF109203X (Tocris 30 mg/kg, dissolved in 0.5% DMSO) was injected into the right paw 30 minutes before applying 20 μ L (10 μ g) of the Cdtsp2 protein, also in the right paw.

5.5.4 Dexamethasone

A total of 100 μ L (50 μ g) of the anti-inflammatory corticosteroid Dexamethasone, for veterinary use, (Corvet) (0.5 ml/kg per animal) was injected intraperitoneally into the right paw 10 minutes after the injection of the Cdtsp2 protein. In another group the same procedures as mentioned above were followed, however, application of Dexamethasone occurred 30 minutes before applying 20 μ L (10 μ g) of the Cdtsp2 protein, also in the right paw.

5.6. Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviations. The results were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) of one or two routes followed by the Bonferroni and t-test with statistical variance $p < 0.05$.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/link, Figure S1: **Figure S1.** Venom purification in chromatographic column Superdex G75 pre-packed in a chromatographic column on a HPLC column (1.6 x 60 cm) previously equilibrated with two column volumes with ammonia bicarbonate buffer (0.1M, pH 7.9) with isocratic flow maintained at 0.2 mL / min. **Figure S2.** The sample purified from total venom was repurified on a DEAE 5PW Protein Pack ion exchange (Supelco) column. Fractionation was performed on a column previously equilibrated with 0.05M Ammonia Bicarbonate buffer, pH 7.9. **Figure S3: A:** C4 reverse phase chromatography using solution gradient A (0.05% TFA) for 10 minutes for salt removal and followed by a stepwise gradient with 100% solution B (Acetonitrile 66% in solution A). Fractionation was carried out at a flow rate of 2 mL / min and the elution monitoring was performed at 280nm. Therefore, the fraction was separated into three new fractions: F201, F202 and F203. **B:** Purification of F202 chromatographic profile from Cdt4, using C18 reverse phase chromatography. Two-dimensional SDS-Page confirmed the sample purity with a single molecular weight band estimated at approximately 27kDa and pI of approximately 4.5. Conventional SDS-Page showed that F202 has fibrinogenolytic activity, revealing thrombin-like characteristics. **Figure S4:** Enzymatic assay of Cdtsp2 (absorbance x time). **Figure S5:** In the attached figure, we present a set of results compiled showing the fractionation of the whole crotoxin and fractionation of the CA (acid component, Crotoxin A, crotapotin, Crpt), CB (basic component, Crotoxin B, secretory Phospholipase A2, sPLA2) and a new group of proteases that are eluted with fraction F20 and that after a period of chromatographic production gave serine protease F202 non-venom of *Crotalus durissus cascavella* or Cdtsp2 in the venom of Cdt.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Boldrini-França, J.; Santos Rodrigues, R.; Santos-Silva, L.K.; de Souza, D.L.; Gomes, M.S.; Cologna, C.T.; de Pauw, E.; Quinton, L.; Henrique-Silva, F.; de Melo Rodrigues, V.; Arantes, E.C. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2015**, *99*(23), 9971-9986.
2. Fonseca, F.V.; Antunes, E.; Morganti, R.P.; Monteiro, H.S.; Martins, A.M.; Toyama, D.O.; Marangoni, S.; Toyama, M.H. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J.* **2006**, *25*(3), 183-192.
3. Yonamine, C.M.; Prieto-da-Silva, A.R.; Magalhães, G.S.; Rádis-Baptista, G.; Morganti, L.; Ambiel, F.C.; Chura-Chambi, R.M.; Yamane, T.; Camillo, M.A. Cloning of serine protease cDNAs from

- Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon* **2009**, 54(2), 110-120.
4. da-Silva-Freitas, D.; Boldrini-França, J.; Arantes, E.C. PEGylation: a successful approach to improve the biopharmaceutical potential of snake venom thrombin-like serine protease. *Protein Pept Lett.* **2015**, 22(12), 1133-1139.
 5. Mamede, C.C.; de Sousa, B.B.; Pereira, D.F.; Matias, M.S.; de Queiroz, M.R.; de Moraes, N.; Vieira, S.A.; Stanziola, L.; de Oliveira, F. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon* **2016**, 117, 37-45.
 6. Nikai, T., Suzuki, Y., Komori, Y. and Sugihara, H. 2000. Edema factor from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishimahabu). *J Nat Toxins.* 9(2), 147-158.
 7. Zychar, B.C., Dale, C.S., Demarchi, D.S. and Gonçalves, L.R. 2010. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon.* 55(2-3), 227-234
 8. Patiño, A.C., Pereañez, J.A., Gutiérrez, J.M. and Rucavado, A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. *Toxicon.* 2013 63, 32-43.
 9. Burke, J.E.; Dennis, E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* **2009**, 50 Suppl, S237-S242.
 10. Leslie, C.C. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **2015**, 56(8), 1386-1402.
 11. Lindgren, C.A.; Newman, Z.L.; Morford, J.J.; Ryan, S.B.; Battani, K.A.; Su, Z. Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 glycerol ester and nitric oxide are involved in muscarine-induced presynaptic enhancement at the vertebrate neuromuscular junction. *J Physiol.* **2013**, 591(19), 4749-4764.
 12. Norris, P.C.; Gosselin, D.; Reichart, D.; Glass, C.K.; Dennis, E.A. Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. *PNAS.* **2014**, 111, 12746-51.
 13. Mouchlis, V.D.; Dennis, E.A. Membrane and Inhibitor Interactions of Intracellular Phospholipases A2. *Adv Biol Regul.* **2016**, 61, 17-24.
 14. Farooqui, A.; Horrocks, L. Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences,* **2005**, 45 (5), 613-631.
 15. Cosentino-Gomes, D.; Rocco-Machado, N.; Meyer-Fernandes, J.R. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int J Mol Sci.* **2012**, 13(9), 10697-10721.
 16. Newton, A.C. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2010**, 298(3), E395-E402.
 17. Grimsey, N.; Soto, A.G.; Trejo, J. Regulation of Protease-activated Receptor Signaling by Posttranslational Modifications. *IUBMB Life.* **2011**, 63(6), 403-411.
 18. Hamilton, J.R.; Trejo, J. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2017**, 57, 349-373.
 19. Sun, G.Y.; Chuang, D.Y.; Zong, Y.; Jiang, J.; Lee, J.C.M.; Gu, Z.; Simonyi, A. Role of cytosolic phospholipase A2 in oxidative and inflammatory signaling pathways in different cell types in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* **2014**, 50(1), 6-14.
 20. Baskol, G.; Demir, H.; Baskol, M.; Kilic, E.; Ates, F.; Karakukcu, C.; Ustdal, M. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2006, 24(4), 307-311.
 21. Busch, C.J.; Binder, C.J. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta.* **2017**, 1862(4), 398-406.
 22. Castro, H.C.; Silva, D.M.; Craik, C.; Zingali, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta.* **2001**, 1547(2), 183-195.
 23. Maroun, R.C.; Serrano, S.M. Identification of the substrate-binding exosites of two snake venom serine proteinases: molecular basis for the partition of two essential functions of thrombin. *J. Mol. Recognit.* **2004**, 17(1), 51-61.
 24. Mukherjee, A.K. The Pro-Coagulant Fibrinogenolytic Serine Protease Isoenzymes Purified from *Daboia russelii* Venom Coagulate the Blood through Factor V Activation: Role of Glycosylation on Enzymatic Activity. *PLoS One* **2014**, 9(2), e86823.
 25. Goettig, P. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(12), 1969.
 26. Farooqui, A.A.; Horrocks, L.A. Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod. Nutr.* 2005, 45(5), 613-631.

