AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Purificação e caracterização de inibidores de proteases do veneno de Bitis gabonica
rhinoceros com potencial farmacológico**

Tamara Mieco Fucase

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

**São Paulo
2016**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Purificação e caracterização de inibidores de proteases do veneno de Bitis gabonica
rhinoceros com potencial farmacológico**

Tamara Mieco Fucase

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Purificação e caracterização de inibidores de proteases do veneno de *Bitis gabonica rhinoceros* com potencial farmacológico

TAMARA MIECO FUCASE

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2016

Dedico este trabalho à minha família.

Amo muito vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e toda a proteção no decorrer do caminho.

Ao meu orientador e querido amigo Dr. Patrick Jack Spencer pelo apoio e confiança.

Ao meu amigo e ex-colega de trabalho Dr. Vincent Louis Viala sempre me apoiando em todos os experimentos.

Aos amigos e companheiros de bancada Marcela Di Giacomo Messias e Samuel Levindo por todo carinho, ajuda, paciência e confiança

Ao querido amigo Rodolfo Ferreira e minha amiguinha Larissa Miranda por todo apoio e conselhos

À Dra. Máisa Splendore Della Casa e Dra. Nancy Oguiura do Instituto Butantan pelo fornecimento dos anticorpos policlonais

Ao Dr. Daniel Perez Vieira pelo auxílio fornecido para os ensaios de citotoxicidade e análise estatística.

À Dra. Nanci do Nascimento pela ajuda na organização do trabalho e auxílio na submissão do projeto ao Comitê de Ética.

Ao Dr. Daniel Pimenta, Dra. Juliana M. Sciani e Douglas Oscar Ceolin Mariano pelo suporte nas análises por espectrometria de massas e nos ensaios enzimáticos

Ao João Ezequiel de Oliveira (Johnny) e Miriam Fussae pela ajuda nas purificações e fornecimento de reagentes.

À Dra. Olga Zazuco Higa e Dra. Regina Affonso pelo fornecimento de reagentes e por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.

Ao Dr. Ivan Kaiser e Venom Supplies pelo fornecimento do veneno.

Aos funcionários do IPEN, pela manutenção e organização dos laboratórios.

A aluna de iniciação científica Fernanda Mouro por toda a dedicação e auxílio sempre que precisei.

Ao IPEN pelo fornecimento de toda a estrutura necessária.

À CAPES pelo financiamento do projeto

“A virtude, o estudo e a alegria são três irmãos que não devem viver separados.”

(Voltaire)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

Purificação e caracterização de inibidores de proteases do veneno de *Bitis gabonica rhinoceros* com potencial farmacológico

Tamara Mieco Fucase

RESUMO

Os venenos de serpentes são complexas misturas de proteínas e peptídeos que apresentam uma variedade de atividades biológicas. Estudos apontam para uma rica diversidade de moléculas bioativas de baixa massa molecular nos venenos, como a crotamina, miotoxina A, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) inibidores do tipo Kunitz de serinopeptidases e tripeptídeos inibidores de metalopeptidases. O interesse nestas moléculas está relacionado ao potencial uso como agentes terapêuticos contra diversas patologias, como distúrbios da coagulação e modulação da atividade de metalopeptidases, moléculas estas envolvidas com tumorigênese e outros processos patológicos como inflamação crônica e distúrbios neurológicos. O veneno da serpente *Bitis gabonica rhinoceros* provoca alterações fisiopatológicas como severa desordem na coagulação sanguínea e danos teciduais seguidos de necrose. No presente estudo foram isoladas e caracterizadas metalopeptidases e serinopeptidases, além de componentes de baixa massa molecular como inibidor do tipo Kunitz e BPPs. Estes peptídeos foram testados quanto a sua capacidade inibitória frente as peptidases endógenas e sequenciados por espectrometria de massa. Os nossos dados mostram que as peptidases isoladas degradam caseína e não tem atividade sobre colágeno. A serinopeptidase tem atividade β -fibrinogenolítica e o inibidor tipo Kunitz isolado apresenta maior capacidade de inibir a quimotripsina, com valor de $K_i = 0,07 \mu\text{M}$, mostrando-se um promissor substituto ao fármaco aprotinina. Este peptídeo apresentou também atividade citotóxica em células B16F10 e tênue atividade antimicrobiana. Dentre os BPPs identificados, o peptídeo que possui sequência não canônica apresentou a capacidade de potencializar a ação da bradicinina tanto em ensaio edematogênico quanto de inibição da atividade enzimática da enzima conversora de angiotensina. Esses resultados indicam o potencial de peptídeos de venenos animais para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de enfermidades como hipertensão e distúrbios de coagulação.

Purification and characterization of proteases inhibitors of *Bitis gabonica rhinoceros* venom with pharmacological potencial

Tamara Mieco Fucase

ABSTRACT

Snake venoms are complex mixtures of proteins and peptides with a wide array of activities. Some studies point towards a vast diversity of low molecular mass bioactive molecules in venoms such as crotoamine, myotoxin A, bradykinin potentiating peptides (BPPs), Kunitz type serine peptidase inhibitors and tripeptides inhibiting metallopeptidases. The interest on these molecules is related to their potential use as therapeutic drugs against several pathologies such as coagulation disturbs and modulation of the activity of metallopeptidases, involved in tumorigenesis and other disease like chronic inflammation and neurological disorders. The venom of *Bitis gabonica rhinoceros* promotes severe blood clotting disorders and tissular damages followed by necrosis. In the present study we isolated and characterized metallo and serine-peptidases, as well as low molecular mass components such as Kunitz inhibitors and BPPs. Those peptides were assayed for their ability to inhibit the venom endogenous peptidases and were sequenced by mass spectrometry. Our data indicate that the isolated peptidases hydrolyze casein, but not gelatin, indicating that they have no activity on collagen. The isolated serine protease has β -fibrinogenolytic activity and is not inhibited by the endogenous Kunitz peptide isolated from the venom. The Kunitz-like peptide inhibits preferentially chymotrypsin with a K_i of 0.07 μ M and appears as a promising substitute for the commercial drug aprotinin. Among the three bradykinin potentiating peptides, two displayed non-canonical sequences, a fact that might represent an interesting field for new studies for the development of new anti-hypertensives. Although displaying mutations in highly conserved regions, the non-canonical BPP potentialized bradykinin in both edematogenic and angiotensin converting enzyme inhibition assays. These results indicate the potential of animal venom peptides for the development of new drugs against Diseases such as hypertension and coagulopathies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Toxinas de serpentes	10
1.2 Inibidores de peptidase e peptídeos	14
1.3 Uso de toxinas como plataforma para produção de fármacos	19
3. METODOLOGIA	25
3.1 Material	25
3.2 Fracionamento e caracterização parcial do veneno	25
3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular	25
3.2.2 Cromatografia de afinidade	25
3.2.3 Cromatografia de troca iônica	25
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis)	26
3.4 Zimografia	26
3.5 Ensaio fibrinogenolítico	27
3.6 Análise peptídica por espectrometria de massas tipo electrospray	27
3.7 Sequenciamento químico (Edman)	27
3.8 Análise por MALDI/ ToF da massa molecular do inibidor tipo Kunitz	27
3.9 Determinação da constante de inibição (K_i) do BPP por afinidade do substrato a enzima	28
3.10 Determinação da constante de inibição (K_i) do inibidor tipo Kunitz por afinidade do substrato a enzima	29
3.11 Western Blot	29
3.12 Cultivo de células B16F10	30
3.13 Citotoxicidade e atividade proliferativa	30
3.14 Detecção de toxinas crotamina-símile por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	31
3.15 Avaliação preliminar da atividade antibacteriana	31
3.16 Ensaio edematogênico em ratos Wistar	32
3.17 Análise de atividade hidrolítica por FITC-caseína	32
3.18 Proteômica <i>in gel</i> e análise por espectrometria de massas	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Fracionamento e caracterização das proteínas	34
4.1.1 Primeira etapa do fracionamento do veneno bruto de <i>Bitis gabonica rhinoceros</i>	34

4.1.2 Identificação de metalopeptidases por Western Blot	35
4.1.3 Análise da atividade gelatinolítica	36
4.1.4. Atividade Fitc-caseína	36
4.1.5 Análise da atividade caseinolítica	37
4.1.6 Segunda etapa de fracionamento em coluna de afinidade a metal.....	39
4.1.7 Atividade fibrinogenolítica	41
4.1.8 Análise de peptidase através de digestão <i>in gel</i> , seguida de LC/MS/MS	42
4.2 Identificação de inibidores de peptidase e oligopeptídeos	43
4.2.1 Sequenciamento N-terminal	43
4.2.2 Determinação da massa molecular do inibidor tipo Kunitz por MALDI-ToF .	44
4.2.3 Purificação do inibidor tipo Kunitz	45
4.2.4 Atividade fibrinogenolítica na presença de inibidor Kunitz	46
4.2.5 Determinação da constante de inibição (ki) por fluorescência	47
4.2.6 Ensaio de viabilidade celular em células tumorais com inibidor tipo Kunitz e moléculas de baixa massa.	48
4.2.7 Análise por espectrometria de massas (<i>electrospray</i>) dos peptídeos	50
4.2.8 Atividade edematogênica do peptídeo	52
4.2.9 Identificação de β defensinas por ELISA	53
4.2.10 Avaliação preliminar da atividade antibacteriana	54
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1 Identificação e caracterização parcial das peptidases	56
5.2 Identificação e caracterização parcial dos peptídeos e inibidores de peptidases	62
6. CONCLUSÃO	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Modelo da estrutura 3D da bitisilin-2 (BPTI/Kunitz)	15
Figura 2-	Distribuição geográfica de serpentes do gênero <i>Bitis</i> no continente africano	21
Figura 3-	Exemplar da espécie <i>Bitis gabonica rhinoceros</i>	22
Figura 4-	Composição proteica do veneno de <i>Bitis gabonica rhinoceros</i>	23
Figura 5-	Fracionamento do veneno bruto em coluna de exclusão molecular	34
Figura 6-	Gel SDS Page 15% das frações coletadas durante a cromatografia de exclusão molecular	35
Figura 7-	Western Blot das frações coletadas durante a cromatografia de exclusão molecular	36
Figura 8-	Gráfico de atividade caseinolítica	37
Figura 9-	Zimografia em gel com caseína	37
Figura 10-	Zimografia em gel com caseína na presença de inibidores	38
Figura 11-	Fracionamento do pico IA (gel filtração) em coluna de afinidade a metal	39
Figura 12-	Fracionamento do pico IB (gel filtração) em coluna de afinidade a metal	40
Figura 13-	Gel SDS PAGE 15% das frações coletadas na etapa de fracionamento de afinidade	41
Figura 14	Gel SDS Page 15% de atividade fibrinogenolítica do pico 3A	41
Figura 15-	Gel SDS Page 15% de atividade fibrinogenolítica do pico 3B	42
Figura 16-	Espectros MS ² de m/z= 473,25 com sequências e gráficos de distribuição de erros	43
Figura 17-	Análise comparativa do sequenciamento N-terminal de inibidores de serinopeptidases	44
Figura 18-	Espectro de massas do pico V por MALDI-ToF	45
Figura 19-	Purificação do inibidor tipo Kunitz	46
Figura 20-	Atividade fibrinogenolítica de serinopeptidase incubada com inibidor	47

Figura 21-	Gráfico de viabilidade celular com inibidor tipo Kunitz	49
Figura 22-	Gráfico de viabilidade celular com pico XII	49
Figura 23-	Fracionamento do pico VIII coletado em coluna de exclusão molecular em RP/HPLC	50
Figura 24-	Espectro de MS ² com m/z = 644.30	51
Figura 25-	Espectro de MS ² com m/z=598.77	51
Figura 26-	Espectro de MS ² com m/z= 591,76	51
Figura 27-	Alinhamento da sequência do BPP obtida por espectrometria de massas	52
Figura 28-	Gráfico de atividade edematogênica obtido por pletismografia	53
Figura 29-	Ensaio de Elisa com veneno bruto de <i>B.gabonica rhinoceros</i>	54
Figura 30-	Ensaio de determinação de atividade antimicrobiana	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Inibidores seletivos dos C e N- domínios para a ACE	17
Tabela 2	Drogas aprovadas derivadas de proteínas de veneno	20
Tabela 3	Parâmetros cinéticos das diferentes serinopeptidases e metalopeptidase	48
Tabela 4	Sequências peptídicas obtidas para as frações de fase reversa e suas m/z	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Abz- FRK (Dnp)-P-OH Aminobenzoic acid-Phe-Arg-Lys (Dinitrophenil)-Pro-OH
 Abz- GIVRAK-Dnp Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys (Dinitrophenil)-OH
 N-Succinyl-AAPF-MCA N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide 7-amido-4-methyl coumarin
 ACE Angiotensin Converting Enzyme
 ACN Acetonitrile
 BPP Bradykinin Potentiating Peptide
 CID Collision Induced Dissociation
 CRISP Cysteine-rich secretory proteins
 EDTA Ethylenediamine tetra-acetic acid
 ESI Eletrospray Ionization
 FITC Fluorescein isothiocyanate
 HPLC High Performance Liquid Chromatography
 IT-ToF Ion Trap- Time of Flight
 LAAOs L-aminoacid oxidase
 MALDI-ToF Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight
 MS Mass spectrometry
 NCBI National Center for Biotechnology Information
 NP Natriuretic Peptide
 PAGE Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 PBS Phosphate Buffer Saline
 PBST Phosphate Buffer Saline with Tween 20
 PLA₂ Phospholipase A₂
 PMSF Phenylmethane sulfonyl fluoride
 SDS Sodium Dodecyl Sulphate
 SEC Size Exclusion Chromatography
 SVMP Snake Venom Metallopeptidase
 SVSP Snake Venom Serine Peptidase
 TFA Trifluoroacetic acid
 TRIS (hydroxymethyl) aminomethane

NOMENCLATURA PARA AMINOÁCIDOS

A Ala Alanine
R Arg Arginine
N Asn Asparagine
D Asp Aspartate
C Cys Cysteine
E Glu Glutamate
Q Gln Glutamine
G Gly Glycine
H His Histidine
I Ile Isoleucine
L Leu Leucine
K Lys Lysine
M Met Methionine
F Phe Phenylalanine
P Pro Proline
S Ser Serine
T Thr Threonine
W Trp Tryptophan
Y Tyr Tyrosine
V Val Valine
Z Pyr Pyroglutamate

1. INTRODUÇÃO

1.1 Toxinas de serpentes

Os venenos de serpentes são os fluidos secretórios mais concentrados que se conhece (Stocker, 1991). São constituídos de uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas que apresentam diferentes estruturas e atividades e causam uma variedade de efeitos biológicos (Porto, *et.al.*, 2007). Dentre os componentes orgânicos podemos citar: aminoácidos livres, carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios, e aminas biogênicas, além de peptídeos e proteínas (Rajendra, *et.al.*, 2004).

Dentre os componentes inorgânicos, são encontrados o ferro, cobre, cálcio, manganês, magnésio, entre outros. Algumas destas moléculas como o zinco, podem exercer uma função de atuar em domínios catalíticos de enzimas como as metalopeptidases (Bjarnason & Fox, 2004).

Cerca de 90% a 95% do peso seco do veneno são constituídos de proteínas e peptídeos que são biologicamente ativos, com elevado potencial terapêutico (Markland, 1998; Bennacef-Heffar & Laraba-Djebari, 2003).

Uma boa parte dos compostos destes venenos mimetiza estrutura e funcionalmente moléculas endógenas da presa envolvidas na homeostase escapando, porém aos mecanismos de regulação que modulam estas atividades, levando assim a exarcebação de processos fisiológicos normalmente benéficos. Assim, o envenenamento pode ser considerado um distúrbio agudo dos mecanismos de regulação da homeostase, levando a um colapso das funções fisiológicas que resulta em morte da presa ou efeitos severos em acidentados.

Os venenos de viperídeos são constituídos de variados componentes, que podem ser agrupados em famílias de proteínas, incluindo enzimas como fosfolipases A₂ (PLA₂), serinopeptidases (SVSP), metalopeptidases (SVMP), l-aminoácido-oxidases (LAAOs), nucleotidases e hialuronidases assim como proteínas não enzimáticas como disintegrinas, lectinas tipo C, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento endotelial e neuronal, cistatinas e inibidores de peptidase do tipo Kunitz (Fry, 2005 e Calvete, 2007).

As fosfolipases A₂ são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídios e ácidos

graxos (araquidônico). O íon Ca^{2+} é essencial como cofator e o resíduo de ácido aspártico na posição 49 é necessário para que ocorra a catálise. Sua atividade catalítica sobre a membrana celular em tecidos específicos sugerem um importante papel dessas enzimas na toxicidade do veneno (Samy, *et.al.*, 2012).

Estas proteínas são encontradas em vários tecidos de diferentes animais como mamíferos, serpentes, escorpiões e abelhas. Com base na sua origem, atividade catalítica, sequência de aminoácidos, comprimento da cadeia e os padrões de ligação dissulfeto, elas são divididas em 16 grupos (Murakami, *et.al.* 2006), sendo que 10 grupos são PLA_2 secretadas (sPLA_2) (Schaloske & Dennis, 2006; Burk & Dennis, 2009).

As fosfolipases secretadas são proteínas de baixa massa molecular (13 a 15 kDa), que apresentam uma grande variedade de efeitos, além de auxiliar na digestão da presa, como anticoagulante, miotóxico, inibição de agregação plaquetária, neurotóxico e edema (Kini, 2005). Somente dois grupos foram identificados em serpentes (GI e GII). No GI, estão incluídas as svPLA_2 (snake venom phospholipase A_2) de Elapinae e de Hydrophiinae com 115 a 120 aminoácidos, que são homólogos as PLA_2 GIB do pâncreas de mamíferos. Os grupos GIIA e GIIB com 120 a 125 aminoácidos, compreendem as svPLA_2 de Crotalinae e Viperinae (Burk & Dennis, 2009). As enzimas pertencentes ao grupo IIA, apresentam semelhanças moleculares e estruturais com as fosfolipases encontradas em exsudatos inflamatórios de mamíferos (Schaloske & Dennis, 2006). Assim, essas similaridades podem ser utilizadas como uma ferramenta farmacológica importante para o entendimento da função dessas enzimas em doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide, asma e aterosclerose.

As serinopeptidases hidrolisam a ligação peptídica e apresentam papel importante em diversos processos biológicos como digestão e controle e regulação da coagulação sanguínea, sistema imune e inflamação (Neurath, 1984; Kang, *et.al.*, 2011). Essas substâncias provavelmente evoluíram a partir de enzimas digestivas que sofreram duplicação gênica que levaram variabilidade de funções e especificidades ao substrato (Birktoft & Blow, 1972; Kang, *et.al.*, 2011). Elas são agrupadas em seis clãs e subdivididas em famílias baseadas na sequência e similaridades funcionais (MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk>).

As SVSP (Snake Venom Serine Peptidases) são exclusivas do clã SA e pertencentes a família S1, sendo responsáveis por promover alterações na cascata da coagulação sanguínea e sistema fibrino(geno)lítico. Apesar de apresentarem sequências muito similares (50-70%), as SVSP exibem alta especificidade em distintos substratos (Murakami & Arni, 2005), atuando no sistema fibrino(geno)lítico, exibindo atividade pró e/ou anticoagulante e podem também promover a agregação plaquetária.

Estas peptidases com massa molecular entre 25 kDa e 35 kDa, apresentam uma tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195), posicionados na junção entre duas estruturas secundárias do tipo beta-barril e catalisar a hidrólise de ligações peptídicas. Por exemplo, peptidases semelhantes à tripsina, que hidrolisam ligações peptídicas de aminoácidos básicos como arginina (Arg) e lisina (Lis) e atuam promovendo diversos efeitos fisiológicos como, alterações no sistema hemostático (Rawlings & Barrett, 1994).

Algumas SVSP são conhecidas como trombina-símile, pela capacidade de tornar o sangue incoagulável devido a depleção dos estoques de fibrinogênio (Bortoleto, *et.al.*, 2002). Na última década, essas enzimas tem sido estudadas devido ao seu potencial terapêutico. Por exemplo, o Ancrod e Batroxobin (Reptilase) que são utilizados para o tratamento de doenças cardiovasculares (Marsh, 1998).

