

LEONARDO ZAMBOTTI VILLELA

Efeito de frações peptídicas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae: Crotalinae) sobre a atividade enzimática dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) e sobre o receptor (GLP-1R) do peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira

**São Paulo
2010**

RESUMO

ZAMBOTTI-VILLELA, L. **Efeito de frações peptídicas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae: Crotalinae) sobre a atividade enzimática dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) e sobre o receptor (GLP-1R) do peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1).** 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O diabetes melito (DM) é uma das principais doenças crônicas humanas. Da estreita relação entre o DM do tipo 2 (DM-2) e a obesidade, emerge o conceito de síndrome metabólica. Neste contexto, novos agentes que preservem as células β pancreáticas e o controle da massa corporal são de grande interesse para o tratamento do DM-2 e sua busca constitui uma das principais áreas de investimento da indústria farmacêutica. Dentre esses agentes estão, principalmente, aqueles que aumentam a meia-vida plasmática do peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1), via inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), ou os que apresentam ação GLP-1-símile, mediada pelo receptor do GLP-1 (GLP-1R). No primeiro grupo, estão disponíveis comercialmente a vildagliptina e sitagliptina e, no segundo grupo, a exendina-4 (exenatida), derivada do veneno do lagarto *Heloderma suspectum*. A exenatida é vantajosa em relação ao próprio GLP-1, por ser resistente à ação da DPP-IV. Dado que a filogenia molecular considera os lagartos próximos das serpentes e que a exenatida foi sequenciada somente em glândulas mandibulares de lagartos *Anguimorpha*, o presente estudo pretendeu realizar a prospecção de compostos exendina-4-símiles e de inibidores da DPP-IV em frações peptídicas do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, com o objetivo de contribuir com a toxilogia comparada de venenos de répteis e com a eventual descoberta de novos e mais eficientes agentes insulíntricos. O ensaio imunoenzimático sugeriu a existência de exendina-4 e/ou análogos estruturais antígenicamente competentes em frações deste veneno com peso molecular abaixo de 30 kDa e tempos de retenção, em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), próximos da exendina-4. O teste oral de tolerância à glicose mostrou a existência de efeito hipoglicemiante do *pool* destas frações, em ratos diabéticos. O ensaio de ligação ao receptor GLP-1R sugeriu que há ligação de compostos do *pool* a esse receptor. Este mesmo *pool* não apresentou efeito sobre a pressão média arterial do rato anestesiado, sugerindo a ausência de peptídeos hipotensores, como a helodermina e as helospectinas (do veneno dos lagartos *H. suspectum*), bem como de potenciadores da bradicinina (do veneno de *B. jararaca*). A recromatografia deste *pool* em HPLC resultou em cinco picos resolvidos. A espectrometria de massa desses picos evidenciou a existência de polipeptídeos de 903 a 13672

Da. Desses, só foi possível identificar, por “Peptide Mass Fingerprint”, o de 13672 Da, uma K49 Fosfolipase A₂ originalmente descrita no veneno da serpente *Bothrops pirajai* e conhecida como “Chain A, Piratoxin-II (PRTX-II)”. Uma comparação entre as sequências dos íons detectados e da exendina-4 não evidenciou similaridades. A prospecção de inibidores da DPP-IV humana recombinante em frações de baixo peso molecular (PM<3000 Da) do veneno de *B. jararaca* indicou a ausência destes compostos. Em conclusão, o presente estudo mostra, pela primeira vez, o efeito sobre o metaboloma de frações polipeptídicas de veneno de serpente, evidenciando a similaridade imunológica destas frações do veneno de *B. jararaca* com a exendina-4 e seu efeito hipoglicemiante e provável capacidade de ligação ao receptor GLP-1R. A análise destas frações permitiu identificar, também pela primeira vez, uma K49 Fosfolipase A₂ neste veneno. Outros peptídeos destas frações não puderam ser comparados por similaridade e permanecem sem identificação, pois ainda não foram descritos e publicados em bancos de dados de domínio público.

Palavras-chave: Veneno. *Bothrops jararaca*. Diabetes melito tipo II. Dipeptidil-peptidase IV. Peptídeo glucagon-símile tipo 1.