27. Clark, J.D. Schievella, A.R.; Nalefski, E.A.; Lin, L.L. Cytosolic phospholipase A2.J. Lipid Mediat Cell Signal. 1995, 12(2-3), 83-117.
28. Coorsen, J.R. Phospholipase activation and secretion: evidence that PLA2, PLC, and PLD are not essential to exocytosis. *Am J Physiol*. 1996, 270(4 Pt 1), C1153-C1163.
29. Masliah, J.; Berguerand, M.; Bereziat, G. [Coupling of seven transmembrane domains receptors cytosolic PLA2: role of G proteins and protein kinases]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1996;190(4), 417-423.
30. Börsch-Haubold, A.G. Regulation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation. *Biochem Soc Trans*. 1998, 26(3), 350-354.
31. Gijón, M.A.; Leslie, C.C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J. Leukoc. Biol*. 1999, 65(3), 330-336.
32. Balsinde, J.; Balboa, M.A.; Dennis, E.A. Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D1 macrophage-like cells. *J. Biol. Chem*. 2000, 275(29), 22544-22549.
33. Touqui, L.; Alaoui-El-Azher, M. Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr Mol Med*. 2001, 1(6), 739-754.
34. Xu, J.; Weng, Y.I.; Simonyi, A.; Krugh, B.W.; Liao, Z.; Weisman, G.A.; Sun, G.Y. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes. *J. Neurochem*. 2002, 83(2), 259-270.
35. Balsinde, J.; Winstead, M.V.; Dennis, E.A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS letters* 2002, 531(1), 2-6.
36. Balboa, M.A.; Balsinde, J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1761(4), 385-391.
37. Soubhye, J.; van Antwerpen, P.; Dufrasne, F. Targeting Cytosolic Phospholipase A2 α for Novel Anti-Inflammatory Agents. *Curr Med Chem*. 2018, 16.
38. Cinque, B.; Fanini, D.; Di Marzio, L.; Palumbo, P.; La Torre, C.; Donato, V.; Velardi, E.; Bruscoli, S.; Riccardi, C.; Cifone, M.G. 2008. Involvement of cPLA2 inhibition in dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008, 21(3), 539-551.
39. Alves da Silva, J.A.; Muramoto, E.; Ribeiro, M.T.C.P.; Rogero, J.R.; Camillo, M.A.P. 2006. Biodistribution of gyroxin using 125-iodine as radiotracer. *J. Radiat. Nucl. Chem*. 269(3), 579-583.
40. Waasdorp, M.; Duitman, J.; Spek, A. 2017. Plasmin reduces fibronectin deposition by mesangial cells in a protease-activated receptor-1 independent manner. *Biochem Biophys Rep*. 10, 152-156.
41. Yonamine, C.M.; Prieto-da-Silva, A.R.; Magalhães, G.S.; Rádis-Baptista, G.; Morganti, L.; Ambiel, F.C.; Chura-Chambi, R.M.; Yamane, T.; Camillo, M.A. Enzyme specificity and effects of gyroxin, a serine protease from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, on protease-activated receptors. *Toxicon* 2014, 79, 64-71.
42. Trejo, J. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003, 307(2), 437-442.
43. Traynelis, S.F.; Trejo, J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol*. 2007, 14(3), 230-235.
44. Dale, C.; Vergnolle, N. Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications for inflammation and pain. *J Recept Signal Transduct Res*. 2008, 28(1-2), 29-37.
45. Vergnolle, N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005, 100 Suppl 1:173-6.
46. Balboa, M.A.; Balsinde, J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1761(4), 385-391.
47. Korbecki, J.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I. and Chlubek, D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol*. 2013, 64(4), 409-421.
48. Cho, K.J.; Seo, J.M.; Kim, J.H. Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Mol Cells*. 2011, 32(1), 1-5.
49. Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T. and Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, Vol 12 gku340.
50. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific; 2015. ©



2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CONCLUSÕES:

1. Conclusão capítulo 1.

Foi possível identificar e caracterizar μ Ma nova serino protease encontrada em peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que possui atividades biológicas semelhantes a giroxina, com características de trombina-símile demonstradas pelos ensaios do presente trabalho, possuindo estrutura e sítio catalítico conservado. Porém, a cdtsp-2 possui diferenças contundentes com a giroxina em relação a sua estrutura e características físico-químicas, aumentando então a concentração de serinoproteases presentes no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, o que aumenta a problemática do soro antiveneno, uma vez que as serinoproteases não são totalmente neutralizadas pelo tratamento tradicional.

