

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

Avaliação da ação protetora de extratos de *Laguncularia racemosa* na evolução da atividade farmacológica de sPLA2: Danos moleculares e resposta antioxidante durante o processo inflamatório.

Rolando Ié

São Vicente-SP

2018

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

Avaliação da ação protetora de extratos de *Laguncularia racemosa* na evolução da atividade farmacológica de sPLA2: Danos moleculares e resposta antioxidante durante o processo inflamatório.

Mestrando: Rolando Ié

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista São Vicente, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Bioquímica, Biologia Molecular e Moléculas Biologicamente Ativas

São Vicente-SP

2018

615.32 Ié, Rolando
R618 Avaliação da ação protetora de extratos de *Laguncularia racemosa* na evolução da atividade farmacológica de sPLA2: Danos moleculares e resposta antioxidante durante o processo inflamatório / Rolando Ié. - São Vicente, 2018.
65 p.: il, figs., gráfs.

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

Orientador: Marcos Hikari Toyama

Co-orientador: Marcos Antônio Oliveira

1. Biologia molecular. 2. Farmacologia. 3. *Laguncularia racemosa*. 4. Foslipase A2. 5. Veneno de serpente. 6. Estresse oxidativo. 7. Extratos vegetais. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Campus do Litoral Paulista

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Instituição: UNESP-IB/CLP

Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto

Instituição: UNESP-IB/CLP

Prof. Dr. Fernando Gomes

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da ação protetora de extratos de *Laguncularia racemosa* na evolução da atividade farmacológica de sPLA2: Danos moleculares e resposta antioxidante durante o processo inflamatório

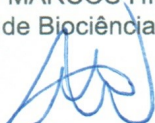
AUTOR: ROLANDO IÉ

ORIENTADOR: MARCOS HIKARI TOYAMA

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



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



Prof. Dr. MILTON COSTA LIMA NETO
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Dr. FERNANDO GOMES
Instituto de Biociências / USP

São Vicente, 22 de fevereiro de 2018

Dedico este trabalho aos meus três irmãos: Flávio lé, Tome lé e Albino lé pelo sofrimento e dor de tudo aquilo que têm passado, vocês são três guerreiros. Valentese imortais!

Vamos lutar, a vida é tão difícil poucos conseguem vencer, não tenham inveja de ninguém e muito menos a raiva ou ódio, vamos vingar pelo bem da humanidade!

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, em especial ao Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista, por ter me oferecido a infraestrutura necessário e adequado para desenvolver este trabalho. Agradeço ao professor Dr. Marcos Hikari Toyama e ao professor Dr. Marcos Antônio de Oliveira, pela orientação e co-orientação fornecendo todos meios possíveis para desenvolver este trabalho, gostaria de agradecer pela determinação e confiança que vocês têm depositado em mim e agradeço-o pela oportunidade, obrigado por tudo.

Gostaria de agradecer ao Marcos Antônio de Oliveira e a Denise Martins de Valle, por ser a melhor coisa que poderia acontecer na minha vida e por tudo que vocês têm feito para construir uma vida digna e proporcionado para mim ao longo dessa trajetória, obrigado por tudo.

Agradeço aos colegas do trabalho do Laboratório de Biomoléculas e Peptídeos (Biomolpep), Dr. Henrique Gaeta pela grande contribuição ao longo da execução dos experimentos deste trabalho. E aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (Labimes), Dr. Carlos Alexandre Breyer pela contribuição em ajudar com as técnicas do Western blot, bem como outras técnicas.

E gostaria de agradecer a todos integrantes do laboratório, por serem grande colegas e exemplo do profissionalismo dentro do ambiente do trabalho e pela contribuição de cada um de vocês têm dedicado neste trabalho, agradeço a todos no fundo do meu coração!

Gostaria de agradecer aos Professores Dr. Milton C. L. Neto e Dr. Fernando Gomes por compor a banca examinadora e gostaria de agradecer professor Dr. Gustavo Maruyama Mori, membro da banca de qualificação.

Meus agradecimentos especiais à Dra. Renata Bannitz Fernandes pela ajuda em me auxiliar nas construções também nos demais experimentos do projeto, amo você Curu.

Gostaria de agradecer toda família Raposo, pelo suporte ao longo desses anos, e meus agradecimentos especiais para Rose Raposo, Dr. Marcos Jessé, Gabriel Raposo, Aline Geralde e Dra. Arina Raposo, João Pedro Raposo, Rosana Raposo e toda família Raposo e em especial a Ariana, te amo Ariana obrigado por tudo que vocês têm contribuindo para o meu crescimento.

Gostaria de agradecer ao Laboratório do Rodoxoma do IB-USP do Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto por disponibilizar seus equipamentos e seus alunos, Renata Bannitz Fernandes e Thiago Alegria em me auxiliarem nos experimentos.

Agradeço aos meus irmãos de coração, Leonardo Schultz da Silva, Carlos Abranhosa Tairum Jr, Gabriel Raposo, Pedro Bellini Dantas Leite, Francisco Cammarota Paulino, Lucas Antal Cruz e Thiago Hirata Sugiuti.

Resumo: Os acidentes ofídicos foram recentemente incorporados na lista de doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil, uma parcela significativa destes acidentes (~10%) é ocasionada pela serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), popularmente conhecida como cascavel. Dentre os componentes do veneno, a fosfolipase A2 secretória (sPLA2) representa aproximadamente 35% da massa do veneno seco. A Cdt sPLA2 responde pela atividade mais importante e clinicamente significativa que inicia com o processo inflamatório logo após o contato com a peçonha. Quando não tratada, a peçonha pode fazer com que o indivíduo sofra com insuficiência renal aguda, a qual não é neutralizada em curto espaço de tempo, nem mesmo pelo antiveneno específico. O processo inflamatório em diversas doenças humanas, está altamente relacionado com a formação de altas quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), conhecido como explosão oxidativa/nitrosativa. Este processo é combatido por moléculas de baixo peso molecular como (vitaminas D e E, e glutatona), como também por enzimas antioxidantes, como a catalase (Cat), superóxido dismutase (Sod) e peroxirredoxinas (Prx). Já foi demonstrado que as sPLA2 humanas compartilham grande similaridades bioquímicas e farmacológicas com seus homólogos de serpentes e são capazes de induzir a formação de EROs e ERNs em células de mamíferos, mas nenhum estudo até o presente momento abordou de forma sistemática danos em biomoléculas efetuados por EROs e ERNs e a expressão de proteínas antioxidantes em resposta a administração de sPLA2 de serpentes. Recentemente demonstramos que a administração de extratos de *Laguncularia racemosa* (mangue branco) capazes de inibir a ação da trombina, entretanto não foram efetuadas avaliações se a aplicação do extrato de *L. racemosa* frente a Cdt sPLA2. Também é importante salientar que apesar de existir inúmeros trabalhos de caracterização bioquímica, farmacológica e estrutural de sPLA2 de serpentes até o presente momento poucos trabalhos tiveram como objetivo sua produção de forma recombinante. Este ponto é importante pois a manipulação gênica destas proteínas, através de mutações sitio dirigidas, podem auxiliar a identificar resíduos envolvidos na catálise, levando a uma melhor compreensão dos mecanismos funcionais, abrindo caminho para novas abordagens terapêuticas para o tratamento do envenenamento por serpentes. Adicionalmente, a enzima sPLA2 de origem animal é utilizada em processos biotecnológicos e possui importância econômica. Este trabalho teve dois grandes objetivos: 1) investigar a existência de danos oxidativos, a expressão de proteínas antioxidantes em resposta a administração de sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt sPLA2), bem com avaliar possíveis efeitos protetores da administração de extratos butanólico e de acetato de etila extraídos de folhas de *L. racemosa* após a inoculação da Cdt sPLA2 na fase tardia da edemaciação; 2) Obtenção de sPLA2 recombinante de Cdt (Cdt sPLA2r) visando fornecer subsídios para sua manipulação genética e maior entendimento de seu funcionamento. Com relação ao primeiro objetivo nossos resultados indicam que os extratos de *L. racemosa* não são capazes de inibir o processo de edemaciação induzido por Cdt sPLA2. A investigação de processos indicadores de estresse oxidativo como oxidação de sulfidrilas, carbonilação proteica e peroxidação lipídica não indicaram a existência de estresse oxidativo na fase tardia do processo de edemaciação ocasionado por Cdt sPLA2. Também avaliamos os níveis de expressão e modificação das proteínas antioxidantes Sod, Cat e Prx2 por *western blot*, e os resultados também revelaram que os níveis da enzima foram muito similares independente da administração de Cdt sPLA2 ou Cdt sPLA2 com extratos de *L. racemosa*. Em conjunto os resultados indicam fortemente que não ocorre estresse oxidativo na fase tardia do processo da edemaciação por Cdt sPLA2. No caso do segundo objetivo foi possível clonar, expressar e purificar a enzima recombinante Cdt sPLA2 (Cdt sPLA2r). Análises da atividade de fosfolipase revelaram que Cdt sPLA2r possui padrão de atividade Michaeliana ao passo que a enzima purificada do veneno possui perfil alostérico. Adicionalmente a velocidade inicial (V_0) de Cdt sPLA2r ($10.8 \times 10^{-1} \mu\text{M/s}$) foi maior que para a enzima nativa ($7.1 \times 10^{-1} \mu\text{M/s}$). A expressão de Cdt sPLA2r abre caminhos para investigações envolvendo mutações sitio dirigidas para melhor entendimento da enzima, a qual também possui importância biotecnológica. Em conjunto os resultados apresentados neste trabalho representam avanços na compreensão do processo de toxicológico envolvido na ação de Cdt sPLA2 e de sua expressão recombinante.

Palavras chaves: Venenos de serpentes, Fosfolipase A2 secretória, Estresse oxidativo, Enzimas recombinantes

Abstract: Snake envenomation have recently been added to the list of tropical neglected diseases by the World Health Organization (WHO). In Brazil, a significant portion of ophidian accidents (~ 10%) is caused by the *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) snake, popularly known as rattlesnake. Among the components of the venom, secretory phospholipase A2 (sPLA2) accounts for approximately 35% of the mass of the dry venom. Cdt sPLA2 accounts for the most important clinical damages and to the inflammatory process. When untreated, venomation can cause acute renal failure, which is not neutralized in a short time, not even by the specific antivenom. The inflammatory process, which is very well characterized in several human diseases, is highly related to the formation of high amounts of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), known as oxidative / nitrosative burst. This process is counteracted by low molecular weight molecules such as vitamins D and E and glutathione, as well as antioxidant enzymes such as peroxiredoxins (Prx). human sPLA2 share high biochemical and pharmacological similarities with their snake homologs and are able to induce the formation of ROS and RNS in mammalian cells, but no study to date has systematically addressed damage to biomolecules carried out by ROS and RNS and the expression of peroxiredoxins in response to sPLA2 administration of snakes. We have recently shown that the administration of polyphenolic extracts of *Laguncularia racemosais* able to inhibit the action of thrombin, however, were not evaluated the action of *L. racemosa* extracts administration combat the deleterious effects of the Cdt sPLA2. It is also important to point out that although there are numerous biochemical, pharmacological and structural characterizations of sPLA2 from snakes, at the presene, few studies have aimed at its production by recombinant techniques. This is very important since the genetic manipulation of these proteins through site-directed mutations can help identify residues involved in catalysis, leading to a better understanding of the functional mechanisms, which may in future be reflected in new therapeutic approaches. Additionally, these enzymes are used in biotechnological processes. This work had two main objectives: 1) to investigate the existence of oxidative damages, the expression of antioxidant proteins in response to sPLA2 administration of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt sPLA2), and to evaluate possible protective effects of the administration of butanolic and acetate extracts of ethylene extracted from *L. racemosa* leaves after inoculation of the Cdt sPLA2 at the late stage of edema; 2) the production of recombinant Cdt sPLA2 (Cdt sPLA2r) to provide subsidies for its genetic manipulation aiming a better understanding of molecular aspects of the enzyme function as also its applicability in biotechnological processes. Regarding the first objective, our results indicate that extracts of *L. racemosa* were not able to inhibit the process of the edema induced by Cdt sPLA2. The investigation of oxidative stress markers such as sulfhydryl oxidation, protein carbonylation and lipid peroxidation did not identify the existence of oxidative stress in the late phase of the edema process caused by Cdt sPLA2. We also evaluated levels of expression and modification of the antioxidant proteins Sod, Cat and Prx2 by western blot, and the results also revealed that enzyme levels were very similar regardless of the administration of Cdt sPLA2 or Cdt sPLA2 with extracts of *L. racemosa*. Together the results strongly indicate that oxidative stress does not occur in the late phase of the edema caused by Cdt sPLA2. In the case of the latter objectives it was possible to clone, express and purify the recombinant enzyme Cdt sPLA2 (Cdt sPLA2r). Analysis of the phospholipase activity revealed that Cdt sPLA2r has a Michaelian environment activity whereas the enzyme purified from the venom has an allosteric profile. In addition, the initial velocity (V_0) of the Cdt sPLA2r ($10.8 \times 10^{-1} \mu\text{M} / \text{s}$) was higher than for the native enzyme ($7.1 \times 10^{-1} \mu\text{M} / \text{s}$). The expression of Cdt sPLA2r opens pathways for investigations involving site directed mutations to a better understanding of the enzyme, which also has biotechnological importance. Together the results presented in this work represent advances in the understanding of the toxicological process involved in the action of Cdt sPLA2 and its recombinant expression.

Keywords: Snake venoms, Secretory Phospholipase A2, Oxidative Stress, Recombinant enzymes

LISTA DE ABREVIATURAS

Cat	Catalase
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GPx	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography)
HPx	Hidroperóxidos
HRP	Peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase)
IFN- γ	Interferon gama
IMAC	Cromatografia de afinidade por metais imobilizados
iNOS	Óxido nítrico sintetase
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
NADPH	β - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NEM	N-etilmaleimida
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
Lp-OOH	Hidroperóxido de lipídeo
LPS	Lipopolissacarídeos
\cdot OH	Radical hidroxila
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
O ₂ \cdot^-	Radical ânion superóxido
MDA	Malondialdeído
NFK- β	Fator de transcrição nuclear K- β
NO \cdot	Óxido nítrico
NOOH	Peroxinitrito protonado
NOO \cdot^-	Peroxinitrito desprotonado
NOS	Óxido nítrico sintetase
Prx	Peroxirredoxina
R.m.s.d.	Desvios quadráticos médios (Root mean square deviations)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
Sod	Superóxido dismutase
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression (meio de cultura)
sPLA2	Fosfolipase A ₂ secretória
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (ativador de transcrição e transdutor de sinal 3)

TNF	Fator de necrose tumoral
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
WT (wild type)	Linhagem selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Diferentes classes e especificidades de fosfolipases.....	19
Figure 2. Estrutura cristalográfica de sPLA2 básica dependentes de Ca^{++} de serpentes.....	19
Figure 3. Estruturas cristalográficas de sPLA2 de serpente e humanos	20
Figure 4. Reações de Harber-Weiss e Fenton	22
Figure 5. Avaliação dos extratos butanólico e de acetato de etila sobre a atividade de Cdt sPLA2.	36
Figure 6. Avaliação da edemaciação da pata de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> em resposta aos tratamentos com Cdt sPLA2 e extratos de <i>L. racemosa</i>	37
Figure 7. Resultado de extração do extrato proteico total de tecido de pata de camundongos submetido a diferentes condições.....	38
Figure 8. Avaliação dos níveis de carbonilação de proteica de amostras.	39
Figure 9. Determinação de tióis livres nos extratos proteicos totais	40
Figure 10. Avaliação da peroxidação lipídica (MDA) em resposta a administração de Cdt sPLA2 na fase pós aguda de edemaciação.....	41
Figure 11. Resultado de <i>western blot</i> para detecção de S-Nitrosilação proteica.....	42
Figure 12. Análise da expressão de Sod1 em amostras tratadas com Cdt sPLA2 e Cdt sPLA2 e extratos de <i>L. racemosa</i>	43
Figure 13. Resultado de <i>western blot</i> com anticorpo monoclonal de camundongo anti-catase.....	44
Figure 14. Resultado de <i>western blot</i> com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Prx2 e anticorpo anti espécie superoxidada (anti- $SO_{2/3}H$)	45
Figure 15. Clonagem de Cdt sPLA2	47
Figure 16. Expressão de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r) as linhagens pLysS BL21 (DE3) e BL21 (DE3).....	48
Figure 17. Estrutura primária e terciária de Cdt sPLA2 revelam elevada quantidade de resíduos cisteínas.....	49
Figure 18. Expressão de Cdt sPLA2r utilizando a linhagem Origami (DE3) e purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC)	50
Figure 19. Expressão de Cdt sPLA2r utilizando a linhagem BL21 (DE3) C43.....	51

Figure 20. Avaliação da atividade de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r).	51
Figure 21. SDS PAGE contendo o resultado de purificação de Cdt sPLA2 recombinante.....	52
Figure 22. Avaliação da atividade de sPLA2 recombinante.....	53

Sumário

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 Acidentes ofídicos	17
1.2 Composição do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	17
1.3 Características funcionais e estruturais das fosfolipases	18
1.3 O processo inflamatório e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (ERNS).....	21
1.4 Decomposição de EROs e ERNs por enzimas antioxidantes	23
1.5 Laguncularia racemosa como fonte de biofármacos	25
2. OBJETIVOS	27
3. Materiais e Métodos	28
3.1 Purificação da sPLA2 de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	28
3.2 Extratos e moléculas isoladas de <i>L. racemosa</i>	28
3.3 Indução do edema de pata por sPLA2	29
3.4 Extração e quantificação de proteínas totais.....	29
3.5 Carbonilação de proteínas método colorimétrico	29
3.6 Avaliação de grupos sulfidrilas método DTNB á 412 nm.....	29
3.7 Avaliação da nitrosilação de proteínas método westem blot	30
3.8 Análise da expressão de níveis protéicos Cat, Sod1 e Prx2	30
3.9 Avaliação da peroxidação lipídica método colorimétrico	31
3.10 Análises estatísticas	31
3.11 Clonagem de sPLA2.....	31
3.12 Oligonucleotídeos.....	31
3.13 Seleção de transformantes.....	32
3.14 Sequenciamento de DNA	32
3.15 Meios de cultura, linhagens e plasmídeos.....	33

3.15.1 Meios de Cultura:	33
3.15.2 Linhagens de	33
3.15.3 Plasmídeos:.....	33
3.16 Expressão e purificação de proteínas recombinantes por IMAC	33
3.17 Purificação pelo método de fervura	34
3.18 Liofilização do extrato proteico purificado pelo método de fervura	34
3.19 Ensaio para verificação de atividade de fosfolipase	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Efeitos da administração de extratos <i>L. racemosa</i> na indução do edema de pata por Cdt sPLA2	36
4.2 Proteínas totais de patas de camundongos extraídos após o tratamento com Cdt sPLA2.....	37
4.3 Avaliação da carbonilação de proteínas após a administração de Cdt sPLA 2 e extratos de <i>L. racemosa</i>	38
4.4 Quantificação de grupos sulfidrilas livres	39
4.6 Avaliação da peroxidação lipídica	40
4.7 Avaliação da nitrosilação de proteínas	41
4.8 Análise da expressão das enzimas antioxidantes Sod1, Cat 1 e Prx2	42
5. Obtenção de sPLa2 <i>C. durissus terrificus</i> recombinante	46
5.1 Clonagem de Cdt sPLA2	46
5.1 Padronização da expressão de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r).....	48
5.2 Ensaio de atividade para Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r).....	51
5.3 Purificação por fervura de sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r).....	52
5.1 Conclusão e Perpectivas	54
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos ocasionados por serpentes são considerados como uma doença tropical negligenciada que afeta todos os anos centenas de milhares de indivíduos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Apesar da soroterapia, estes acidentes são responsáveis pelo óbito de uma parcela significativa dos atingidos, sendo que muitos indivíduos desenvolvem sequelas físicas permanentes que afetam a sua qualidade de vida (Zornetta *et al.*, 2012). Apesar da grande biodiversidade existente entre as serpentes, no continente americano as espécies da família Viperidae são responsáveis pela grande maioria dos envenenamentos ofídicos. Na América do Sul, em especial no Brasil, a espécie *Crotalus durissus terrificus*, conhecida popularmente como cascavel, responde por grande parte dos casos de acidentes ofídicos graves (Azevedo-Marques, 2003).