ABSTRACT

ZAMBOTTI-VILLELA, L. **Effect of peptide fractions from *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae: Crotalinae) venom on dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) enzyme activity and glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R).** 2010. 69 f. Master's thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Diabetes mellitus (DM) is one of the major human chronic diseases. From the narrow relationship between DM type 2 (DM-2) and obesity rises the concept of metabolic syndrome. In this context, new agents able to protect pancreatic β cells and to control the body mass are of great interest for the treatment of DM-2. The search for these agents is one of the main objectives of investments made by pharmaceutical industries. Among these agents are those which prolong the half-life of glucagon-like peptide type 1 (GLP-1) by the inhibition of dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV), and those which mimic GLP-1 action mediated by GLP-1 receptor (GLP-1R). In the later group there are the vildagliptin and sitagliptin, while in the former there is exendin-4 (exenatide), a peptide from *Heloderma suspectum* lizard venom. In comparison to GLP-1, exenatide has the advantage to be resistant to DPP-IV hydrolysis. Since lizards and snakes are closely related by the molecular phylogeny point of view and exenatide was sequenced only in mandibular glands from *Anguimorpha* lizards, the present study aimed to find exendin-4 analogues and DPP-IV inhibitors in the venom of the snake *Bothrops jararaca*, in order to contribute to the comparative toxinology of reptile venoms and to reveal new and more efficient insulinotropic agents. The immunoenzymatic assay suggested the presence of exendin-4 and/or antigenically competent structural analogues in venom fractions within the range of molecular weight lower than 30 kDa and retention time near by exendin-4 in high performance liquid chromatography (HPLC). In diabetic rats, the oral glucose tolerance test showed the hypoglycemic effect of the *pool* of these fractions. The assay of binding to GLP-1R suggested that there are GLP-1R ligands of this receptor in this *pool*. This *pool* has no effect on the mean arterial blood pressure of anesthetized rats, suggesting the absence of hypotensive peptides, such as helodermin and helospectin (from *H. suspectum* venom), or bradykinin potentiating peptides (from *B. jararaca* venom). The rechromatography of this *pool* in HPLC resolved five peaks. The mass spectrometry of these peaks showed the existence of polypeptides with molecular weights from 903 to 13,672 Da. Among them, only the 13,672 Da polypeptide was identified by Peptide Mass Fingerprint. It is a K49 Phospholipase A₂, also known as Chain A Piratoxin-II (PRTX-II), originally described in *Bothrops pirajai* snake venom. A comparison between sequences of the ions

detected and exendin-4 did not show similarities. The search for human recombinant DPP-IV inhibitors evidenced the absence of these compounds in venom fractions with molecular weight lower than 3000 Da. In conclusion, this study shows, for the first time, the effect of polypeptide fractions from snake venom on metaboloma, evidencing the immunological similarity of these fractions from *B. jararaca* venom with exendin-4 and their hypoglycemic effect and probable ability to bind to GLP-1R. The analysis of these fractions also allowed us to identify, for the first time, a K-49 Phospholipase A₂ in this venom. Other peptides within these fractions could not be compared by similarity and remain unidentified, since they are not yet described and published in public domain databases.

Keywords: Venom. *Bothrops jararaca*. Diabetes mellitus type II. Dipeptidyl-peptidase IV. Glucagon-like peptide type 1.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a definição da Federação Internacional do Diabetes (IDF), o diabetes melito (DM) é uma doença crônica, que surge quando o pâncreas não produz insulina suficiente, ou quando o organismo não é capaz de utilizar a insulina produzida de modo eficaz. Assim, o DM é classicamente dividido em dois tipos: DM tipo 1 (DM-1), conhecido como DM insulino-dependente; e DM tipo 2 (DM-2), conhecido como DM não-insulino-dependente. Um terceiro tipo de DM (DM-3) foi recentemente sugerido, estando confinado ao sistema nervoso central e estreitamente relacionado à patogênese da doença de Alzheimer (STEEN et al., 2005). Neste sentido, também foi evidenciado que o DM experimental em ratos, induzido pela administração periférica de estreptozotocina, altera não só o nível de atividade aminopeptidásica em tecidos periféricos (ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2008), como no hipotálamo e hipocampo (ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2007a; ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2007b).