2. Conclusão Capítulo 2

A *Laguncularia racemosa* é uma planta do mangue que apresenta capacidade de inibir a atividade enzimática da trombina humana, por causa da sua rica composição de flavonóides. Estes compostos são descritos na literatura ressaltando sua capacidade antioxidante e assim importantes ao combate ao processo inflamatório. No entanto a nova serino protease purificada do veneno de Cdt, apresenta alta capacidade de indução ao processo inflamatório e mionecrótico, possivelmente muito similar a sPLA2 de veneno de serpentes. Porém, os extratos e compostos puros de *Laguncularia racemosa*, não foram eficientes ao combate aos danos induzidos pela Cdtsp2, ou seja, não se apresentou uma opção adequada para tratamento secundário ao soro antiofídico. Estes resultados foram importantes balizadores para iniciarmos os estudos quanto ao mecanismo de ação da serino protease em questão neste estudo.

3. Conclusão Capítulo 3 - Artigo Toxins

A via de efeito inflamatório proposta envolvida e utilizada por Cdtsp2 para induzir edema por clivagem enzimática do acoplamento do receptor PAR1 o PAR2 com a proteína G que leva a ativação do PLC e PKC que desencadeiam aumento da atividade de cPLA2 pelo aumento do metabolismo do ácido araquidônico e sua interação com estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS:

- Adukauskienė, D.; Varanauskienė, E.; Adukauskaitė, A. Venomous snake bite. *Medicina*, v. 47, n. 8, p. 461-467, 2011.
- Andrião-Escarso SH, Sampaio SV, Cunha OAB, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon* 1997; 35 (7): 1043-52
- Alexander, K. A., Wakim, B. T., Doyle, G. S., Walsh, K. A. & Storm, D. R. (1988) *J. Biochem.* 263, 7544-7549
- Arnold I, et al. (2006) Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1. *Gene* 367:74-88
- A. Giullietti, R. Harley, L. De Queiroz, M. Wanderley, C. Van den Berg, Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation biology* 19 (3) (2005) 632-639.
- Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC - Natal, RN - Julho/2010.
- Andrews, R.K; Berndt, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*. Jun; 38 (6): 775-91, 2000.
- ALI, S.A; Stoeva, S; Abbasi, A; Alam, J.M; Kaye, R; Faigle, M; Neumeister, B; & Voelter, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 216-226, 2000.
- A. Mukhopadhyay, P. Stahl, Bee venom Phospholipase A2 is recognized by the macrophage mannose receptor. *Arch Biochem Biophys* 324 (1) (1995) 78-84.
- A.T. Tu, Blood coagulation, venoms chemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, New York (1977).
- A.T. Tu, Hemorrhage Induced by Snake Venoms. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 81 (1982) 807-818.
- Baride RM. Jain SD, Gaitonde BB. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian J Med Res.* 1980;72:571-6.
- Bernade, P. S.; Gomes, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 42, n. 1, p. 1, 2012.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T. and Schwede, T. (2014). SWISS- MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, Vol 12 gku340.
- Balsinde, J.; Winstead, M. V; Dennis, E. A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, v. 531, n. 1, p. 2-6, out. 2002.
- Bandaranayake, W. M. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and salt marshes* v. 164863, p. 133-148, 1998.
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., de Paula, S.O., Minim, V.P.R. and Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4), 629-643.
- Bayer, S.B., Maghazal, G., Stocker, R., Hampton, M.B. and Winterbourn, C.C. 2013. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. *FASEB J.* 27(8), 3315-3322.
- Benipal, B., Feinstein, S.I., Chatterjee, S., Dodia, C. and Fisher, A.B. 2015. Inhibition of the phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 prevents lung damage with exposure to hyperoxia. *Redox Biol.* 4, 321-327.

- Berlyn, G. P. Coastal trees: the botany of mangroves. *Science* (New York, N.Y.), v. 234, n. 4774, p. 373, 1986.
- Bernade, P. S.; Gomes, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 42, n. 1, p. 1, 2012.
- Berenguer B, Sánchez LM, Quílez A, López-Barreiro M, de Haro O, Gálvez J, et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006;103(2):194–200. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105005040>
- Biology and Medicine. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.
- Biology and Medicine. v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.
- Brizuela, M., Huang, H.M., Smith, C., Burgio, G., Foote, S.J. and McMorran, B.J. 2014. Treatment of erythrocytes with the 2-cys peroxiredoxin inhibitor, Conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PLoS One*. 9(4), e92411.
- Bjarnason, J.B & Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 62(3):325-72, 1994.
- Boffa, M.C; Boffa, G.A. A phospholipase A2 with anticoagulant activity II. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Enzymology*, 429 (3), 839-852, 1976.
- Braud, S; Bon C & Wisner, A Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 82, (9-10): 851-859, 2000.
- Brazil, O.V; & Fontana, M.D. Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle membrane. *Toxicon* 31: 1085-1098, 1993
- Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research*, v. 50 Suppl, p. S237–42, maio 2009
- Calvette, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, v. 583, n. 11, 1736-1743, 2009.
- Camillo, M.AP., ArrudaPaes,P.C., Troncone, L.R.P.,Rogero,J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rot and mouse striatal tissue. *Toxicon*, v.39,p.843-853,2001.
- Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 131–4, 22 ago. 2005
- Calvette, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, v. 583, n. 11, 1736-1743, 2009.
- Camillo, M.AP., Arruda Paes,P.C., Troncone, L.R.P.,Rogero,J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rot and mouse striatal tissue. *Toxicon*, v.39,p.843-853,2001.
- Castrogiovanni, P. and Imbesi, R. 2012. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. *Ital J Anat Embryol*. 117(2), 107-117.
- Chiricozzi, E., Fernandez-Fernandez, S., Nardicchi, V., Almeida, A., Bolanos, J.P., Goracci, G. 2010. Group IIA secretory phospholipase A2 (GIIA) mediates apoptotic death during NMDA receptor activation in rat primary cortical neurons. *J Neurochem* 112(6), 1574-1583.
- Da Silva, N.J., Aird, S.D., Seebart, C. and Kaiser, I.I. 1989. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* 27(7), 763-771.
- D. de Oliveira, M. Murakami, A. Cintra, J. Franco, S. Sampaio, R. Arni, Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus*