O envenenamento por picada de *C. durissus terrificus* é capaz de induzir alterações patológicas locais como edemas, mionecrose, dermonecrose, bolhas e hemorragia (Gutiérrez *et al.*, 2009a). Adicionalmente, o veneno desta serpente também é capaz de induzir alterações fisiopatológicas no nível sistêmico como coagulopatias, insuficiência renal aguda e choque cardiovascular (Gutiérrez *et al.*, 2009b; Marchi-Salvador *et al.*, 2008). Esta ampla matriz de alterações fisiopatológicas é induzida pela ação dos diversos componentes do veneno da serpente como metaloproteases, serino proteases, fosfolipase A2 (PLA2), além de outros componentes os quais já foram caracterizados no nível bioquímico e farmacológico (Hernandez-Oliveira *et al.*, 2005; Marchi-Salvador *et al.*, 2007; Toyama *et al.*, 2014).

1.2 Composição do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O veneno de *C. durissus terrificus* é considerado extremamente tóxico levando a letalidade aproximada de 72% em casos não tratados e de 5% nos tratados com soroterapia. Seus componentes são complexos, contendo enzimas, toxinas e peptídeos. Dentre as toxinas, algumas já foram identificadas, como crotamina, crotoxina, giroxina, convulsina, crotapotina e fosfolipase A2, com destaque para a crotoxina, que representa 50% da composição proteica do veneno (Cruz *et al.*, 2009). A crotoxina corresponde à maior fração do veneno do gênero crotálico, é responsável pela composição de 65% do total da peçonha e é considerado o principal componente

tóxico do veneno. Esta toxina é formada por 2 subunidades, sendo uma básica, a fosfolipase A2secretória (sPLA2), e uma ácida, a crotapotina, que inibe a atividade enzimática e potencializa a letalidade da fosfolipase. A sPLA2 presente na crotoxina possui ação miotóxica e neurotóxica do veneno (Cunha e Martins, 2012).

Curiosamente, apesar de sPLA2 de serpentes serem bastante estudadas poucos trabalhos a produziram de forma recombinante. Este é um ponto de grande importância pois cada vez mais a sociedade científica limita a extração do veneno das serpentes para evitar maus tratos aos animais. Adicionalmente, enzimas produzidas de forma recombinante possuem um rendimento muito maior do que as nativas extraídas dos organismos. Como exemplo para enzima asparaginase é possível obter aproximadamente 500 mg de proteína nativa a partir de 40L de cultura (12,5 mg/L de cultura) (Offman et al., 2011). Estes números contrastam com o rendimento obtido para asparaginases superexpressas em *E. coli*, de forma recombinante (87-168 mg/L de cultura), o que indica que esta abordagem possa ser bastante vantajosa na obtenção de enzimas (Huang et al., 2014; Lee et al., 2016; Roth et al., 2013). Neste contexto, a produção recombinante é de grande importância pois evita a necessidade de sua extração, pode aumentar o rendimento e diminuir os custos e também possibilitaria sua manipulação genética por meio de mutações sítio dirigidas e o mapeamento de resíduos essenciais para sua atividade biológica.

1.3 Características funcionais e estruturais das fosfolipases

As fosfolipases são enzimas que respondem pela clivagem de fosfolipídios e podem ser divididas em quatro tipos de acordo com a forma específica que a clivagem é efetuada: A1, A2, C e D (Figura 1) (Nelson, 2008). Uma vez que hidrolisam fosfolipídios de membrana, estas enzimas geram a liberação do ácido araquidônico, estimulando a ativação de pro-inflamatórios, Ciclooxigenase (Cox) e Lipoxigenase (Lox) no qual geram os precursores de segundos mensageiros como prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos, lipoxinas e outros importantes mediadores de fenômenos fisiológicos envolvidos, principalmente, em processos inflamatórios (Murakami et al., 2002; Murakami et al., 2013; Ramanadham et al., 2015).

As sPLA2 de básicas de venenos de serpentes como a de *C. durissus terrificus* são dependentes de Ca^{++} e são denominadas de sPLA2-Asp49, em razão de possuírem um resíduo de ácido aspártico (Asp) na posição 49. Em alguns casos este resíduo pode ser naturalmente substituído por lisina (Lys), sendo que esta mutação reduz drasticamente a atividade da enzima (Correa et al., 2008).

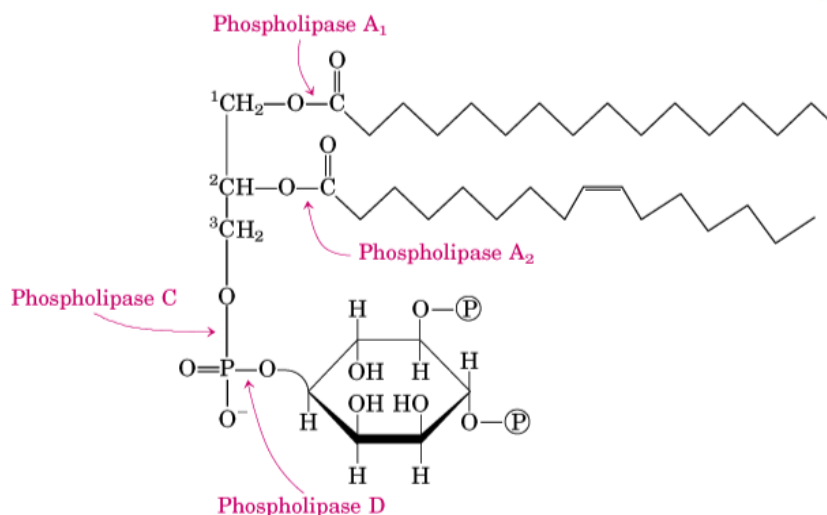


Figure 1. Diferentes classes e especificidades de fosfolipases. As PLA₁ e PLA₂ hidrolisam, as ligações éster dos fosfoglicerídeos em C1 e C2, respectivamente. As PLC e PLD hidrolisam ligações fosfodiéster glicerofosfolípídios no carbono C1 e C2 do glicerol (Compilado de Nelson *et al.*, 2008).

Adicionalmente a Asp49, outros três resíduos são estritamente conservados neste grupo de sPLA₂, a His48, Tyr52 e o Asp99, e estão envolvidos na catálise. Também existe grande conservação de aminoácidos envolvidos na ligação com o átomo de cálcio, representados pelos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32 (dos Santos *et al.*, 2011). A figura 2 ilustra a estrutura deste grupo de proteínas (Figura 2A), como também dos aminoácidos envolvidos na catalise e ligação com Ca⁺⁺.

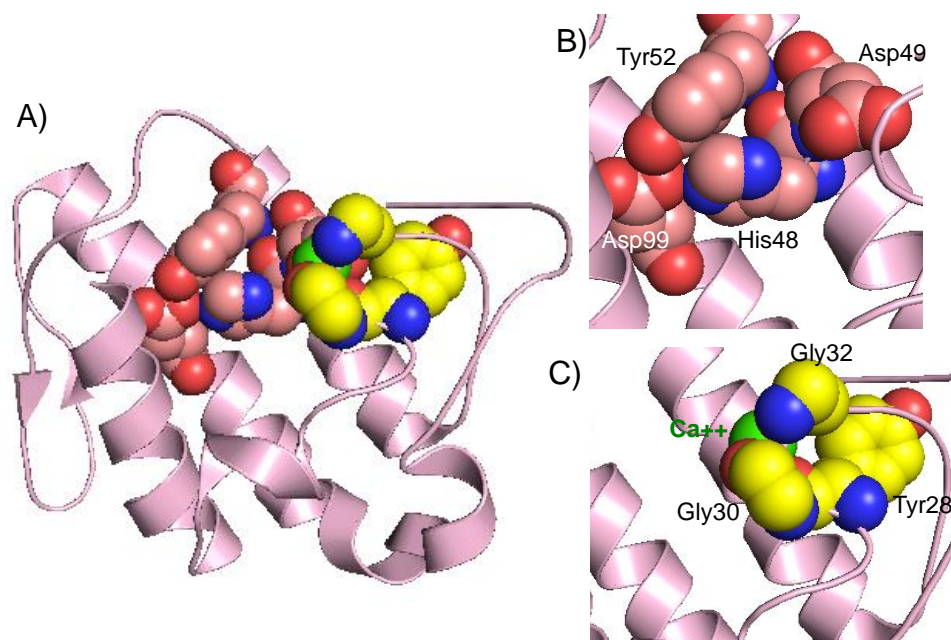


Figure 2. Estrutura cristalográfica de sPLA₂ básica dependentes de CA⁺⁺ de serpentes. (A) Estrutura do monômero de PLA₂ de *Bothrops jararacussu* (rosa) (pdb = 3JR8) representada em *cartoon* com os resíduos envolvidos na catálise representados por esferas com os átomos de carbono (C) em rosa e os resíduos de ligação a Ca⁺⁺ com os C representados em amarelo. Em (B) e (C) estão representados em detalhe os sítios catalíticos e ligação a Ca⁺⁺, com os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação representados por esferas (rosa ou amarelo). Para o restante dos átomos

representados por esferas as cores significam: vermelho = oxigênio, azul = nitrogênio e verde claro = Ca^{++} . A representação gráfica foi produzida utilizando o software PyMOL (<https://www.pymol.org/>).

Todas as PLA2 secretórias (sPLA2) de venenos, além de possuírem uma grande similaridade estrutural, também compartilham mecanismos de ação similares com as sPLA2 de mamíferos. De fato, estudos mais recentes demonstraram que as sPLA2 de mamíferos em condições experimentais podem também induzir eventos farmacológicos semelhantes aos induzidos pelas sPLA2 de venenos (Fagundes *et al.*, 2011, Murakami e Lambeau, 2013, Murakami *et al.*, 2014; Murakami e Taketomi, 2015; Ximenes *et al.*, 2012,). Enquanto diversos estudos demonstram que as enzimas de mamíferos estão largamente envolvidas em processos inflamatórios nos mais diferentes tecidos (Sun *et al.*, 2010; Vadas *et al.*, 1993; Vishwanath *et al.*, 1988; Wijewickrama *et al.*, 2006; Yarla *et al.*, 2016) pouco se sabe sobre mecanismos inflamatórios desencadeados por sPLA2 de serpentes (Deka. *et al.*, 2017; Lindahl *et al.*, 1996).

Quando se analisa estrutura cristalográfica de sPLA2 de serpentes e humanos, é possível constatar que existe grande similaridade das estruturas terciárias, incluindo a posição de resíduos de cisteína que estão envolvidos na estabilidade de proteínas extracelulares (Figura 3A e 3B, respectivamente).

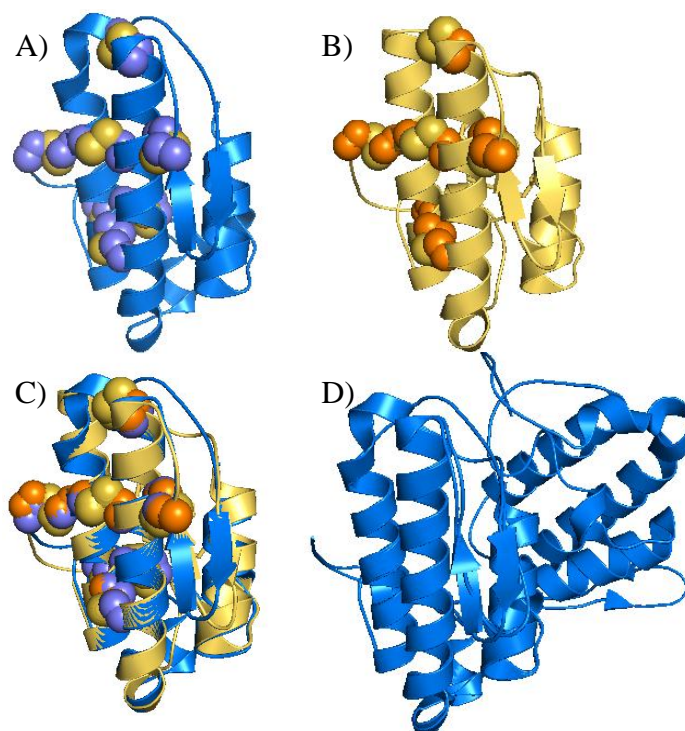


Figure 3. Estruturas cristalográficas de sPLA2 de serpente e humanos. (A) Estrutura do monômero de PLA2 de *Bothrops jararacussu* (azul) (pdb = 3JR8) e de sPLA2 de *H. sapiens*(B) (laranja claro) (pdb = 1KQU). Os dissulfetos das proteínas estão representados por esferas com os átomos de enxofre em laranja. Os átomos de carbono seguem o tom da cor de cada proteína. (C)

Sobreposição das estruturas de sPLA2 de serpente (azul) e humano (laranja claro). **(D)** Dímero de sPLA2 de *Bothrops jararacussu* (azul). A representação gráfica foi produzida utilizando o software PyMOL (<https://www.pymol.org/>).

De fato, o alinhamento espacial destas estruturas revela um desvio quadrático médio da posição dos C α bastante reduzido (r.m.s.d. = 0.675Å). Esta análise revela a grande semelhança entre as enzimas de serpentes e mamíferos (Figura 3C), o que contribui para explicar seus papéis biológicos similares. Entretanto, as sPLA2 de serpentes podem formar dímeros através de ligações não covalentes, característica não descrita para a enzima de mamíferos (Figura 3C) (Hansford et al., 2003; Marchi-Salvador et al., 2008).

Já foi demonstrado que a ação pró-inflamatória induzida pelas sPLA2 de mamífero são potentes indutores da atividade oxidativa na célula, aumentando o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão envolvidos em processo como a peroxidação lipídica e carbonilação proteica, as quais em determinados níveis podem levar a eventos patológicos (Yagami *et al.*, 2002). Estudos realizados por Chiricozzi e colaboradores (2010) demonstraram de forma clara a relação do aumento da atividade enzimática de sPLA2 como agente indutor da produção de radicais livres que contribuem fortemente para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

1.3 O processo inflamatório e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (ERNs)

Além da ação pró-inflamatória induzida, as sPLA2 de mamíferos são potentes indutores da atividade oxidativa na célula, aumentando o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em acordo com estas observações, trabalhos realizados por Sampaio e colaboradores (2003) demonstraram que o veneno de *C. durissus terrificus* pode levar a um aumento da produção de óxido nítrico (NO \cdot) e peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$).

Durante a inflamação, mastócitos e leucócitos são recrutados para o local danificado (quimiotoxia) levando a uma “explosão respiratória” caracterizada pelo alto consumo de oxigênio e a produção/acumulação de EROs como o radical ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$). Estas espécies podem gerar, de forma direta ou indireta, por meio de reações químicas como as de Fenton e Harber Weiss, um composto altamente reativo e tóxico denominado de radical hidroxila (\cdot OH) (Halliwell e Gutteridge, 2007) **(Figura 4)**.

A) Reação de Haber-Weiss: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^{\bullet} + \text{OH}^-$

B) Reações de Fenton: $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ (Reação 1)



(Reação 2)

Figure 4. Reações de Harber-Weiss e Fenton. (A) Representação a reação de Haber Weiss, originando radical hidroxila a partir da interação entre peróxido de hidrogênio e ânion superóxido; (B) Reações de Fenton, em que a interação entre uma molécula de Fe^{3+} com uma de ânion superóxido resulta na liberação de Fe^{2+} que, ao interagir com peróxido de hidrogênio, produz a radical hidroxila.