Wild et al. (2004) avaliaram a projeção mundial de portadores do DM para o ano de 2030. Neste, estimou-se o número de diabéticos em 366 milhões, sendo 11,3 milhões no Brasil. Estes números seriam subestimados, visto que em sua metodologia de análise, o estudo considerou somente a evolução demográfica como a razão do surgimento de novos indivíduos diabéticos; a influência de eventual incremento dos fatores de risco não foi considerada nessa estatística.

As consequências do DM aos pacientes são severas: 2% tornam-se cegos e 10% adquirem graves problemas visuais devido às retinopatias; 50% apresentam neuropatias (por exemplo: dores e fraqueza nas extremidades); 10-20% morrem por falência renal; e 50% morrem de doença cardiovascular. No geral, os portadores desta doença apresentam pelo menos duas vezes mais risco de morte do que os não portadores. Um aumento de 50% no índice de mortalidade entre os diabéticos foi projetado para 2015 (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2008).

Para o Sistema Público de Saúde, as despesas são elevadas. Acredita-se que a China gastará cerca de 558 bilhões de dólares com doenças cardiovasculares e diabetes até 2015 (OMS, 2008). No Reino Unido, 10% da verba anual do Serviço Nacional da Saúde em 2008 era destinada ao tratamento do DM (SRINIVASA et al., 2008). No Brasil, a *International*

Diabetes Federation (IDF) (2009) estimou o valor de US\$ 563,00 por cada portador do DM no presente ano de 2010.

1.1 PATOLOGIA DO DM

1.1.1 Características do pâncreas endócrino

O pâncreas é um órgão do sistema digestivo e endócrino de animais vertebrados. Ele é tanto exócrino (secretor de suco pancreático, que contém enzimas digestivas) quanto endócrino (secretor dos hormônios insulina, glucagon, somatostatina e grelina, bem como do polipeptídeo pancreático).

A principal função do pâncreas endócrino é o controle da glicose sanguínea, produzindo tanto a insulina (hormônio hipoglicemiante) quanto o glucagon (hormônio hiperglicemiante). As estruturas funcionais do pâncreas endócrino são as ilhotas pancreáticas. Estima-se que representem de 1,0 a 1,5% da massa do pâncreas, num total de 1 milhão de unidades no pâncreas adulto. As ilhotas pancreáticas são compostas por cinco tipos celulares: *células α* – produtoras de glucagon; *células β* – produtoras de insulina; *células δ* – produtoras de somatostatina; *células ϵ* – produtoras de grelina; e *células PP* – produtoras de polipeptídeo pancreático. As células β são encontradas em maior número e localizadas no centro da ilhota, enquanto os outros tipos celulares estão localizados periféricamente.

Cada ilhota é vascularizada com pequenas arteríolas, que se prolongam para a sua região central. Dessa arteríola saem capilares fenestrados, formando vênulas que nutrem a região periférica da ilhota. Esse arranjo vascular facilita a ação intra-ilhota dos hormônios produzidos, o que permite, por exemplo, que a insulina regule a atividade das células α , que o glucagon regule a atividade das células β e que a somatostatina regule as atividades das células α e β .

1.1.2 Obesidade e resistência à insulina

A resistência à insulina é marcante no DM-2, sendo principalmente atribuída ao decréscimo no transporte de glicose, via GLUT 4, do ambiente extra-celular para o intra-celular, devido à inibição da fosforilação, estimulada por insulina, do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (PETERSEN e SHULMAN, 2006). A obesidade visceral é um dos fatores desencadeadores dessa resistência. De fato, o risco de desenvolvimento do DM-2 aumenta com a elevação no índice de massa corporal (IMC) dos pacientes. A probabilidade de uma pessoa obesa ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) desenvolver DM-2 é 20 vezes maior que uma pessoa com o peso considerado adequado ($IMC 18,0-24,9 \text{ kg/m}^2$) (COLAGIURI, 2010).