- durissus terrificus and Crotalus durissus collilineatus. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 41 (1)(2009)21-29.
- DE Paula, Rafael Cisne . Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente Lachesis muta. Dissertação submetida à Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia. NITERÓI/RJ, 90 p. 2009.
- Ding, Y., Yamada, S., Wang, K.Y., Shimajiri, S., Guo, X., Tanimoto, A., Murata, Y., Kitajima, S., Watanabe, T., Izumi, H., Kohno, K. and Sasaguri, Y. 2010.
- Drickman, K. Recognition of complex carbohydrate by Ca^{+2} dependent animal lectins. Biochem. Soc. Trans. 21(2): 456-459, 1993.
- Drickman, K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins structure. 5, (4): 465-468, 1997.
- DU, X.Y. & Clemetson, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases-Review. Toxicon. 695-665, 2002.
- DE Paula, Rafael Cisne . Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente Lachesis muta. Dissertação submetida à Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia. NITERÓI/RJ, 90 p. 2009.
- De Oliveira DGL, Murakami MT, Cintra ACO, Franco JJ, Sampaio SV, Arni RK. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of Crotalus durissus terrificus and Crotalus durissus collilineatus. ActaBiochimbiophys Sin. 2009; 41 (1):21-9.
- DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA: DeLanoScientific; 2015.
- Emerenciano, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. Biochemical Systematics and Ecology, v. 29, n. 9, p. 947–957, 2001.
- E.P.Schenkel, G. Gosmann, P.R. Petrovick, Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. Porto Alegre (Ed.), Farmacognosia: da planta ao medicamento (1999).
- E.Miyabara, R. Tostes, H. Selistre-de-Araújo, M.Aoki, A.Moriscot, Role of nitric oxid in myotoxic activity induced by crotoxin in vivo. Toxicon 43 (4) (2004)425-432.
- Espinosa, L. et al. Wood variation in Laguncularia racemosa and its effect on fibre quality. Wood Science and Technology, v. 38, n. 3, p. 217–226, 1 jun. 2004.
- Fagundes, F.H., Aparício, R., dos Santos, M.L., Diz Filho, E.B., Oliveira, S.C., Toyama, D.O. and Toyama, M.H. 2011. A catalytically inactive Lys49 PLA2 isoform from Bothrops jararacussu venom that stimulates insulin secretion in pancreatic beta cells. Protein Pept Lett. 18(11), 1133-1139.
- FAO. Food and Agronomy Organization. The world's Mangroves 1980-2005. v. 143, 2007.
- Fernandes, C.A., Borges, R.J., Lomonte, B. and Fontes, M.R. 2014. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. Biochim Biophys Acta. 1844(12),2265-2276.
- Fernandes, C.A., Cardoso, F.F., Cavalcante, W.G., Soares, A.M., Dal-Pai, M., Gallacci, M. and Fontes, M.R. 2015. Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A2-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. PLoS One. 10(7), e0133370.
- Fisher, A.B. 2011. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. Antioxid Redox Signal. 15(3), 831-844.
- Fisher, A.B. 2011. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. Antioxid Redox Signal. 15(3), 831-844.
- Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G. and Ursini, F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. Antioxid Redox Signal. 15(3), 763-780.