As metalopeptidases de veneno de serpentes (SVMP- Snake Venom Metallopeptidase) são hidrolases do tipo endopeptidases pertencentes à família M12 da superfamília das metzincinas, que possui o motivo “Met-turn” constituído por aminoácidos conservados HEXXHGXH e são subdivididas em três classes: PI, PII e PIII. As toxinas do tipo PI consistem em proteínas que apresentam somente o domínio metalopeptidase e geralmente apresentam pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. As PII possuem os domínios metalopeptidase e disintegrina na porção C-terminal e são subdivididas em PII, PIIa e PIIb de acordo com as modificações pós translacionais e formação de proteínas diméricas (Fox & Serrano, 2008). A classe PIII, apresenta o domínio disintegrina e rico em cisteína, sendo consideradas as mais hemorrágicas e são subdivididas em PIIIa a PIIIc, sendo que a PIIIc possui o domínio lectina tipo C na porção C-terminal, ligado através de uma ponte dissulfeto ao domínio rico em cisteína (Bjarnason & Fox,

1994) que atua em receptores de adesão plaquetária e glicoproteínas. O domínio metalopeptidase apresenta uma sequência de aminoácidos conservados HEXXHGXH e no sítio ativo um íon Zn^{2+} ligado, que ativa uma molécula de água e age como um nucleófilo ao atacar a carbonila peptídica. (Berg, *et.al.*, 2004; Escalante & Serrano, 2005,). Seus efeitos tóxicos estão associados a distúrbios hemostáticos, incoagulabilidade pela interferência na cascata de coagulação e hemorragia local e sistêmica através de danos vasculares e trombose (Escalante *et.al.*, 2011).

A maioria das PI são produtos de genes do tipo PIII que apresentam um códon de parada ao final da região do transcrito, que representa o domínio metalopeptidase traduzido. Portanto, a diferença entre os RNA mensageiros de PI e PIII não é a ausência da sequência que codifica a disintegrina, mas sim a presença de um códon de parada entre os domínios. As SVMP são sintetizadas a partir de zimógenos, que são constituídos de um peptídeo sinal e um pró-domínio. A ativação enzimática é mediada pela interação da sulfidril da cisteína, localizada no pró-domínio e o íon zinco presente no domínio catalítico (Howard, *et.al.*, 1996).

As L-aminoácido-oxidases (LAOs) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa específica de L-aminoácidos em α - cetoácidos com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. Esta enzima exibe uma preferência por aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos como a fenilalanina (Phe) e leucina (Leu) (Kang, 2011).

Vários estudos indicam que as LAOs contribuem para a toxicidade do veneno. Entretanto, não existe um consenso sobre o papel desta proteína e seu mecanismo de ação. Alguns sugerem que a enzima inibe a agregação plaquetária (Takatsuka, *et.al.*, 2001). Outros reportam que a agregação plaquetária é induzida pela enzima e que o efeito antibacteriano é causado pela produção de H_2O_2 (Li *et.al.*, 1994; Ianzer, *et.al.*, 2004).

Na glândula de veneno, as toxinas permanecem armazenadas durante vários meses e existem mecanismos endógenos que protegem os tecidos glandulares da ação auto-proteolítica (Odell, *et.al.*, 1998). Fatores físico-químicos como pH, força iônica e concentração de pequenas moléculas como o citrato (Odell *et.al.*, 1998), secreção de enzimas inativas na forma de precursores

zimógenos e a expressão de peptídeos endógenos como inibidores específicos de enzimas presentes no veneno estão certamente envolvidos no processo (Wagstaff, *et.al.*, 2007).

As SVMP são altamente ativas contra os diferentes tecidos da presa ou vítima, sem interferir nos componentes teciduais próprios. Sousa e colaboradores em 2001, demonstraram um mecanismo de inibição frente as SVMP quando na glândula, que é inativado quando ocorre a liberação do veneno.

1.2 Inibidores de peptidase e peptídeos

Além de enzimas, o veneno apresenta componentes não enzimáticos que apresentam baixa massa molecular como as neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas, inibidores de peptidase e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (Kini, 1990).

Os inibidores de peptidase são agrupados inicialmente como inibidores reversíveis e irreversíveis. Rawling *et.al.*, 2004, descreveram um método de classificação de inibidores de peptidase em 48 famílias baseando-se na similaridade entre as sequências de aminoácidos. Alguns inibidores de peptidase como os polipeptídeos aprotinina e ulinastatina, são utilizados atualmente como fármacos, apresentando ação anti-hemorrágica (Guo, *et.al.*, 2013).

Alguns autores consideram que tripeptídeos piroglutâmicos são responsáveis pela inibição de SVMP na glândula de veneno (Robeva, *et.al.*, 1991; Gomis-Ruth, *et.al.*, 1998). Esses peptídeos atuam basicamente por competir com o substrato pelo sítio catalítico da enzima, impedindo a hidrólise. Esse mecanismo pode ser dependente da conformação da enzima, o tripeptídeo <EKW perde significativamente a habilidade de inibir a atividade da metalopeptidases como a bothropasin em presença de 1 mM CaCl₂ (Marques-Porto, *et.al.*, 2008). Os mesmos autores, demonstraram haver três mecanismos inibitórios presentes no veneno de *B. jararaca* capazes de abolir de maneira tênue o funcionamento das SVMP como: a ação quelante de citrato de cálcio, pH ácido e inibição competitiva pelo tripeptídeo piroglutamato-lisil-triptofano. Porém, esses fatores quando atuam de maneira sinérgica, tornam-se inibidores mais potentes capazes de agir contra o veneno bruto e a metalopeptidase purificada. Entretanto, essa inibição é totalmente revertida em solução com pH ótimo como o sangue.

Muitos inibidores de serino peptidases foram isolados de serpentes Viperidae e Elapidae. Alguns deles, são homólogos aos inibidores tipo Kunitz, originados de inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI), cuja estrutura é composta por dobramentos conservados em sua estrutura com aproximadamente 60 aminoácidos, estabilizados por três pontes dissulfeto, como indicado na figura 1. Esta conformação determina a capacidade de inibir uma ou mais serinopeptidases como a tripsina, quimotripsina, elastase, trombina e ativador de fator X (Earl, *et.al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013; Mourao & Schwartz, 2013; Mukherjee *et. al.*, 2014).

Figura 1: modelo da estrutura tridimensional da bitisilin-2 (BPTI/Kunitz) encontrado no veneno de *Bitis gabonica*. A: estrutura tridimensional completa. B: estrutura tridimensional destacando as pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína. Rosa: 56-77; Azul: 40-64 e verde: 31-81. Extraído de Protein Model Portal.

Estes inibidores Kunitz/BPTI são moléculas ubíquas, presentes em uma variedade de microorganismos, plantas e tecidos animais, onde exibem uma variedade de funções biológicas, como o bloqueio de canais iônicos, alterações na coagulação sanguínea, inflamação e fibrinólise (Mukherjee *et. al.*, 2014). Além disso, o veneno pode conter alguns inibidores de serino peptidase associados a complexos proteicos de maneira não-covalente (Mukherjee, *et. al.*, 2014).

Assim, baseando-se nas suas funções, os inibidores tipo Kunitz de serpentes podem ser divididos em dois grupos: Inibidores de Tripsina (Ti) e Quimotripsina (Chi), que são referidas como não-neurotóxicas, e os seus

homólogos, com atividade neurotóxica, se incluem no grupo Kunitz/BPTI neurotóxico (Cardle & Dufton, 1997).

A textilina-1, inibidor de serinopeptidase do tipo Kunitz, isolada do veneno de *Pseudonaja textilis textilis*, indicou ser um seletivo e potente inibidor de plasmina. Ensaio *in vivo* e *in vitro*, mostraram que esta molécula foi igualmente efetiva e mais segura que a aprotinina, indicando ser um forte candidato a substituto deste fármaco como um agente antifibrinolítico (Earl, *et.al.*, 2012).

Os Kunitz/ BPTI neurotóxicos, como as dendrotoxinas e calcicludina são conhecidas por bloquear canais de Ca^{2+} ou K^+ (Gilquin, *et.al.*, 1999). Além disso, esses inibidores podem ser encontrados ligados de maneira covalente a PLA_2 , como no caso das β -bungarotoxinas, cuja toxicidade é caracterizada pelo bloqueio neuronal, obtida pela ação lipolítica da fosfolipase, direcionada para a membrana pré-sináptica pelo domínio do inibidor tipo Kunitz (Kwong, *et.al.*, 1995).

Em 1965, Sérgio Ferreira, observou a presença de peptídeos que alteravam significativamente a contração da musculatura lisa induzida por bradicinina. Estes peptídeos nomeados peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) reprimem a degradação do peptídeo hipotensor e a formação de Angiotensina II, pela inibição da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ACE), promovendo a redução da pressão sanguínea, afetando tanto o sistema Renina-Angiotensina, como o sistema Calicreína-Cininas.

Em 1970, Ferreira *et.al.*, identificaram a estrutura primária do primeiro BPP descrito, sendo a molécula Bj-BPP-5a, de sequência (<EKWAP).

Os BPPs são considerados os inibidores da ACE e são constituídos estruturalmente por 5 a 14 resíduos de aminoácidos, com o resíduo de Piroglutamato na região N-terminal e um resíduo de Prolina no C-terminal. A maioria dos peptídeos apresentam aspectos semelhantes que incluem muitos resíduos de prolina e o tripeptídeo Ile-Pro-Pro no C-terminal (lanzer, *et.al.*, 2004; Gomes *et.al.*, 2007).

A ACE preferencialmente se liga a substratos que apresentam resíduos hidrofóbicos como os aromáticos ou de cadeia ramificada no tripeptídeo C-terminal (Cheung, *et.al.*, 1980). A relação existente entre a estrutura e a atividade dos diferentes peptídeos inibidores da ACE indica que a ligação dessa enzima é predominantemente influenciada pela sequência do tripeptídeo C-terminal do

substrato e/ou inibidor, interagindo com os subsítios S1, S1' e S2' do sítio ativo da enzima (Pan, *et.al.*, 2011).

Devido a sua capacidade de promover a redução da pressão arterial, esses peptídeos são considerados possíveis agentes terapêuticos para o tratamento da hipertensão (Ferreira, *et.al.*, 1998).

Os BPPs são encontrados em diferentes espécies de serpentes como a *Bothrops jararaca* (Ferreira, *et.al.*, 1994; Ianzer, *et.al.*, 2004), *Agkistrodon* (Murayama, *et.al.*, 2000; Munawar, *et.al.*, 2016), *Lachesis* (Soares, *et.al.*, 2005), *Naja* (El Saadani & El Sayed, 2003), *Crotalus* (Higuchi, *et.al.*, 2006) e *Bitis* (Calvete, *et.al.*, 2007). Além disso, alguns BPPs são mais seletivos para C-domínio do que para o N-domínio da ACE, como destacado na tabela 1.

Tabela 1: Inibidores seletivos dos C e N- domínios para a ACE

Inhibitor	Inhibitor residues*	Domain inhibition (nM) [†]	
	P ₂ P ₁ P ₁ ' P ₂ '	N-domain	C-domain
BPPa	-Gln-Ile-Pro-Pro	100.0	1.0
BPP-10c	-Gln-Ile-Pro-Pro	200.0	0.5
BPPb	-Lys-Ile-Pro-Pro	10,000.0	30.0
BPPc	-Pro-Ile-Pro-Pro	80.0	80.0
BPP-12b	-Pro-Ile-Pro-Pro	5.0	150.0
Ang ₁₋₇	-Tyr-Ile-His-Pro	3,400.0	130.0
Comp. II	Ac-Asp-Phe-Ala-Ala	2.0	7.0
RXP407	Ac-Asp-Phe-Ala-Ala-NH ₂	2.0	2,500.0
Comp. IV	Ac-Ala-Phe-Ala-Ala-NH ₂	5.0	200.0
RXPA380	Phe-Phe-Pro-Trp	10,000.0	3.0
Captopril	Ala-Pro	8.9	14.0
Enalaprilat	Phe-Ala-Pro	26.0	6.3
Lisinopril	Phe-Lys-Pro	44.0	2.4
Keto-ACE	Bnz-Phe-Gly-Pro	1,500.0	40.0
Trandolapril	Phe-Ala-Trp	3.1	0.3

Adaptado de Acharya *et.al.*, 2003

Atualmente, o estudo de peptídeos de veneno é considerado uma área de grande interesse, pois estes apresentam alta estabilidade e são resistentes à degradação promovida por peptidases e são moléculas pouco imunogênicas. A estabilidade de alguns peptídeos é resultado da formação de pontes dissulfeto e modificações pós-traducionais (Pimenta & de Lima, 2005).

Uma família bastante descrita na literatura é a das β -defensinas, comumente conhecida por sua atividade antimicrobiana. A maioria dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) apresentam três, quatro ou cinco pontes dissulfeto, que conferem alta estabilidade e rigidez estrutural a molécula. A β -defensina é um desses peptídeos cisteína-estabilizados, que consiste de uma pequena alfa-hélice e três folhas beta posicionadas de maneira anti-paralelas. São moléculas pequenas, catiônicas, compostas por pontes dissulfeto pareados nos aminoácidos 1-5, 2-4 e 3-6 (Nicastro, *et.al.*, 2003). Esses peptídeos são expressos em diferentes tecidos e órgãos envolvidos na defesa do indivíduo contra microorganismos invasores e estão presentes em diferentes organismos como anêmonas do mar, serpentes e mamíferos. Membros dessa família apresentam além da atividade antimicrobiana, atividades farmacológicas diversas como analgésico e inibidor de canal iônico (Torres & Kuchel, 2004; Taylor, *et.al.*, 2008).

Na literatura, são encontrados vários trabalhos que descrevem a presença de β -defensinas símile em diferentes organismos como no lagarto *Anolis carolinensis* (Dalla Valle, *et.al.*, 2012) em anêmonas do mar (Torres & Kuchel, 2004), e lagartos *Pogona barbata* (Fry, *et.al.*, 2006), assim como em serpentes (Rádis-Baptista, *et.al.*, 2003; Correia & Oguiura, 2013).

Um outro grupo de AMPs que podemos destacar são as catalecidinas, que são caracterizadas por possuírem um domínio catalina com 98 a 114 resíduos de aminoácidos, em sua forma inativa (Zanetti, *et.al.*, 1995). As moléculas pertencentes a essa família são encontradas em diferentes grupos de vertebrados e assim como as defensinas apresentam propriedades microbicidas contra bactérias Gram-positivas, Gram- negativas, vírus e fungos. As catalecidinas são constituídos por aproximadamente 23 a 37 resíduos de aminoácidos lineares, que se dobram em α -hélices anfipáticas quando estão próximos a ambientes que mimetizam membranas biológicas (Zanetti, 2004).

O interesse nos peptídeos de venenos está relacionado ao potencial uso como agentes terapêuticos contra diversas patologias, como distúrbios da coagulação e modulação da atividade de metalopeptidases, moléculas estas envolvidas com tumorigenêse e outros processos patológicos como inflamação crônica, infecções e distúrbios neurológicos.

1.3 Uso de toxinas como plataforma para produção de fármacos

A indústria farmacêutica no decorrer dos últimos 60 anos já entregou mais de 1200 drogas, desempenhando um papel fundamental no aumento da expectativa de vida de pacientes. A diversidade de biomoléculas lapidadas pela evolução constitui uma imensa fonte de fármacos, muito mais rica do que aquela obtida com moléculas sintéticas (Koehn & Carter, 2005).

Venenos animais possuem uma longa história nos tratamentos para diferentes enfermidades. Toxinas de serpentes são usadas desde a medicina Ayurvédica há cerca de 7 mil anos, como medicamento para prolongar a vida e tratar doenças gastrointestinais e artrite (Gomes, *et.al.*, 2010). Secreções da pele de sapo (Chan Su) são utilizadas na tradicional medicina chinesa a mais de 1000 anos como diurético, anestésico e agente antitumoral (Meng, *et.al.*, 2009). O veneno de *Naja* é usado desde os anos 30 para o tratamento de asma, poliomielite, esclerose múltipla, reumatismo, dor severa e nevralgia do trigêmeo (Reid, 2007). No entanto, a descoberta de drogas modernas baseadas em venenos se iniciou no ano de 1970, com o desenvolvimento do agente hipertensivo Captopril, usado como um inibidor da ACE, desenvolvido a partir do veneno de *Bothrops jararaca* (Cushman & Ondetti, 1991; Opie & Kowolik, 1995).

Apesar do desenvolvimento do Captopril ser um destaque como um fármaco promissor, o foco para a produção de novas drogas com base em venenos animais manteve-se relativamente estagnado até a última década por várias razões: Primeiro, ao contrário dos microorganismos, muitos venenos de animais são de difícil obtenção. Segundo, muitos dos animais, incluindo principalmente os invertebrados, são pequenos e fornecem uma quantidade muito pequena de toxina. Terceiro, as técnicas utilizadas para a caracterização dos componentes do veneno até os anos 90 eram consideradas relativamente primitivas e conseqüentemente a vasta diversidade química e farmacológica destas secreções foi pouco explorada. Felizmente, recentes avanços tecnológicos que facilitam o rastreamento de toxinas baseada na caracterização estrutural e funcional vem ocorrendo de uma maneira acelerada, permitindo o desenvolvimento de diferentes drogas a partir de venenos ou toxinas (King, 2011).

O desenvolvimento de uma variedade de drogas derivada de toxinas foi bem sucedido para o tratamento de diversas fisiopatologias, incluindo diabetes e

hipertensão. Assim, o potencial uso do veneno como uma fonte terapêutica continua a ser amplamente explorado. Com o advento de técnicas avançadas em combinação com uma indústria cujo foco são produtos naturais, os estudos têm convergido de maneira significativa a fim de favorecer o uso desses componentes derivados de veneno como ferramentas terapêuticas, na tabela 2 são listados alguns fármacos derivados de toxinas de serpentes já comercializados pela indústria farmacêutica.

Tabela 2: Drogas aprovadas derivadas de proteínas de veneno

Proteína ou derivado	Origem	Alvo molecular	Via de administração	Indicação	Aprovação FDA	Companhia	Ref.
Captopril (Capoten®)	<i>Bothrops jararaca</i>	ACE	Oral	Hipertensão	1981	Bristol - Myers Squibb	Cushman, <i>et.al.</i> , 1991
Epitífibatide (Integrilin®)	<i>Sistrurus mliarius barbouri</i>	Receptor de Integrina $\alpha IIb\beta 3$	Parenteral	Síndrome Coronariana aguda	1998	Merck	O'Shea <i>et.al.</i> , 2001
Tirofiban (Aggrastat®)	<i>Echis carinatus</i>	Receptor de Integrina $\alpha IIb\beta 3$	Parenteral	Síndrome Coronariana aguda	1999	Iroko Cardio and Merck	Menozi, <i>et.al.</i> , 2005
Exenatide (Byetta®)	<i>Heloderma suspectum</i> (Monstro de Gila)	Receptor GLP-1	Parenteral	Diabetes tipo 2	2005	Amylin and Eli Lilly	Barnett, <i>et.al.</i> , 2010
Batroxobin ou Reptilase (Baquiting)	<i>Bothrops atrox</i>	Fibrinogênio	Parenteral	Pré-operatório (anti-coagulante)	Usado clinicamente fora dos EUA	Nuokang Byofarma	Zhang, <i>et.al.</i> , 2011

Adaptado de King, 2011

1.4 Aspectos biológicos da serpente *Bitis gabonica rhinoceros*

O gênero *Bitis* compreende 16 espécies reconhecidas e distribuídas nos territórios da África e Arábia Saudita. Essas serpentes diferem com relação ao fenótipo e composição do veneno (Calvete *et.al.*, 2007; Currier, *et.al.*, 2010).

Figura 3: Exemplar da espécie *Bitis gabonica rhinoceros*

Na região da África Subsaariana, estima-se que aproximadamente 300.000 acidentes ofídicos ocorram por ano. Dentre esses, 32.000 resultam em óbitos. A maioria das vítimas acabam sofrendo com sequelas como lesões locais e incapacidades permanentes, sendo que a maioria desses acidentes são causados por serpentes do gênero *Bitis* (Kasturiratne, *et.al.*, 2008).