Os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos são alvos que podem ser atacados por EROs, e seu ataque pode levar a um aumento no risco de mutagênese devido à modificação destas moléculas. Em proteínas, pode levar a formação de grupos carbonilas como aldeídos e cetonas, em um processo denominado de carbonilação proteica. Este fenômeno é consequência de várias reações oxidativas, sendo considerado um marcador padrão do estresse oxidativo. As proteínas carboniladas tendem a ser mais hidrofóbicas, resistentes à proteólise e consequentemente apresentam perda de função (Fedorova *et al.*, 2014).

No caso dos lipídios, o marcador biológico de danos oxidativos são moléculas oriundas do processo de peroxidação lipídica. Lipídios poli-insaturados são suscetíveis ao ataque por EROs, resultando numa reação em cadeia bem definida, com a produção de produtos finais como o malondialdeído (MDA). A oxidação dos lipídeos das membranas biológicas pode levar à perda de sua fluidez e seu enrijecimento pode resultar na ruptura da célula (Ayala *et al.*, 2014). Para combater os oxidantes, os organismos necessitam de uma efetiva proteção contra estas moléculas, utilizando antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e peroxirredoxinas) e não enzimáticos (glutathione, vitaminas C, D e E) (Gozal, 2008).

Adicionalmente, as células em processo inflamatório sintetizam mediadores solúveis, como metabólitos de ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas, o que leva ao recrutamento de mais células envolvidas no processo inflamatório para o local lesionado, aumentando deste modo, a produção de EROs. Além disso, esses mediadores-chave podem ativar cascatas de transdução de sinal, induzir mudanças nos fatores de transcrição nucleares, como $\text{IKK-}\beta$ (NFK- β) e o transdutor de sinal/ativador de transcrição 3 (STAT 3), entre outros, que medeiam a resposta ao

estresse oxidativo (Netto e Antunes, 2016; Sobotta *et al.*, 2015). Além disso, a indução de um mediador pró-inflamatório denominado de cicloxigenase-2 (COX-2) é capaz de estimular a síntese de óxido nítrico (NO[•]) pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), elevando a expressão do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) (Sobotta *et al.*, 2015).

Apesar do NO[•] gerado pela iNOS, ser um importante sinalizador celular, ele pode reagir com o O₂^{•-} em um ambiente com estresse oxidativo, gerando peroxinitrito (NOO⁻), o qual pode ser bastante danoso a célula (Szabó *et al.*, 2007). Adicionalmente, o NO[•] é capaz de reagir diretamente com grupos heme e não-heme de sítios ativos de proteínas, ou indiretamente através de sua oxidação e formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Também já foi demonstrado que a S-nitrosilação de proteínas (a ligação de um grupo NO ao tiól de resíduos de cisteínas) pode ser extremamente danosa em razão da perda de função enzimática (Nakamura *et al.*, 2016). Alguns autores sugerem que impedir a formação do NOO⁻ ou acentuar sua decomposição em processos inflamatórios pode resultar em uma nova frente terapêutica para o tratamento de processos inflamatórios (Szabó *et al.*, 2007).

No caso de sPLA2 de *C. durissus terrificus*, não é conhecido o seu papel no estresse oxidativo. Entretanto já foi demonstrado que a Cdt sPLA2 está envolvida no processo mionecrótico, sendo considerado um agente potencial para destruição das fibras musculares que estão relacionados a morbidade das vítimas não fatais (Tonon *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). Neste contexto, enzimas que respondem pela decomposição de NOO⁻ com elevada eficiência como as Gpx e Prx aparentam ter grande importância no estabelecimento ou remediação do processo inflamatório (Flohé *et al.*, 2011; Ogusucu *et al.*, 2007; Sies *et al.*, 1997).

1.4 Decomposição de EROs e ERNs por enzimas antioxidantes

A decomposição de EROs e ERNs são fundamentais para inibir o processo inflamatório em diversos tecidos. De fato, já foi demonstrado que a superexpressão da enzima superóxido dismutase é capaz de diminuir fortemente o processo inflamatório e foi proposto o uso da enzima purificada como uma alternativa para o tratamento de processos inflamatórios agudos ou crônicos (Yasui *et al.*, 2006; Carillon *et al.*, 2013). Também, já foi demonstrado que a expressão da enzima catalase é aumentada em tecidos que passam por processos inflamatórios. Foi demonstrado que administração de catalase em inflamações causadas pelos retrovírus H1N1 apresenta resultados altamente positivos, indicando que esta enzima pode ser

utilizada como agente anti-inflamatório (Shi *et al.*, 2013). Em ambos os casos, o efeito anti-inflamatório destas enzimas reside na habilidade de decompor EROs como o radical ânion superóxido (superóxido dismutase) e o H_2O_2 (catalase). Adicionalmente, a decomposição destas espécies impede a formação de radical hidroxila, diminuindo os danos celulares. Neste contexto, é de grande importância a investigação do padrão de expressão das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat), em resposta a administração de Cdt sPLA2, pois o aumento de sua expressão seria importante para evitar danos em biomoléculas.

Apesar de estas enzimas serem capazes de decompor algumas $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 eficientemente, elas não são capazes de decompor hidroperóxidos de lipídios (HPL) ou peroxinitrito (NOO^{\cdot}). Desta forma, estas espécies são decompostas por outras enzimas como as peroxirredoxinas e as glutacionas peroxidases (Flohé *et al.*, 2011). Em mamíferos existem quatro isoformas de glutaciona peroxidases (Gpx), todas com nível de expressão moderada (Flohé *et al.*, 2011). Estas enzimas podem decompor peróxidos de lipídios, peroxinitrito e H_2O_2 com elevada reatividade ($10^7 M^{-1} s^{-1}$) utilizando moléculas de glutaciona (GSH) como receptores de elétrons (Flohé *et al.*, 2011).

Em relação às peroxirredoxinas, seis isoformas são encontradas em mamíferos (Prx 1-6) distribuídas em distintos compartimentos subcelulares e também no meio extracelular (Hanschmann *et al.*, 2013). Estas enzimas apresentam nível de expressão maior em relação às Gpx, mas a reatividade é similar sobre os diferentes tipos de hidroperóxidos (Flohé *et al.*, 2011). As Prx de mamíferos são expressas constitutivamente, embora em níveis diferentes, em praticamente todos os tecidos e tipos de células (Hanschmann *et al.*, 2013; Perkins *et al.*, 2015). Entretanto, já foi demonstrado que expressão das Prx é significativamente aumentada em processos inflamatórios em diferentes tecidos (Kinnula *et al.*, 2002; Knoops *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 2015). Em macrófagos e células microgliais, as Prx são reguladas positivamente após estimulação por interferon gama ($IFN-\gamma$) e lipopolissacarídeos (LPS), sugerindo que as Prx desempenham papéis fundamentais como enzimas antioxidantes citoprotetoras em células que geram altos níveis de EROs/ERNs após estimulações pró-inflamatórias, mas também como moduladores redox de sinalização na imunidade inata e inflamação (Abbas *et al.*, 2009; Diet *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que apesar de possuir diversas isoformas, a isoforma Prx2 é a mais abundante em mamíferos, e em alguns tipos celulares que possuem alto níveis de

estresse oxidativo, como o eritrócito, chega a ser a terceira mais abundante proteína solúvel da célula (Matte *et al.*, 2010), o que indica um papel biológico de grande relevância. Cabe ressaltar que esta enzima, assim como as demais peroxirredoxinas, utiliza um resíduo de cisteína, denominada de cisteína peroxidásica (C_P) para a decomposição de hidroperóxidos que se encontra na forma desprotonada de tiolato (C_P-S^-) que se oxida ao decompor o peróxido em cisteína ácido sulfênico (C_P-SOH). A Prx2 é um homodímero e possui um segundo resíduo de cisteína denominado de cisteína de resolução (C_R) que se encontra protonada (C_R-SH) e se condensa com C_P-SOH formando um dissulfeto ($C_P-S-S-C_R$) com consequente liberação de uma molécula de H_2O (Wood *et al.*, 2003; Tairum *et al.*, 2016).

Em condições de alto estresse oxidativo, antes da condensação com C_R, C_P-SOH pode ser atacada por outra molécula de hidroperóxido formando cisteína ácido sulfínico (C_P-SO_2H) ou cisteína ácido sulfônico (C_P-SO_3H). Estas modificações são denominadas de superoxidação e levam a inativação da atividade peroxidásica da enzima, porém ainda sob debate (Jang *et al.*, 2004), processo que tem implicação na transdução de sinal promovida por hidroperóxidos (Day *et al.*, 2004; Veal *et al.*, 2018).

A expressão de Prx2 ou sua superoxidação (C_P-SO_2H) em processos inflamatórios ocasionados por Cdt sPLA2 de serpentes ainda não foram estudados. Importante abordagem seria de grande importância no qual promover seu maior entendimento no processo inflamatório em resposta à picada de serpentes bem como para busca de novas terapias para o tratamento de acidentes ofídicos.

1.5 Lagunculariaracemosa como fonte de biofármacos

Diversas moléculas em plantas estão envolvidas em sua adaptação com o meio ambiente, participando dos processos bioquímicos, do crescimento celular e da reprodução, além de atuarem na defesa à herbivoria e patógenos, regulação de simbiose, controle de germinação de sementes e alelopatia, portanto, são reconhecidos como compostos bioativos. Estes compostos são denominados de metabólitos secundários, são classificados de acordo com as vias biossintéticas em que atuam e as famílias de moléculas geralmente são formadas por compostos fenólicos, terpenos, esteroides e alcaloides (Bennett *et al.*, 1994; Bourgaud *et al.*, 2001; Buer *et al.*, 2010; Treutter, 2006).

Dentre os mais diversos ecossistemas onde podem ser encontrados compostos bioativos, o mangue é uma fonte bastante utilizada pela medicina popular através de partes da planta em natura e também extratos e produtos químicos, que possuem

propriedades de inseticidas, pesticidas, adstringente, tônico, remédio contra afta, disenteria e febre (Bandaranayake, 1998; Bandaranayake, 2002). Porém, a extração de novos compostos provenientes do mangue, além dos já conhecidos da população e das indústrias farmacêuticas, ainda permanece aberta a novas investigações (Bandaranayake, 1998; Bandaranayake, 2002; Patra *et al.*, 2014). Os flavonóis e os terpenos, são os compostos químicos mais abundantes em plantas do mangue e são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos (Shilpi *et al.*, 2012), devido à especificidade em algumas espécies, abundância em quase todo o reino vegetal, facilidade de identificação e relativa estabilidade.

A *Laguncularia racemosa*, conhecida como mangue-branco, está presente na América, África e sul da Ásia, e juntamente com a *Avicennia* sp. e *Rizophora mangle* formam um tríptico das espécies mais presentes nos manguezais (Tomlinson e Thomlinson, 1994; Landry *et al.*, 1997). O processo de adaptação evolutiva que estas plantas desenvolveram como proteção contra herbívoros, microrganismos e excesso de salinidade levaram a uma complexidade química nestes organismos, levando assim ao desenvolvimento de metabólitos secundários, principal fonte de descoberta de novos fármacos (Patra *et al.*, 2014). Portanto as plantas de manguezais são um reservatório de compostos naturais em potencial, com muitos deles ainda não explorados na sua extensão.

De fato, recentemente demonstramos que extratos de *L. racemosa* são capazes de inibir a atividade de trombina e a identificação das moléculas revelou que dois flavonoides glicosilados (quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo) respondem pela inibição da trombina (Rodrigues *et al.*, 2015). Nossos resultados contribuem para demonstrar o potencial terapêutico de compostos naturais isolados de plantas do mangue. Neste contexto, é sabido que flavonoides podem apresentar ação antioxidante e podem ser importantes no combate ao processo inflamatório (Mamta *et al.*, 2013; Pietta *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2015). Portanto uma abordagem valiosa reside na utilização de extratos e moléculas purificadas para avaliar o impacto destas moléculas no processo inflamatório ocasionado pela administração de sPLA2.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos: No que concerne ao primeiro objetivo, é de Investigar se ocorrem danos oxidativos/nitrosativos, bem como avaliar a expressão de enzimas antioxidantes (Sod1 Cat1 e Prx2) após 240 minutos (fase tardia) da administração de sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*. Em conjunto pretendemos avaliar possíveis efeitos protetores da administração de extratos de folhas de *Laguncularia racemosa* (mangue branco) logo após a inoculação da sPLA2.

No que concerne ao segundo objetivo, é a obtenção de sPLA2 recombinante de *Crotalus durissus terrificus* (sPLA2) visando a autossuficiência do laboratório desta biomolécula e também para fornecer subsídios para sua manipulação genética levando a um maior entendimento de seu funcionamento molecular.

3. Materiais e Métodos

3.1 Purificação da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*

Amostras de veneno de *Crotalus durissus terrificus* foram adquiridas do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda – ME (CNPJ01.997.843/0001-77), empresa certificada pelo IBAMA. Apurificação das sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada em duas etapas cromatográficas. Na primeira fase, o veneno foi fracionado em uma coluna C18 e C5 HPLC de exclusão molecular, utilizando-se coluna Tricon (1 ×60cm) previamente empacotada com resina Superdex 75. A coluna foi acoplada ao sistema HPLC semipreparativo Jasco e foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônia 0.2M, pH 7.8 bombeados ao sistema cromatográfico a um fluxo de 0.6mL/ min durante 60 minutos. Aproximadamente 15mg do veneno total foram dissolvidos em 250 µL de tampão, homogeneizado, centrifugado a 4500g por 5 minutos, filtrado em filtro millex 0.45µm e então aplicado a coluna. O fracionamento do veneno foi realizado a um fluxo constante de 0.3 mL/ min e o monitoramento da corrida foi realizado a absorvância de 280nm e as frações coletadas em um coletor de frações a razão de 3 minutos por tubo, que foram submetidos aos ensaios para detectar a atividade fosfolipásica A2 da fração. O veneno total de Cdt possui uma fração denominada crotoxina que é a principal fração com atividade fosfolipásica A2 de veneno de Cdt. Uma vez confirmada a atividade enzimática fosfolipásica A2 da fração correspondente a crotoxina, esta foi submetida a uma nova etapa cromatográfica em HPLC de fase reversa utilizando-se uma coluna semi analítica C5. Nesta etapa cromatográfica, o fracionamento da Cdt sPLA2 foi realizado em cromatografia de fase reversa C5. A coluna cromatográfica foi previamente equilibrada com tampão A (TFA 0.1%) durante 30 minutos a um fluxo de 1mL/ min. As amostras de sPLA2 (1mg) foram dissolvidas em 250 µL de tampão A devidamente clarificadas e aplicadas a coluna cromatográfica. A eluição da Cdt sPLA2 foram realizadas em gradiente linear contínuo de tampão B (66% Acetonitrila em TFA 0.1%) e os monitoramentos dos perfis cromatográficos foram acompanhados a 280nm. Em seguida a purificação das amostras foi avaliada em SDS-PAGE.

3.2 Extratos e moléculas isoladas de *L. racemosa*

Nesta investigação foram utilizados de frações butanólica (BuOH) e de acetato de etila (AcoET) de extratos de *L. racemosa* obtidos em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (Rodrigues *et al.*, 2015).

3.3 Indução do edema de pata por sPLA2

Foram realizados dois modelos experimentais *in vivo* para avaliação da inflamação aguda causada por sPLA2 purificada, ambos utilizando camundongos fêmeas Swiss. Nestes experimentos foram inoculados 20µL através de injeção subplantar posterior direita, as amostras (Cdt sPLA2 ou veneno total) (n=5). Foram feitos controle utilizando solução salina (NaCl 0,9%) e mantendo a mesma proporção (concentração) de moléculas inoculadas. O monitoramento do volume do edema foi efetuado através de hidroleistiomômetro durante 4h ou até a diminuição da inflamação do controle chegar a 20% da inicial. Após os testes, os camundongos foram anestesiados e sacrificados via deslocamento cervical.

3.4 Extração e quantificação de proteínas totais

A extração de proteínas foi realizada utilizando o reagente T-PER® para extração de proteínas totais de tecidos, seguindo as orientações do fabricante (Thermo Scientific). Em todos os casos a extração foi realizada 240 minutos após a administração de Cdt sPLA2 com ou sem tratamento com os extratos de *L. racemosa*. O material extraído foi submetido a quantificação pelo método colorimétrico de quantificação de proteínas totais (Bradford, 1976).

3.5 Carbonilação de proteínas pelo método colorimétrico

Neste trabalho, o conteúdo de proteínas carbonila das foi determinado pela formação de adutos dehidrazina em proteínas (DNP) em espectrofotômetro (Carry 60, Agilent) a 370nm, após o tratamento com 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os ensaios foram efetuados utilizando o kit Protein Carbonyl Content Assay (Sigma, MAK094-) seguindo as orientações do fabricante.

3.6 Avaliação de grupos sulfidrilas pelo método DTNB á 412 nm

Grupos tiól (SH) são encontrados intracelularmente em cisteínas livres, glutathiona (GSH) e resíduos de cisteína em proteínas, incluindo enzimas envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo/nitrosativo que utilizam tióis de cisteína altamente reativos para efetuar suas funções biológicas como a Glutathiona reductase (GR), Tiorredoxina (Trx), Tiorredoxina reductase (TrxR), peroxirredoxinas, (Prx) glutathiona peroxidases (GPx), glutarredoxinas (Grx), e glutathiona acetil transferases (GST), dentre outras. Neste contexto, sob estresse oxidativo/nitrosativo as EROs e ERNs podem levar a oxidação dos tióis destas enzimas resultando na perda da atividade enzimática. Para avaliar a quantidade de tióis livres foi empregado o método

de DTNB (5-5'-dithiobis, ácido 2-nitrobenzóico) um método espectrofotométrico (Ellman, 1959) e também utilizando o kit Thiol Detection Assay (Cayman Chemicals, cat. n° 700340) no qual se utiliza uma sonda que emite fluorescência somente ao se ligar a um tiol livre. Para a realização dos experimentos foram seguidas as orientações do fabricante.