- F.M.O. Pinho, I.D.Pereira, Ofidismo. Rev. Ass. Med. Brasil 47 (1) (2001)24-29.
- Farooqui, A. A. and Horrocks, L. A. 2006. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: The Good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist*, 12, 245-260.
- Furukawa, K.; Funayama, K.; Ohkura, M.; Oshima, Y.; TU, A.T.; Ohizumi. Y. Ca²⁺ release induced by myotoxin a, a radio-labellable probe having novel Ca²⁺ release properties in sarcoplasmatic reticulum. *Br. J. Pharmacol.* 113: 233239, 1994.
- Falcão, Felipe Jose de Andrade, Carvalho, Leonardo, Chan, Mark, Alves, Cláudia Maria Rodrigues, Carvalho, Antônio Carlos Camargo, & Caixeta, Adriano Mendes. (2013). Receptores plaquetários P2Y₁₂: importância na intervenção coronariana percutânea. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 101(3), 277-282. Epub August 06, 2013. <https://dx.doi.org/10.5935/abc.20130162>
- FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; MORGANTI, R. P.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A M. C.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S., Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *The protein journal*, v. 25, n. 3, p.183–92, 2006.
- Gomes et al., 2011 M.S. Gomes, M.R. de Queiroz, C.C. Mamede, M.M. Mendes, A. Hamaguchi, M.I. Homs-Brandeburgo, M.V. Sousa, E.N. Aquino, M.S. Castro, F. de Oliveira, V.M. Rodrigues Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom.
- Gutiérrez, J. M; Rucavado, A; Escalante, T; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. V.45,p.997-1011,2005.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. 2013. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27-39.
- Gutiérrez, J.M., Fan, H.W., Silvera, C.L. and Ângulo, Y. 2009. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 53(6), 625-630.
- Giulietti, A.M. et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology*, v.19, n.3, p.632-9, 2005.
- Gogo, A.J.D., Sinqueira, A.F., Ramos, A.C., Cruz, Z.M.A. and Silva, A.G. 2009. Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. *Natureza on line* 7 (1): 37-42.
- Gozal, D. and Kheirandish-Gozal, L. 2008. The multiple challenges of obstructive sleep apnea in children: morbidity and treatment. *Curr Opin Pediatr.* 20(6), 654-658.
- Gutiérrez, J. M; Rucavado, A; Escalante, T; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. V.45,p.997-1011,2005.
- Gutiérrez, J.M. and Lomonte, B. 2013. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27-39.
- Gutiérrez, J.M., Fan, H.W., Silvera, C.L. and Ângulo, Y. 2009. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 53(6), 625-630.
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(4), 561-564.
- Hifumi, T., Sakai, A., Kondo, Y., Yamamoto, A., Morine, N., Ato, M., Shibayama, K., MMezawa, K., Kiri, N., Kato, H., Koido, Y., Inoue, J., Kawakita, K. and Kuroda, Y. 2015. Venomous snake bites: clinical diagnosis and treatment. *J Intensive Care.* 3(1),:16.

- <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/l2-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>
- Huancahuire-vega, S. et al. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Porthidium myoprora* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology, v. 154, n. 2, p. 108-119, 2011.
- Hall, A., Karplus, P.A. and Poole, L.B. 2009. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. FEBS J. 276(9), 2469-2477.
- Hall, L., Otter, J.A., Chewins, J. and Wengenack, N.L. 2007. Use of hydrogen peroxide vapor for deactivation of *Mycobacterium tuberculosis* in a biological safety cabinet and a room. J Clin Microbiol. 45(3), 810-815.
- Harris, J.B. and Scott-Davey, T. 2013. Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. Toxins (Basel). 5(12), 2533-2571.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, v. 55, n. 6, p. 481-504, nov. 2000.
- Hati, R, Mitra, P, Sarker, S, Bhattacharyya, K K. Snake venom hemorrhagins. Crit. Rev. Toxicol. 29 (1): 1-19, 1999.
- Hifumi, T., Sakai, A., Kondo, Y., Yamamoto, A., Morine, N., Ato, M., Shibayama, K., MMEzawa, K., Kiriou, N., Kato, H., Koido, Y., Inoue, J., Kawakita, K. and Kuroda, Y. 2015. Venomous snake bites: clinical diagnosis and treatment. J Intensive Care. 3(1):16.
- Hirabayashi, J.; Kusunoki, T.; Kasai, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca^{+2} dependent type lectins. J.Biol. Chem. 266 (4):2320-2326, 1991.
- Hou, J.K., Huang, Y., He, W., Yan, Z.W., Fan, L., Liu, M.H., Xiao, W.L., Sun, H.D. and Chen, G.Q. 2014. Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. Cell Death Dis. 5:e1400.
- <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/l2-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>
- Huancahuire-vega, S. et al. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology, v. 154, n. 2, p. 108-119, 2011.
- Huang, Q.Q; Teng, M.K. & Niu, L.W. Purification and characterization of two fibrinogen-clotting enzyme from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. Toxicon, 999-1013, 1999.
- I. Sano-Martins, S.Tomy, D.Campolina, M. Dias, S. de Castro, M. de Sousa-e-Silva, C.Amaral, N. Rezende, A. Kamiguti, D. Warrell, R. Theakston, Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. Qjm-an International journal of Medicine 94 (10)(2001)551-559.
- Ishii, T., Warabi, E. and Yanagawa, T. 2012. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. J Clin Biochem Nutr. 50(2),91-105.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J. and Lee, S.Y. 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display

- oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*. 117(5), 625-635.
- J.Evangelista, A. Martins, N. Nascimento, C.Sousa, R.Alves, D.Toyama, M. Toyama, J.Evangelista, D. Menezes, M. Fonteles, M. Fonteles, M. Moraes, H. Monteiro, Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durssis cascavella* venom. *Toxicon* 52 (7)(2008)737-744.
- J.Gutiérrez, L.Ponce-Soto, S.Marangoni, B. Lomonte, Systemic and local myotoxicity induced by snake vem group II phospholipase A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. *Toxicon* 51 (1) (200) 80-92.
- Jiménez, N., Escalante, T., Gutiérrez, J.M. and Rucavado, A. 2008. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *J Invest Dermatol*. 128(10), 2421-2428.
- Kamiguti, A.S.; Zuze, M. Theakston, R.G.D. South venom metalloproteinases and desintegrins: interctions with cells. *Braz. J. Med. Res*, 31: 853-862, 1998.
- Kasturiratne, A. et al. The global snake burden of snakebite: A literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLOS Medicine*, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.
- Kang, D.H., Lee, D.J., Lee, K.W., Park, Y.S., Lee, J.Y., Lee, S.H., Koh, Y.J., Koh, G.Y., Choi, C., Yu, D.Y., Kim, J. and Kang, S.W. 2011. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells. *Mol Cell*. 44(4), 545-558.
- Kini, R. & Evans, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28: 1387-1422,1990.
- Kitsiouli, E., Nakos, G. and Lekka, M.E. 2009. Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 1792(10), 941-953.
- Knox, G.A., Miyabara, T. Coastal Zone Resource Development and Conservation in Southeast Asia. With Special Reference to Indonesia. In: Unesco, jakarta, indonesia. [s.l: s.n.]. p. 182
- Kornalik, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of Toxinology*, pp 683 (Shier, W.T. & Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker, 1990.
- Kuniyoshi, A.K., Rocha, M., Cajado Carvalho, D., Juliano, M.A., Juliano Neto, L., Tambourgi, D.V. and Portaro, F.C. 2012. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* 59(1), 124-131
- Kasturiratne, A. et al. The global snake burden of snakebite: A literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLOS Medicine*, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.
- Kuniyoshi, A.K., Rocha, M., Cajado Carvalho, D., Juliano, M.A., Juliano Neto, L., Tambourgi, D.V. and Portaro, F.C. 2012. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* 59(1), 124-131.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lima, A.C.S.F.; Campos, C.E.C.; Ribeiro, J.R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. *Revista da Sociedade Brasileira deMedicina. Tropical*, v. 42, n. 3, p. 329-335, 2009a.
- Lambeau, G. and Gelb, M. H. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem*. 77, 495-520.