O envenenamento por *Bitis* geralmente resulta em dano local severo, hipotensão, coagulopatia, trombocitopenia e hemorragias locais, sendo que a ausência de um tratamento correto pode ser fatal (Lavonas, *et.al.*, 2002). Entretanto, as propriedades bioquímicas do veneno de *Bitis* e os mecanismos envolvidos na patologia ainda são pouco compreendidos.

Estudos funcionais demonstraram que o veneno de *Bitis* contém metalopeptidases que degradam colágeno e fibrinogênio (Currier, *et.al.*, 2010), serinopeptidases que clivam cininogênio liberando cininas ou lisil-bradicininas (Nikai, *et.al.*, 1993), lectinas que induzem a liberação de cálcio (Ohkura, *et.al.*, 1996), adenosinas que induzem a degranulação por mastócitos (Graham, 2005), fosfolipases A2 (Bitanarin) que reversivelmente bloqueiam receptores nicotínicos de acetilcolina (Vulfius, *et.al.*, 2011), peptídeos que contêm Arg-Gly-Asp que interferem na agregação plaquetária como a Arietina e Gabonina (Huang, *et.al.*, 1991), lectinas tipo C que se ligam ao fator de von Willebrand que interfere na cascata de coagulação, como a Bitiscetina (Maita, *et.al.*, 2003).

Em 2007, Calvete e colaboradores relataram a presença de 33 toxinas no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*, descritas como disintegrinas diméricas, PLA₂, serinopeptidases, CRISP, Lectinas tipo-C, LAAOs e metalopeptidases, como indicado na figura 4. Entretanto, no que se refere aos peptídeos ativos, é um veneno pouco estudado.

Figura 4: Composição proteica do veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*, adaptado de Calvete e cols, 2007. SVMP: Metalopeptidase; SP: Serino peptidase; CTL: Lectina tipo C símile; DISI: Disintegrina; Kunitz: inibidor tipo Kunitz de serino peptidase; Cystatin: Inibidor de cisteíno peptidase; PLA₂: Fosfolipase A₂; LAO: L-aminoácido-oxidase; CRISP: proteína secretada rica em cisteína; DC: Fragmento de disintegrina-símile e rico em cisteína derivado de PIII-SVMP e BPP: Peptídeo potencializador de Bradicinina.

A análise peptidômica do veneno de serpentes pode auxiliar no desenvolvimento de diferentes metodologias que, por exemplo, otimizam a produção de soro e com o uso de métodos mais sofisticados e abordagens diferenciadas, pode-se compreender melhor os aspectos biológicos e diferentes mecanismos envolvidos no envenenamento, além de fornecer ferramentas úteis para o produção de novos fármacos.

2. OBJETIVO

Isolar e caracterizar inibidores de peptidase e peptídeos com potencial farmacológico de veneno de serpente *Bitis gabonica rhinoceros*.

2.1 Objetivos específicos

- Isolar por cromatografia e identificar por espectrometria de massas peptídeos e peptidases do veneno.
- Caracterizar as diferentes atividades biológicas dos peptídeos.
- Analisar os peptídeos quanto a sua capacidade inibitória frente à serino e metalopeptidases.
- Caracterizar os peptídeos mais promissores quanto à cinética e mecanismos de inibição.

3. METODOLOGIA

3.1 Material

O veneno utilizado neste trabalho faz parte do estoque de venenos do Centro de Biotecnologia e foi fornecido pela empresa Venom Supplies (Austrália).

3.2 Fracionamento e caracterização parcial do veneno

3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular baseia-se na separação das moléculas a partir de seu tamanho, sendo eluídas em condições isocráticas. O fracionamento do veneno foi realizado em tampão Bicarbonato de Amônio 100 mM, pH 7,8 e após centrifugação, o sobrenadante límpido foi injetado em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE), previamente ambientada no mesmo tampão e acoplada a um sistema Äkta purifier (GE). A eluição das proteínas foi realizada com fluxo de 0,6 mL/min. A absorvância do eluato foi medida em 220 nm e 280 nm.

3.2.2 Cromatografia de afinidade

Na cromatografia de afinidade são utilizadas resinas que apresentam características específicas como afinidade pela proteína de interesse a ser isolada dos demais componentes do veneno bruto. Para isolamento das metalopeptidases, foi utilizada uma coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare) carregada com Zn^{2+} . Como tampão de adsorção, foi usado Tris-HCl 100 mM +150 mM de NaCl pH 7,4 (tampão A) e, para eluição, foi feito um gradiente de 0 a 100% de Imidazol 100 mM pH 7,4 (Tampão B). O fluxo foi de 1 mL/minuto.

3.2.3 Cromatografia de troca iônica

Nesta técnica cromatográfica, a separação das proteínas é realizada com base em suas cargas. O fracionamento foi realizado em coluna Resource S, previamente ambientada com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,8. O gradiente foi realizado de 0 a 100% de acetato de amônio 50 mM, com NaCl 0,5 M, em pH 4,8, sob fluxo de 2 mL/min.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecil

Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis)

A eficiência dos métodos de purificação foi avaliada qualitativamente por eletroforese, sob condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 4% de poliacrilamida e para o gel de separação utilizou-se 15% de poliacrilamida. Agentes catalisadores (persulfato de amônio e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos.

Após cada etapa de fracionamento, 40 µL de cada amostra foram diluídos em 10 µL de tampão de amostra não redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidas durante aproximadamente 5 minutos à 70°C.

Posteriormente, 10 µL/poço da amostra foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese sob uma voltagem constante de 90 V. As amostras foram então coradas utilizando-se o corante Coomassie Blue G-250.

3.4 Zimografia

Para análise da atividade proteolítica, foi realizado o teste de zimografia, que consiste em uma eletroforese das amostras em sistema SDS PAGE, que inclui gelatina ou caseína no gel de separação na concentração de 2 mg/mL, com o objetivo de evidenciar a presença de peptidases nas amostras coletadas após o fracionamento. As amostras foram preparadas de forma similar à descrita no item 3.3, porém, uma vez que se pretendia avaliar a atividade hidrolítica das mesmas, omitiu-se a etapa de aquecimento. Foram utilizados inibidores de metalopeptidase (EDTA) e de serinopeptidase (PMSF) na molaridade de 25 mM e 20 mM, respectivamente. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes durante 15 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida o gel foi incubado no tampão de hidrólise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e CaCl₂ 5 mM), a 37°C durante 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com solução corante Coomassie Blue G-250 (Blue Silver).

3.5 Ensaio fibrinogenolítico

A atividade fibrinogenolítica foi realizada a partir da incubação de 20 µL de uma solução de fibrinogênio bovino (4,5 mg/mL em Tris-HCl pH 8,0) com 20 µL de amostra em temperatura de 37°C, durante diferentes tempos (15, 30, 45, 90, 120 minutos e 24 horas). Foram realizados dois controles negativos (somente proteína e somente fibrinogênio), com incubação de 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram diluídas em 10 µL de tampão de amostra redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol e β-mercaptoetanol) e aquecidas durante aproximadamente 5 minutos à 70°C. Para a análise de clivagem, as amostras foram aplicadas em gel SDS PAGE 15%.

3.6 Análise peptídica por espectrometria de massas tipo electrospray

Para espectrometria de massa tipo *electrospray*, as análises foram realizadas em um instrumento IT-ToF (Shimadzu Co., Japan), no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. As amostras foram analisadas em modo positivo (preferencialmente), após injeção direta no instrumento sob fluxo constante de 20 µL/min em uma solução de 50% acetonitrila, contendo 0,5% de ácido fórmico. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution e o processamento de dados pelo Mascot (Matrix Science) e Peaks (Bioinformatics Solutions Inc.).

3.7 Sequenciamento químico (Edman)

Na degradação de Edman, a proteína imobilizada é incubada com feniliotiocianato e submetida à hidrólise ácida liberando o (feniltiohidantoína) PTH-aminoácido N-terminal e, este é identificado por cromatografia. A análise foi realizada em um sequenciador automático PPSQ-21 (Shimadzu Co, Japan) de acordo com as instruções do fabricante, no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

3.8 Análise por MALDI/ ToF da massa molecular do inibidor tipo Kunitz

As análises para a identificação da massa do peptídeo foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Butantan. O material foi analisado por espectrômetro de massas tipo MALDI/ToF (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz), (Axima Performance, Shimadzu), sob a supervisão do Dr. Daniel Carvalho Pimenta. Antes da obtenção dos dados, o

aparelho foi previamente calibrado utilizando-se uma mistura de 3 proteínas: Sub-unidade β oxidada da Insulina (3495,65 Da, massa média); Insulina (5734,51 Da, massa média); Citocromo C (12361,96 Da, massa média). Após a calibração, a amostra foi ressuspensa em 0,1% de Ácido Acético em água deionizada. Em seguida, uma alíquota do material foi co-cristalizada com o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (solução saturada em ACN / água / 0,1 % de ácido trifluoroacético) (matriz) e depositada sobre o amostrador para secagem a temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos utilizando-se o modo linear positivo e utilizando um intervalo de massas entre 1000 e 14000 Da.

3.9 Determinação da constante de inibição (K_i) do BPP por afinidade do substrato a enzima

Para a determinação da constante de inibição (K_i) foram realizados ensaios em fluorímetro com cubeta ($d=1$ cm) a 37°C , utilizando substrato Abz-FRK(Dnp)-P-OH em solução de Tris- HCl 0,1 M, pH 7,0 com NaCl 50 mM e ZnCl_2 10 mM. Após a incubação de 5 minutos, foi realizada a primeira leitura. Posteriormente, foram adicionados 5 μL da ACE (0,5 mU), e novamente incubado durante 5 minutos, e obtido o valor de fluorescência considerado o valor V_0 , na ausência do peptídeo, nos comprimentos de onda de excitação a 320 nm e de emissão a 420 nm, Em seguida, foram realizadas a cada cinco minutos, novas leituras aumentando-se a concentração do inibidor. Ao final foram obtidas diferentes valores de velocidade do ensaio enzimático na presença do inibidor (V_i). Para o cálculo da constante de inibição foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$1: v_0/v_i = 1 + [I]/K_i(\text{app})$$

$$2: K_i = K_i(\text{app}) / (1 + [S]/K_m)$$

Onde:

V_0 : Velocidade de hidrólise do substrato pela ação da ACE na ausência do peptídeo inibidor.

V_i : velocidade da hidrólise na presença do inibidor

$[I]$: concentração do inibidor expressa em μM

$K_i(\text{app})$: valor da constante de inibição aparente expressa em μM

K_i : valor da constante de inibição expressa em μM

K_m : constante de Michaelis-Menten

3.10 Determinação da constante de inibição (K_i) do inibidor tipo Kunitz por afinidade do substrato a enzima

Para a determinação da atividade inibitória do peptídeo Kunitz, foram realizados ensaios em espectrofluorímetro de cubeta (SpectraMax, Molecular Devices), a 37°C. As leituras foram feitas a cada 30 s, durante 4 minutos, nos comprimentos de onda de excitação de $\lambda_{ex} = 320$ nm e $\lambda_{em} = 420$ nm, para o substrato Abz-GIVRAK-Dnp (tripsina) e para o substrato N-Succinyl- AAPF-MCA (quimotripsina), a leitura foi realizada nos comprimentos de onda de $\lambda_{ex} = 360$ nm e $\lambda_{em} = 480$ nm.

O pico referente ao inibidor na concentração de 500 μ g/mL foi diluído em Tris 100mM, pH 8,5. As enzimas tripsina e quimotripsina foram utilizadas na concentração de 40 μ g/mL e 50 μ g/mL, respectivamente. Após a estabilização da temperatura em 37°C, foi realizada a primeira leitura somente o substrato com o tampão Tris 100 mM, pH 8,5. Posteriormente, foram adicionados 0,5 μ L da enzima e obtido o valor de fluorescência considerado o valor V_0 , na ausência do peptídeo. Em seguida, foram realizadas a cada 30 s, durante quatro minutos, novas leituras aumentando-se a concentração do inibidor e obtendo-se diferentes valores de V_i (velocidade da hidrólise).

A constante de Michaelis-Menten, cujo valor é a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos da enzima estão preenchidos foi previamente calculada, sendo de 5 μ M para a quimotripsina e 2 μ M para a tripsina. Para o cálculo da constante de inibição foram utilizadas as mesmas fórmulas citadas no protocolo anterior.

3.11 Western Blot

Após a separação eletroforética, as proteínas coletadas na cromatografia de exclusão molecular, foram transferidas em membrana de nitrocelulose durante 1 hora sob corrente de 90 V. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 10% de metanol, pH 8,3. Após a lavagem com PBS, a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó, desnatado (Molico, Nestlé). Posteriormente, a membrana foi

incubada, overnight a 4°C, em solução de anticorpo primário policlonal de coelho anti-jararagina gentilmente cedido pela Dra. Splendore Della Casa, na diluição (1:5000). Após a lavagem da membrana com PBS, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para a revelação, utilizou-se 25 µL de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de DAB (Diaminobenzidina) diluídos em 50 mL de PBS.

3.12 Cultivo de células B16F10

As células aderentes B16F10 foram desenvolvidas a partir do melanoma de pele em camundongos da linhagem C57BL/6J e adquirida da ATCC (American Type Cell Collection).

As células foram cultivadas seguindo os métodos tradicionais de cultivo celular e antes de atingirem em torno de 80% de confluência, foram subcultivadas para ampliação e congelamento em nitrogênio líquido, sendo mantidas em meio RPMI com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 1% (2 mM) de L-Glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico estreptomicina (25 µg/mL), penicilina (50 U/mL), e anfotericina (1,25 µg/mL) GIBCO®. As células foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂.

3.13 Citotoxicidade e atividade proliferativa

Os ensaios com as toxinas fracionadas e o veneno bruto foram feitos pelo Método Colorimétrico utilizando o corante vital MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium).

O teste de viabilidade celular avalia a toxicidade que um determinado material pode causar em contato com células em cultura. É baseado na avaliação quantitativa da viabilidade celular em exposição a agentes tóxicos, pela incubação com corante vital MTS e reagente acoplador de elétrons, PMS (phenazine methosulfate). A quantidade de MTS, marcador de viabilidade celular, absorvido por uma população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (Malich, 1997).

Em uma placa de 96 poços, 1x10⁴ células/poço foram plaqueadas contendo 100 µL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio dos poços foi trocado e 50 µL de toxina em concentrações variáveis foi diluído em 50 µL de meio de cultura. As placas foram incubadas por mais 24 horas a 37° C com 5% de CO₂.

Uma solução de 2 mL de MTS para cada 0,1 mL de PMS, diluída em 10 mL de meio de cultura foi produzida, e 120 µL desta solução foram aplicados em cada poço da placa. As células foram mantidas incubadas em estufa de CO₂ a 37° C durante 3 horas. Posteriormente, a absorvância foi medida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 490 nm, e os cálculos de viabilidade para análises estatísticas de desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. Foram determinados a atividade citotóxica da fração e do componente isolado.

3.14 Detecção de toxinas crotamina-símile por ELISA (Enzyme Linked

Immuno Sorbent Assay)

Inicialmente, o veneno foi diluído em tampão de sensibilização (Carbonato/Bicarbonato 0,1 M, pH 8,8) na concentração de 200 µg/ mL. As placas com 96 poços foram cobertas com 100 µL/poço da solução, seguida por incubação overnight a 4°C. Após a sensibilização, a placa foi lavada 3X com tampão PBST (solução salina tamponada, pH 7,5, contendo 0,1% Tween 20). Posteriormente, foram adicionadas a cada poço da placa a solução de bloqueio (leite em pó a 3% em PBST) e incubado durante 40 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de anti-crotamina, gentilmente cedido pela Dra. Nancy Oguiura, do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, nas diluições seriadas de 1:500 a 1:10000. A placa foi incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBST e adicionados 100 µL anti-IgG de coelho (anticorpo anti-IgG, 1:1000 (v/v) em PBST) a cada poço. Após 1 hora, a placa foi lavada com PBST e foram adicionados 100 µL da solução de substrato-cromógeno contendo TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). As placas foram mantidas em câmara escura por 30 minutos. A reação foi interrompida ao adicionar 50 µL/poço de HCl 0,25 M. As leituras de absorvância foram obtidas em espectrofotômetro a 450 nm.

3.15 Avaliação preliminar da atividade antibacteriana

Para a realização do ensaio preliminar de atividade antimicrobiana, foi utilizada a técnica de difusão em gel, que consiste em adicionar 1 mL da suspensão de cultivo da cepa bioindicadora (DO 0,5) em 9 mL de meio suplementado com 1,0% de ágar. Após a solidificação do meio, a amostra foi

diluída em ácido acético 0,01% e foi adicionado 10 µL de cada amostra sobre o meio-ágar. As placas de Petri foram incubadas a 37°C, por 16-18 horas. A atividade antimicrobiana da amostra foi visualmente detectada pela observação de áreas claras, indicadas pela formação de halos, que caracterizam a inibição do crescimento bacteriano. As bactérias utilizadas no ensaio foram a *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*.

3.16 Ensaio edematogênico em ratos Wistar

O edema foi induzido na ausência de anestesia por injeção na região intraplantar das patas posteriores dos animais. Inicialmente, os animais receberam injeção somente de solução salina na pata direita (controle) e dose do agente causador de edema (bradicinina) diluído em 50 µL de salina, na concentração de 0,04 µg/mL, na pata esquerda. Após 30 minutos, foi realizada a medida de edema com o auxílio do pletismógrafo seguida da aplicação do peptídeo (BPP), na região intraplantar da pata posterior esquerda, na mesma concentração da bradicinina (0,04 µg/mL). Após a injeção do peptídeo, nos tempos de 5 a 40 minutos foi avaliado o aumento de formação de edema, decorrência da atividade potencializadora já descrita em diferentes BPPs (Fernandes, *et.al.*, 1991). Os animais foram divididos em três grupos de 5 animais/por grupo e análise estatística do tipo ANOVA. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética, aprovado e registrado com o número 171/16.

3.17 Análise de atividade hidrolítica por FITC-caseína

O método de FITC-caseína consiste no acoplamento do fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) ao substrato caseína. Para o preparo do substrato, foi utilizado 200 mg de caseína, diluído em 20 mL de tampão (50 mM de Na₂CO₃, com 150 mM NaCl, em pH 9,5). A solução foi incubada com 8 mg de FITC durante 8 horas. Posteriormente, a solução foi dialisada contra Tris 100 mM, pH 7, 5 durante 48 horas. Após a incubação da amostra com o substrato (5 µL de amostra + 40 µL tampão + 5 µL da solução de caseína) no período de 20 minutos, a reação é acidificada com a adição de tricloroacético (TCA) a 5%, em seguida a mistura foi então centrifugada durante 10 minutos à 10000 G. O sobrenadante foi neutralizado com a adição de Tris 0,5 M, pH 8,5 e a leitura foi realizada em fluorímetro de placas (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) nos comprimentos de onda λ_{ex} =490 nm e λ_{em} =522 nm.

3.18 Proteômica *in gel* e análise por espectrometria de massas

As bandas de interesse provenientes do SDS Page foram recortadas, descoradas em solução de 75 mM de NH_4HCO_3 em etanol 40% durante duas horas ou até que as bandas ficassem totalmente descoradas. Em seguida, após a remoção da solução descorante, foi adicionado solução redutora (5 mM de DTT em NH_4HCO_3 25 mM), posteriormente ao tempo de incubação de 30 minutos a 60°C, adicionou-se a solução alquilante (iodoacetamida 55 mM em 25 mM de NH_4HCO_3), por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após a remoção da solução alquilante, procedeu-se a etapa de desidratação com acetonitrila 100%, com três lavagens de 10 minutos cada. A acetonitrila foi totalmente removida e o restante da solução evaporou-se a temperatura ambiente. Após a secagem completa das bandas, os fragmentos de gel foram reidratados em solução de tripsina na concentração 40 ng/ μL , diluída em NH_4HCO_3 50 mM e as amostras mantidas no gelo e incubadas durante 45 minutos. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada e uma nova solução de NH_4HCO_3 50 mM foi adicionada e as amostras foram mantidas *overnight* à temperatura ambiente.