Uma das explicações para a contribuição da obesidade para o desenvolvimento do DM-2 se encontra, em particular, no aumento da adiposidade visceral. Quando a capacidade dos adipócitos armazenarem gordura é excedida, inicia-se um efluxo de lipídeos para outros tecidos, em particular o fígado, musculatura esquelética e células β (CUSI, 2010; LEE et al., 2009). Isso resulta na deposição ectópica dos lipídeos. Os níveis elevados de ácidos graxos livres (AGLs), e a conversão destes em derivados de acil-CoA, de cadeia longa, reduzem a sinalização da insulina e também o transporte de glicose, além de induzirem o fígado e o tecido muscular a desenvolverem resistência à insulina (COLAGIURI, 2010). Essas mudanças, ocasionadas pelos AGLs, levam à condição conhecida como lipotoxicidade, que resulta em estresse oxidativo e é considerada como um dos fatores redutores da massa de células β , característica de pacientes diabéticos (COLAGIURI, 2010; KRUIT et al., 2010).

Além das consequências resultantes do efluxo de lipídeos dos adipócitos, mudanças dos níveis de leptina (hormônio) e adiponectina (citocina) produzidas, principalmente, no tecido adiposo, são também consideradas importantes para o desenvolvimento do DM-2 (CUSI, 2010).

Fisiologicamente, a leptina é um hormônio que age no hipotálamo promovendo a saciedade e o gasto de energia (COVEY et al., 2006). De modo paradoxal, a concentração sanguínea desse hormônio está elevada na obesidade. A explicação reside no fato dos indivíduos obesos apresentarem resistência à leptina, o que a impede de exercer sua ação no sistema nervoso central (LEE et al., 2009), que seria positiva para esses indivíduos. Adicionalmente, os altos níveis de leptina têm sido relacionados à perda da massa de células β (COLAGIURI, 2010).

A adiponectina é uma adipocina associada com a sensibilização à insulina e com a proteção vascular, encontrada em concentrações sanguíneas elevadas em indivíduos normais. Sua produção é reduzida em pessoas com acúmulo de gordura visceral, sendo os níveis plasmáticos negativamente relacionados à adiposidade visceral (MATSUZAWA, 2010). Este

fato decorre, possivelmente, da sua inibição pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e/ou pelo cortisol (LEE et al., 2009). A hipoadiponectinemia, induzida pelo acúmulo de gordura visceral, está presente em indivíduos obesos e resistentes à insulina, estando estreitamente relacionada ao DM-2 (COLAGIURI, 2010).

A participação da obesidade no desenvolvimento da resistência à insulina também está estreitamente relacionada a complicações microvasculares que se associam à doença cardiovascular (DeFRONZO, 2010). Da relação entre a obesidade, o DM-2 e as complicações cardiovasculares surge o conceito de síndrome metabólica dado pela IDF (2005): conjunto de fatores de risco cardiovascular que possui uma estreita relação com a hipercolesterolemia (dislipidemia), pré-diabetes melito, diabetes melito e obesidade visceral.

1.2 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

Os dados supramencionados, referentes à evolução epidemiológica e consequências do diabetes e da obesidade (síndrome metabólica), são suficientes para explicar a intensa busca por novas terapias. Novos agentes, que permitam o controle do ganho de peso e a preservação das células β pancreáticas, despertam atualmente grande interesse para o tratamento do diabetes (SRINIVASA et al., 2008). Nessa linha enquadra-se a busca por compostos que aumentem a meia-vida plasmática do peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1), ou os que ativem o receptor do GLP-1 (GLP-1R) e sejam resistentes à inativação enzimática. A empresa Decision Resorces, Inc. (2003), uma das líderes mundiais em pesquisa de mercado farmacêutico, estima que o mercado para o DM-2 alcançará a marca de US\$ 20,5 bilhões em 2012, com os medicamentos agonistas do GLP-1R correspondendo a boa parte dessa quantia.

1.2.1 GLP-1

Por ser um hormônio intestinal secretado em resposta à ingestão de nutrientes (o que estimula a secreção da insulina dependente da glicose), o GLP-1 é categorizado como uma incretina. Além dessa ação insulínica, o GLP-1 inibe a secreção de glucagon, retarda o

esvaziamento gástrico, induz a saciedade e promove o aumento da massa de células β pancreáticas e da sua resistência à apoptose, mediante a ativação de seus receptores, em diferentes órgãos e tecidos (DRUCKER e NAUCK, 2006). Neste sentido, a ativação do GLP-1R promove benefícios aos portadores do DM-2.