- Lien, Y.C., Feinstein, S.I., Dodia, C. and Fisher, A.B. 2012. The roles of peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 in protecting pulmonary microvascular endothelial cells against peroxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 16(5), 440-451.
- L.Ferreira, O. Henriques, A. Andreoni, G. Vital, M. Campos, G. Habermehl, V. de Moraes, Antivenom and biological effects of ar - turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* (10)(1992)1211-1218.
- Lima, A.C.S.F.; Campos, C.E.C.; Ribeiro, J.R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 3, p. 329-335, 2009a.
- Liu, C.X., Yin, Q.Q., Zhou, H.C., Wu, Y.L., Pu, J.X., Xia, L., Liu, W., Huang, X., Jiang, T., Wu, M.X., He, L.C., Zhao, Y.X., Wang, X.L., Xiao, W.L., Chen, H.Z., Zhao, Q., Zhou, A.W., Wang, L.S., Sun, H.D. and Chen, G.Q. 2012. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nat Chem Biol*. 8(5), 486-493.
- Lopes, A.M., Oliveira-Nascimento, L., Ribeiro, A., Tairum, C.A. Jr, Breyer, C.A., Oliveira, M.A., Monteiro, G., Souza-Motta, C.M., Magalhães, P.O., Avendaño, J.G., Cavaco-Paulo, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.O., Sette, L.D., Converti, A. and Pessoa, A. 2015. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit Rev Biotechnol*. 23,1-18.
- Matte, A., Bertoldi, M., Mohandas, N., Na, X., Bugatti, A., Brunati, A.M., Rusnati, M., Tibaldi, E., Siciliano, A., Turrini, F., Perrotta, S. and De Franceschi, L. 2013. Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radic Biol Med*. 55,27-35.
- Mendez, J. ; Bilia, AR; Morelli, I. Investigações fitoquímicas do gênero *Licania* . Flavonoids e triterpenoids de *Licania pittieri* . *Pharm. Acta Helv*. 1995 , 70 , 223-226
- M.Murakami, I.Kudol, Phospholipase A2. *J.Biochem* 131 (3) (2002) 285-292.
- Ministério da Saúde- Governo Federal. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>. – 12/02/2016 as 21h18.
- Murakami, M. Diversity of Phospholipase A 2 Enzymes Hot Topics in Phospholipase A 2 Field. *Biology Pharmacology*, v. 27, n. August, p. 1179–1182, 2004.
- Moore, A.H. and O'Banion, M.K. 2002. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 54(12), 1627-1656.
- Muchowicz, A., Firczuk, M., Chlebowska, J, Nowis, D., Stachura, J., Barankiewicz, J., Trzeciecka, A., Kłossowski, S., Ostaszewski, R., Zagożdżon, R., Pu, J.X., Sun, H.D. and Golab, J. 2014. Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds. *Biochem Pharmacol*. 89(2), 210-216.
- Murakami, M. and Lambeau, G. 2013. Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: an update. *Biochimie* 95(1),43-50.
- Murakami, M. and Taketomi, Y. 2015. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol Int*. 64(1),4-10.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Yamamoto, K. and Lambeau, G. 2014. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: the 3rd edition. *Biochimie*. 107 Pt A, 105-113.
- Mamede CCN, de Sousa BB, Pereira DF da C, Matias MS, de Queiroz MR, de Moraes NCG, et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops*

- moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon* [Internet]. 2016;117:37–45
- Markland FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes. An updated inventory. *Thromb Haemost.* 1988;79.
- Menaldo DL, Bernardes CP, Pereira JC, Silveira DSC, Mamede CCN, Stanziola L, et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Aug 25];15(4):764–71
- Nadur-Andrade, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med Sci*, v. 27, p. 65–70, 2012. Neurath H. (1986) The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell. Biochem.*, 32, 35–49. [PubMed]
- Neurath H. (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 14, 268–271
- Nadur-Andrade, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med Sci*, v. 27, p. 65–70, 2012.
- Nanda, B.L., Nataraju, A., Rajesh, R., Rangappa, K.S., Shekar, M.A. and Vishwanath, B.S. 2007. PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants--a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem.* 7(8):765-777.
- Neumann, C.A., Cao, J. and Manevich, Y. 2009. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 8(24), 4072-4078.
- Niewiarowski, S; McLane, M.A; Kloczewiak, M; Stewart, G.J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol.* Oct; 31(4):289-300, 1994.
- N. Marsh, V. Williams, Practical applications of snake venom. *Toxins in haemostases.* *Toxicon* 45 (8) (2005)1171-1181.
- Nussmeier, N.; Whelton, A. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *The new England Journal of medicine*, p. 1081–1091, 2005.
- Ogasawara, Y., Ohminato, T., Nakamura, Y. and Ishii, K. 2012. Structural and functional analysis of native peroxiredoxin 2 in human red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(7), 1072-1077.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D.C., Netto, L.E. and Augusto, O. 2007. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med.* 42(3),326-334.
- Ouyang C. & Teng C.M. The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Thromb Haemost.* 25, 41(3):475– 490, 1979.
- Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice. *Antioxid Redox Signal.* 13(10), 1477-1490.
- Ownby, C.L., Colberg, T.R. and White, S.P. 1997. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A2 myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* 35(1), 111-124.
- O'Farrell, Patrick H. "alta resolução Two-Dimensional Electrophoresis" *Journal of Biological Chemistry* 250.10(1975): 4007-4021
- Oshima-Franco Y, Hyslop S, Prado-Franceschi J, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus*