A etapa de extração dos peptídeos foi realizada adicionando novamente o NH_4HCO_3 50 mM, e as amostras foram sonicadas durante 10 minutos. Após, foi adicionada solução de acetonitrila com TFA 5% e novamente sonicado. Em seguida, o sobrenadante com os peptídeos extraídos foi separado em outro tubo. A etapa de sonicação com solução de acetonitrila com TFA 5% foi repetida mais duas vezes. Por último, as amostras foram sonicadas em acetonitrila 100%, e o sobrenadante foi adicionado aos outros das etapas anteriores.

Os peptídeos resultantes foram ressuspensos em solução de 50% acetonitrila, contendo 0,5% de ácido fórmico e analisados em espectrômetro de massas do tipo *electrospray*, as amostras foram analisadas em modo positivo (preferencialmente), sob fluxo constante de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution e o processamento de dados pelo Mascot (Matrix Science) e Peaks (Bioinformatics Solutions Inc.).

4. RESULTADOS

4.1 Fracionamento e caracterização das proteínas

4.1.1 Primeira etapa do fracionamento do veneno bruto de *Bitis gabonica rhinoceros*

Como passo inicial, realizamos a cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL. Na coluna previamente ambientada com Bicarbonato de Amônio 100 mM (solução A), foram injetados 25 mg de veneno bruto de *B.g.rhinoceros*, diluído em 1,2 mL de fase móvel (figura 5). As frações foram separadas em doze picos, que em seguida foram agrupados, aliquoteados e liofilizados.

Figura 5- Fracionamento do veneno total em coluna de gel filtração. O fluxo foi mantido em 0,6mL/min.

Para a identificação de bandas e análise do grau de pureza das frações, foram realizadas eletroforese em gel SDS PAGE 15%, sob condições redutoras e não redutoras, como indicado na figura 6.

Figura 6- Gel SDS PAGE 15% das frações coletadas na etapa de gel filtração. Foi aplicado 15 μ L de amostra em cada poço. VT: veneno total; M: Padrão de massa molecular (kDa) A: amostras reduzidas; B: amostras não reduzidas.

A figura acima ilustra a eficiência da cromatografia de gel filtração na separação dos componentes do veneno de acordo com a sua massa molecular. Dentre as frações de baixa massa, que são o escopo do presente trabalho, são observadas proteínas com massa molecular >18 kDa nas frações IV e V. Para as frações VI a XII, não foi possível a identificação de bandas por SDS PAGE.

A banda isolada observada na fração V foi submetida a sequenciamento N-terminal por degradação de Edman, sendo realizados 20 ciclos. A sequência obtida (KKRPNFCYLPADPGPCMANF) foi confrontada com os bancos de dados e mostrou similaridade (90% de identidade) com o inibidor de peptidase do tipo Kunitz, bitisilin-2, encontrado na serpente *Bitis gabonica* (Uniprot accession number Q6T6S5).

4.1.2 Identificação de metalopeptidases por Western Blot

Visando a purificação de peptidases endógenas, as frações coletadas no fracionamento de exclusão molecular foram submetidas ao ensaio de Western Blot para a identificação de metalopeptidases que apresentam imunoreatividade frente ao anticorpo anti-jararagina (figura 7). A jararagina é uma metalopeptidase hemorrágica da classe PIII, que apresenta os domínios de metalopeptidase, disintegrina e rico em cisteína.

Figura 7- Western Blot das frações coletadas na cromatografia de exclusão molecular. M: padrão de massa molecular em kDa. C+: veneno *Bothrops jararaca* (2mg/mL).

No Western Blot, podemos verificar a presença de metalopeptidase na fração I, sendo observadas duas bandas de aproximadamente 100 kDa e 60 kDa, possivelmente metalopeptidases tipo PIII.

4.1.3 Análise da atividade gelatinolítica

A análise das peptidases foi realizada primeiramente por zimografia em gel, polimerizado com gelatina. Não foi observada atividade proteolítica.

4.1.4. Atividade Fitc-caseína

Com o objetivo de identificarmos a presença de enzimas hidrolíticas presentes no veneno bruto e nos picos, foi realizado um ensaio de atividade caseinolítica (figura 8), que possibilitou a identificação das peptidases presentes nos picos de I a IV eluídos na cromatografia de exclusão. Essa atividade foi confirmada em zimografia.

Figura 8: Gráfico de atividade caseinolítica do veneno bruto de *Bitis gabonica rhinoceros* e os picos (I a V) coletados na cromatografia de exclusão molecular. Análise estatística pelo Anova $p < 0,05$

4.1.5 Análise da atividade caseinolítica

Com o objetivo de identificarmos as massas moleculares das peptidases que apresentam a capacidade de hidrolisar a caseína, foi realizada uma nova zimografia (figura 9).

Figura 9: Zimografia em gel com caseína dos picos coletados na cromatografia de exclusão molecular. As áreas destacadas em vermelho indicam as regiões de atividade hidrolítica. C+: veneno de *B. jararaca* (2 mg/mL).

Pela análise das amostras submetidas ao ensaio, observou-se a presença de peptidases de massa molecular intermediária, que possuem a capacidade de hidrolisar a caseína, presentes no veneno total e nos picos de I a III. Portanto, pelo resultado obtido, as enzimas mostraram especificidade ao substrato utilizado. Essa especificidade indicada pela zimografia sugere que algumas características observadas no envenenamento, como atividade hemorrágica não está associada a degradação da matrix extracelular mediada pela ação de collagenases.

Posteriormente, foi realizada uma nova zimografia na presença de inibidores de metalopeptidases (EDTA) e serinopeptidase (PMSF), visando a identificação das famílias responsáveis pela atividade hidrolítica, como indicado na figura 10:

Figura 10: Zimografia em gel com caseína dos picos coletados na cromatografia de exclusão molecular. As áreas destacadas em vermelho indicam as regiões de atividade hidrolítica. C+: veneno de *B.jararaca* (2 mg/mL). IE-IIIIE: picos da exclusão incubados com EDTA; IP-IIIP: picos da exclusão incubados com PMSF.

Pela análise do gel, pôde-se observar a ausência de inibição nas amostras com EDTA e uma inibição parcial em presença de PMSF. Esses resultados sugerem que a atividade hidrolítica não é dependente de cátions divalentes e/ou a molaridade utilizada não foi suficiente para observar a inibição total.

4.1.6 Segunda etapa de fracionamento em coluna de afinidade a metal

Posteriormente, o pico I, oriundo da exclusão molecular foi separado em duas frações IA e IB (ascendente e descendente, respectivamente), e submetido a um novo fracionamento em coluna de afinidade a metal (Histrap 1mL), previamente carregada com íons Zn^{+2} com um gradiente de 0-100% de Imidazol 100 mM (figura 11 e 12).

Figura 11 – Fracionamento do pico 1A (gel filtração) em coluna de afinidade a metal. Fluxo de 1mL/min.

Pela análise do cromatograma indicado pela figura 11, podemos observar a presença de três picos, onde o pico 1A é correspondente a fração não

adsorvida. E os picos 2A e 3A, representam proteínas que apresentaram afinidade aos íons Zn^{+2} , sendo eluídas a partir do gradiente de 0 a 100% de Imidazol.

Figura 12- Fracionamento do pico IB (gel filtração) em coluna de afinidade. Fluxo de 1mL/min.

No cromatograma referente ao pico IB, obtivemos o mesmo padrão de fracionamento da cromatografia anterior (figura 11). O pico 1B, indica a fração não adsorvida e os picos 2B e 3B, representam as frações coletadas no decorrer da eluição do gradiente de imidazol.

Para avaliarmos o padrão de distribuição das proteínas coletadas no fracionamento e o grau de pureza, foi realizada uma eletroforese sob condições desnaturantes (Figura 13).

Figura 13- Gel SDS PAGE 15% das frações coletadas na etapa de fracionamento de afinidade. M: padrão de massa molecular; 1A a 3B: Amostras dos picos coletados.

Pelo padrão de migração indicado nas amostras coletadas, os picos 3A e 3B, são considerados SVMP do tipo PIII e PI, respectivamente.

4.1.7 Atividade fibrinogenolítica

As frações que apresentaram maior grau de pureza (3A e 3B) quando analisadas em gel, foram submetidas ao ensaio fibrinogenolítico, sendo observada a clivagem da cadeia α do fibrinogênio bovino a partir de 90 minutos de incubação (figura 14 e 15).

Figura 14- Gel SDS Page 15% indicando atividade fibrinogenolítica do pico 3A. nos tempos de 30-120 minutos e 24 horas de incubação. 60F: somente o fibrinogênio (4mg/mL). 60P: somente a fração 3A.

Figura 15- Gel SDS Page 15% indicando atividade fibrinogenolítica do pico 3B. nos tempos 30-120 minutos e 24 horas de incubação. 60F: somente o fibrinogênio (4mg/mL).60P: somente a fração 3B.

4.1.8 Análise de peptidase através de digestão *in gel*, seguida de LC/MS/MS

Com o objetivo de identificarmos a peptidase eluída no pico IV, foi realizado o ensaio de digestão triptica em gel. Para isso, a banda de interesse proveniente da eletroforese foi recortada e descorada conforme o protocolo já estabelecido, seguido dos processos de redução com DTT e alquilação com iodoacetamida. Os peptídeos provenientes da fragmentação promovida pela tripsina foram submetidos a análise por espectrometria de massas (*electrospray*), que resultou em duas sequências, EWVLTARR ($m/z=473,25$ $z=2$), e IMGWGSITTTK ($m/z= 605,79$), sendo a última obtida por sequenciamento *de novo*, que, confrontado no banco de dados apresentou identidade com uma serinopeptidase conhecida como rhinocerase, já descrita em veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*, que apresenta atividade fibrinogenolítica, sendo inibida por PMSF e não por benzamidina. Os espectros MS² obtidos e os gráficos de distribuição de erros seguem abaixo (figura 16).

Figura 16: A Espectro MS² de m/z= 473,25. B: sequência peptídica deduzida baseada no espectro. C: tabela dos ions obtidos e distribuição de erros.

4.2 Identificação de inibidores de peptidase e oligopeptídeos

4.2.1 Sequenciamento N-terminal

No pico V, coletado no fracionamento de exclusão molecular, observou-se a presença de uma única banda em gel SDS PAGE. Como o pico apresentava baixa massa molecular, optamos em realizar a análise por sequenciamento N-terminal. Como resultado, após 20 ciclos de reação, foi obtida a sequência KKRPNFCYLPADPGPCMANF, indicada abaixo. Esta sequência foi

alinhada com diferentes inibidores tipo Kunitz de Viperidae que apresentaram identidade > 80%. Na figura, podemos observar a elevada identidade entre o peptídeo encontrado e o inibidor de peptidase do tipo Kunitz, encontrado em *Bitis gabonica*, chamado de bitisilin-2.

Figura 17 – Análise comparativa do sequenciamento N-terminal de inibidores de serinopeptidases. Os aminoácidos hachurados em azul indicam identidade. A seta indica o resíduo crítico (sítio P1).

Apesar da análise pelo SDS PAGE indicar a presença de uma única banda presente no pico V, outros ensaios apontaram a presença de um contaminante que foi confirmada ao realizar uma nova eletroforese com alta concentração do pico e pela análise de sua massa molecular foi identificada uma proteína com massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Assim, foi realizado um refracionamento em coluna de troca catiônica, visando a separação do inibidor que sabidamente apresenta aminoácidos básicos, da peptidase contaminante eluída na mesma fração coletada na exclusão molecular.

4.2.2 Determinação da massa molecular do inibidor tipo Kunitz por MALDI-ToF

Para determinarmos com mais precisão a massa molecular do peptídeo, foi realizada a espectrometria de massas por MALDI. Pela amostra separada por ToF, pôde-se analisar o espectro de massas de acordo com a sua razão m/z (massa/carga), cujos picos indicam as quantidades variáveis dos componentes presentes na amostra. Assim, pela espectro indicado pela figura 18,

é possível a identificação do pico mais abundante, representada pela massa de 7020 Da.

Figura 18: Espectro de massas do pico V da gel filtração por MALDI-ToF

No espectro de massas, podemos observar a presença de outros componentes de baixa massa molecular, que pelas relações m/z poderiam ser peptídeos como os BPPs e catelicidinas.

4.2.3 Purificação do inibidor tipo Kunitz

O fracionamento foi realizado em coluna Resource S, previamente ambientada com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,8. O gradiente foi realizado de 0 a 100% de acetato de amônio 50 mM, com NaCl 0,5 M, em pH 4,8, sob fluxo de 2 mL/min.

Figura 19: Purificação do inibidor tipo Kunitz. Fluxo de 2mL/min.

4.2.4 Atividade fibrinogenolítica na presença de inibidor Kunitz

As serinopeptidases comumente encontradas em venenos de serpente em sua maioria, apresentam atividade fibrinogenolítica. Assim, visando a identificação de atividade inibitória frente a serinopeptidases endógenas, promovida pelo peptídeo inibidor tipo Kunitz encontrado no veneno de *B.g.rhinoceros*, foi realizado um ensaio de incubação do fibrinogênio com a peptidase identificada como serinopeptidase nomeada de rhinocerase, juntamente com o inibidor, em diferentes tempos, como indicado na figura 20.

Figura 20: Atividade fibrinogenolítica de serinopeptidase incubada com inibidor endógeno tipo Kunitz. α : cadeia polipeptídica de 64 kDa; β : cadeia polipeptídica de 55 kDa e γ : cadeia polipeptídica de 47 kDa. 15 a 120: tempos indicados em minutos. 24 h: tempo de 24 horas de incubação.

Pela análise da figura 20, pôde-se observar a manutenção da clivagem da cadeia α do fibrinogênio a partir de 45 minutos, seguida da fragmentação da cadeia β , no período de 24 horas. Portanto, o peptídeo não foi capaz de inibir a atividade fibrinogenolítica descrita da serinopeptidase.

4.2.5 Determinação da constante de inibição (k_i) por fluorescência

Para avaliarmos a atividade inibitória dos peptídeos tipo Kunitz e BPP, foi realizado o ensaio de fluorescência utilizando os substratos fluorescentes específicos abz-GIVRAK-Dnp (tripsina) e N-succinyl-AAPF-MCA (quimotripsina) e Abz-FRK(Dnp)-P-OH (ACE). Para o cálculo do K_i , foi realizado inicialmente ensaios para a determinação da K_m . Para isso, ensaios sucessivos variando a concentração de substrato, partindo-se de 1 mg/mL foram realizados, até atingir o valor onde não foi mais observada a variação da velocidade, obtendo-se portanto, o $V_{m\acute{a}x}$. Nesse contexto, o $V_{m\acute{a}x}$ representa a condição que todos os sítios ativos da enzima, estão ocupados pelo substrato. Assim, foram obtidos os valores de $K_m = 2 \mu M$ para a tripsina e de $K_m = 5 \mu M$ para a quimotripsina e $K_m = 4 mM$ para a ACE.

Com a determinação dos valores da constante de Michaelis-Menten, foram realizados novos ensaios, variando-se as molaridades do inibidor, como o objetivo de se obter os valores das constantes de inibição (K_i). Na tabela abaixo estão indicados os valores de K_i obtidos:

Tabela 3: Parâmetros cinéticos obtidos pelas diferentes serinopeptidases e metalopeptidase

Enzima	K _m	K _i
Tripsina	2 µM	0,3 µM
Quimotripsina	5 µM	0,07 µM
ACE	4 mM	1 mM

4.2.6 Ensaio de viabilidade celular em células tumorais com inibidor tipo Kunitz e moléculas de baixa massa.

Os inibidores de serpente do tipo Kunitz são conhecidos por atuar na coagulação, fibrinólise e inflamação. A habilidade do veneno de serpente de atuar sobre células tumorais é conhecida a um longo tempo. Um dos primeiros estudos com a descrição do uso do veneno contra células tumorais foi relatado no processo de defibrinação. Sugeriu-se que o Ancrod, uma peptidase de *Agkistrodon rhodostoma*, administrado em associação com ciclofosfamida, pode produzir defibrinação, contribuindo para a fragmentação e redução do tamanho do tumor (Calderon, *et.al.*, 2014).

Em 2010, dois inibidores de peptidase isoladas do veneno de *Bungarus multicinctus* mostraram uma notável atividade de reduzir a migração e invasão em neuroblastoma humano da linhagem SK-N-SH (Chou, *et.al.*, 2010) e glioblastoma U87 (Morjen, *et.al.*, 2013). Baseando-se em artigos publicados, com o objetivo de rastreamos uma provável atividade antitumoral, foi realizado um ensaio de atividade citotóxica em células tumorais (B16F10), utilizando diluições seriadas da toxina, partindo da concentração de 2 mg/mL. Como resultado, foi observada a redução do crescimento celular nas diferentes concentrações e a obtenção do IC₅₀, equivalente a concentração de 5,1 µg/mL. O IC₅₀ indica a concentração de fármaco e/ou outra substância, que apresenta a capacidade de inibir 50% do crescimento celular *in vitro*, como indicado na figura 21.

Figura 21: Viabilidade celular com inibidor tipo Kunitz. 100 μL de toxina com 1×10^4 células por poço. Linha tracejada indica o valor equivalente ao IC_{50} . Análise estatística realizada por ajuste sigmoidal ($p < 0,0001$).

O ensaio de atividade citotóxica foi repetido com o pico XII, eluído durante o fracionamento em coluna de exclusão molecular. Como resultado, podemos observar a redução da viabilidade em células tumorais B16F10, com uma IC_{50} calculada de 71,97 $\mu g/mL$, como indicado na figura 22.

Figura 22: Viabilidade celular com pico XII. 100 μL de toxina com 1×10^4 células por poço. Linha tracejada indica o valor equivalente ao IC_{50} . Análise estatística realizada por ajuste sigmoidal ($p < 0,0001$).

Pela análise comparativa da atividade de ambos os picos (V e XII) podemos observar uma maior atividade de inibição da proliferação celular presente no pico V, devido ao menor valor de IC₅₀.

4.2.7 Análise por espectrometria de massas (*electrospray*) dos peptídeos

As frações que no perfil cromatográfico de exclusão molecular apresentaram massa molecular abaixo de 7 kDa, indicados pelos picos V ao XII, foram refracionadas por cromatografia de fase reversa RP-HPLC em coluna C18. No cromatograma abaixo, referente ao pico VIII, estão indicados os picos e suas respectivas massas em Daltons.

Figura 23 - Fracionamento do pico VIII coletado na coluna de gel filtração submetido a purificação de fase reversa em C18, ambientada com 0,1% de ácido trifluoracético em água Milli Q (solução A). Eluição realizada com solução B ((90% acetonitrila/0,1% A) com gradiente de 20 – 50%, durante 20 min, sob fluxo de 1 ml/min. (Reproduzido de Pôster BrMass 2013- autores: Ingrid Cavalcante, Tamara Fucase, Patrick J. Spencer, Daniel C. Pimenta)

Os três picos identificados no cromatograma, foram submetidos à espectrometria de massas do tipo *electrospray* e as análises foram realizadas em instrumento IT-ToF. Abaixo estão indicados os espectros de massas e sequências

de aminoácidos obtidos pelo sequenciamento *de novo* dos peptídeos (figuras 24, 25 e 26).

Figura 24: Espectro de MS² m/z = 644.30 [M+2H]²⁺

Figura 25: Espectro de MS² de m/z=598.77 [M+2H]²⁺

Figura 26: Espectro de m/z = 591,76[M+2H]²⁺.

Na figura 25, está representado o espectro de fragmentação do íon parental com m/z = 644.30, pode-se observar dentre os íons filho obtidos a presença do pico com m/z= 213,125, característico de P-P. Um pico semelhante

foi observado no espectro representado na figura 25. Baseando-se no sequenciamento *de novo*, foram obtidos peptídeos com sequências P-P, características dos BPPs. Posteriormente, os dados foram analisados pelos software Mascot e Peaks e confrontados em banco de dados disponíveis. A sequência representada na figura 25 apresentou elevada identidade com outros BPPs encontrados em serpentes do gênero *Bothrops*. Estes resultados indicam a presença de peptídeos potenciadores de bradiginina em serpentes Viperinae, sendo que até então, somente na espécie *Vipera aspis* havia sido identificada a presença desses oligopeptídeos. Entretanto, não houve identidade entre as sequências de *Vipera aspis* e *Bitis gabonica rhinoceros*. Na tabela abaixo, constam os peptídeos obtidos por sequenciamento *de novo*.