3.7 Avaliação da nitrosilação de proteínas pelo método de western blot

Em mamíferos o óxido nítrico (NO[•]) é produzido por três isoformas distintas de óxido nítrico sintase (NOS) e funciona como uma molécula de sinalização chave na fisiologia e fisiopatologia. O NO[•] é capaz de reagir diretamente com os centros de proteínas heme e não heme ou indiretamente via oxidação adicional de várias espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que podem danificar proteínas e outras biomoléculas. Uma das principais modificações é a formação de nitrosotióis (S-NO) em moléculas contendo cisteínas. Para detectar esta modificação é utilizado método desenvolvido Jaffrey e colaboradores (2001) que permite a detecção direta de proteínas S-NO em células/tecidos, bem como por *western blot*. Utilizando este método, os grupos SH livres são primeiro bloqueados (uma adição de 125,1 Da por resíduo) e quaisquer ligações de S-NO presente nas amostras são então clivadas. A biotilação dos grupos SH formados (uma adição de 523,6 Da por resíduo) fornece a base para a detecção colorimétrica ou de fluorescência à base de estreptavidina. Para a quantificação da nitrosilação de proteínas foi utilizado o kit de detecção de proteínas nitrosiladas (S-Nitrosylated Protein Detection Kit) e os ensaios seguiram as orientações do fabricante (Cayman chemicals).

3.8 Análises da expressão de níveis protéicos Cat, Sod1 e Prx2

A avaliação da expressão de Prx2 foi efetuada por meio da técnica de *western blot*. Para tanto, amostras de proteínas totais em quantidades equivalentes foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de PVDF (Invitrogen) por eletroblotting utilizando sistema de transferência semi-seco Trans-Blot SD (BioRad) em tampão contendo Tris-HCl 150 mM (pH 8.3), glicina 50 mM e metanol 20%. Após estes procedimentos, a eficiência na transferência das proteínas para a membrana foi avaliada com o reagente de Ponceau (Sigma). A membrana lavada novamente com tampão PBS (Tris 100mM pH 8.0 e NaCl 70mM) e incubada durante 16 horas em solução de bloqueio contendo 0,5 g de leite em pó desnatado dissolvido em PBS. Após o bloqueio foi feita a lavagem novamente da

membrana com tampão PBS. Em seguida a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-Prx2 LF-MAO368 em concentração de 1:1000 por 90 minutos e lavada novamente com PBS por três vezes por 5 minutos. A detecção das enzimas foi efetuada com anticorpos secundários conjugados com HRP (Santa Cruz Biotechnology- sc-2955). Os resultados foram analisados utilizando o ChemiDoc MP System (Bio-Rad).

3.9 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método colorimétrico

Para se avaliar a peroxidação lipídica utilizou o kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma Aldrich, cat n° MAK085), seguindo as orientações do fabricante. Os lípidos poliinsaturados são suscetíveis a um ataque oxidativo, tipicamente por espécies reativas de oxigênio, resultando em uma reação em cadeia bem definida com a produção de produtos finais como o malondialdeído (MDA). Neste kit, a peroxidação lipídica é determinada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que pode ser detectado por fluorescência ($\lambda_{ex} = 532$ / $\lambda_{em} = 553$ nm).

3.10 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (para Nanimais no caso das análises do tópico 3.3; ou pelas triplicatas dos resultados de experimentos descritos nos tópicos 3.5, 3.6, 3.7 e 3.9) e os resultados foram analisados por análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste a posteriori de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.11 Clonagem de sPLA2

O gene de sPLA2 foi sintetizado pela GenScript (<https://www.genscript.com/>) contendo códons otimizados para a expressão em *E. coli*, flanqueado por sítios *NdeI* e *BamH I*, e inserido no vetor pUC57. Para eliminar o sítio de *NdeI* extra, encontrado na sequência otimizada, foram utilizados os primers M13 e o produto da reação é o gene otimizado com apenas um sítio de *NdeI*. Após digestão do plasmídeo com *NdeI* e *BamHI*, foram realizadas purificações da reação de PCR. Posteriormente, foi realizada a ligação com a enzima T4 ligase (Promega) do pET15b previamente digerido com o inserto *cdtspla2*. Para confirmação da ligação, foi realizado um PCR de colônia, e aquelas que apresentaram o inserto, foram sequenciadas.

3.12 Oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento de Cdt sPLA2.

Oligonucleotídeos	Sequência
Triagem de recombinantes	
M13 forward GTTTTCCCAGTCACGAC	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'
M13 reverse	5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA3'
Sequenciamento	
T7 promoter	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
T7 terminator	5' TGCTAGTTATTGCTCAGGCGG 3'

3.13 Seleção de transformantes

A triagem dos transformantes foi realizada através da técnica de PCR. A reação de PCR utilizando como DNA molde o plasmídeo pET15b supostamente ligado ao gene *cdtspla2*. As reações foram feitas em volume final de 20 µl e foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um programa constituído de denaturação inicial a 96°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C/40seg, 55°C/30seg e 60°C/60seg. Os reagentes são listados na Tabela 2. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (10µg/ml), visualizados e fotodocumentados utilizando o equipamento ChemiDoc (BioRad).

Tabela 2. Reagentes, volumes e concentrações utilizadas na reação de amplificação por PCR para a seleção dos transformantes.

Reagente	Volume (µl) []
Tampão de reação	2,0/10 ×
MgCl ₂	2,0/25mM
DNTPs	4,0/2,5mM
Plasmídeo pTZ57R/gene de interesse	2,0/50ng/µl
M13 forward	1,0/15pmol
M13 reverse	1,0/15pmol
Taq DNA Polimerase	0,2/5u/µl
H ₂ O Milli-Q	7,8
Volume total	20,0

3.14 Sequenciamento de DNA

A confirmação do gene livre de mutações foi efetuada em sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle

Sequencing (Life Technologies) utilizando os oligonucleotídeos T7 promoter e T7 terminator.

3.15 Meios de cultura, linhagens e plasmídeos

3.15.1 Meios de Cultura: LB (1% triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 1% NaCl); SOC (2% triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH7). Quando o meio tinha como finalidade a seleção, foi adicionado 100µg de ampicilina/ml. Os meios sólidos foram obtidos com a adição de 2% de Ágar;

3.15.2 Linhagens de *Escherichia coli*: *E. coli* BL21 (DE3): *T-Suflet F' lac, pro, lacIQ / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvullphoRahpC* galE (or U) galKatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB rpsL150(StrR) Δgor Δ(malF); C43 (DE3) (Lucigen): F- amT, hsdSb (rB- mb-), gal, dcm (DE3) (); endA1gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB+ lacIqΔalacZ]M15]hsdR17(rK- mK+); DH5 α (Merck Millipore): F'(Z80dlacZ_(lacZ)M15)_(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, m+k); *E. coli* BL21 Origami B (DE3) (Merck Millipore): F ompThsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R); *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen): F- ompThsdSB (rB - mB -) gal dcm (DE3) pLysS (CmR).*

3.15.3 Plasmídeos: Foram utilizados o plasmídeo de clonagem pUC57 (GenScript) para a clonagem do gene e pET15b (Novagen) para a expressão heteróloga de Cdt sPLA2.

3.16 Expressão e purificação de proteínas recombinantes por IMAC

Para a padronização das expressões foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BL21 (DE3), pLys (DE3), C43 (DE3), Origami (DE3) todas contendo o plasmídeo pET15b foi inoculado em LB sólido contendo ampicilina (100µg/ml) e incubadas a 37°C/16hs. Em seguida, foi selecionada uma colônia axêmica e feito o pré-inóculo em 10 ml de LB contendo 100µg/ml de ampicilina e incubado em *shaker* orbital 16hs/37°C/250-300rpm. Após este período, os 10 ml de cultura foram transferidos para 1 litro de meio LB líquido e cultivados até atingirem OD = 0.6-0.8. Neste momento, foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,1mM. Passadas 2hs de indução (*shaker* 28°C/220rpm), as células foram decantadas por meio de centrifugação 20min/4°C/4000rpm e ressuspensas em tampão fosfato (20 mM/pH 7,4).

O rompimento das células foi feito através de sonicação (35% de amplitude) e os ácidos nucléicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de

estreptomicina em concentração final de 1%, durante 15 minutos, seguido de centrifugação por 45 min/4°C/12000rpm. O precipitado foi descartado e os extratos celulares livres de ácidos nucleicos coletados. sPLA2 que contem cauda de histidina, foi purificada por cromatografia de afinidade por metais (IMAC) em colunas His-Trap (GE Healthcare) e TALON (GE Healthcare), respectivamente, em gradiente de Imidazol (5-500mM), seguindo as orientações do fabricante.

3.17 Purificação pelo método de fervura

A proteína Cdt sPLA2 foi purificada pelo método de fervura (*Boiling Method*) como descrito por Gonzalez Porqué e colaboradores (1970), com algumas modificações. O procedimento de purificação consistiu na utilização dos 5 ml de extrato protéico em tampão fosfato (1M, pH = 7,4) (obtido após o protocolo de indução, sonicação e precipitação de ácidos nucleicos por estreptomicina, como descrito no item anterior para a purificação por IMAC), que foi distribuído em eppendorfs em alíquotas de 500 µl e a estes foram acrescentadas DTT (10mM), sendo posteriormente incubados à 95°C por 30 min. em banho maria. Ao final deste procedimento, as amostras foram centrifugadas por 20min/15.000rpm, o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf e o precipitado foi descartado.

3.18 Liofilização do extrato proteico purificado pelo método de fervura

A proteína Cdt sPLA2 foi liofilizada pelo método de liofilização (Fourier-transform IR) descrito pelo Ispita Roy e colaboradores (2004) entretanto as amostras de extratos proteicos purificados por fervura foram submetidas ao procedimentos de liofilização por 48 horas, método na qual consiste na remoção da água de uma amostra líquida congelada com nitrogênio líquido e passando por vaporização, dessecção e secagem o que protege a proteína de desnaturação.

3.19 Ensaio para verificação de atividade de fosfolipase

Para os ensaios o padrão das reações continha 100µl de tampão (20 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 8.0); 50µl de substrato a 2,98mM (ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (4N3OBA); 5µl de proteína (Cdt sPLA2 nativa ou recombinante) em concentração de 1mg/ml e 50µl de Salina a 0,15M. A reação foi incubada por 20 minutos a 37°C em placa de ELISA. Após este período, as reações foram monitoradas durante 60 min, com leituras de absorbância a 405nm a cada 5 minutos (adaptado de Oliveira *et al.*, 2008) utilizando o leitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da administração de extratos *L. racemosa* na indução do edema de pata por Cdt sPLA2

Como mencionado na seção *Material e Métodos* extratos *L. racemosa* foram submetidos ao processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, no caso, acetato de etila e butanol, em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho estas duas frações foram utilizadas para avaliar o possível efeito protetor das frações butanólica (BuOH) e de acetato de etila (AcoEt) sobre o edema de pata induzido pela administração de Cdt sPLA2 purificada do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Para se avaliar se os extratos BuOH e AcoTeram capazes de inibir a atividade de sPLA2 foi efetuado o ensaio de atividade de fosfolipase A2 utilizando como substrato 4-N-3-OBA utilizando como controle negativo solução salina (NaCl). Os resultados revelaram que os extratos inibiram a enzima de forma similar (Figura 5).

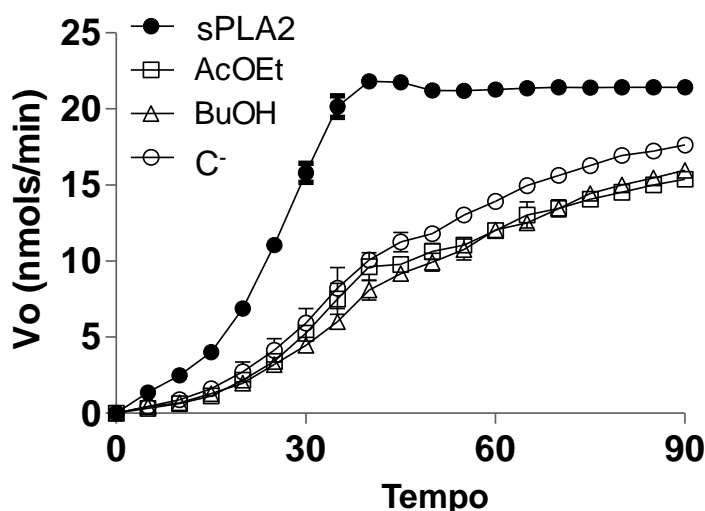


Figure 5. Avaliação dos extratos butanólico e de acetato de etila sobre a atividade de Cdt sPLA2.

O edema de pata foi realizado em modelo experimental *in vivo* para avaliação da inibição da inflamação aguda causada por Cdt sPLA2 purificada utilizando camundongos fêmeas Swiss. Para tanto, foram efetuados testes após administração com Cdt sPLA2 com intuito de averiguar a inibição ou interação com extratos e compostos extraídos de o material foliar vegetal compostos fenólicos de *L. racemosa*. Inicialmente foram inoculados 20 μ L através de injeção subplantar posterior direita de extratos de Acetato de Etíla e Butanólico e incubados 30 min com Cdt sPLA2 (n=6). E

onde também foram feitos controle negativo utilizando solução salina (NaCl 0,9%) e controle positivo utilizando somente Cdt sPLA2, mantendo a mesma proporção (concentração de um 1mg) de moléculas injetadas. As concentrações dos compostos utilizados foram iguais a de Cdt sPLA2 (1:1 p/p). O monitoramento de volume do edema foi efetuado através de hidropleistiomômetro em intervalos de 30 min por 4hs. Como controles internos foram injetados somente os extratos de *L. racemosa*.

Como esperado quando foi utilizada salina não houve o processo de edemaciação. Os controles com as frações BuOH e AcoeT dos extratos induziram edema em pequena extensão (Figura 6). A indução do edema de pata com Cdt sPLA2 foi bastante significativa causando um deslocamento de ~110µL. Por outro lado, quando em adição a CdtsPLA2 foram também aplicadas as frações BuOH e AcoeT houve uma diminuição significativa do edema (~90µL) na fase aguda (30 min), indicando um efeito protetor destes extratos as células que passam no edema ocasionado pela CdtsPLA2 (Figura 6).

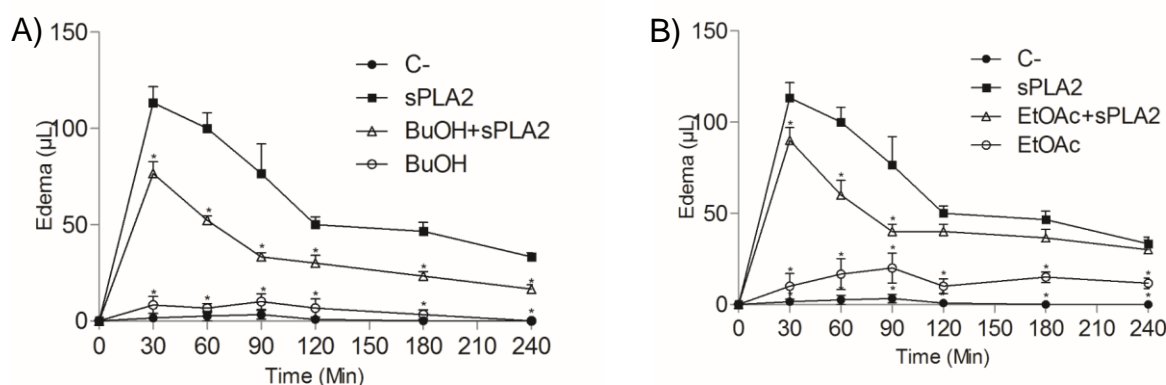


Figure 6. Avaliação da edemaciação da pata de camundongos fêmeas *Swiss* em resposta aos tratamentos com Cdt sPLA2 e extratos de *L. racemosa*. Foi utilizado o extrato Acoet (A) e BuOH (B). Como controle negativo foi injetado somente solução salina (●) e controle positivo somente Cdt sPLA2 (■). Como controle interno foram aplicados somente os extratos. O triângulo denota as amostras em que foi aplicado Cdt sPLA2 e extrato de *L. racemosa*.

4.2 Proteínas totais de patas de camundongos extraídas após o tratamento com Cdt sPLA2

As proteínas solúveis totais do tecido das patas foram extraídas conforme descrito na seção *Materiais e Métodos* e quantificadas pelo método de Bradford. Para se avaliar a qualidade dos procedimentos as amostras foram submetidas a SDS PAGE. Os resultados revelam que a extração foi bem-sucedida (Figura 7), não sendo detectado excesso de proteínas degradadas em nenhuma das alíquotas (Figura 7, lanes 2-7).

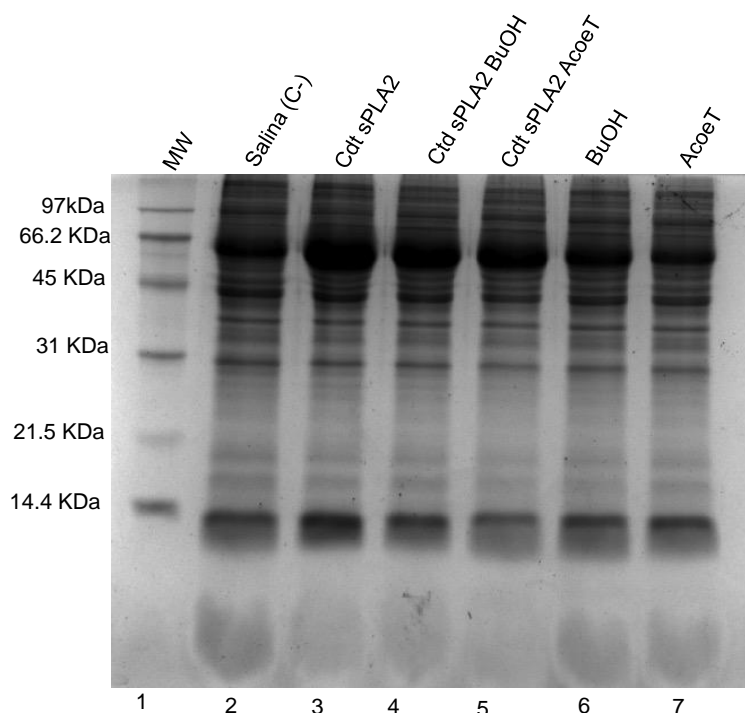


Figure 7. Resultado de extração do extrato proteico total de tecido de pata de camundongos submetido a diferentes condições. A extração das proteínas totais de tecidos da pata de camundongos fêmeas Swiss. Nas *lanes* foram aplicadas as seguintes amostras: MW marcador de peso molecular (*lane* 1), seguida pelo controle negativo salina (solução salina, *lane* 2), controle positivo (Cdt sPLA2, *lane* 3), seguido pelos tratamentos com Cdt sPLA2 e extratos da fração butanólica (BuOH, *lane* 4) ou acetato de etila (AcoeT, *lane* 5), e os controles internos seguido pelos tratamentos contendo somente extratos da fração butanólica (BuOH, *lane* 6) ou acetato de etila (AcoeT, *lane* 7) + solução salina. Antes dos procedimentos de SDS-PAGE todas amostras foram reduzidas com 1mM ditioneitol (DTT) para evitar a formação de pontes dissulfetos inespecíficas entre as proteínas.