- terrificus* (South American rattlesnake) venom and its major toxin, crotoxin. *Toxicon*. 1999;37:1341–1357
- Pawelek, P.D; Cheah, J; Coplombe, R; Macheroux, P; Ghisla, S; Vrieling, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *Embo J*. Aug 15; 19(16):4204-15, 2000.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B. And Karplus, P.A. 2015. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci*. 40(8), 435-445.
- Perkins, A., Poole, L.B. and Karplus, P.A. 2014. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry* 53(49), 7693-7705.
- Piccolo, G., Chacur, M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F. and Cury, Y. 2002. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res*. 35(10), 1221-1228.
- Prance, G. T.; Tomlinson, P. B. The Botany of Mangroves. *Brittonia*, p. 10, 1987 R.Kini, H. Evans, Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28 (12)(1990)1387-1422
- Piccolo, G., Chacur, M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F. and Cury, Y. 2002. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res*. 35(10), 1221-1228.
- Pochet, L., Frédérick, R. and Masereel, B. 2004. Co μ Marin and isoco μ Marin as serine protease inhibitors. *Curr Pharm Des*. 10(30), 3781-3796.
- Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C., Furtado, M. de F. and Tambourgi, D.V. 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 52(8), 842-851.
- Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C., Furtado, M. de F. and Tambourgi, D.V. 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 52(8), 842-851.
- Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz J Med Biol Res*. 1986; 19(3):333-38.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(Pt 1), 205–218.
- Reuter, S., Prasad, S., Phromnoi, K., Ravindran, J., Sung, B., Yadav, V.R., Kannappan, R., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B. 2010. Thiocolchicoside exhibits anticancer effects through downregulation of NF- κ B pathway and its regulated gene products linked to inflammation and cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 3(11), 1462-1472.
- Reyes, A.M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R. and Trujillo, M. 2011. Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic Biol Med*. 51(2), 464-473.
- Reyes, A.M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R. and Trujillo, M. 2011. Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic Biol Med*. 51(2), 464-473.
- . Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamento por Animais Peçonhentos no Brasil. São Paulo, Sarvier, 2003. p. 289-303.

- Schagger, H. and Von Jagow, H. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379
- Saccoccia, F., Di Micco, P., Boimis, G., Brunori, M., Koutris, I., Miele, A.E., Morea, V., Sriratana, P., Williams, D.L., Bellelli, A. and Angelucci, F. 2012. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Structure* 20(3), 429-439.
- Sakurai, Y; Takatsuka, H; Yoshioka, A; Matsui, T; Suzuki, M; Titani, K; Fujimura, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon*. Dec; 39(12):1827-3, 2001.
- Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, E.M., Lillig, C.H., Bowler, L.D., Chan, P., Vaudry, D., Mengozzi, M., Coppo, L., Sacre, S., Atkuri, K.R., Sahaf, B., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L., Mullen, L. and Ghezzi, P. 2014. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(33), 12157-12162.
- Samy, P. R., Gopalakrishnakone P. and Chow, V.T. 2012b. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). *Bioinformation* 8(1):48-57.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Stiles, B.G., Girish, K.S., Swamy, S.N., Hemshekhar, M., Tan, K.S., Rowan, E.G., Sethi, G. and Chow, V.T. 2012. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. *Curr Med Chem*. 19(36), 6150-6162.
- Santos-Mendonça, I. et al. Are *Laguncularia racemosa* galled leaves less attractive to chewing herbivores? *Neotropical Biology and Conservation*, v. 4, n. 2, p. 77–82, 24 ago. 2009.
- Sato, A., Hoshino, Y., Hara, T., Muro, S., Nakamura, H., Mishima, M. and Yodoi, J. 2008. Thioredoxin-1 ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 325(2),380-388.
- Scandalios, J. G. Introduction to Oxyradicals. *Free Radical*
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 38(7), 995-1014.
- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J.J. and Jiménez, A. 2015. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *J Exp Bot*. 66(10), 2945-2955.
- Shi, H., Yu, H.J., Wang, H.Y., Wang, W.T., Jin, S.H., Zhu, P., Li, S.J., Rong, C.T. and Li, J.Y. 2012. Topical administration of peroxiredoxin-6 on the cornea suppresses inflammation and neovascularization induced by ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(13), 8016-8028.
- SHILPI, J. A. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic activity of mangrove plants: A mini review. *Advances in Pharmacological Sciences*, p 7, 2012.
- Sies, H. 2014. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 289(13), 8735-8741.
- Smolka, M.B; Marangoni, S; Oliveira, B; Novello, J.C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. Jul; 36(7):1059-63, 1998.
- Sobotta, M.C., Liou, W., Stöcker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., Scharf, A.N. and Dick, T.P. 2015. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol*. 11(1),64-70.