Tabela 4: sequências peptídicas obtidas para as frações de fase reversa e suas respectivas relações m/z

Peptídeo	m/z z=2
APQERGPPEIPP	640,30
ENWPHPQIPP	598,77
XXXXVSPK/QVPP	591,76

A sequência ENWPHPQIPP apresentou elevada identidade com outros BPPs encontrados em serpentes do gênero *Bothrops*, como indicado na figura 27.

1	-----ENWPHPQIPP-----	10	20140127523E89IXAJ
58	IPPLTVQQWNAQNWPHQIIPPLTVQQWNAQGRP-----P-----	89	Q7T1M3 BNP_BOTJR
39	-PPLVVQQWNSQNWPHQIIPPLVVQNWKSPTQ-----L-----	69	B0VXV8 BNP_SISCA
58	IPPLTVQQWNAQNWPHQIIPPLTVQQWNAQ-GRAPGPIIPPLTVQQWNAQGRAPHPPIPPAPL	116	Q6LEM5 BNP1_BOTJA
61	IPPLTVQQWNAQNWPHQIIPPLTVQQWNAQLGPPPRQIIPPLEVQQWNAQGRAPHPPIPPAPL	120	P68515 BNP_BOTIN
61	IPPLTVQQWNAQNWPHQIIPPLTVQQWNAQWRPPGPIIPPLTVQQWNAQARPPHPPIPPAPL	120	Q9FW56 BNP2_BOTJA
	:*****		

Figura 27: alinhamento da sequência obtida por m/z = 644.30 $[M+2H]^{2+}$. : aminoácidos com propriedades semelhantes (hidrofílicos). * : aminoácidos idênticos.

4.2.8 Atividade edematogênica do peptídeo

A sequência de aminoácidos não canônica adquirida por sequenciamento *de novo* foi utilizada para a produção do peptídeo sintético (APQERGPPEIPP), cuja atividade potencializadora de bradiginina foi avaliada indiretamente através do ensaio que consiste na análise da formação progressiva

de edema, desencadeada pela injeção intraplantar de bradicinina. Nas patas dos animais que receberam a injeção de bradicinina associada ao peptídeo pôde-se observar um aumento do processo edematogênico, quando comparados aos animais controle que receberam somente injeções de bradicinina, como indicado na figura 28.

Figura 28: Gráfico dos dados obtidos pelo pletismômetro em diferentes tempos de formação do edema. Análise estatística por ANOVA, $p < 0,05$.

4.2.9 Identificação de β defensinas por ELISA

Visando a identificação de peptídeos com estrutura de β defensinas, foi realizado o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, onde a placa de 96 poços foi sensibilizada com o veneno bruto de *Bitis gabonica rhinoceros*, na concentração de 40 $\mu\text{g/poço}$ (figura 29).

Figura 29: Ensaio de Elisa utilizando o veneno bruto de *B. gabonica rhinoceros* na concentração de 40µg/poço.

O anticorpo policlonal anti-crotamina foi utilizado em diluições seriadas partindo-se da diluição 1:500. Acima da diluição 1:2000, pôde-se observar a ausência de imunoreatividade do antígeno (veneno) frente ao anticorpo policlonal anti-crotamina. Esse resultado sugere que o veneno bruto contém baixas concentrações de moléculas imunoreativas ao soro anti-crotamina.

4.2.10 Avaliação preliminar da atividade antibacteriana

Com a identificação de componentes imunorreativos frente ao anticorpo anti-crotamina, foi realizada uma varredura da atividade antimicrobiana nos picos eluídos durante o fracionamento em coluna de exclusão molecular. Para esse ensaio foram utilizadas as cepas de bactérias *E.coli* e *M.luteus*. Pela análise da figura 30, é possível observar a presença de um halo de inibição nos picos I e V respectivamente.

Figura 30: Ensaio de determinação de atividade antimicrobiana. A: cepa de *M.luteus* incubado com os picos I ao IV. B: cepa de *E.coli* incubado com os picos V ao VIII. C: cepa de *M.luteus* incubado com os picos V ao VIII, na concentração de 2mg/mL. Como controle negativo foi utilizado ácido acético 0,01%. E como controle positivo foi utilizado antibiótico estreptomicina na concentração de 0,3mg/mL. Halo de inibição indicado pelo círculo vermelho.

Pela análise da figura 30, podemos observar um destacado halo de inibição na amostra referente ao pico I, que pelo padrão de eluição obtido pela técnica de exclusão molecular, são proteínas de alta massa. Portanto, essa atividade pode estar associada a presença de LAOs e SVMP.

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação e caracterização parcial das peptidases

Os venenos de serpentes Viperidae possuem diversos componentes proteicos e peptídicos, incluindo enzimas (serinopeptidases, metalopeptidases, LAAOs, PLA₂) e toxinas sem atividade enzimática (disintegrinas, lectinas tipo C, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento endotelial e neuronal e inibidores de peptidase do tipo Kunitz e cistatina) (Fry, 2005; Serrano, *et.al.*, 2005; Juarez, *et.al.*, 2004).

A caracterização do conteúdo de proteínas/peptídeos fornece uma série de benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico, desenvolvimento de novas drogas de potencial uso clínico e novas estratégias para a produção de soro anti-ofídico (Menez, *et.al.*, 2006).

Em 2007, Calvete e colaboradores fizeram um estudo proteômico do veneno de diferentes espécies do gênero *Bitis* e observaram a presença de disintegrinas diméricas, PLA₂, serino peptidase, CRISP, lectina tipo-C like, LAAOs e metalopeptidases.

No presente trabalho, foi realizada a caracterização parcial das toxinas do veneno da serpente *Bitis gabonica rhinoceros* (West african gaboon viper), nativa de áreas de alta pluviosidade de Gana, Serra Leoa e Costa do Marfim. A elevada prevalência e a gravidade dos acidentes, associada às propriedades bioquímicas do veneno de *Bitis* e os mecanismos envolvidos na patologia ainda são pouco compreendidos (Currier, *et.al.*, 2010; Fasoli, *et.al.*, 2010).

Inicialmente, procedeu-se um fracionamento do veneno bruto, utilizando a cromatografia de exclusão molecular, sendo observada a presença de doze picos (figura 5). Nesta técnica cromatográfica, ocorre a separação das moléculas com base nas diferenças em seu tamanho, forma ou volume hidrodinâmico. Após a separação parcial das toxinas, as frações foram submetidas a eletroforese, sob condições desnaturantes redutoras e não-redutoras, sendo possível a identificação de proteínas diméricas nos picos I e II.

As frações que apresentavam proteínas de massa molecular acima de 7 kDa (picos I ao IV) foram submetidas a Western Blot. Neste ensaio, foram identificadas duas bandas localizadas no pico I, que apresentaram imunoreatividade frente ao anticorpo anti-jararagina. A jararagina é uma

metalopeptidase do tipo PIII, encontrada no veneno de *B.jararaca*, que apresenta uma atividade proteolítica zinco-dependente, hemorrágica moderada, massa molecular aparente de 52 kDa e que corresponde a 5-12% da massa total do veneno (Paine, *et.al.*, 1992). As enzimas do tipo PIII (50 a 70 kDa), são geralmente glicoproteínas que contêm o domínio C-terminal rico em cisteína.

Estudos de proteômica, em conjunto com a transcriptômica indicam que a composição do veneno de *Bitis* apresenta ampla diversidade de isoformas de SVMP (Currier, *et.al.*, 2009).

Calvete *et.al.*, em 2007, identificaram por espectrometria de massas, a presença de diferentes PIII, presentes no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*, com massas moleculares que variavam entre 52 a 110 kDa, o que corrobora os resultados obtidos.

As SVMP são pertencentes as reprotinas, subfamília das metzincininas (Fox & Serrano, 2005) sendo responsáveis pela formação de hemorragias locais e sistêmicas, que são os sintomas mais relevantes do envenenamento por serpentes da família das Viperidae. Sua ação hemorrágica se deve a fibrinogenólise que interfere na coagulação sanguínea e a danos aos vasos sanguíneos, devido a degradação de integrinas, localizadas na membrana basal (Gutierrez, *et.al.*, 2005; Escalante, *et.al.*, 2006). Outras interessantes funções relacionadas as PIII-SVMP podem ser citadas como: a ativação de protrombina (Nishida, *et.al.*, 1995; Silva, *et.al.*, 2005), indução de apoptose em célula endotelial (Tanjoni, *et.al.*, 2005) e inibição da função plaquetária (Wijeyewickrema, *et.al.*, 2005).

Para a identificação de peptidases presentes nos picos eluídos durante o fracionamento de exclusão molecular, foi realizada uma varredura de atividade hidrolítica por meio do ensaio de Fitc-caseína. A atividade hidrolítica foi detectada nas amostras referentes aos picos I a IV. Este resultado foi confirmado pela zimografia realizada com o mesmo substrato (caseína) onde foram visualizadas duas bandas com atividade hidrolítica, com aproximadamente 35 e 25 kDa (figura 9). Porém, em presença de inibidores, a atividade caseinolítica foi mantida. Os resultados obtidos indicam que a atividade hidrolítica das enzimas não é dependente de cátions divalentes como o Ca^{2+} ou Zn^{2+} , no caso do mecanismo de inibição por EDTA. Com o inibidor específico de serinopeptidase (PMSF),

houve uma inibição parcial nas amostras incubadas. Sendo necessário ensaios com elevadas molaridades de PMSF ou o uso de outros inibidores, como o de DFP (Diisopropilfosfofluoridrato), que promove a inibição enzimática por fosforilação ao se ligar no sítio ativo composto por serina.

Entretanto, o veneno total e as frações analisadas, não apresentaram atividade gelatinolítica, esse resultado corrobora com o obtido por Paixão-Cavalcante e colaboradores em 2015. Sanchez, *et.al.*, em 2011, apontaram atividade semelhante em *Bitis parviocula*, o que sugere a baixa quantidade de collagenases, apesar de ambos os venenos apresentarem atividade hemorrágica. Os resultados sugerem que a atividade hemorrágica desencadeada pelo envenenamento por *Bitis gabonica rhinoceros*, pode não estar associada a degradação de colágeno por SVMP. As peptidases, principalmente as SVMPs apresentam distinta especificidade ao substrato. Porém, são capazes de exercer efeitos patológicos semelhantes (Gowda, *et.al.*, 1994 e Bee, *et.al.*, 2011).

A fração I identificada pela presença de metalopeptidases, foi separada em dois picos A e B, equivalentes aos tubos coletados durante a eluição, e submetida a uma recromatografia em coluna de afinidade a metal, onde observamos a presença de uma banda isolada no pico 3A, com aproximadamente 110 kDa, que demonstrou ser uma α -fibrinogenase tempo-dependente, como indicado na figura 14. As fibrinogenases clivam seletivamente ou em combinação as cadeias α , β , ou γ do fibrinogênio (Hung, *et.al.*, 1994; Assakura, *et.al.*, 1994; Jennings, *et.al.*, 1999). Estas peptidases apresentam massa molecular acima de 15 kDa, sendo responsáveis por distúrbios da coagulação sanguínea, com atividade pró ou anti-coagulante (Paine, *et.al.*, 1992; Assakura, *et.al.*, 1994).

O quadro de coagulopatia, associadas com o efeito pró-coagulante, é um processo comum desencadeado pelo envenenamento por serpentes das famílias *Elapidae*, *Colubridae*, *Atractaspididae* e *Viperidae*, que desencadeia a incogulabilidade sanguínea em animais e humanos (Warrell, 2010).

Efeitos sistêmicos desencadeados pelo envenenamento por serpentes africanas incluem choque hipovolemico, hemorragia (epistaxe, hemoptise e sangramento gengival e intracranial) que sem tratamento, são frequentemente fatais. Por isso, apresentam uma significativa importância médica. A patologia do

envenenamento sistêmico por serpentes dos gêneros *Echis* e *Bitis* mostraram muitas semelhanças com as Viperidae da Ásia e das Américas (Harrison, 2004).

Alterações na estrutura do fibrinogênio apresentam a capacidade de influenciar na função plaquetária. A interação do fibrinogênio com o receptor plaquetário, integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, é essencial para a hemostase normal e crucial para a interação entre as plaquetas no quadro de trombose (Ruoslahti, 1991).

A análise do gel SDS Page e o padrão de clivagem do fibrinogênio (α -fibrinogenase) observado para a amostra 3A indica que esta proteína é uma metalopeptidase do tipo PIII. Essas peptidases são comumente encontradas dimerizadas, com a adição de subunidades constituídas por proteínas lectina tipo-C, ligadas a cadeia principal por pontes dissulfeto. Fato esse constatado na eletroforese indicada pela figura 6. Posteriormente, a banda isolada também identificada no SDS PAGE, pico 3B, com massa molecular em torno de 25 kDa, foi incubada com o fibrinogênio bovino, apresentando comportamento semelhante ao da peptidase indicada na fração 3A (figura 14). Entretanto, sendo classificada como metalopeptidase do tipo PII.

As peptidases da família das SVMs, degradam o subendotélio vascular causando hemorragias e em virtude da presença do domínio disintegrina símile, se ligam a integrina $\alpha_2\beta_1$, gerando sangramentos pela inibição da agregação plaquetária (Kamiguti, *et.al.*, 1996).

Eagle e colaboradores em 1937, foram os pioneiros a identificar atividade fibrinogenolítica em diferentes venenos de *Viperidae*, incluindo algumas espécies dos gêneros *Agkistrodon*, *Crotalus*, *Bitis* e *Vipera*.

Alguns estudos mostram que toxinas de *Bitis sp* interferem na cascata de coagulação por clivagem direta das proteínas envolvidas ou por estímulo exacerbado dos fatores envolvidos no processo (MacKay, *et.al.*, 1970; Mebs & Panholzer, 1982). Cavalcante, *et.al.*, em 2015, demonstraram que os venenos das espécies *B. arietans* e *B. gabonica rhinoceros* são capazes de clivar a cadeia α do fibrinogênio. Além disso, o veneno de *B. arietans* é capaz de clivar as cadeias β e γ . E o de *B. nasicornis* é somente capaz de clivar a cadeia β . A atividade fibrinogenolítica é fortemente inibida por PHE (1,10- Fenantrolina). A PHE é um composto orgânico, que age como um quelante metálico, indicando o envolvimento de metalopeptidases no processo.

Duas classes distintas de enzimas fibrin(ogen)olíticas foram identificadas e descritas como as SVMs e SVSPs, pelos ensaios indicados pelas figuras 15,16 e 20. Essas duas classes de peptidases diferem no seu mecanismo de ação e geralmente atuam em diferentes regiões ou sequências do fibrinogênio e/ ou fibrina. Ambas todavia desempenham funções semelhantes na natureza. Quando a serpente inocula o veneno na presa, é necessário um mecanismo que facilite a dispersão do veneno através da corrente sanguínea. Enzimas fibrino(geno)líticas degradam coágulos ricos em fibrina e ajudam a prevenir a formação de novos pela ação do fibrinogênio. Essas características enzimáticas tem possibilitado o desenvolvimento de novos agentes no tratamento de trombooses oclusivas. A Fibrinolase, uma metalopeptidase isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* e a serinopeptidase β -fibrinogenolítica do veneno de *Vipera lebetina* são alguns dos representantes de enzimas que apresentam tal atividade (Swenson & Markland, 2005).

Em 1985, Pirkle e cols, descreveram a atividade catalítica de uma serinopeptidase trombina símile, com ação pró-coagulante, encontrada no veneno de *Bitis gabonica*, chamada Gabonase. Essa enzima atua sobre o fibrinogênio e fator XIII, apresenta massa molecular aparente de 30,6 kDa, sendo reticulada por cinco pontes dissulfeto, com 20,6% de carboidrato e pl de 5,6.

Pela digestão *in gel*, foi possível a identificação da proteína eluída juntamente com o peptídeo inibidor tipo Kunitz, indicado no pico IV como sendo a serinopeptidase chamada rhinocerase, identificada por Vayapuri e colaboradores em 2010. Estudos preliminares realizados por estes autores indicam que esta peptidase apresenta três principais funções que são responsáveis pelos efeitos sistêmicos na presa: redução da fibrinogenólise, fibrinólise que atua dissolvendo os coágulos e cininogenólise gerando cinina e bradicinina, as quais alteram a pressão sanguínea. No mesmo trabalho, foi realizada a análise de sequência por degradação de Edman, que apontou alta similaridade entre a rhinocerase e outras sequências de SVSP.

Dentre as serino peptidases presentes no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*, apenas a rhinocerase foi sequenciada (Vayapuri, *et.al.*, 2010). É importante destacar que esta proteína possui uma característica peculiar por não apresentar a tríade catalítica clássica composta por His 57, Asp 102 e Ser 195,

pois apresentam substituições His 57 Arg e Ser 195 Asp, respectivamente. Uma substituição idêntica é observada na serino peptidase VLP2 de *Vipera lebetina* (Francischetti, *et.al.*, 2004).

Em nossos ensaios, a atividade α e β -fibrinogenolítica foi observada para esta serinopeptidase a partir do ensaio de incubação em diferentes tempos com fibrinogênio bovino, e ausência de clivagem da cadeia γ , o que corrobora com o observado por Vayapuri e colaboradores em 2010. Além disso, estes autores relatam que mesmo com o uso de inibidor EDTA em diferentes molaridades (20 mM e 100 mM) a clivagem foi mantida, o que permite concluir que a atividade descrita não é dependente de cátions divalentes como o Ca^{2+} .

Samy, *et.al.*, 2006, identificaram a presença de atividade antimicrobiana no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*. Tal atividade geralmente está relacionada a toxinas como as LAOs, PLA_2 , peptídeos catiônicos ou crotamina-símiles. Assim, basendo-se nos resultados obtidos no artigo citado anteriormente foi realizado um ensaio preliminar para a determinação da atividade antibacteriana. Os picos I e V apresentaram tal atividade. Como o pico I, representa uma fração constituída por proteínas que apresentam alta massa molecular, tal atividade pode estar relacionada a enzimas LAOs, cuja atividade bactericida é amplamente descrita (Stiles, *et.al.*, 1991).

As LAOs são flavoenzimas diméricas com massa molecular que varia de 150 kDa 110 kDa, responsáveis pela desaminação de L-aminoácidos, formando α -cetoácidos, amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). São amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e animais. Os venenos de serpentes *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae* são ricos em L-aminoácido oxidases, geralmente homodiméricas associadas ao cofator FAD (Dinucleotídeo de flavina adenina) ou FMN (Mononucleotídeo de flavina). As flavinas encontradas em LAOs são responsáveis pela coloração amarela em venenos e contribuem para o aumento da toxicidade via stress oxidativo devido à produção de H_2O_2 , (Doley & Kini, 2009; Lomonte, *et.al.*, 2009).

Stocker & Traynor, em 1986, descreveram efeitos antibacterianos em venenos de *Naja naja*, *Vipera russelli* e *Crotalus adamanteus* em colônias de *E.coli*. Alguns anos depois, em 1991, Stiles e colaboradores demonstraram que uma variedade de venenos de serpentes africanas, asiáticas, australianas e norte-

americanas apresentam atividade antibacteriana. O veneno bruto e enzimas (LAAO1 e LAOO2) de *Pseudechis australis* são conhecidos por apresentar o mesmo efeito contra bactérias gram (+) e gram (-), sendo 70 vezes mais eficazes contra a ação de *Aeromonas*, do que a tetraciclina (Stiles, *et.al.*, 1991). Torres, *et.al.*, 2010, mostraram o efeito de inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, *Candida albicans* e *S. aureus* provocado pelo veneno de *Bothrops marajoensis*.

No gel de SDS Page (figura 6) e no western blot (figura 7), pode-se identificar a presença de SVMP no pico I. Portanto, existe a possibilidade dessas enzimas influenciarem também na atividade antimicrobiana. Em 2008, Samy e colaboradores avaliaram o efeito antibacteriano de SVMP encontrada em *Agkistrodon halys* em diferentes cepas bacterianas como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva). Em todas as cepas foi observada a atividade, sendo mais efetiva em *S. aureus*, *P. vulgaris* e *P. mirabilis*.