4.3 Avaliação da carbonilação de proteínas após a administração de Cdt sPLA2 e extratos de *L. racemosa*

O estresse oxidativo e nitrosativo pode induzir danos ao DNA, lipídios e proteínas. A oxidação das proteínas resulta na produção de grupos carbonila estáveis, que podem ser utilizados como medida de lesão oxidativa (Baraibaret *al.*, 2013; Augustyniak *et al.*, 2014; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Curtis *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2015). O teor de carbonila é determinado pela derivação de grupos carbonila de proteínas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) levando à formação de adutos de dinitrofenila (DNP) hidrazona estáveis, que podem ser detectados espectrofotometricamente a 375 nm, proporcional aos grupos carbonilas presentes.

Os resultados revelaram que a carbonilação proteica não diferiu de forma significativa entre amostras tratadas com solução salina e aquelas tratadas com Cdt sPLA2 ou CdtsPLA2 em conjunto com os extratos, indicando que a administração de Cdt sPLA2 não foi capaz de levar a danos oxidativos em proteínas (Figura 8). De fato, estes resultados estão de acordo com o observado na extração de proteínas

totalmente não foi detectada degradação proteica em amostras tratadas com Cdt sPLA2 e a toxina em conjunto com os extratos de *L. racemosa* (Figura 7).

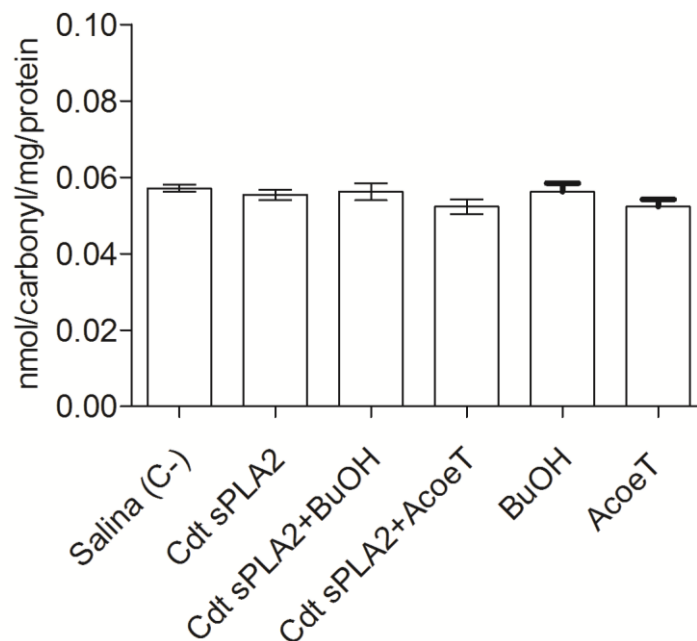


Figure 8. Avaliação dos níveis de carbonilação de proteica de amostras. O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado pela formação de adutos de hidrazina em proteínas após tratamento com DNPH. Nos procedimentos foram utilizados 2mg de proteínas totais de cada amostra. Solução salina representa controle negativo, Cdt sPLA2 representa o controle positivo, BuOH amostras tratadas com Cdt sPLA2/fração butanólica, AcoET amostras tratadas com Cdt sPLA2 e extrato de acetato de etila. Os resultados estão expressos na quantidade de grupamentos carbonila (nmol) por mg de proteína.

4.4 Quantificação de grupos sulfidrilas livres

Em condições de homeostase o ambiente celular é altamente redutor e grupos tióis de Cys livres ou que incorporados em peptídeos e proteínas normalmente se encontram em sua forma reduzida (SH). Por outro lado, quando as células são submetidas a estresse oxidativo/nitrosativo os grupamentos tiol se oxidam e forma pontes dissulfetos (SS) que podem levar a agregação proteica com consequente perda de suas funções biológicas (Jeong *et al.*, 2014; Knoops *et al.*, 2016, Bayer *et al.*, 2013). Neste contexto, investigamos o estado redox dos tióis celulares de amostras proteicas oriundas de tecidos submetidos a aplicação de Cdt sPLA2 e de extratos de *L. racemosa*.

Nossos resultados indicam que a quantidade de grupamentos tióis determinados para a enzima não tratada com Cdt sPLA2 (~ 2.200µM de Cys) é bastante semelhante ao detectado nas amostras tratadas (~ 2.300µM de Cys) (Figura 9). Quando se compara com a aplicação conjunta de Cdt sPLA2 e as frações dos extratos BuOH e AcoET foi possível detectar um sutil aumento na quantidade de

Cys livres (~ 2.600 e 2.550 μ M, respectivamente). Entretanto, o controle interno representado pela aplicação somente dos extratos BuOH e AcoeT, revela que os níveis de Cys livres (~ 2.400 e 2.300 μ M, respectivamente) é muito similar ao observado para o controle negativo (salina) ou contendo Cdt sPLA2. Conjuntamente, os resultados indicam que os peptídeos e proteínas não apresentam danos durante a fase pós aguda do edema (240 minutos).

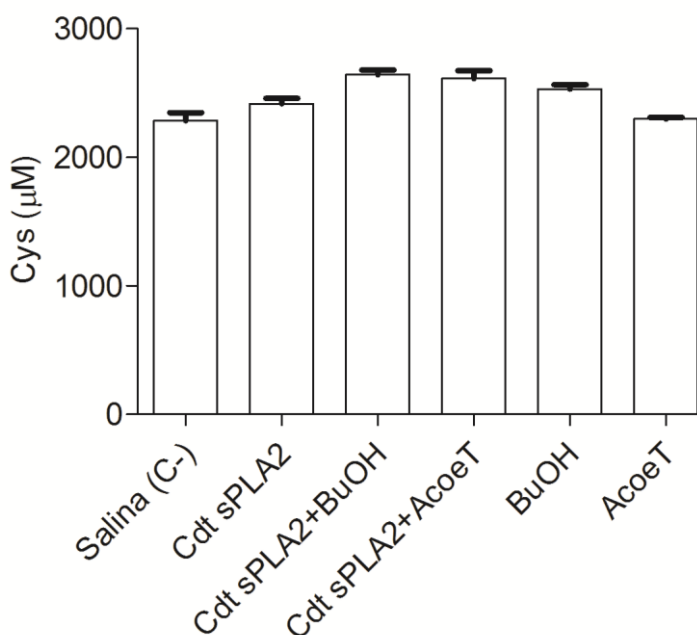


Figure 9. Determinação de tióis livres nos extratos proteicos totais. O conteúdo de grupos tióis livres no extrato proteico total foi determinado utilizando métodos DTNB. Para as análises foram utilizados 2 mg de proteínas total de cada amostra na reação. Salina representa controle negativo, Cdt sPLA2 como controle positivo, BuOH amostras tratadas com Cdt sPLA2/fração butanólica, amostras tratadas com Cdt sPLA2/Acetato de etila, e em seguida extratos BuOH e acetato de etila respectivamente. Os resultados estão expressos em quantidades de grupamentos tióis livres por μ M de proteína.

4.6 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um fenômeno biológico largamente estudado no estresse oxidativo/nitrosativo. Ela se inicia pelo ataque de oxidantes sobre lipídeos insaturados resultando em uma reação em cadeia bem definida, que tem como produto final como o malondialdeído (MDA) (Ayala *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2014). Lipídeos polares insaturados e poli-insaturados são moléculas que compõe as membranas celulares e posteriormente participam da formação da barreira de permeabilidade de células e organelas subcelulares na forma de bicamada lipídica e sua oxidação pode levar a seu enrijecimento, perda de sua fluidez e pode resultar na ruptura da célula (Ayala *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2014).

Neste contexto, resolvemos investigar mais este marcador de estresse oxidativo. Os tratamentos conjuntos de Cdt sPLA2 com os extratos BuOH ou Acoet revelam níveis de MDA semelhantes aos detectados nas amostras contendo somente solução salina (0.46 μ M). Os controles internos contendo somente dos extratos de *L. racemosa* e salina revelaram níveis similares as amostras que receberam somente solução salina, indicando que no estágio pós aguda (240 minutos) da edemaciação ocasionada por Cdt sPLA2 não existe indícios de peroxidação lipídica.

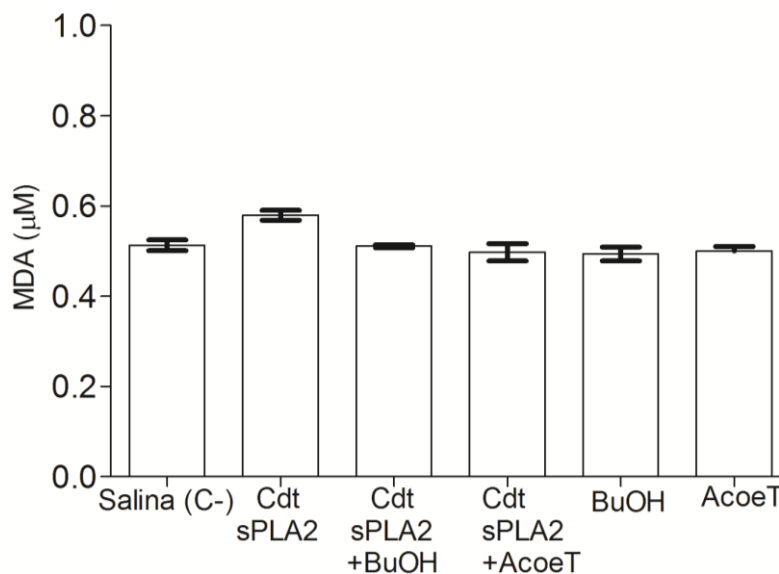


Figure 10. Avaliação da peroxidação lipídica (MDA) em resposta a administração de Cdt sPLA2 na fase pós aguda de edemaciação. Após a quantificação as amostras foram submetidas ao ensaio de peroxidação lipídica. Na reação foram usados 10mg de tecidos para cada amostra. Salina representa controle negativo, fosfolipase A2 (sPLA2 + Salina) controle positivo, seguido pelos extratos de *Laguncularia racemosa* butanolíco (BuOH + sPLA2), acetato de etila (Acoet + sPLA2). em seguida extratos de *Laguncularia racemosa* Butanolíco (BuOH + Salina), e Acetato de etila (Acoet + Salina) respectivamente. Os resultados expressam a quantidade de MDA (μ M).

De forma geral fica claro que a administração de Cdt sPLA2 não leva a uma maior peroxidação lipídica na fase pós aguda de edemaciação. Adicionalmente, nas membranas danificadas os extratos obtidos aparentam não acentuar dano a membrana, provavelmente uma vez que possui a mesma concentração de malondaldeído quando se compara ao controle negativo.

4.7 Avaliação da nitrosilação de proteínas

O NO \cdot é capaz de reagir diretamente com os centros de proteínas heme e não heme ou indiretamente via oxidação adicional de várias espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Para se detectar a reação de espécies S-nitrosiladas de proteínas pelo método desenvolvido por Jaffrey e colaboradores (2001) que permite a detecção

direta de proteínas S-NO em células/tecidos ou de proteínas purificadas (*western blot*) por meio de anticorpo anti-nitrosotíol. Neste método, os grupos SH livres são primeiramente bloqueados, S-nitrosotíóis são reduzidos a tíol (SH) que são rotulados covalentemente com maleimida-biotina. A detecção subsequente é efetuada por reagente acoplado a avidina é utilizada para identificar as proteínas biotiniladas.

Aplicando os procedimentos descritos acima avaliamos amostras com tratamento e sem tratamento com Cdt sPLA2 e também com a administração dos extratos em conjunto com a toxina ou não. Os nossos resultados indicam que a nitrosilação de proteínas foi mais abundante em amostras em que foi aplicada somente Cdt sPLA2 (Figura 11B, *lane 2*) quando comparada com o controle negativo (Figura 11, *lane 1*). No caso do extrato butanólico (BuOH) foi possível observar que sua administração em conjunto com Cdt sPLA2 inibiu de forma significativa a S-nitrosilação de proteínas (Figura 11B, *lane 3*). Por outro lado, a administração conjunta de Cdt sPLA2 não foi capaz de inibir a ação inflamatória da toxina (Figura 11B, *lane 4*). A administração somente dos extratos BuOH ou AcoeT, não levou a um aumento da S-nitrosilação de proteínas (Figura 11B, *lanes 5 e 6*), indicando que o extrato BuOH, possui propriedades capazes de inibir danos causados Cdt sPLA2.

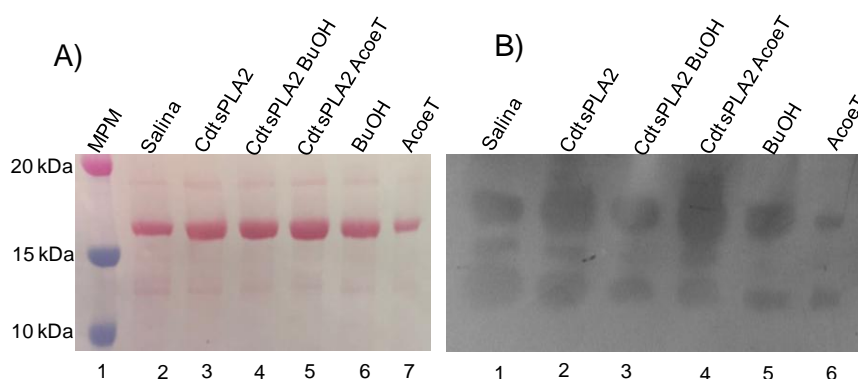


Figure 11. Resultado de *western blot* para detecção de S-Nitrosilação proteica. A concentração de amostras utilizada foi de 30µg/µl. (A) membrana após transferência de amostras corado com Ponceau. (B) Resultado de western blot com anticorpo anti-nitrosotíol.

4.8 Análise da expressão das enzimas antioxidantes Sod1, Cat 1 e Prx2

Como mencionado anteriormente, o processo inflamatório causa o aumento de espécies reativas de oxigênio em especial o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroperóxidos (H_2O_2 , Lp-OOH, $NOO^{\cdot-}$, dentre outros) os quais podem ser decompostos pela enzima superóxido dismutase (Sod) e peroxidases como a catalase e as Prx, respectivamente. De fato, diversos trabalhos demonstram que

estas enzimas possuem sua expressão aumentada em processos inflamatórios, um mecanismo utilizado para neutralizar o estresse oxidativo

Para se avaliar se as enzimas tiveram aumento na expressão na fase pós aguda da inflamação foram investigados os padrões de expressão da superóxido dismutase citosólica (Sod1).

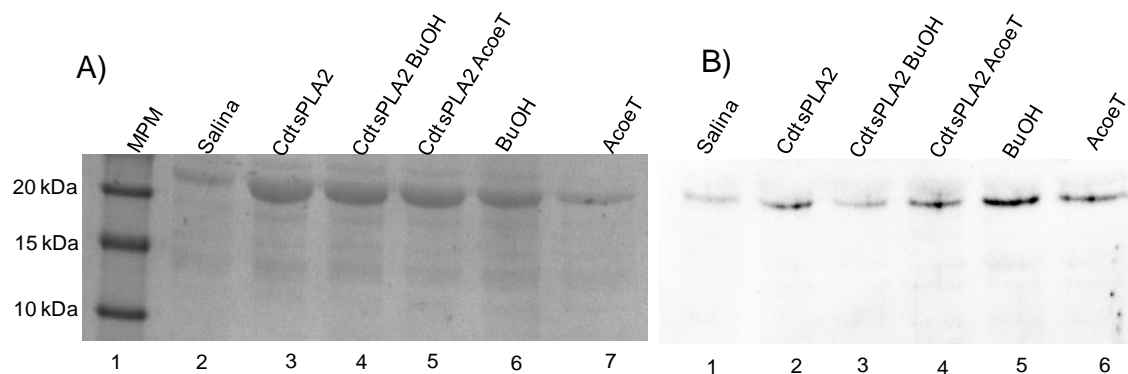


Figure 12. Análise da expressão de Sod1 em amostras tratadas com Cdt sPLA2 e Cdt sPLA2 e extratos de *L. racemosa*. A concentração de amostras proteicas utilizadas foi de 14µg/µl. (A) gel controle contendo as amostras de proteínas solúveis totais revelados com *coomassie blue*. (B) Resultado de *western blot* com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Sod1 (diluição 1: 5000).

Nossos resultados revelam que em nenhuma das condições avaliadas ocorreu diferenças no padrão de expressão de Sod1, indicando que não ocorreu aumento acentuado de $O_2^{\cdot-}$ em razão do tratamento com Cdt sPLA2 ou da toxina em conjunto com os extratos de *L. racemosa* (Figura 12).

A análise de expressão da catalase, enzima capaz de decompor H_2O_2 , também foi avaliada por *western blot*. Novamente, nossos resultados não revelaram aumento da expressão da enzima em nenhuma das condições testadas (Figura 13).