- Spalding, M. D.; Blasco, E.; Field, C. D. World Mangrove Atlas. The International Society for Mangrove Ecosystems, p. 178, 1997.
- Suhr, S.M. & Kin, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 224(1): 134 – 139, 1996.
- Szabo, L.G., Molnár, P. and Botz, L. 2007. Medicinal plant research and phytochemical traditions of Pécs. *Acta Pharm Hung.* 77(1),29-35.
- Seki C, Vidal JC, Barrio A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon.* 1980;18 (3): 235-47
- T.A.Fernandes, C.N.Aguiar, E.F.Daher, Envenenamento Crotálico: Epidemiologia, insuficiência Renal aguda e outras manifestações químicas, *Revista Eletronica Pesquisa Médica* 2 (2) (2008)1-10.
- TairuM, C.A. Jr, de Oliveira, M.A., Horta, B.B., Zara, F.J. and Netto, L.E. 2012. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. *J Mol Biol.* 424(1-2),28-41.
- Tempore, A.G; Andrade Jr.; H.F., Spencer, P.J., Lourenço, C.O., Rogero, J.R., & Nascimento, N. Bothrops moojeni venom kills Leishmania ssp. with hydrogen peroxide by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 620-624, 2001.
- Tonon, E., Ferretti, R., Shiratori, J.H., Santo Neto, H., Marques, M.J. and Minatel, E. 2012. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in mdx mice. *Nutrition* 28(6),686-690.
- Toyama, D.O., Marangoni, S., Diz-Filho, E.B., Oliveira, S.C. and Toyama, M.H. 2009. Effect of μ Mbelliferone (7-hydroxyco μ Marin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon* 53(4), 417-426.
- Toyama, DO; Gaeta, HH; Pinho, MVT; Ferreira, MJP; Romoff, P .; Matioli, FF; Magro, AJ; de Mattos Fontes, MR; Toyama, MH MMa avaliação da quercetina 3-rhamnosil, μ Ma forma glicosilada de quercetina, contra os efeitos miotóxicos e edematogênicos da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* . *Biomed. Res. Int.* **2014** , 2014
- Ximenes, R.M., Alves, R.S., Pereira, T.P., Araújo, R.M., Silveira, E.R., Rabello, M.M., Hernandez, M.Z., Soares, V.C., Bristot, D., Pires, C.L., Toyama, D.O., Gaeta, H.H., Monteiro, H.S. and Toyama, M.H. 2012. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. *BMC Complement Altern Med.* 27;12:139
- Warrell, D. A. Snake bite. *The Lancet*. Vol. 375, n. 9708, 77- 88, 2010.
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrel, D.A., White, J., Winkel, K.D. et al. 2010. The global snake bite initiative: An antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89-91.
- Williams MG, Shirai H, Shi J, Nagendra HG, Mueller J, Mizuguchi K, Miguel RN, Lovell SC, Innis CA, Deane CM, Chen L, Campillo N, Burke DF, Blundell TL, de Bakker PI. Sequence-structure homology recognition by iterative alignment refinement and comparative modeling. *Proteins.* 2001;5:92-7.
- Wang J, Cox DG, Ding W, Huang G, Lin Y, Li C. Three New Resveratrol Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Alternaria* sp. *Mar Drugs* [Internet]. 2014 May 13;12(5):2840–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052320/>
- Warrell, D. A. Snake bite. *The Lancet*. Vol. 375, n. 9708, 77- 88, 2010.

- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrel, D.A., White, J., Winkel, K.D. et al. 2010. The global snake bite initiative: An antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89-91.
- Wood, Z.A., Poole, L.B. and Karplus, P.A. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 300(5619), 650-653.
- Yagami, T. et al., 2001. Deterioration of axotomy-induced neurodegeneration by group IIA secretory phospholipase A2. *Brain Res.* 917, 230-234.
- Yagami, T. et al., 2002. Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol Pharmacol.* 61, 114-126.
- Yamasaki, S.C. et al. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon.* v. 52, p. 445-454, 2008.
- Yashiro, M., Tsukahara, H., Matsukawa, A., Yamada, M., Fujii, Y., Nagaoka, Y., Tsuge, M., Yamashita, N., Ito, T., Yamada, M., Masutani, H., Yodoi, J. and Morishima, T. 2013. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med.* 41(1), 171-181.
- Yonamine, C.M., Prieto-da-Silva, A.R., Magalhães, G.S., Rádis-Baptista, G., Morganti, L., Ambiel, F.C., Chura-Chambi, R.M., Yamane, T. and Camillo, M.A. 2009. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon* 54(2), 110-120.
- Yonamine, C.M., da Silva, A.R.B.P. and Magalhães, G.S. 2013. Serine proteases — Cloning, Expression and Potential Applications, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Dr. Gandhi Radis-Baptista (Ed.), ISBN: 978-953-51-1151-1, InTech, DOI: 10.5772/53063.
- Yonamine, C.M., Prieto-da-Silva, A.R., Magalhães, G.S., Rádis-Baptista, G., Morganti, L., Ambiel, F.C., Chura-Chambi, R.M., Yamane, T. and Camillo, M.A. 2009. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon* 54(2), 110-120.
- Yonamine, C.M., da Silva, A.R.B.P. and Magalhães, G.S. 2013. Serine proteases — Cloning, Expression and Potential Applications, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Dr. Gandhi Radis-Baptista (Ed.), ISBN: 978-953-51-1151-1, InTech, DOI: 10.5772/53063.
- Zhang Y, et al. (1998) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell* 1(7):1021-31.
- Zhu Z, Liang Z, Zhang T, Zhu Z, Xu W, Teng M, Niu, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *J Biol chem.* 2005;280(5):10524-29.