Accary e colaboradores, em 2014 utilizando o veneno de *Montivipera bornmuelleri*, e frações oriundas de cromatografia de exclusão molecular demonstraram a presença de proteínas como metalopeptidases do tipo PIII, serinopeptidase e PLA₂, que apresentaram potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Morganella morganii*. Porém, nenhuma atividade foi observada em colônias de *Enterococcus faecalis*.

5.2 Identificação e caracterização parcial dos peptídeos e inibidores de peptidases

A partir do padrão de migração observado pelas amostras oriundas da cromatografia de exclusão molecular submetidas a eletroforese, definiu-se que as amostras representadas pelos picos V em diante seriam descritas como peptídeos.

Diferentes trabalhos demonstram que essas moléculas de baixa massa podem apresentar atividade inibitória contra diferentes toxinas enzimáticas endógenas presentes no veneno. Assim, alguns ensaios relacionados a essa ação foram realizados como, por exemplo, inibição da atividade fibrinogenolítica desencadeada pelas serinopeptidases endógenas do veneno. Porém, o inibidor tipo Kunitz por nós isolado não apresentou ação inibitória frente a esta atividade.

Alguns autores observaram que proteínas não tóxicas ou peptídeos podem exercer um efeito sinérgico, promovendo o aumento da toxicidade do veneno (Murkhejee, *et.al.*, 2010; Doley & Kini, 2009), como o caso da ruviprase, um inibidor tipo Kunitz identificado no veneno de *Daboia russelli russellii*, que ao ser injetado com outros componentes do mesmo veneno contribuiu para o aumento da letalidade do envenenamento (Thakur, *et.al.*, 2014).

No veneno da serpente *Bungarus multicinctus* foi relatado por Kondo, *et.al.*, 1982 a presença de β -bungarotoxinas. Cada dímero de proteína contém uma subunidade de PLA₂ ligado covalentemente através de uma ponte dissulfeto a uma pequena subunidade descrita como inibidor de peptidase tipo Kunitz. A sequência da subunidade PLA₂ se assemelha a outras fosfolipases A₂ extracelulares encontradas em secreções pancreáticas, exsudatos inflamatórios e certas toxinas. A ação lipolítica das β -bungarotoxinas é responsável pela despolarização da membrana plasmática, que caracteriza sua toxicidade. Entretanto, as pequenas sequências idênticas a aquelas encontradas nos membros pertencentes a família dos inibidores tipo Kunitz não apresentam a capacidade de inibir peptidases. Fernandez, *et.al.*, 2015 descreveram a partir da análise de venômica da espécie de *Micrurus mosquitensis* a presença de toxina heterodimérica contendo o complexo PLA₂-símile/Kunitz que se assemelha a toxina MitTx ativador de ASIC1a/2 (canal sensível a ácido) isolada do veneno de *Micrurus tener*. Dessa maneira, a função do inibidor tipo Kunitz pode estar relacionada a atividade neurotóxica associada a PLA₂.

Nos primórdios, um dos principais objetivos dos toxinologistas era a identificação das principais toxinas, responsáveis pelos efeitos letais ou altamente tóxicos presentes na peçonha. A maioria destes estudos visava uma abordagem estrutural. Assim, muitas toxinas foram purificadas devido a sua atividade tóxica mais destacada. Contudo, pequenas moléculas com efeitos que não são facilmente observados podem ser negligenciadas. Esta situação tem mudado com o advento de técnicas de espectrometria de massas que fornecem maior sensibilidade e resolução e permitem a identificação de peptídeos com atividades biológicas como peptídeos vasoativos, similares a hormônios e fatores de crescimento e antimicrobianos (Pimenta & De Lima, 2005).

O estudo de componentes de baixa massa molecular presentes em venenos de serpentes (peptidomas), é uma área vasta porém, pouco explorada. Alguns peptídeos apresentam similaridades estruturais e funcionais com moléculas fisiológicas humanas. Eles se ligam a receptores alvos, influenciando nos processos fisiológicos vitais como hemostase, coagulação sanguínea e sistemas cardiovascular e nervoso. A alta especificidade, baixa massa molecular (e consequente baixa imunogenicidade), estabilidade estrutural e relativa facilidade de síntese fazem com que os peptídeos sejam uma alternativa promissora para a produção de novos fármacos (Georgieva, *et.al.*, 2008; Calvete, 2009; Munawar, *et.al.*, 2011). Pela cromatografia inicial, o veneno bruto foi separado em doze picos e nas frações V e VIII, foram identificados um peptídeo inibidor do tipo Kunitz e alguns BPPs, respectivamente.

Os inibidores de peptidase do tipo Kunitz, são constituídos por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, exibindo uma ampla variedade de funções fisiológicas como inibidor de peptidase e bloqueador de canal iônico, como o de potássio (Harvey, 2001; Yang, *et.al.*, 2013). Muitos dos peptídeos tipo Kunitz canônicos inibem a quimotripsina através de um sítio anti-peptidase altamente conservado. A especificidade para as serinopeptidases é determinado pelo aminoácido P1 e pequenas diferenças na sequência que interage com a superfície da enzima (Laskowski & Kato, 1980). Inibidores Kunitz/BPTI presentes nos venenos de serpentes podem apresentar um padrão diferente de sequências conservadas. Em Kunitz/BPTI neurotóxicos, a mais importante região responsável pela neurotoxicidade está localizada na região próxima ao domínio C-terminal de dendrotoxinas (Dtxs) e regiões mais expostas da cadeia β de Bungarotoxinas (β -Btxs). Kunitz/BPTI não- neurotóxicos apresentam a região N-terminal mais conservada e não possuem o sítio de anti-peptidase. Assim, esses inibidores apresentam dobramentos semelhantes e funções variadas. Porém, a função fisiológica nas serpentes é ainda desconhecida. Mas, devido a interação com peptidases, é proposto seu envolvimento em processos de coagulação, fibrinólise e inflamação (Pritchard & Dufton, 1999).

Ao realizar uma busca no banco de dados (Uniprot), foram encontrados sessenta peptídeos nomeados como inibidores de peptidase do tipo Kunitz de

serpentes, sendo que três deles são da espécie *Bitis gabonica* (bitisilin 1 a 3), identificadas a partir de transcriptoma por Francischetti, *et.al.*, em 2004.

O sequenciamento N-terminal obtido por degradação de Edman determinou a sequência de vinte aminoácidos com identidade de 90% com o inibidor de peptidase, bitisilin-2- (Uniprot accession number Q6T6S5).

Nos inibidores do tipo Kunitz, existe uma conservação com relação aos dobramentos da cadeia básica e sua conformação. Esta conformação característica é a essência da capacidade de interação com a família de peptidases, como foi observado com diversos inibidores de proteínas geneticamente não relacionados que evoluíram de forma convergente para apresentarem uma arquitetura semelhante aos seus locais sítio específicos na proteína, ou seja, essas especificidades podem ter surgido independentemente em várias ocasiões no decorrer da evolução (Cardle & Dufton, 1997).

Pela análise da sequência foi observada a conservação do sítio ativo na maioria dos peptídeos submetidos ao alinhamento. Um típico inibidor de tripsina apresenta o aminoácido carregado positivamente Arg ou Lys no sítio P1, e quando apresentam Leu, Val ou Ile nesta posição, geralmente são inibidores de elastase (Czapinska, *et.al.*, 2004). Além disso, um inibidor de quimotripsina apresenta resíduos hidrofóbicos como Phe, Leu, Met, Tyr ou Trp no mesmo sítio (Lankowski & Kato, 1980; Guo, *et.al.*, 2013). Desta maneira, a presença de Met no sítio P1 sugere que o peptídeo purificado é um inibidor de quimotripsina.

Para validar essa hipótese, foi realizado o ensaio de determinação da constante de inibição (K_i) por fluorescência. Os diferentes valores de K_i indicaram maior inibição frente à quimotripsina ($K_i=0,07 \mu\text{M}$) do que frente à tripsina ($K_i= 0,3 \mu\text{M}$), corroborando com Lankowski & Kato em 1980.

Estudos realizados por Flight, *et.al.*, 2009, indicaram que a aprotinina, um importante inibidor de serinopeptidase, desencadeia a formação lenta, mas estável de um coágulo. Por isso, o seu uso em cirurgias cardíacas, está associado ao aumento da incidência de infarto do miocárdio, oclusão de veias e choques anafiláticos (Sohda, *et.al.*, 2006).

A textilinina-1, um inibidor de serinopeptidase encontrada no veneno de *Pseudonaja textilis*, apresenta sequência semelhante a da aprotinina e exibe uma estrutura tridimensional típica de BPTI/Kunitz (Millers, *et.al.*, 2006). Em estudos

preliminares a textilina-1 inibiu fortemente a tripsina e plasmina (Flight, *et.al.*, 2005), e reduziu o sangramento em animais modelo (Masci, *et.al.*, 2000).

Além disso, Flight e colaboradores em 2009, indicaram que a textilina-1 promove a formação mais rápida do coágulo, além de apresentar propriedades anti-fibrinogenolíticas reversíveis. Sua atividade inibitória (K_i) foi determinada em presença de tripsina, sendo o valor obtido de 0,76 nM/L.

As mais importantes regiões que determinam a especificidade enzimática e inibição pelos BPTI/Kunitz são os resíduos P1 e P1'. Na textilina-1, por exemplo, são encontrados os resíduos arginina e valina. As propriedades hidrofóbicas e as cargas desses resíduos são observados também nas posições de cargas positivas encontradas na aprotinina. Esses dois resíduos, na aprotinina, se destacam na superfície da molécula e atuam inserindo suas cadeias laterais na região específica da fenda ou "bolso" da superfície da enzima. Na textilina-1, ambos os resíduos são maiores e por essa razão, esse peptídeo pode apresentar especificidade inibitória mais restrita. Assim, a presença de cadeias laterais maiores para P1 e P1' na textilina-1 enfraquece a ligação para algumas serinopeptidases em comparação com a aprotinina (Millers, *et.al.*, 2009).

A maioria das sequências que apresentaram identidade com a obtida por degradação de Edman, com exceção da bitisilina-2, são de serpentes do gênero *Daboia*. Em 2014, Mukherjee e colaboradores, caracterizaram funcionalmente um BPTI/ Kunitz nomeado de rusvikunin, peptídeo básico com 6,9 kDa, purificado do veneno de *Daboia russellii russellii* e que apresenta atividades anti-plasmina e anti-trombina. Além das atividades descritas anteriormente, algumas destas toxinas podem apresentar uma atividade citotóxica em células tumorais.

Estudo realizado por Morjen e colaboradores em 2013, com o inibidor tipo Kunitz (PIVL), isolado do veneno de *Macrovipera lebetina* demonstrou um efeito antitumoral de maneira dose-dependente, inibindo a adesão, migração e invasão de células U87 de glioblastoma humano. Os resultados mostrados pelo grupo apontaram a influência do peptídeo sobre integrinas, principalmente do tipo $\alpha V\beta 3$ e menos destacado em $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$, indicando a importância do domínio localizado entre os aminoácidos R-G-N da posição 41-43 para tal

efeito, sendo essa sequência tripeptídica bem descrita em moléculas chamadas disintegrinas.

Os tumores apresentam alta expressão de receptores integrinas, que são glicoproteínas heterodímeras de subunidades α e β , ligados não-covalentemente, que interagem especificamente com proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, a fibronectina e a laminina. A interação com a membrana basal é essencial para a integridade estrutural e funcional do tecido, modulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células (Mangini, *et.al.*, 2002). Mudanças na expressão de receptores integrinas de fibronectinas são observadas em alguns tipos de fibroblastos e alterações no padrão de expressão desses receptores são apresentados em diversas células tumorais (Plantefaber e Hynes, 1989). Os processos de migração, proliferação e desenvolvimento tumoral são influenciados por fatores de crescimento produzidos pelos tecidos do hospedeiro, os quais podem interagir com as integrinas (Honn e Tang, 1992).

As disintegrinas são representantes de uma família de polipeptídeos presentes em vários venenos de serpentes que atuam seletivamente bloqueando a função das integrinas. São geralmente constituídas de motivos RGD localizados próximos à região C-terminal. Integrinas como a $\alpha 5 \beta 1$ ou $\alpha v \beta 3$, apresentam sítio de ligação para o domínio RGD de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, ou Fator von Willebrand (Ruoslahti, 1996). A principal função dessas integrinas RGD dependentes no câncer já foi abordada usando várias disintegrinas com esses domínios (Eble & Tuckwell, 2006). Entretanto, ligantes KGD, RTS, KTS, MGD, WGD e ECD também já foram identificados (McLane, 2004 e Calvete, 2003). Eble e Bruckner, 2003 descreveram a ação de lebeína 1 e 2, duas disintegrinas presentes no veneno de *Vipera lebetina*, capazes de inibir especificamente a integrina $\alpha 2 \beta 1$.

Baseando-se na sequência adquirida por degradação de Edman, não foram observados tripeptídeos com sequência semelhante aos responsáveis pela ligação as integrinas. Entretanto, não foi obtida a sequência completa do peptídeo, em virtude disso não se pode descartar tal hipótese.

Além do inibidor citado anteriormente (PIVL), outra molécula nomeada de BJ46a, comumente conhecida por ser um inibidor de metalopeptidase também

apresenta atividade citotóxica, com a capacidade de inibir a invasão e metástase em células B16F10 e carcinoma hepatocelular humano MHCC97H (Tian, *et.al.*, 2013).

Ao realizarmos uma comparação entre a sequência peptídica do BPTI/Kunitz obtido com a molécula encontrada em *Bitis gabonica* (bitisilin-2), observa-se séries de aminoácidos polares básicos, especialmente lisina, que determina uma característica básica a molécula.

Vários trabalhos relatam a atividade citotóxica de biomoléculas catiônicas, como Araya & Lomonte em 2007, que descreveram redução de crescimento celular em linhagens de B16, carcinoma mamário EMT6, sarcoma S-180, mieloma P3X e células endoteliais tEnd. Os peptídeos de caráter básicos testados foram: KKYKAYFKLKCKK e KKWRWWLKALAKK, derivada de PLA₂ de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e miotoxina II de *Bothrops asper*, respectivamente.

Experimentos mostram que o efeito citotóxico associado as toxinas de serpentes são específicos com relação as espécies, gêneros e alvos teciduais. Assim, os venenos são agrupados de acordo com sua atividade patofisiológica: (I) venenos podem causar alterações irreversíveis nas células, destruindo-as totalmente (incluindo os venenos de Elapidae); (II) venenos crotálicos podem causar redução da viabilidade celular, e (III) venenos de Viperidae podem causar alteração na agregação celular. *In vivo*, foi demonstrado que o veneno de *Naja nigricollis* inibiu o crescimento de melanoma através de um desses mecanismos. Deste modo, esses achados fornecem uma nova direção e provável aplicação de veneno de serpentes ou toxinas isoladas para o tratamento do câncer (Borkow, *et.al.*, 1992).

No ensaio de viabilidade celular, em cultura de melanoma murino B16F10, foi observada a atividade citotóxica nas amostras referentes ao pico V e XII, sendo considerado um BPTI/Kunitz e moléculas de baixa massa (<6 kDa), respectivamente. Pela análise dos gráficos (figuras 22 e 23), foi possível avaliar a redução de viabilidade celular, em diferentes concentrações partindo-se de 2 mg/mL, além da obtenção do valor de IC₅₀ de 5 µg/mL e 71,97 µg/mL.

Considerando a posologia indicada na bula de alguns fármacos comumente utilizados no tratamento de melanoma, como a cisplatina e a

vimblastina, geralmente é utilizada a concentração de 3,7 mg/m², sendo administrada por infusão intravenosa. Assim, ao considerarmos que um indivíduo adulto apresenta em torno de 1,8m², o paciente irá receber 6 mg do fármaco. Portanto, os baixos valores de IC50 obtidos indicam que ambas as moléculas apresentam potencial terapêutico para o tratamento antineoplásico.

Dentre os atributos farmacológicos associados as toxinas está a sua atividade antimicrobiana. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as infecções bacterianas estão entre as dez maiores causadoras de morte no mundo. O surgimento de bactérias resistentes faz com que o risco dessas infecções se tornam um problema universal com efeitos deletérios (Lopez, *et.al.*, 2006).

Os antibióticos são representados por moléculas que apresentam a capacidade de inibir o crescimento (efeito bacteriostático) ou causar a morte das bactérias (efeito bactericida) (Chopra, *et.al.*, 2002). Atualmente, os antibióticos sintéticos são conhecidos como quimioterápicos, e exibem diferentes mecanismos de ação, cuja a produção é realizada por indústrias farmacêuticas do mundo inteiro. De fato, o controle dos efeitos deletérios dos microorganismos foi reduzido significativamente a partir da introdução de sulfonamidas (quimioterápico) e a penicilina (antibiótico) em 1936 e 1941, respectivamente (Brown, 2004). Esses fármacos foram cruciais para a redução da incidência de infecções bacterianas como meningite, endocardite, pneumonia e gonorréia (Chopra, *et.al.*, 2002).

O entendimento dos mecanismos e alvos envolvidos no processos fisiológicos bacterianos é essencial. Dentre eles, a inibição na formação da membrana celular, nucleotídeos e ligações peptídicas que interferem diretamente na sobrevivência, replicação cromossômica e síntese de proteínas da bactéria (Brown, 2004). Portanto, os antibióticos podem atuar no aumento da permeabilidade celular ou inibição através da ligação aos ribossomos, impedindo a polimerização e formação de proteínas (Brown, 2004).

Componentes proteicos como as neutotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, peptidases e nucleases são encontradas em quantidades variadas em venenos de serpentes. Por exemplo, as miotoxinas básicas PLA₂ (miotoxina II) de *Bothrops asper* (Rodrigues, *et.al.*, 2004) e Bnp Tx I de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentam atividade bactericida contra *E.coli* e *S. aureus*. Juntamente com a

forte atividade hemolítica contra eritrócitos, o peptídeo policatiônico magainina símile (pandinina 1 e 2) encontrado em escorpiões africanos *Pandinus imperator* demonstrou alta atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias gram (+) e (-) (Corzo, *et.al.*, 2001), atividade essa apresentada também pelas defensinas, que incluem a atividade contra bactérias resistentes a antibióticos (Ganz, 2003; Selsted & Ouellett, 2005). Estudo realizado por Torres & Kuchel em 2004, demonstrou que o mecanismo de ação mediado pelas defensinas é baseado na interação eletrostática que ocorre entre o peptídeo catiônico e os componentes da membrana bacteriana que possuem carga negativa, seguido da inserção do peptídeo, formação de canal e rompimento da membrana. Portanto, é sugestivo que a característica da molécula de apresentar carga positiva é importante para a interação com a membrana bacteriana.

O pico V, representa o peptídeo identificado no presente trabalho como sendo análogo ao inibidor tipo Kunitz, nomeado de bitisilin 2, já descrito em veneno de serpentes da espécie *Bitis gabonica*. O peptídeo por nós isolado possui dentre várias características a presença de aminoácidos básicos conforme evidenciado pelo sequenciamento por degradação de Edman e pela cromatografia catiônica, massa molecular de 7,02 kDa, indicada pelo espectro do MALDI-ToF e no ensaio preliminar de atividade antimicrobiana, assim como ocorreu com o pico I, apresentou uma ação antimicrobiana em culturas de *M.luteus* e *E.coli*.

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas que apresentam massa molecular geralmente abaixo de 10 kDa, sobretudo catiônicos, hidrofóbicos e que interagem com a membrana. Os AMPs são comumente organizados em grupos baseando-se no seu tamanho, apresentam estrutura secundária variada como α -hélice, folhas β e β -turn e presença de pontes dissulfeto. Esses peptídeos exibem propriedades variadas como: bactericida, fungicida, antiviral e antitumoral, indicando que essas moléculas são candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos (Bals, 2000).

Pela interpretação do espectro de massas obtido por MALDI-ToF, observa-se a presença de peptídeos com massa molecular de 3,244.3 Da e 3,532 Da, que são característicos de peptídeos antimicrobianos chamados de catelicidinas.