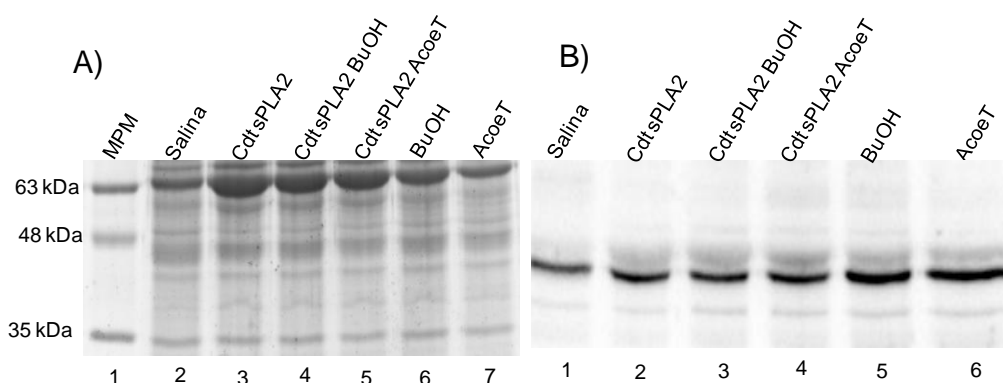


Figure 13. Resultado de *western blot* com anticorpo monoclonal de camundongo anti-catalase. (A) A concentração de amostras é de 14µg/µl. (A) Gel controle de carregamento para amostra de proteínas solúveis totais de pata de camundongo. (B) Resultado de *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-catalase de camundongo (diluição 1: 5000).

Entretanto, uma vez que a catalase não é capaz a decompor outros tipos de peróxidos formados durante o estresse oxidativo como peroxinitrito e peróxidos orgânicos (Tairum *et al.*, 2016) avaliamos também os níveis de expressão de Prx2, a isoforma de peroxirredoxinas mais abundante em eucariotos. Os resultados obtidos revelam que os níveis de expressão da enzima Prx2 não apresentaram diferenças significativas no nível de expressão (Figura 14 B).

Uma vez sob estresse oxidativo/nitrosativo elevado Prx2 pode ter sua C_P superoxidada a C_P-SO₂H ou CP-SO₃H. Para investigar se as cisteínas se apresentavam superoxidadas realizamos também a análise da presença destas espécies por meio de *western blot*, utilizando anticorpos anti-SO_{2/3}H. Os resultados revelaram que em todas as condições testadas a quantidade de espécies superoxidadas foi a mesma (Figura 14D). Novamente os resultados não sugerem a existência de estresse oxidativo/nitrosativo na fase tardia do edema.

De forma coletiva e possível afirmar que nenhuma das análises efetuadas por meio de análises globais de danos oxidativos/nitrosativos (peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas ediminuição no nível de tióis livres) e aquelas envolvendo o aumento de expressão de enzimas antioxidantes (Sod, Cat e Prx2) ou a modificação oxidativa (Prx2) nenhum deles indica a existência de danos oxidativo ou alteração nos níveis de expressão de enzimas antioxidantes na fase tardia do edema.

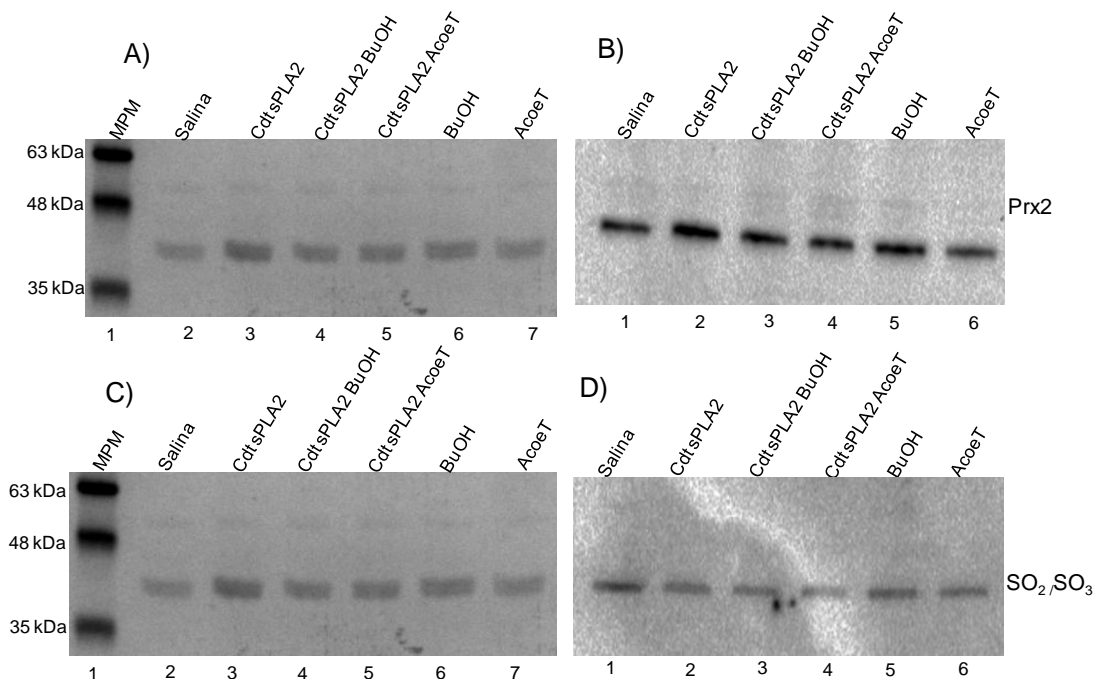


Figure 14. Resultado de *western blot* com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Prx2 e anticorpo anti espécie superoxidada (anti-SO_{2/3}H). A concentração de amostras de proteína total foi de 14µg/µl Prx2. **A e C**) Gel controle de carregamento de amostra corado por *coomassie blue*. **B**) resultado de *western blot* utilizando anti-corpo LF-MAO368 específico para Prx2 de camundongo (diluição 1: 7000). **D**) resultado de *western blot* utilizando anti-corpo específico para anti-SO_{2/3} de camundongo (diluição 1: 10000). A concentração de amostras foi de 14µg/µl.

Neste contexto acreditamos que mesmo havendo edema (Figura 6), no estágio tardio os mecanismos de defesa oxidativo já efetuaram seu papel e a homeostase redox já foi re-estabelecida.

5. Obtenção de sPLA2 *C. durissus terrificus* recombinante

5.1 Clonagem de Cdt sPLA2

Como mencionado, anteriormente a extração de Cdt sPLA2 além de ser bastante trabalhosa, pois envolve diversos passos para a sua purificação, cada vez mais esbarra em barreiras regulatórias o que dificulta bastante sua obtenção. Adicionalmente sua extração a partir do veneno rende aproximadamente 3mg por grama de veneno. Uma alternativa seria sua produção através de metodologias envolvendo sua produção recombinante, uma vez que este tipo de abordagem é capaz de produzir miligramas de proteína (Jozala et al., 2016; Lopes et al., 2017), o que pode permitir não só sua produção em abundância (na ordem de gramas por litro de cultura) mas também permitir estudos que visem sua caracterização molecular aprofundada, uma vez que sua clonagem pode permitir estudos de substituição de aminoácidos chave envolvidos em sua atividade bioquímica e conseqüentemente levar a um maior entendimento do funcionamento da enzima o que pode permitir a criação de novas abordagens terapêuticas.

Até o presente momento existem diversos trabalhos voltados para a clonagem de toxinas de serpentes (Fan et al., 1999; Ferreira et al., 2013; Kassab et al., 2004; Picelliet al., 2017; Singhet al., 2005; Rojnuckarinet al., 2006) entretanto poucos trabalhos tiveram como objetivo a expressão heteróloga de toxinas em sistemas bacterianos. Como exemplos, a sPLA2 acídica de *Bothrops jararacussujá* foi expressa de forma recombinante em bactérias. Entretanto, a expressão resultou em corpos de inclusão sendo necessário seu re-novelamento para que a enzima apresentasse atividade (Roberto et al., 2004). De fato, procedimentos envolvendo a expressão recombinante de sPLA2 de *Agkistrodon halys pallas* levou a produção em corpos de inclusão e mesmo após renaturação somente 27% da atividade da enzima foi retida (Pan et al., 1998) o mesmo ocorreu para *Naja naja sputatrix* e *Bungarus multicinctus* (Armugam et al., 1997, Changet al., 1996b).

A estrutura cristalográfica da sPLA2 de *C. durissus terrificus* já foi determinada o que favorece o estudo da substituição de aminoácidos por mutagênese sítio dirigida e a avaliação dos efeitos das substituições de aminoácidos (Marchi-Salvador et al., 2008), que são bastante escassos nesta área (Chang et al., 1996).

A expressão heteróloga deste grupo de proteínas representa um grande desafio, uma vez que elas são tóxicas para as células hospedeiras bacterianas em razão da atividade de fosfolipase que é capaz de desorganizar as membranas celulares levando a morte da célula. Como pode ser observado o sucesso na expressão de algumas PLA2 acídicas se deu quando elas se apresentaram em corpos de inclusão, ou seja não solúveis, portanto, sem atividade. Cabe ressaltar que as sPLA2 que foram expressas atividade enzimática só foi parcialmente restaurada após processos de renaturação *in vitro* da proteína.

Com o objetivo de expressar a Cdt sPLA2 optamos por sintetizar o gene com os códons otimizados e clonar em vetor de clonagem pUC57 flanqueado com sítios para enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde* I (seção *Material e Métodos*) visando a transferência para vetor de expressão pET15b, o qual insere na proteína recombinante uma cauda de histidinas (His 6 ×) e possibilita a purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (em inglês IMAC).

Para tanto inicialmente digerimos pET15b com *Bam*HI e *Nde* I. O resultado da digestão do plasmídeo é mostrado na figura 15A. O gene inserido no plasmídeo pUC57 foi amplificado com o oligonucleotídeos M13F E M13R e posteriormente digeridos com *Bam*HI e *Nde* I e o produto após purificação foi ligado no plasmídeo pET15b e transformado em linhagem de *E. coli* DH5 α . Em seguida foi efetuado o PCR de colônia para se checar a inserção do gene *cdtspla2* e os resultados revelaram que todos os clones continham o gene (Figura 15B). A confirmação de que os genes não continham mutações foi efetuada por meio do sequenciamento dos insertos dos plasmídeos utilizando os oligonucleotídeos T7F E T7R.

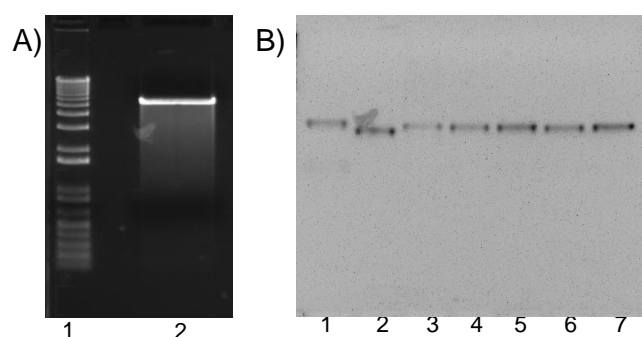


Figure 15. Clonagem de Cdt sPLA2. **A)** Gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (10 μ g/ml) contendo o resultado da digestão enzimática do plasmídeo expressão pET15b com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde* I (*lane* 2). Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de massa molecular. **B)** Triagem por PCR de plasmídeos pET15b contendo o gene *cdtspla2*. Nas *lanes* 1-7 foram aplicados o produto de amplificação de diferentes clones.

5.1 Padronização da expressão de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r)

Para a expressão de Cdt sPLA2r (o “r” denota a proteína recombinante) foram utilizadas linhagens de *E. coli* contendo características distintas. Inicialmente foram utilizadas as linhagens BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysS. A linhagem BL21 (DE3) contém o gene da polimerase do fago T7 com o promotor lac inserido genomicamente, que é induzido por IPTG. Esta linhagem possui a deleção das proteases lon e OmpT, sendo que é adequada para a expressão de genes cujo produto não é tóxico. Por sua vez a linhagem BL21 (DE3) pLysS além de conter as características da BL21 (DE3) contém o plasmídeo pLysS, que expressa constitutivamente lisozima de T7, a qual reduz a expressão basal de genes alvo através da inibição da T7RNA polimerase. Como efeito, o controle rigoroso da T7RNA polimerase auxilia na expressão de proteínas recombinantes e tóxicas ou de baixa solubilidade.

A figura 16 revela o resultado em SDS PAGE não redutor (sem a adição de DTT) da expressão utilizando as duas linhagens em duas diferentes temperaturas (37°C ou 20°C) das frações proteicas totais solúveis e insolúveis.

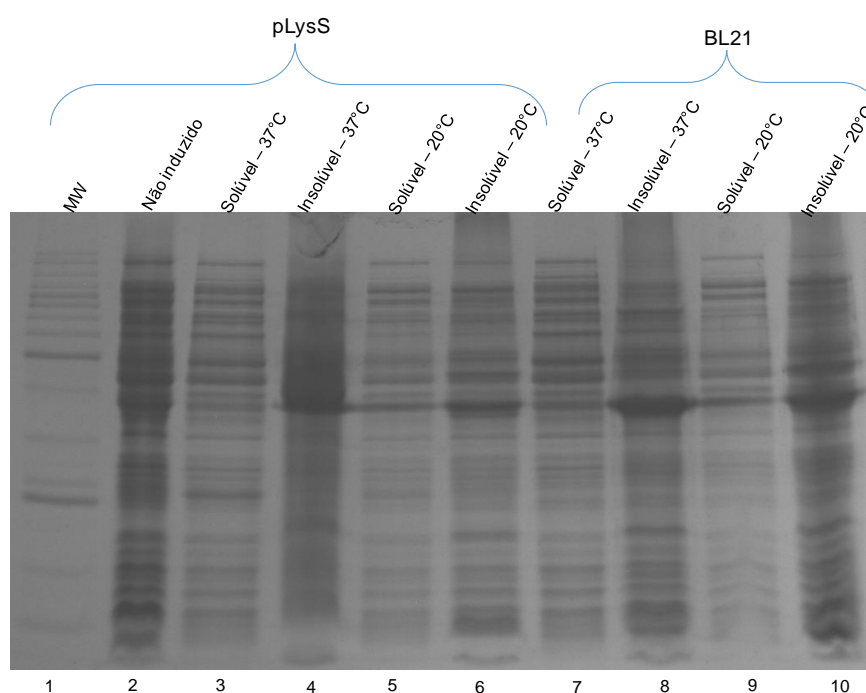


Figure 16. Expressão de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r) as linhagens pLysS BL21 (DE3) e BL21 (DE3). Resultado de SDS PAGE (concentração do gel = 12%) e revelado com *coomassie brilliant blue* contendo os resultados da indução da expressão utilizando as linhagens pLysS BL21 (DE3) e BL21 (DE3) em temperatura de 37°C ou 20°C. A indução foi efetuada utilizando 0.3mM de IPTG por 3hs (37°C) ou 12 hs (20°C). Foram avaliadas as frações solúveis e insolúveis para ambas as condições de expressão.

Os resultados revelaram que não foi possível a expressar Cdt sPLA2r de forma satisfatória, o que poderia indicar que a indução da expressão de Cdt sPLA2r possa ter sido tóxica para a célula o que impediu sua detecção em quantidades satisfatórias. Adicionalmente, a análise da sequência de aminoácidos e da estrutura de Cdt sPLA2 revelam a existência de 14 resíduos cisteínas sendo que doze deles podem formar dissulfetos (Figura 17). Neste contexto, foram selecionadas duas outras linhagens para a expressão de Cdt sPLA2 a linhagem Origami (DE3) e a linhagem C43 (DE3).

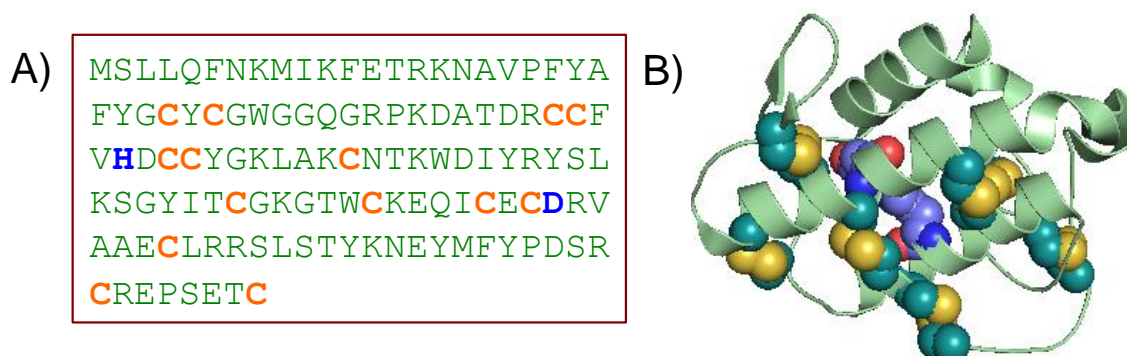


Figure 17. Estrutura primária e terciária de Cdt sPLA2 revelam elevada quantidade de resíduos cisteínas. **A)** Sequência de aminoácidos de Cdt sPLA2. As cisteínas estão em laranja e resíduos envolvidos na catálise em azul e os demais estão representados em verde. **B)** Estrutura cristalográfica de Cdt sPLA2 representada em *cartoon* (verde) (pdb = 2COG). Os resíduos de cisteína estão representados por esferas e os átomos colorizados em verde (carbono) e laranja (enxofre). Os resíduos His48 e Asp99 envolvidos na catálise estão representados por esferas com os átomos de carbono em roxo, os de oxigênio em vermelho e os de nitrogênio em azul. A representação gráfica foi produzida utilizando o *software* PyMOL (<https://www.pymol.org/>).

A linhagem Origami (DE3) apresenta mutações na tiorredoxina redutase (*trxB*) e glutationa redutase (*gor*), genes envolvidos em vias redutoras e cujas mutações favorecem fortemente a formação de ligações dissulfeto no citoplasma da bactéria. Por sua vez a linhagem BL21 (DE3) C43 é efetiva na expressão de proteínas tóxicas e de membrana de todas as classes de organismos. A razão desta característica reside na mutação no promotor de *lacUV5* para lactose o que o torna menos apto a expressar fortemente a T7 RNAPol e consequentemente as proteínas sob seu controle, o que pode garantir a sobrevivência da bactéria durante o processo de expressão heteróloga.