Em 2008, Wang e colaboradores isolaram e caracterizaram uma catelicidina encontrada no veneno de *B. fasciatus*. A família das catelicidinas é sintetizada na forma de um precursor contendo um domínio catelina, constituído por uma região conservada N-terminal aniônica e que é inibidor de catepsina L, composto por aproximadamente 100 resíduos, flanqueado por um peptídeo sinal de cerca de 30 aminoácidos (Zanetti, 2004; Durr, *et.al.*, 2006). Este precursor contém ainda, na região C terminal, um polipeptídeo cationico com atividade antimicrobiana, a catelicidina.

A catelecidina isolada por Wang e colaboradores em 2008, foi denominada de catelicidina- BF, com massa molecular de 3,637.5 Da, e ponto isoeletrico de 11,79, constituído por 30 resíduos de aminoácidos, incluindo resíduos básicos (lisinas e argininas), fenilalaninas e somente um único resíduo ácido (ácido glutâmico). A estrutura secundária foi definida a partir de dicroísmo circular, indicando predominantemente a conformação do tipo α -hélice anfipática. O peptídeo catelecidina-BF demonstrou intensa atividade antimicrobiana, sendo mais eficiente em bactérias Gram-negativas e também contra bactérias resistentes como a *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* e *Salmonella typhi*. Além disso, a catelicidina-BF também foi efetiva contra fungos como a *Candida albicans* ATCC2002 e *Pichia pastoris*. Portanto, a atividade antimicrobiana observada pelo pico V, como indicada pela figura 30-B e C, pode ser justificada pela presença de peptídeos catiônicos como o inibidor tipo Kunitz e pela presença de moléculas, que a partir dos resultados obtidos por espectrometria de massas, são sugestivos da existência de catelecidinas.

Apesar de outros picos de baixa massa molecular não apresentarem a mesma atividade, foi realizado o ensaio do tipo ELISA, com o uso do anticorpo policlonal anti-crotamina. A crotamina é um peptídeo catiônico com 42 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4,9 kDa e valor de pI 9,5 (Oguiura, *et.al.*, 2005) pertencente a família de miotoxinas básicas encontradas em venenos de cascavéis sulamericanas. Essas toxinas provocam paralisia do membro posterior em camundongos, seguida de mionecrose no músculo esquelético (Oguiura, *et.al.*, 2005), sendo consideradas homólogas as β -defensinas. A conformação estrutural e o pareamento entre as cisteínas são semelhantes entre ambos os grupos peptídicos. Porém, possuem baixa

similaridade no que se refere à sequência de aminoácidos e atividades biológicas (Fadel, *et.al.*, 2005).

Considerando que o anticorpo anti-crotamina usado no ensaio imunoenzimático era policlonal, a imunoreatividade observada pode ser decorrente de epitopos compartilhados entre a miotoxina e as beta-defensinas, sugerindo assim, a presença de β -defensinas no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*. Porém, até o momento não há relatos da presença de β -defensinas em serpentes *Viperinae*.

Serpentes do gênero *Bitis* são responsáveis por causar envenenamentos graves na África Sub-Saariana. Dentre os sintomas observados, é descrita exarcebada hipotensão (Lavonas, *et.al.*, 2002). Alguns estudos associavam a hipotensão presente nas vítimas com hemorragias na região da picada (Chapman, *et.al.*, 1968), mas as mortes ocorridas por diferentes pacientes devido ao colapso do sistema circulatório não demonstravam perda de sangue, sugerindo outro mecanismo responsável por tal atividade (Warrel, *et.al.*, 1975).

Os efeitos cardiovasculares provocados pelo veneno de *Bitis gabonica* foram primeiramente descritos por Whaler em 1972, que observou que pequenas doses do veneno, quando injetadas pela via intravenosa induziam rapidamente uma abrupta hipotensão seguida de uma recuperação da pressão sanguínea. Em altas doses, os animais morriam após um período de progressiva hipotensão seguida de insuficiência cardíaca (Marsh & Whaler, 1984).

A hipertensão é o resultado da associação de diferentes fatores de risco como o ambiental e genético (Majunder & Wu, 2014) tendo a ACE uma função essencial na regulação da pressão sanguínea (Zhuo, *et.al.*, 2013). O mecanismo de regulação cardiovascular é realizado a partir de diferentes sistemas bioquímicos, e um dos mais importantes que podemos destacar é o sistema Renina Angiotensina (SRA), o SRA é um regulador fisiológico importante que atua através de vias endócrinas, parácrinas (afetando células vizinhas), autócrinas (afetando a mesma célula) e intracrina (afetando compartimentos intracelulares), localmente nos tecidos ou em nível subcelular (Wolf & Neilson, 1996).

Atualmente, o SRA é tido como o maior sistema hormonal envolvido no controle das funções cardiovasculares e renais. Estudos realizados no decorrer

das últimas décadas estabeleceram a função desse sistema, não somente associado as funções clássicas conhecidas mas, também no controle da função da adrenal, do balanço entre fluídos e eletrólitos e da pressão arterial, que consiste numa cascata de reações químicas que se inicia com a liberação de renina (Ferrario, 2010).

A renina é uma enzima com atividade hidrolítica, composta por aproximadamente 350 aminoácidos, produzida e armazenada sob a forma inativa (pró-renina), nas células renais justaglomerulares (Ondetti & Cushman, 1982).

O Angiotensinogênio (AGT), glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, é produzido por diferentes tecidos como o adiposo ou em órgãos como o cérebro e fígado. Essa molécula é cataliticamente clivada pela renina, uma aspartil endopeptidase, e quando clivada na sua porção N-terminal resulta na liberação do decapeptídeo (Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) Angiotensina I, em resposta a redução da pressão sanguínea. Nos pulmões, a enzima conversora de Angiotensina (ACE), em seguida remove o dipeptídeo (His-Leu) para produzir Angiotensina II. Este octapeptídeo estimula a síntese de Aldosterona pelo córtex suprarrenal, que promove a redução de excreção de sal e água pelos rins, desencadeando o aumento da pressão sanguínea. (Li, *et.al.*, 2004).

A Ang II atua através de dois tipos de receptores: tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) (Keidar, *et.al.*, 2007). Apesar de possuírem concentrações circulantes similares, as consequências de suas ligações ao Ang II são opostas (Touyz, 2003). O receptor AT1 é altamente expresso em adultos e a ligação da Angiotensina II ao receptor AT 1 resulta em vasoconstrição, proliferação, inflamação (Schelling, *et.al.*, 1991), coagulação e remodelação da matriz extracelular (Vaughan, 2001). A ligação de Ang II ao receptor AT2 promove ações opostas e poucos conhecidas com efeito cardioprotetor (Anavekar & Salomon, 2005).

A ACE é uma zinco metalopeptidase, dependente de íons Cl^- capaz de clivar os dois últimos aminoácidos da porção C-terminal de vários substratos, com exceção dos que apresentam um resíduo de prolina na penúltima posição da cadeia polipeptídica (Yang, *et.al.*, 1970). Esta enzima interfere em diferentes

funções como fertilidade, inflamação, desenvolvimento de órgão e regeneração tecidual (Woodman, *et.al.*, 2000).

A ACE é expressa em duas isoenzimas: germinal, expressa somente nas células dos testículos (tACE), com 90 a 100 kDa, composta por apenas um domínio (domínio-C) e apenas um sítio catalítico e a isoforma somática (sACE), com 150 a 180 kDa, expressa na maioria dos tecidos e no plasma com dois domínios, classificados com N e C, cada um com um sítio catalítico e propriedades bioquímicas distintas (Pan, *et.al.*, 2011), sendo o C-domínio dependente do íon Cl^- (Guang, *et.al.*, 2012). Ambos os domínios participam na hidrólise dos substratos Ang I e bradicinina (BK). Portanto, os inibidores de ACE podem atuar em ambos os domínios porém, com atividades modulatórias distintas. O C-domínio promove maior eficiência catalítica na conversão da Ang I em Ang II. Porém, na degradação do substrato BK, ambos os domínios apresentam o mesmo poder de catálise (Bernstein, *et.al.*, 2011; Fuchs, *et.al.*, 2008). Assim, inibidores que apresentam seletividade para cada domínio da ACE têm sido mais bem investigados com o objetivo de elucidar a função específica que cada um dos domínios desempenha para promover a redução da pressão arterial (Acharya, *et.al.*, 2003; Akif, *et.al.*, 2010).

As drogas sintéticas como o Captopril, Enalapril e Lisinopril são potentes inibidores da ACE, que auxiliam na redução da pressão arterial em indivíduos com hipertensão e, portanto diminuem o risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral, melhorando o prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca e diabetes (Sica & Gehr, 2005).

A ACE apresenta um papel importante como promover a inativação do peptídeo vasodilatador bradicinina (BK) e da Lys-BK, através da remoção do dipeptídeo C-terminal interligando os SRA e sistema Caliceína cininas (Yang, *et.al.*, 1970). Portanto, as Angiotensinas, bradicinina e Lys-BK são importantes reguladores da pressão arterial e resposta inflamatória (Ryan, 1988).

O Sistema Caliceína-Cinina atua na regulação de BK e outras cininas, promovendo a redução da pressão arterial, através da vasodilatação, natriurese e moduladores de crescimento vascular. Estudos realizados por Rocha e Silva e colaboradores em 1949 com o veneno de *Bothrops jararaca* levaram ao maior entendimento sobre os mecanismos envolvidos no Sistema Caliceína Cinina,

através da identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) ou oligopeptídeos ricos em Prolina (PROs) (Hawgood, 1997).

O primeiro BPP isolado a partir do veneno de *B.jararaca* tornou-se o precursor para a produção de agentes anti-hipertensivo como Captopril ou Lisinopril (Cushman & Ondetti, 1999). Após a descoberta dos primeiros BPP, homólogos desses peptídeos ricos em prolina tem sido isolados de diferentes venenos de serpentes.

Através do ensaio de determinação da constante de inibição (K_i) foi possível identificar a atividade inibitória frente a ACE presente no peptídeo identificado como um BPP, de sequência não-canônica A-P-Q-E-R-G-P-P-E-I-P-P. A constante de inibição obtida foi de 1 μ M porém, o fármaco Captopril, por exemplo, apresenta um valor de K_i para a ACE de 0,046 μ M (Gomes, *et.al.*, 2007). Assim, apesar da capacidade de inibição estar fortemente associada a presença de aminoácidos hidrofóbicos na região C-terminal, é possível que haja a influência da conformação do inibidor para a sua eficiência inibitória.

A bradicinina, assim como outras cininas apresenta diferentes ações farmacológicas como, por exemplo, promover a alteração da permeabilidade vascular. A queda da pressão sanguínea induzida por Bk é resultado da diminuição da resistência vascular em diferentes órgãos como o coração, rim, intestino, músculo esquelético e fígado. A capacidade de alterar a permeabilidade vascular ocorre principalmente em vasos periféricos, como as vênulas e envolve a separação das junções entre as células endoteliais.

As cininas desencadeiam o aumento do fluxo no leito capilar, favorecendo a saída de líquido do sangue para os tecidos. O efluxo pode ser facilitado por variados fatores como: o aumento da permeabilidade dos vasos em consequência da formação de poros no endotélio vascular, aumento da pressão venosa, como consequência da constrição das veias, permitindo a passagem de água e solutos como proteínas, do sangue para o líquido extracelular, aumentando o fluxo de linfa, que como consequência há formação de edema. Portanto, uma das maneiras de se avaliar a atividade da bradicinina é através da análise edematogênica (De Lucia, 2008). Por isso, o peptídeo sintético foi submetido ao ensaio de atividade edematogênica em ratos Wistar.

Através da análise do gráfico é possível observar a influência do BPP potencializando a atividade edematogênica inerente da bradicinina. O acúmulo de BK, pôde induzir uma maior vasodilatação e permeabilidade vascular. Consequentemente, a presença do BPP promoveu um aumento significativo da formação do edema.

Estudo realizado por Fernandes, *et.al.*, 1991, utilizando uma metodologia semelhante a adotada no presente trabalho, mostrou que o peptídeo KPP foi 25 vezes mais ativo que o BPP9a, na formação de edema desencadeada pela BK e como o BPP9a, o peptídeo KPP é específico para potencializar cininas formadoras de edema, não sendo efetiva para histamina ou serotonina.

Além do BPP não canônico, foram identificados, pelo sequenciamento *de novo*, mais dois BPPs no veneno de *Bitis gabonica rhinoceros*. Uma das sequências é um típico BPP (<ENWPRPQIPP), com a presença do tripeptídeo Ile-Pro-Pro na região C-terminal, homólogo ao peptídeo BPP-10b encontrado no veneno de *Bothrops jararaca*.

Atualmente, mais de 19 BPPs já foram descritos na glândula venenífera, no veneno e no tecido nervoso de *B.jararaca* (Campeiro, *et.al.*, 2005). A ação hipotensora de BPPs de veneno de serpente foi demonstrada em modelos animais indicando a capacidade de potencializar o efeito farmacológico da bradicinina, como a contração do íleo isolado de cobaia e ação anti-hipertensiva em humanos (Krieger, *et.al.*, 1971; Gavras, *et.al.*, 1974). Entretanto, apesar da elevada homologia entre as sequências de aminoácidos, os variados BPPs podem apresentar diferenças funcionais notáveis. Por exemplo, os BPP-11e e BPP-12b exibem diferentes atividades biológicas, assim como seletividade e a capacidade de inibição no sítio ativo da ACE (Hayashi, *et.al.*, 2005). O mesmo grupo em 2003, demonstrou também por atividade biológica, a capacidade de potencialização da bradicinina exercida pelo peptídeo BPP10-b (Hayashi, *et.al.*, 2003). Além da sequência com alta porcentagem de identidade (90%), outros dois BPPs foram observados no veneno de *B.gabonica rhinoceros*, sugerindo a presença de diferentes isoformas. Em 2011, Munawar e colaboradores identificaram, no veneno de *Vipera a. meridionalis*, a presença do aminoácido valina na porção C-terminal, ao invés da isoleucina seguidas de duas prolinas(

XXXXVSPK/QVPP), este padrão também foi observado em BPPs de *Vipera berus* (Komori & Sugihara, 1990).

A diversidade de BPPs em um único veneno pode ser justificada pela ocorrência de duplicações gênicas e mutações aceleradas dentro do domínio de BPP no decorrer da evolução da serpente (Hayashi & Camargo, 2005). Este processo pode ser observado em toxinas, como as fosfolipases A₂, sugerindo uma evolução acelerada do tipo Darwiniana (Nakashima, *et. al.*, 1995).

Da mesma forma, como ocorre nas PLA₂, a aquisição de tal diversidade de isoformas de BPPs bioativos deve garantir uma forte vantagem seletiva, e reflete variações genético-ambientais, determinada pelas experiências alimentares (Hayashi & Camargo, 2005). Assim, os precursores presentes na glândula de veneno devem fornecer um conjunto de toxinas eficientes capazes de alterar a integridade fisiológica da presa, com o objetivo de alimentação ou defesa contra predadores (Ohno, *et.al.*, 1998).

A evolução molecular de cada toxina presente no veneno foi necessária para melhorar a sua capacidade tóxica, baseando-se na ação sinérgica de todas as toxinas, promovendo o descontrole da homeostase da presa. Por outro lado, demonstrou-se que a estrutura de diversas toxinas conhecidas evoluíram de moléculas endógenas do próprio animal peçonhento (Fry, *et.al.*, 2006), com o objetivo de se adaptar a diferentes alvos, como canais iônicos, enzimas e receptores, definindo uma estratégia especial de envenenamento (Lewis & Garcia, 2003). A biodiversidade de toxinas animais, como os peptídeos do veneno, torna-os uma fonte rica de modelos a partir dos quais novos agentes terapêuticos são desenvolvidos. A identificação e a caracterização dessas moléculas de baixa massa molecular são campos de estudo ainda pouco explorados.

As nossas análises das toxinas presentes no veneno de *B.g. rhinoceros* indicam um conteúdo rico e complexo que auxilia na busca de novas moléculas bioativas para fins farmacêuticos.

6. CONCLUSÃO

Foram identificadas e caracterizadas peptidases com atividades: caseinolítica, fibrinogenolítica, não-gelatinolítica e antimicrobiana.

Os peptídeos identificados e caracterizados foram: inibidor tipo Kunitz com atividade inibitória frente a serino peptidase, peptídeo similar à β -defensina, BPP homólogo ao encontrado em serpentes do gênero *Bothrops* e BPP não canônico com ação de potencializar bradicinina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, K. Ravi et al. ACE revisited: a new target for structure-based drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 891-902, 2003.

AKIF, Mohd et al. High-resolution crystal structures of *Drosophila melanogaster* angiotensin-converting enzyme in complex with novel inhibitors and antihypertensive drugs. **Journal of molecular biology**, v. 400, n. 3, p. 502-517, 2010.

ANAVEKAR, Nagesh S.; SOLOMON, Scott D. Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodelling. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 6, n. 1, p. 43-48, 2005.

ASSAKURA, Marina T.; REICHL, Antonia P.; MANDELBAUM, Fajga R. Isolation and characterization of five fibrin (ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, v. 32, n. 7, p. 819-831, 1994.

BALS, Robert. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respiratory research**, v. 1, n. 3, p. 141, 2000.

BEE, A. et al. Novel in vitro assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1429-1434, 2001.

BENNACEF-HEFFAR, Nouara; LARABA-DJEBARI, Fatima. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 81, n. 12, p. 1110-1117, 2003.

BERNSTEIN, Kenneth E. et al. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 2011.

BJARNASON, Jon Bragi; FOX, Jay William. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BORKOW, Gadi; CHAIM-MATYAS, Adina; OVADIA, Michael. Binding of cytotoxin P4 from *Naja nigricollis* to B16F10 melanoma and WEHI-3B leukemia cells. **FEMS microbiology immunology**, v. 5, n. 1-3, p. 139-145, 1992.

BORTOLETO, Raquel K. et al. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1307-1312, 2002.

BROWN, K. The history of penicillin from discovery to the drive to production. **Pharmaceutical historian**, v. 34, n. 3, p. 37, 2004.

BURKE, John E.; DENNIS, Edward A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009.

BURKHART, William et al. Amino acid sequence determination of Ancrod, the thrombin-like α -fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodostoma*. **FEBS letters**, v. 297, n. 3, p. 297-301, 1992.

CALVETE, J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem. J**, v. 372, p. 725-734, 2003.

CALVETE, Juan J.; ESCOLANO, Jose; SANZ, Libia. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 7, p. 2732-2745, 2007.

CALVETE, Juan J. Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 121-126, 2009.

CAMPEIRO, Joana D.'Arc et al. Identification of snake bradykinin-potentiating peptides (BPPs)-simile sequences in rat brain–Potential BPP-like precursor protein?. **Biochemical pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 202-215, 2015.

CARDLE, Linda; DUFTON, Mark J. Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: how do variants from snake venom differ?. **Protein engineering**, v. 10, n. 2, p. 131-136, 1997.

CHAPMAN, D. S. The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of Central and Southern Africa. **Venomous animals and their venoms**, v. 1, p. 463-527, 1968.

CHEUNG, Hong-Son et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 2, p. 401-407, 1980.

CHOPRA, Ian; HESSE, Lars; O'NEILL, Alexander J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. s1, 2002.

CHOU, Wen-Min et al. Structure–function studies on inhibitory activity of Bungarus multicinctus protease inhibitor-like protein on matrix metalloprotease-2, and invasion and migration of human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 353-360, 2010.

CORREA, Poliana G.; OGUIURA, Nancy. Phylogenetic analysis of β -defensin-like genes of Bothrops, Crotalus and Lachesis snakes. **Toxicon**, v. 69, p. 65-74, 2013.

CORZO, Gerardo et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion Pandinus imperator. **Biochemical Journal**, v. 359, n. 1, p. 35-45, 2001.

CURRIER, Rachel B. et al. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (Bitis arietans): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 864-873, 2010.

CZAPINSKA, Honorata et al. Crystal structures of five bovine chymotrypsin complexes with P1 BPTI variants. **Journal of molecular biology**, v. 344, n. 4, p. 1005-1020, 2004.

CURRIER, Rachel B. et al. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (Bitis arietans): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 864-873, 2010.

DALLA VALLE, Luisa et al. Bioinformatic and molecular characterization of beta-defensins-like peptides isolated from the green lizard Anolis carolinensis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 222-229, 2012.

DE LUCIA, Roberto. **Farmacologia integrada**. Clube de Autores, 2008.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DÜRR, Ulrich HN; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1408-1425, 2006.

EARL, Stephen TH et al. Drug development from Australian elapid snake venoms and the Venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), Haempatch™(Q8009) and CoVase™(V0801). **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 456-463, 2012.

EBLE, Johanna; TUCKWELL, Danny. The $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin $\alpha 2$ subunit proximal to the collagen-binding site. **Biochem. J**, v. 376, p. 77-85, 2003.

ESCALANTE, Teresa et al. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 455, n. 2, p. 144-153, 2006.

ESCALANTE, Teresa et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781-1794, 2011.

FADEL, Valmir et al. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 759-767, 2005.

FASOLI, Elisa et al. Exploring the venom proteome of the African puff adder, *Bitis arietans*, using a combinatorial peptide ligand library approach at different pHs. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 5, p. 932-942, 2010.

FERNANDES, P. D.; GUIMARÃES, J. A.; ASSREUY, J. Comparative effects of two potentiating peptides (KPP and BPP9a) on kinin-induced rat paw edema. **Agents and actions**, v. 32, n. 3-4, p. 182-187, 1991.

FERNÁNDEZ, Julián et al. Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. **Toxicon**, v. 107, p. 217-233, 2015.

FERRARIO CM. New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. **Hypertension**, v.55, n.11.p. 445-52, 2010.

FERREIRA, LA Faria et al. Isolation: Analysis and Properties of Three Bradykinin–Potentiating Peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) From *Bothrops Neuwiedi* Venom. **Journal of protein chemistry**, v. 17, n. 3, p. 285-289, 1998.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163-169, 1965.

FLIGHT, Simone et al. Comparison of textilinin-1 with aprotinin as serine protease inhibitors and as antifibrinolytic agents. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 188-193, 2006.

FLIGHT, Simone M. et al. Textilinin α 1, an alternative anti α bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss. **British journal of haematology**, v. 145, n. 2, p. 207-211, 2009.

FOX, Jay W.; SERRANO, Solange MT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metallopeptidases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

FRANCIS, Brian; KAISER, Ivan I. Inhibition of metalloproteinases in Bothrops asper venom by endogenous peptides. **Toxicon**, v. 31, n. 7, p. 889-899, 1993.

FRANCISCHETTI, Ivo MB et al. Bitis gabonica (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55-69, 2004.

FRY, Bryan G. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403-420, 2005.

FRY, Bryan G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 584-588, 2006.

FUCHS, Sebastien et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 267-274, 2008.

GANZ, Tomas. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 710-720, 2003.

GAVRAS, Haralambos et al. An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. **New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 16, p. 817-821, 1974.

GRAHAM, Robert Leslie James et al. Adenosine in the venoms from viperinae snakes of the genus Bitis: identification and quantitation using LC/MS and CE/MS. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 333, n. 1, p. 88-94, 2005.

GEORGIEVA, Dessislava; ARNI, Raghuvir K.; BETZEL, Christian. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert review of proteomics**, v. 5, n. 6, p. 787-797, 2008.

GILQUIN, Bernard et al. Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: solution structure of the Ca²⁺ channel blocker calcicludine. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 34, n. 4, p. 520-532, 1999.

GOMES, Claudiana L. et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure–function relationship of BPPs. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 9, p. 1350-1360, 2007.

GOMES, Antony et al. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal Experimental Biology**, v.48, p.93-103, 2010.

GOMIS-RÜTH, F. Xavier et al. Structures of adamalysin II with peptidic inhibitors. Implications for the design of tumor necrosis factor alpha convertase inhibitors. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 7, n. 2, p. 283, 1998.

GOWDA, D. C. et al. Factor X-activating glycoprotein of Russell's viper venom. Polypeptide composition and characterization of the carbohydrate moieties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 14, p. 10644-10650, 1994.

GUANG, Cuie et al. Three key peptidases—angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin—within and beyond the renin-angiotensin system. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 105, n. 6, p. 373-385, 2012.

GUO, Chun-teng et al. Purification, characterization and molecular cloning of chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Burmese Daboia russellii siamensis. **Peptides**, v. 43, p. 126-132, 2013.

GUTIÉRREZ, José María et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

HAWGOOD, Barbara J. Mauricio Rocha e Silva MD: snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. **Toxicon**, v. 35, n. 11, p. 1569-1580, 1997.

HARVEY, Alan L. Twenty years of dendrotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 15-26, 2001.

HIGUCHI, Shigesada et al. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of Crotalus durissus collilineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 107-121, 2006.

HONN, Kenneth V.; TANG, Dean G. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 11, n. 3-4, p. 353-375, 1992.

HOWARD, Linda et al. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. **Biochemical Journal**, v. 317, n. 1, p. 45-50, 1996.

HUANG, Tur-Fu et al. Purification and characterization of an antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1074, n. 1, p. 136-143, 1991.

HUNG, Chin-Chun; CHIOU, Shyh-Horng. Isolation of multiple isoforms of α -fibrinogenase from the Western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*: N-terminal sequence homology with Ancrod, an antithrombotic agent from Malayan viper. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 201, n. 3, p. 1414-1423, 1994.

IANZER, Danielle et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, n. 7, p. 1085-1092, 2004.

JASPARD, Emmanuel; WEI, Lei; ALHENC-GELAS, Franpois. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9496-9503, 1993.

JENNINGS, B. R. et al. A novel high molecular weight fibrinogenase from the venom of *Bitis arietans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1427, n. 1, p. 82-91, 1999.

JOSE, Biju et al. Exenatide once weekly: clinical outcomes and patient satisfaction. **Patient preference and adherence**, v. 4, p. 313, 2010.

JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J. Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327-338, 2004.

KAMIGUTI, Aura S.; CHARLES, R. M.; ZUZEL, Mirko. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 2, p. 635-641, 1996.

KANG, Tse Siang et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **Febs Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.

KASTURIRATNE, Anuradhani et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008.

KEIDAR, Shlomo; KAPLAN, Marielle; GAMLIEL-LAZAROVICH, Aviva. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1–7). **Cardiovascular research**, v. 73, n. 3, p. 463-469, 2007.

KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1387-1422, 1990.

KINI, R. Manjunatha. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A 2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005.

KOEHN, Frank E.; CARTER, Guy T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KORDIŠ, Dušan; GUBENŠEK, Franc. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Gene**, v. 261, n. 1, p. 43-52, 2000.

KOMORI, Yumiko; SUGIHARA, Hisayoshi. Characterization of a new inhibitor for angiotensin converting enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis*. **International Journal of Biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 767-771, 1990.

KRIEGER, E. M. et al. Potential screening test for detection of overactivity of renin-angiotensin system. **The Lancet**, v. 297, n. 7693, p. 269-271, 1971.

KWONG, Peter D. et al. Structure of β 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. **Structure**, v. 3, n. 10, p. 1109-1119, 1995.

LAEMMLI, Ulrich K. et al. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LASKOWSKI JR, Michael; KATO, Ikunoshin. Protein inhibitors of peptidases. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

LAVONAS, Eric J. et al. Severe puff adder (*Bitis arietans*) envenomation with coagulopathy. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 911-918, 2002.

LENK, Peter et al. Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 19, n. 1, p. 94-104, 2001.

LEWIS, Richard J.; GARCIA, Maria L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LI, Guan-Hong et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v. 24, n. 7, p. 469-486, 2004.

LI, Zhao-Yan; YU, Tie-Fu; LIAN, Eric C.-Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1349-1358, 1994.

LONGSTAFF, C. Studies on the mechanisms of action of aprotinin and tranexamic acid as plasmin inhibitors and antifibrinolytic agents. **Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 5, n. 4, p. 537-542, 1994.

LOPEZ, Alan D. et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. **The Lancet**, v. 367, n. 9524, p. 1747-1757, 2006.

MAJUMDER, Kaustav; WU, Jianping. Molecular Targets of Antihypertensive Peptides: Understanding the Mechanisms of Action Based on the Pathophysiology of Hypertension. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 256-283, 2014.

MANGINI, Janine; LI, Ning; BHAWAN, Jag. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. **The American journal of dermatopathology**, v. 24, n. 3, p. 270-281, 2002.

MARQUES-PORTO, Rafael; LEBRUN, Ivo; PIMENTA, Daniel C. Self-proteolysis regulation in the Bothrops jararaca venom: the metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 4, p. 424-433, 2008.

MARKLAND, Francis S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARSH, Neville A.; WHALER, Bernard C. The Gaboon viper (*Bitis gabonica*): its biology, venom components and toxinology. **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 669-694, 1984.

MARSH, Neville A. Use of snake venom fractions in the coagulation laboratory. **Blood coagulation & fibrinolysis**, v. 9, n. 5, p. 395-404, 1998.

MARSH, Neville; WILLIAMS, Vaughan. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171-1181, 2005.

MASCI, P. P. et al. Textilins from *Pseudonaja textilis textilis*. Characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model. **Blood coagulation & fibrinolysis**, v. 11, n. 4, p. 385-393, 2000.

MCLANE, Mary A. et al. Disintegrins. **Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 327-355, 2004.

MÉNEZ, André. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design?. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1557-1572, 1998.

MÉNEZ, André; STÖCKLIN, Reto; MEBS, Dietrich. 'Venomics' or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2006.

MENOZZI, Alberto; MERLINI, Piera Angelica; ARDISSINO, Diego. Tirofiban in acute coronary syndromes. 2005.

MILLERS, E. K. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a Kunitz-type inhibitor, textilinin-1 from *Pseudonaja textilis textilis*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 7, p. 642-645, 2006.

MILLERS, Emma-Karin I. et al. Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). **FEBS journal**, v. 276, n. 11, p. 3163-3175, 2009.

MORJEN, Maram et al. PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. **Matrix Biology**, v. 32, n. 1, p. 52-62, 2013.

MOURÃO, Caroline BF; SCHWARTZ, Elisabeth F. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. **Marine drugs**, v. 11, n. 6, p. 2069-2112, 2013.

MUNAWAR, Aisha et al. Venom peptide analysis of *Vipera ammodytes meridionalis* (Viperinae) and *Bothrops jararacussu* (Crotalinae) demonstrates subfamily-specificity of the peptidome in the family Viperidae. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 12, p. 3298-3307, 2011.

MUNAWAR, Aisha et al. Isolation and characterization of Bradykinin potentiating peptides from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Proteome Science**, v. 14, n. 1, p. 1, 2016.

MURAKAMI, Mário T.; ARNI, Raghuvir K. Thrombomodulin-independent Activation of Protein C and Specificity of Hemostatically Active Snake Venom Serine Proteinases crystal structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 47, p. 39309-39315, 2005.

MURAKAMI, Makoto et al. Recent progress in phospholipase A2 research: from cells to animals to humans. **Progress in lipid research**, v. 50, n. 2, p. 152-192, 2011.

MURAYAMA, Nobuhiro et al. cDNA cloning of bradykinin-potentiating peptides—C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 13, p. 4075-4080, 2000.

MUKHERJEE, Ashis K. Non-covalent interaction of phospholipase A2 (PLA2) and kaouthiotoxin (KTX) from venom of *Naja kaouthia* exhibits marked synergism to potentiate their cytotoxicity on target cells. **Journal of venom research**, v. 1, p. 37, 2010.

MUKHERJEE, Ashis K.; MACKESSY, Stephen P.; DUTTA, Sumita. Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom. **International journal of biological macromolecules**, v. 67, p. 154-162, 2014.

NAKASHIMA, Kin-ichi et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5605-5609, 1995.

NEURATH, Hans. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v. 224, n. 4647, p. 350-357, 1984.

NICASTRO, Giuseppe et al. Solution structure of crotoamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 9, p. 1969-1979, 2003.

NIKAI, T. et al. Kallidin-releasing enzyme from *Bitis arietans* (Puff adder) venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 307, n. 2, p. 304-310, 1993.

ODELL, G. V. et al. Citrate inhibition of snake venom proteases. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1801-1806, 1998.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.

OHKURA, Masamichi et al. Properties of Ca^{++} release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 2, p. 1043-1048, 1996.

OHNO, M. et al. Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversify of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution?. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 59, p. 307-364, 1997.

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Annual review of biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 283-308, 1982.

OPIE, Lionel H.; KOWOLIK, Helmut. The discovery of captopril: from large animals to small molecules. **Cardiovascular research**, v. 30, n. 1, p. 13-25, 1995.

O'SHEA, J. Conor; TCHENG, James E. Eptifibatide: a potent inhibitor of the platelet receptor integrin, glycoprotein IIb/IIIa. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 8, n. 11, p. 1893-1905, 1999.

PAINE, M. J. L. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 32, p. 22869-22876, 1992.

PAN, Daodong et al. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 13, p. 3898-3904, 2011.

PAIXÃO-CAVALCANTE, Danielle et al. African Adders: Partial Characterization of Snake Venoms from Three *Bitis* Species of Medical Importance and Their Neutralization by Experimental Equine Antivenoms. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003419-e0003419, 2015.

PIMENTA, Adriano; DE LIMA, Maria Elena. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 670-676, 2005.

PLANTEFABER, Lisa C.; HYNES, Richard O. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. **Cell**, v. 56, n. 2, p. 281-290, 1989.

PRITCHARD, Leighton; DUFTON, Mark J. Evolutionary trace analysis of the Kunitz/BPTI family of proteins: functional divergence may have been based on conformational adjustment. **Journal of molecular biology**, v. 285, n. 4, p. 1589-1607, 1999.

PORTO, Bárbara N. et al. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270-277, 2007.

QIU, Yuling et al. Molecular cloning and antifibrinolytic activity of a serine protease inhibitor from bumblebee (*Bombus terrestris*) venom. **Toxicon**, v. 63, p. 1-6, 2013.

RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi et al. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 747-752, 2003.

RAJENDRA, Wudayagiri; ARMUGAM, Arunmozhiarasi; JEYASEELAN, Kandiah. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 1-17, 2004.

RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J. Families of serine peptidases. **Methods in enzymology**, v. 244, p. 19, 1994.

REID, Paul F. PART II. Toxins as Therapeutic Agents Alpha-Cobratxin as a Possible Therapy for Multiple Sclerosis: A Review of the Literature Leading to Its Development for This Application. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 27, n. 4, 2007.

ROBEVA, A. et al. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. **Biomedica biochimica acta**, v. 50, n. 4-6, p. 769-773, 1990.

RODRIGUES, Veridiana M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

RUOSLAHTI, Erkki. Integrins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 1, p. 1, 1991.

RYAN, James W. Angiotensin-converting enzyme, dipeptidyl carboxypeptidase I, and its inhibitors. **Methods in enzymology**, v. 163, p. 194-210, 1988.

RITONJA, Anka; TURK, Vito; GUBENŠEK, Franc. Serine proteinase inhibitors from Vipera ammodytes venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 2, p. 427-432, 1983.

SAMY, Ramar Perumal et al. Viper metalloproteinase (Agkistrodon halys pallas) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of cellular physiology**, v. 216, n. 1, p. 54-68, 2008.

SAMY, Ramar Perumal; GOPALAKRISHNAKONE, Ponnampalam; CHOW, Vincent TK. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2. **Bioinformation**, v. 8, n. 1, p. 48, 2012.

SÁNCHEZ, Elda E.; HOTLE, Doug; RODRÍGUEZ-ACOSTA, Alexis. Neutralization of Bitis parviocula (Ethiopian mountain adder) venom by the South African Institute of Medical Research (SAIMR) antivenom. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 213-217, 2011.

SCHALOSKE, Ralph H.; DENNIS, Edward A. The phospholipase A 2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHELLING, Pierre; FISCHER, Hans; GANTEN, Detlev. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? **Journal of hypertension**, v. 9, n. 1, p. 3-16, 1991.

SELSTED, Michael E.; OUELLETTE, Andre J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nature immunology**, v. 6, n. 6, p. 551-557, 2005.

SERRANO, Solange MT et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.

SICA, Domenic A.; GEHR, T. W. B. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Hypertension. Philadelphia: Elsevier-Saunders**, p. 669-82, 2005.

SILVA, M. et al. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem. J**, v. 369, p. 129-139, 2003.

SOARES, Márcia Regina et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 31-38, 2005.

SODHA, Neel R. et al. Aprotinin in cardiac surgery. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 4, n. 2, p. 151-160, 2006.

STÁBELI, Rodrigo G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

STILES, Bradley G.; SEXTON, Francis W.; WEINSTEIN, Scott A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1129-1141, 1991.

STOCKER, Jane F.; TRAYNOR, J. R. The action of various venoms on *Escherichia coli*. **Journal of applied bacteriology**, v. 61, n. 5, p. 383-388, 1986.

STOCKER, Kurt. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. **Medical use of snake venom proteins**, p. 97-160, 1990.

TAKATSUKA, Hideo et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1, p. 267-277, 2001.

TANJONI, I. et al. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TASHIMA, Alexandre K. et al. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 11, p. 1245-1262, 2012.

THAKUR, Rupamoni et al. A new peptide (Ruviprase) purified from the venom of *Daboia russelii russelii* shows potent anticoagulant activity via non-enzymatic inhibition of thrombin and factor Xa. **Biochimie**, v. 105, p. 149-158, 2014.

TAYLOR, Karen; BARRAN, Perdita E.; DORIN, Julia R. Structure–activity relationships in β -defensin peptides. **Peptide Science**, v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008.

TIAN, Yuwei et al. The cathelicidin-BF Lys16 mutant Cbf-K16 selectively inhibits non-small cell lung cancer proliferation in vitro. **Oncology reports**, v. 30, n. 5, p. 2502-2510, 2013.

TORRES, Allan M.; KUCHEL, Philip W. The β -defensin-fold family of polypeptides. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 581-588, 2004.

TORRES, Alba Fabiola Costa et al. Antibacterial and antiparasitic effects of Bothrops marajoensis venom and its fractions: Phospholipase A 2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.

TOUYZ, Rhian M. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. **Current hypertension reports**, v. 5, n. 2, p. 155-164, 2003.

VAIYAPURI, Sakthivel et al. Purification and functional characterisation of rhinocerase, a novel serine protease from the venom of Bitis gabonica rhinoceros. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9687, 2010.

VAUGHAN, Douglas E. Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis. **The American journal of cardiology**, v. 87, n. 8, p. 18-24, 2001.

VULFIUS, Catherine A. et al. An unusual phospholipase A 2 from puff adder Bitis arietans venom—a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 787-793, 2011.

YANG, Weishan et al. BF9, the First Functionally Characterized Snake Toxin Peptide with Kunitz-Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 28, n. 2, p. 76-83, 2014.

YANG, H. Y. T.; ERDÖS, E. G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 214, n. 2, p. 374-376, 1970.

WAGSTAFF, Simon C. et al. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 365, n. 4, p. 650-656, 2008.

WANG, Yipeng et al. Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3217, 2008.

WARRELL, David A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WHALER, B. C. Gaboon viper venom and its effects. **The Journal of physiology**, v. 222, n. 1, p. 61P, 1972.

WIJEYEWICKREMA, L.C.; BERNDT, Michael C.; ANDREWS, Robert K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1051-1061, 2005.

WOODMAN, ZL, Oppong SY, Cook S, Hooper NM, Schwager SL, Brandt WF, et al. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. **The Biochemical journal**, v.347,n.3, p.708-711, 2000

WOLF G, Neilson EG. From converting enzyme inhibition to angiotensin II receptor blockade: new insight on angiotensin II receptor subtypes in the kidney. **Experimental nephrology**, v.4 Suppl. 1:8-19, 1996.

ZANETTI, Margherita; GENNARO, Renato; ROMEO, Domenico. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS letters**, v. 374, n. 1, p. 1-5, 1995.

ZANETTI, Margherita. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 1, p. 39-48, 2004.

ZHANG, Lei et al. Batroxobin mobilizes circulating endothelial progenitor cells in patients with deep vein thrombosis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 17, n. 1, p. 75-79, 2011.

ZHUO, Jia L. et al. New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, 2013.