Com o intuito de diminuir a toxicidade de Cdt sPLA2r para a célula bacteriana o tempo de expressão testado foi reduzido para 1 hora ou 2 horas a 20°C. A figura 18 revela o resultado dos procedimentos para a linhagem Origami (DE3). Após a purificação por IMAC foi efetuado o SDS PAGE não redutor sendo possível identificar uma banda com massa <14 kDa, esperada para a enzima recombinante.

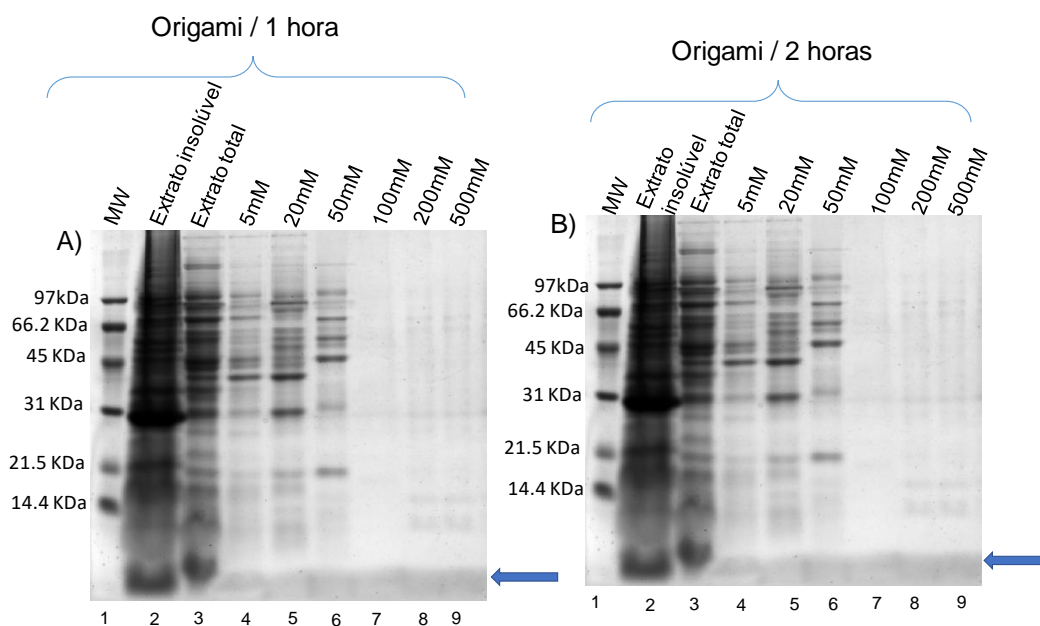


Figure 18. Expressão de Cdt sPLA2r utilizando a linhagem Origami (DE3) e purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC). Resultado de SDS PAGE (gel = 12%) e revelação com *coomassie brilliant blue* para a indução da expressão por 1 hora (A) ou 2 horas (B) utilizando as linhagens Origami (DE3) em temperatura de 20°C utilizando 0.3mM de IPTG. Na *lane* 1 foi aplicado o marcado de massa molecular Benchmark (Thermo Fisher Scientific), na *lane* 2 o extrato proteico insolúvel total, na *lane* 3 seguido pelo eluido em concentrações crescentes de imidazol (5mM, *lane* 4; 20mM, *lane* 5 e 100mM, *lane* 6); 200mM, *lane* 7 e 500mM, *lane* 8).

Para a linhagem C43 (DE3), foram aplicados os mesmos protocolos experimentais descritos acima para a Origami (DE3). Os resultados revelam que assim como para a linhagem origami também foi possível detectar uma banda com massa <14 kDa, entretanto a quantidade no extrato total solúvel (Figura 19, *lane* 2) foi muito superior a detectada a expressão efetuada na linhagem origami (Figura 18, *lane* 2). Entretanto para ambas as linhagens a purificação por IMAC não foi suficiente para se obter a proteína com grau de pureza satisfatório. De fato, mesmo em concentrações intermediárias de imidazol (> 200mM) não foi possível detectar a presença de Cdt PLA2 recombinante (Cdt sPLA2r), sugerindo a oclusão parcial da cauda de histidinas.

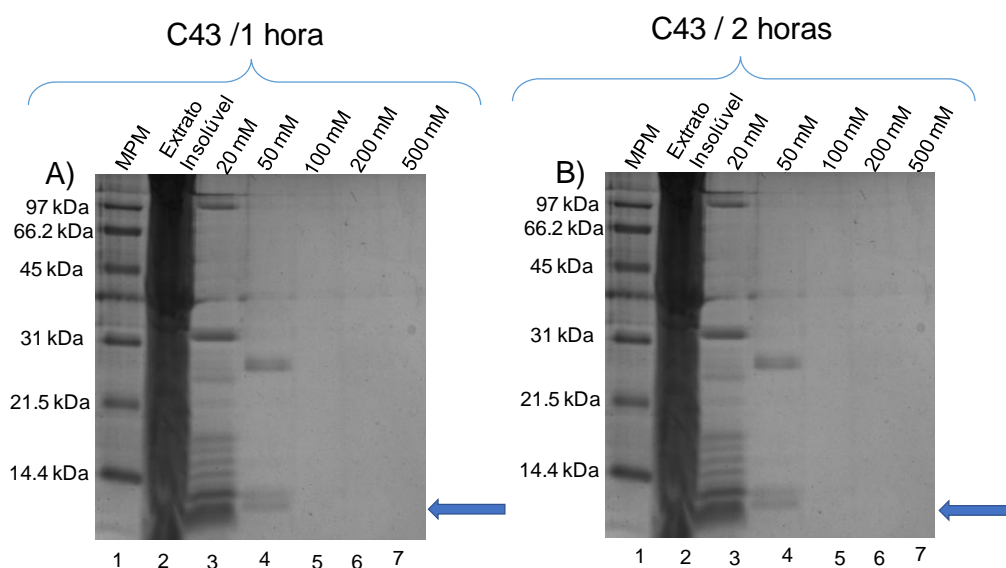


Figure 19. Expressão de Cdt sPLA2r utilizando a linhagem BL21 (DE3) C43. Resultado de SDS PAGE (concentração do gel = 12%) e revelado com *coomassie brilliant blue* contendo os resultados da indução da expressão utilizando as linhagens pLysS BL21 (DE3) e BL21 (DE3) em temperatura de 37°C ou 20°C. A indução foi efetuada utilizando 0.3mM de IPTG por 3hs (37°C) ou 12 hs (20°C). Foram avaliadas as frações solúveis e insolúveis para ambas as condições de expressão. A seta azul indica a proteína superexpressa em *E. coli* com massa molecular esperada para Cdt PLA2 recombinante.

5.2 Ensaio de atividade para Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r)

Para se averiguar se realmente nas frações de extrato total solúvel que a banda de ~ 14 kDa poderia ser Cdt sPLA2r realmente foram efetuados ensaios comparativos de atividade com a proteína nativa extraída de glândula de veneno. Os resultados indicaram que a fração celular solúvel sem nenhuma purificação apresentou atividade de fosfolipase A2 (Figura 20).

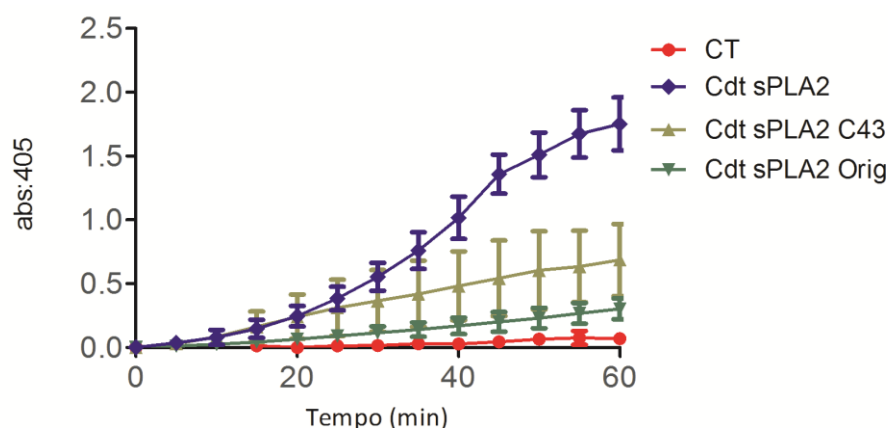


Figure 20. Avaliação da atividade de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r). As amostras recombinantes expressas nas linhagens Origami C43 (DE3) e C43 (DE3) foram avaliadas quanto a atividade enzimática, na reação foi utilizado o extrato proteico total, sem passar por purificação. Como controle 1 (CT1) foi o tampão Tris 0, 02M.HCl, pH 7.4; NaCl 0,15M e CaCl₂ pH 8.0, utilizado para

sonicação das células seguida. Para todas as amostras foi adicionado o substrato 4-N-3-OBA (NOBA 1mg). As amostras foram submetidas a leitura no comprimento de onde 405nm no intervalo de 1 hora a cada 5 min. O controle negativo esta representado pela linha vermelha (●), a sPLA2 nativa extraída de veneno em azul (◆), Cdt sPLA2 recombinante expressa na linhagem Origami (DE3) (linha verde claro, ▲) e C43 (DE3) (linha verde escuro, ▼).

5.3 Purificação por fervura de sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r)

Visando alterar a pureza das amostras optamos por fazer a purificação por fervura. Este tipo de purificação é aplicado para proteínas termo estaveis e uma vez que existe elevado número de dissulfetos (seis) isto poderia indicar uma elevada estabilidade. Para esta metodologia utilizamos a linhagem de *E. coli* C43 (DE3) uma vez que foi a linhagem que apresentou os melhores resultados para a expressão. Aplicando esta metodologia foi possível obter a enzima Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r) com uma pureza bem mais acentuada (Figura 21, lanes 3 e 4). Ainda com a intenção de aumentar a pureza da proteína esta também foi liofilizada, entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre no teor de contaminantes proteicos antes e após a liofilização.

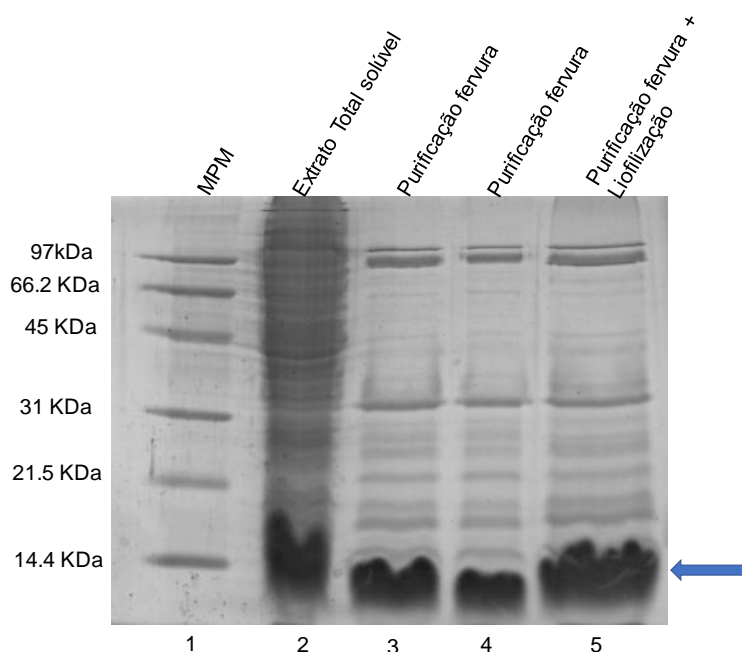


Figure 21. SDS PAGE contendo o resultado de purificação de Cdt sPLA2 recombinante. Para expressão foi utilizada a linhagem de *E. coli* C43 (DE3) com indução por 2hs a 37°C utilizando 0.3mM de IPTG. Na lane 1 foi aplicado o marcador de peso molecular; na lane 2 foi aplicado o extrato proteico solúvel; nas lanes 3 e 4 aliquotas de purificação por fervura; lane5 amostras purificadas por fervura e depois liofilizada e resuspendida em tampão fosfato pH 7.5 (200mM). A seta azul indica a proteína superexpressa em *E. coli* com massa molecular esperada para Cdt PLA2 recombinante.

Avaliamos também a atividade de fosfolipase A2. das amostras (Figura 22). Os resultados revelaram que a fração sem purificação apresentou menor atividade de fosfolipase A2. que a proteína purificada por fervura. Adicionalmente foi possível

constatar claramente um comportamento enzimático diferente entre a proteína nativa purificada e Cdt sPLA2r. Enquanto que a enzima nativa purificada apresenta um perfil de atividade sigmóide denotando comportamento alostérico em acordo com o determinado em estudos anteriores (Oliveira et al., 2002). Por outro lado, a Cdt sPLA2r apresentou um perfil linear característico de enzimas que seguem o padrão Michaeliano (Figura 22). De fato, o cálculo das velocidades iniciais revela que o extrato purificado somente por fervura apresentou atividade de $8,1 \times 10^{-1} \mu\text{M/s}$, enquanto que o extrato que após o procedimento de liofilização e purificação por fervura foi de $10,8 \times 10^{-1} \mu\text{M/s}$, ambas superiores a enzima nativa purificada $7,1 \times 10^{-1} \mu\text{M/s}$).

As razões para estas diferenças não são claras, mas podem estar relacionadas com a presença de cauda de histinas da proteína recombinante. Entretanto, os resultados apresentados aqui representam a primeira vez que é produzida a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* além de ter sido possível determinar um processo bastante vantajoso economicamente para sua purificação.

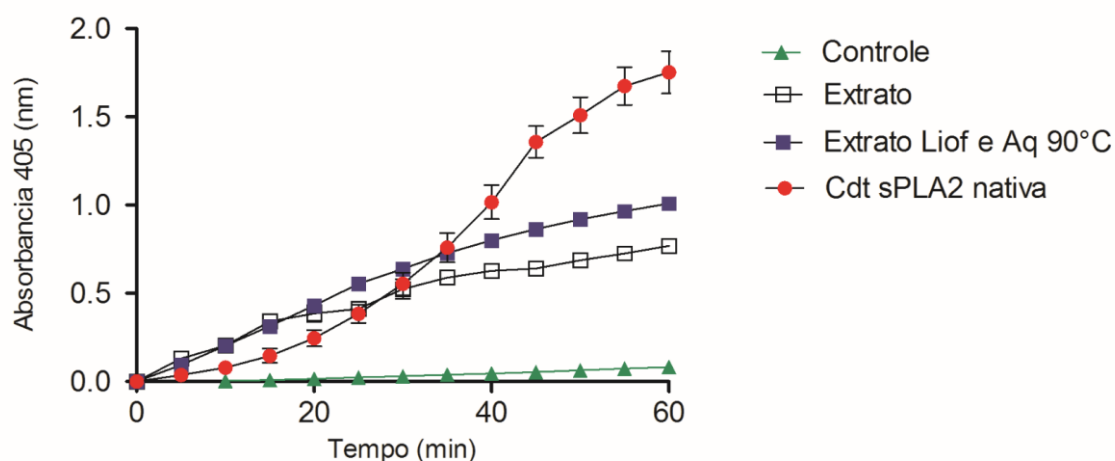


Figure 22. Avaliação da atividade de sPLA2 recombinante. As amostras foram submetidas a ensaio de atividade enzimática, na reação foi utilizado o extrato proteico total (quadrado azul). Como controle negativo foi utilizado somente o tampão da (Tris-HCl 0,02M; NaCl 0,15M, CaCl₂ pH 8.0) seguida por extrato proteico total. o quadrado branco a enzima sem purificar e o azul escuro a proteína purificada por fervura e liofilizada.

5.1 Conclusões e Perspectivas

Este projeto teve dois principais objetivos: 1) avaliar se ocorre efeito protetor das frações butanólica (BuOH) e de acetato de etila (AcoET) de *Laguncularia racemosa* frente a administração de sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt sPLA2), avaliando também se o estresse oxidativo está envolvido na fase tardia do processo de edemaciação promovido pela toxina; 2) clonar, expressar e purificar e caracterizar Cdt PLA2 recombinante (Cdt sPLA2r).

No que concerne ao primeiro objetivo, avaliamos se os extratos AcoET e BuOH eram capazes de inibir a atividade de Cdt sPLA2 (Figura 5). Os resultados revelaram que a administração dos extratos em conjunto com Cdt sPLA2 foi capaz de diminuir a edemaciação na fase aguda (até 30 minutos), no entanto na fase tardia (240 min) enquanto o extrato BuOH levou a uma redução do edema, a administração do extrato AcoET não apresentou efeito protetor (Figura 6). Conjuntamente, os dados indicam que somente o extrato BuOH de *L. racemosa* possui componente(s) capaz(es) de combater os efeitos tóxicos de sPLA2.

Para averiguar o estresse oxidativo sobre biomoléculas de proteína avaliamos a carbonilação proteica e a quantidade de sulfidrilas livres (figuras 8 e 9 respectivamente). Em ambos os casos os resultados obtidos neste trabalho não indicaram que a Cdt sPLA2 ou mesmo os extratos de *L. racemosa* são capazes de promover danos oxidativo em biomoléculas de proteínas na fase tardia do edema (240 min). Também avaliamos de forma global a peroxidação lipídica nesta fase e os resultados indicam que aparentemente os extratos podem proteger levemente as células da peroxidação (Figura 10). Entretanto, a diferença não é significativa, pois as quantidades de MDA foram ~10% maior que o controle negativo. Neste caso, os extratos de *L. racemosa* levaram somente a uma leve proteção em resposta a administração da toxina de *C. durissus terrificus*.

Também para avaliar a existência de estresse oxidativo investigamos a expressão das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e peroxirredoxina II. A enzima superóxido dismutase (Sod) é capaz de decompor o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a catalase (Cat) o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), EROs que são comumente geradas em processos inflamatórios (Halliwell e Gutteridge, 2007; Szabó *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram que nesta fase do processo de edemaciação não foi detectado o aumento da expressão de Sod ou Cat. Também avaliamos a expressão e modificação (superoxidação) de PrxII

umavez que esta enzima é capaz de decompor não somente o H_2O_2 , como a catalase, mas também hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitritos, utilizando um resíduo de cisteína (cisteína peroxidásica - C_P) para efetuar a catálise. A expressão da enzima é aumentada com aumento de oxidantes (Bayer et al., 2013). Entretanto, quando os níveis de hidroperóxidos são muito elevados, ocorre a inativação da enzima em razão da formação de cisteína ácido sulfínico (C_P-SO_2H). De fato, já foi demonstrado que parte da PrxII se encontra com C_P na forma de C_P-SO_2H , mesmo em condições fisiológicas, mas ocorre um aumento acentuado quando as células se encontram sob estresse oxidativo incluindo os processos inflamatórios (Cox et al., 2009).

Nossos resultados revelaram que os níveis de PrxII não se alteram com a aplicação de Cdt sPLA2, dos extratos de *L. racemosa* ou ambos (Figura 14 A). Também investigamos a formação de C_P-SO_2H por meio de western blot, entretanto nossos resultados novamente foram negativos uma vez que os níveis de C_P-SO_2H foram muito similares em todas as condições testadas (Figura 14 B).

Em conjunto, nossos dados indicam fortemente que apesar da edemaciação promovida pela Cdt sPLA2 persistir na fase tardia do processo não existem evidências de estresse oxidativo nesta fase, pois mesmo utilizando diferentes abordagens para detecção do estresse oxidativo como níveis de oxidação de sulfidrilas, carbonilação proteica, peroxidação lipídica e aumento de expressão ou modificação de proteínas antioxidantes, nenhum deles apresentou resultados que indiquem o estresse nesta fase. Uma perspectiva interessante reside em realizar as mesmas avaliações bioquímicas na fase aguda (15-30 min) e na fase media (60 min) do processo de edemaciação, o que deve permitir uma visão mais refinada da existência ou não de estresse oxidativo ocasionado por Cdt sPLA2.

No que concerne ao segundo objetivo, ou seja, a obtenção de Cdt sPLA2 recombinante (Cdt sPLA2r), também foram obtidos resultados bastante relevantes. Conseguimos clonar, expressar e estabelecer protocolos de purificação de baixo custo para Cdt sPLA2r obtendo quantidades bastante elevadas de proteína (Figura 21). De fato, a enzima recombinante obtida apresentou maior velocidade inicial quando comparada com a Cdt sPLA2 nativa (Figura 22). Também foi possível constatar que a enzima recombinante possui um padrão de comportamento enzimático distinto: a proteína nativa purificada de glândula de veneno apresenta comportamento alostérico (Figura 22), ao passo que a enzima recombinante (sPLA2r)

apresenta o padrão Michaeliano (Figura 22). O motivo desta diferença não é claro e pode ser em razão da cauda de histidinas da proteína recombinante. Neste contexto, uma perspectiva importante seria a retirada da cauda de His, entretanto para atingir estes objetivos é necessária a clonagem em outro grupo de plasmídeos de expressão que permita a retirada da cauda de His com HRV 3C protease. Cabe ressaltar que obtenção de Cdt sPLA2r também permitirá estudos envolvendo mutagênese sitio dirigida para um maior entendimento de mecanismos moleculares envolvidos na atividade da enzima além de facilitar a obtenção desta enzima para pesquisa básica. É importante ressaltar que fosfolipases A2 são utilizadas em processos biotecnológicos (Borrelli et al., 2105; de Maria 2007; Ramrakhiani e Chand 2011). Industrialmente a sPLA2 é utilizada no processo de degomagem de óleos vegetais para a remoção de fosfolipídeos que atrapalham de forma significativa no refinamento dos óleos (Yu et al., 2012). Também é utilizada para a produção de lisolecitina, molécula utilizada como emulsificador e antifúngico em alimentos. Entretanto, a principal fonte de sPLA2 são as células acinares de pâncreas de porco (de Maria et al., 2002) e cada vez mais a utilização de enzimas de origem animal em processos biotecnológicos para obtenção de produtos para consumo humano ou animal tende a cair em desuso só por seu alto custo, mas também pelo risco a saúde relacionado a contaminação por bactérias, vírus, retrovírus ou mesmo moléculas infecciosas como príons (Geschwind et al., 2015). Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho possuem elevada perspectiva de aplicação.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas K, Breton J, Picot CR, Quesniaux V, Bouton C, Drapier JC. 2009. Signaling events leading to peroxiredoxin 5 up-regulation in immunostimulated macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 794-802.

Armugam A, Earnest L, Chung MC, Gopalakrishnakone P, Tan CH, Tan NH, Jeyaseelan K. 1997. Cloning and characterization of cDNAs encoding three isoforms of phospholipase A2 in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom. *Toxicon.* 35:27-37.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 360438.

Bandaranayake WM. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat Prod Rep.* 15, 159-72.

Bandaranayake, W. M. 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, 10, 421-452.

Bayer SB, Maghzal G, Stocker R, Hampton MB, Winterbourn CC. 2013. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. *FASEB J.* 27:3315-22.

Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127, 617-633.

Borrelli GM, Trono D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *Int J Mol Sci.* 2015 Sep 1;16(9):20774-840.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., e Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161, 839-851.

Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol.* 52, 98-111

Burke JE, Dennis EA. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* 50, S237-S242.

Chang LS, Wu PF, Chang CC. 1996a. cDNA sequence analysis and mutagenesis studies on the A chain of beta-bungarotoxin from Taiwan banded krait. *J Protein Chem.* 15: 755-61.

Chang LS, Wu PF, Chang CC. 1996b. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A2 in *Escherichia coli*, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:990-6.

Chiricozzi E, Fernandez-Fernandez S, Nardicchi V, Almeida A Bolaños JP, Goracci G. 2010. Group IIA secretory phospholipase A2 (GIIA) mediates apoptotic death during NMDA receptor activation in rat primary cortical neurons. *J Neurochem* 112, 1574-1583. Azevedo-Marques M, Hering S, Cupo P. 2003. *Acidente crotalico.* Sao Paulo: Sarvier. pp. 91–98.

Camargo EA, Santana DG, Silva CI, Teixeira SA, Toyama MH, Cotrim C, Landucci EC, Antunes E, Muscara MN, Costa SK. 2014. Inhibition of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide as a therapeutical target for acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2. *Eur J Pain.* 5, 691-700.

Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R. 2013. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm Res.* 30, 2718-2728.

Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. 2009. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J.* 425:313-25.

Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. 2009. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethn Dis.* 19,S1-42-S1-46.

Cunha EM, Martins OA. 2012. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)* 02(02), 21-26.

Day AM, Brown JD, Taylor SR, Rand JD, Morgan BA, Veal EA. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Mol Cell*. 2012 45: 398-408.

Deka A, Sharma M, Sharma M, Mukhopadhyay R, Doley R. Purification and partial characterization of an anticoagulant PLA2 from the venom of Indian *Daboia russelii* that induces inflammation through upregulation of proinflammatory mediators. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017. *In press*.

Diet A, Abbas K, Bouton C, Guillon B, Tomasello F, Fourquet S, Toledano MB, Drapier JC. 2007. Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages. *J Biol Chem*. 282, 36199-36205.

Fagundes FH, Aparício R, dos Santos ML, Diz Filho EB, Oliveira SC, Toyama DO Toyama MH. 2011. A catalytically inactive Lys49 sPLA2 isoform from *Bothrops jararacussu* venom that stimulates insulin secretion in pancreatic beta cells. *Protein Pept Lett*. 18, 1133-1139.

Fan CY, Qian YC, Yang SL, Gong Y. 1999. cDNA cloning and sequence analysis of Lys-49 phospholipase A2 from *Agkistrodon acutus*. *Genet Anal*. 15: 15-8.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*. 33:79-97.

Ferreira FB, Gomes MS, de Souza DL, Gimenes SN, Castanheira LE, Borges MH, Rodrigues RS, Yoneyama KA, Brandeburgo MI, Rodrigues VM. 2013. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxins (Basel)*. 5: 2403-19.

Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 15, 763-780.

Geschwind MD. 2015. Prion Diseases. *Continuum Neuroinfectious Disease*. 21:1612-38.

Gonzalez Porqué P, Baldesten A, Reichard P. Purification of a thioredoxin system from yeast. *J Biol Chem*. 1970 May 10;245(9):2363-70.

Gozal D, Kheirandish-Gozal L. 2008. The multiple challenges of obstructive sleep apnea in children: morbidity and treatment. *Curr Opin Pediatr*. 20, 654-658.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T 2009a. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54: 958–975.

Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. 2009b. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54: 976–987.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.

Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—Molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1539-1605.

Hernandez-Oliveira S, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. *Protein J.* 2005 4:233-42

Hansford KA, Reid RC, Clark CI, Tyndall JD, Whitehouse MW, Guthrie T, McGeary RP, Schafer K, Martin JL, Fairlie DP. D-Tyrosine as a chiral precursor to potent inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (IIa) with antiinflammatory activity. *Chembiochem.* 2003 4:181-5.

Huang, L. et al. Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity from *Rhizomucormiehei* and Its Application in Food Safety and Leukemia Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* v.80, n.5, p.1561-1569, 2014;

Huang X, Chen L, Liu W, Qiao Q, Wu K, Wen J, Huang C, Tang R, Zhang X. 2015. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. *Aquat Toxicol.* 165,41-50.

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2001 3: 193-7.

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, 625–35.

Jozala AF, Gerald DC, Tundisi LL, Feitosa VA, Breyer CA, Cardoso SL, Mazzola PG, Oliveira-Nascimento L, Rangel-Yagui CO, Magalhães PO, de Oliveira MA, Pessoa A Jr. *Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification*. 2016. *Braz J Microbiol.* 47 S1:51-63.

Kassab BH, de Carvalho DD, Oliveira MA, Baptista GR, Pereira GA, Novello JC. 2004. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. *Protein Expr Purif.* 35:344-52.

Kinnula VL, Lehtonen S, Kaarteenaho-Wiik R, Lakari E, Pääkkö P, Kang SW, Rhee SG, Soini Y. 2002. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax.* 57,157-164.

Knoops, B., Clippe, A., Bogard, C., Aarsalane, K., Wattiez, R., Hermans, C., Duconseille, E., Falmagne, P., and Bernard, A. 1999. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 274, 30451-30458.

Landry, C. L., Rathcke, B. J., Kass, L. B. 2009. Distribution of androdioecious and hermaphroditic populations of the mangrove *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) in Florida and the Bahamas. *Journal of Tropical Ecology.* 25, 75-83.

Lindahl M, Tagesson C. 1996. Zinc (Zn²⁺) binds to and stimulates the activity of group I but not group II phospholipase A2. *Inflammation.* 6, 599-611.

Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. Lopes AM, Oliveira-Nascimento L, Ribeiro A, Tairum CA Jr, Breyer CA, Oliveira MA, Monteiro G, Souza-Motta CM, Magalhães PO, Avendaño JG, Cavaco-Paulo AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui CO, Sette LD, Converti A, Pessoa A. *Crit Rev Biotechnol.* 37:82-99.

Mamta G, Bansal YK, Sandhu SS. 2013. Recent patents on flavonoids. *Recent Pat Biotechnol.* 7, 179-96

Marchi-Salvador DP, Correa LC, Magro A, Oliveira CZ, Soares AM, Fontes MR. 2008. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin:

crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins* 72, 883-891.

de Maria L, Vind J, Oxenbøll KM, Svendsen A, Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. 74:290-300.

Matte A, Low PS, Turrini F, Bertoldi M, Campanella ME, Spano D, Pantaleo A, Siciliano A, De Franceschi L. Peroxiredoxin-2 expression is increased in beta-thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2010 49:457-66.

Murakami M, Kudo I. 2002. Phospholipase A2. *J Biochem.* 131, 285-92.

Murakami M, Lambeau G. 2013. Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: an update. *Biochimie.* 95,43-50.

Murakami M, Taketomi Y. 2015. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol Int.* 64,4-.0.

Murakami M, Taketomi, Y, Miki Y, Sato H, Yamamoto K, Lambeau G. 2014. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: the 3rd edition. *Biochimie.* 107 Pt A, 105-113.

Lee, S. J. et al. A newly identified glutaminase-free L-asparaginase (L-ASPG86) from a marine bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;

Nakamura T, Lipton SA. 2016. Protein S-Nitrosylation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 37, 73-84.

Nelson, DL, Lehninger, Michael M, Cox, MM.2008. *Lehninger principles of biochemistry.* Macmillan.

Netto, LES, Antunes, F. 2016. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* 39, 65–71.

Offman, M. N. et al. 2011. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood*, v.117, n.5, p.1614–1621.

Ogusucu R, Rettori D, Munhoz DC, Netto LE, Augusto O. 2007. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxytrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic Biol Med.* 42: 326-34.

Oliveira DG, Toyama MH, Novello JC, Beriam LO, Marangoni S. 2002. Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. J Protein Chem. 21:161-8.

Pan H, Liu XL, Ou-Yang LL, Yang GZ, Zhou YC, Li ZP, Wu XF. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. Toxicon. 1998 Aug;36(8):1155-63.

Patra JK, Mohanta YK. Antimicrobial compounds from mangrove plants: A pharmaceutical prospective. Chin J Integr Med. *In press*.

Picelli CG, Borges RJ, Fernandes CAH, Matioli FM, Fernandes CFC, Sobrinho JC, Holanda RJ, Ozaki LS, Kayano AM, Calderon LA, Fontes MRM, Stábili RG, Soares AM. 2017. Molecular cloning and structural modelling of gamma-phospholipase A2 inhibitors from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus* snakes. Int J Biol Macromol. 103: 525-532.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 63, 1035-1042.

Ramanadham S, Ali T, Ashley JW, Bone RN, Hancock WD, Lei X. 2015. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in biological processes and diseases. J Lipid Res. 56, 1643-68.

Ramrakhiani L, Chand S. Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. Appl Biochem Biotechnol. 2011 164(7):991-1022.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 49, 1603-16.

Ribeiro D, Freitas M, Lima JL, Fernandes E. 2015. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. Med Res Rev. 35, 877-936.

Roberto PG, Kashima S, Soares AM, Chioato L, Faça VM, Fuly AL, Astolfi-Filho S, Pereira JO, França SC. 2004. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. Protein Expr Purif. 37:102-8.

Rodrigues C, Gaeta HH, Belchor MN, Ferreira MJ, Pinho MV, Toyama D, Toyama MH. 2015. Evaluation of Potential Thrombin Inhibitors from the White Mangrove (*Laguncularia racemosa*). Mar Drugs. 13, 4505-419.

Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Chanhom L, Arpijuntarangkoon J, Intragumtornchai T. 2006. Molecular cloning of novel serine proteases and phospholipases A2 from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom gland cDNA library. *Toxicon*. 47: 279-87.

Roth, G. et al. Recombinant *Erwinia carotovora* l-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Braz. J. Chem. Eng.* v.30, n.2, p.245–256, 2013;

Roy I, Gupta M N. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2004) **39**, 165–177 (Printed in Great Britain).

Shi X, Shi Z, Huang H, Zhu H, Zhou P, Zhu H, Ju D. 2014. Ability of recombinant human catalase to suppress inflammation of the murine lung induced by influenza A. *Inflammation*. 37, 809-817.

Shilpi JA, Islam ME, Billah M, Islam KM, Sabrin F, Uddin SJ, Nahar L, Sarker SD. 2012. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic activity of mangrove plants: a mini review. *Adv Pharmacol Sci.* 576086.

Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. 1997. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem.* 272, 27812-27817.

Singh G, Gourinath S, Saravanan K, Sharma S, Bhanumathi S, Betzel Ch, Srinivasan A, Singh TP. 2005. Sequence-induced trimerization of phospholipase A2: structure of a trimeric isoform of PLA2 from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61: 8-13.

Sobotta, MC. *et al.* 2015. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat. Chem. Biol.* 11, 64–70.

Sun GY, Shelat PB, Jensen MB, He Y, Sun AY, Simonyi A. 2010. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med.* 12, 133-48.

Sun, H.N., Kim, S.U., Huang, S.M., Kim, J.M., Park, Y.H., Kim, S.H., Yang, H.Y., Chung, K.J., Lee, T.H., Choi, H.S. 2010. Microglial peroxiredoxin v acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades. *J. Neurochem.* 114, 39-50.

Szabó C, Ischiropoulos, H, Radi R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 662-80.

Tairum CA, Santos MC, Breyer CA, Geyer RR, Nieves CJ, Portillo-Ledesma S, Ferrer-Sueta G, Toledo JC Jr, Toyama MH, Augusto O, Netto LE, de Oliveira MA. 2016. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* 6, 33133.

Tomlinson, P. B., Tomlinson, P. B. 1994. *The botany of mangroves.* Cambridge University Press. Toyama DO, Ferreira MJ, Romoff P, Fávero OA, Gaeta HH, Toyama MH. 2014. Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic Acid) isolated from *Baccharis oxyodonta* on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*. *Biomed Res Int.* 726585.

Tonon E, Ferretti R, Shiratori JH, Santo Neto H, Marques MJ, Minatel E. 2012. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in mdx mice. *Nutrition* 28, 686-690.

Treutter, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 147.

Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. 1993. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J Lipid Mediat.* 8:1-30.

Veal EA, Underwood ZE, Tomalin LE, Morgan BA, Pillay CS. 2018. Hydroxylation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid Redox Signal.* *In press.*

Vishwanath BS, Fawzy AA, Franson RC. 1988. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation.* 6, 549-61

Wijewickrama GT, Kim JH, Kim YJ, Abraham A, Oh Y, Ananthanarayanan B, Kwatia M, Ackerman SJ, Cho W. 2006. Systematic evaluation of transcellular activities of secretory phospholipases A2. High activity of group V phospholipases A2 to induce eicosanoid biosynthesis in neighboring inflammatory cells. *J Biol Chem.* 281: 10935-44.