No entanto, a meia-vida do GLP-1 é de menos de 3 minutos, sendo a enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) a principal responsável por seu catabolismo (DRUCKER e NAUCK, 2006). O conhecimento de que o GLP-1 é rapidamente degradado por essa aminopeptidase, resultou na busca e descoberta de alguns inibidores, como os compostos vildagliptina (Galvus®, Novartis) e sitagliptina (Januvia®, Merck Sharp & Dohme).

Partindo de observações de que o veneno do monstro de Gila (*Heloderma suspectum*) estimula *in vitro* a secreção pancreática de enzimas (RAUFMAN et al., 1982), chegou-se à descoberta, neste veneno, de peptídeos estruturalmente análogos ao peptídeo intestinal vasoativo (VIP) – ação hipotensora – e à secretina, ou seja, os peptídeos helospectina-1, helospectina-2 (PARKER et al., 1984) e helodermina (HOSHINO et al., 1984). No mesmo veneno, o peptídeo exendina-4 foi isolado e mostrou-se agonista do GLP-1R, possuindo as mesmas ações do GLP-1 endógeno, com a vantagem de ser resistente à degradação enzimática, o que proporciona uma meia-vida maior que a observada para o GLP-1. Esta característica prolonga os efeitos antidiabetogênicos desse peptídeo (GIORGINO et al., 2006). Com essas vantagens, a exendina-4 foi transformada no medicamento Byetta® (Amylin-Lilly).

1.3 FILOGENIA

As toxinas de lagartos e serpentes exibem uma considerável diversidade em suas sequências devido ao mecanismo, aparentemente comum, de “nascimento e morte” de novas toxinas. Esse mecanismo tem como base a frequente duplicação de genes codificadores de toxinas, algumas vezes seguida pela diversificação funcional e estrutural, e taxas aceleradas de evolução (FRY et al., 2003). Estas moléculas são úteis como modelos para o desenho e desenvolvimento de novas drogas.

A filogenia molecular dos *Squamata*, proposta por Fry et al. (2006), mostra os lagartos *Anguimorpha* e as iguanas como os animais mais próximos das serpentes na escala evolutiva. Eles formam uma clade bem resolvida (dos animais venenosos – Toxicofera), sendo as únicas

linhagens a possuir glândulas mandibular e/ou maxilar secretoras de proteínas. Dada essa proximidade filogenética entre lagartos e serpentes e o fato de que a exendina-4 foi sequenciada em glândulas mandibulares de lagartos *Anguimorpha* (FRY et al., 2006; FRY et al., 2010), mas não em serpentes, o presente estudo teve como objetivo a busca de compostos semelhantes à exendina-4 e de inibidores da DPP-IV em frações peptídicas (baixo peso molecular; $PM < 3000Da$) do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, representante da família *Viperidae*. De uma forma mais ampla, esse estudo abre um campo de pesquisa praticamente inexplorado para os venenos de serpentes, qual seja, o efeito de proteínas/peptídeos destes venenos no metaboloma.

7 CONCLUSÕES

- A técnica da dupla imunodifusão de Ouchterlony foi inadequada para mostrar a presença ou ausência de peptídeos com similaridade antigênica à exendina-4;
- A primeira etapa de cromatografia em HPLC do *pool* peptídico com peso molecular próximo a 3,5 kDa, obtido por gel filtração, permitiu evidenciar a presença de cinco picos cromatográficos (RT1 a RT6) com RTs próximos ao da exendina-4;
- Os picos isolados nessa primeira etapa de cromatografia em HPLC foram reagentes ao anticorpo antiexendina-4 (EIA) e o *pool* desses picos apresentou atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos, além de haver evidência sugestiva, no ensaio de competição, de sua capacidade de ligação ao receptor GLP-1R;
- Não houve atividade desse *pool* de picos com ação hipoglicemiante e ligante de GLP-1R sobre a pressão arterial média do rato, o que sugere a ausência de peptídeos semelhantes à helodermina, à helospectina e aos potenciadores de bradicinina nesse material;
- A segunda etapa de cromatografia em HPLC desse *pool* de picos com ação hipoglicemiante, ligante de GLP-1R e sem atividade pressora permitiu isolar cinco picos cromatográficos (P1 a P5);
- Os picos P1 a P5 foram individualmente submetidos à análise de massa molecular de seus componentes, sendo possível somente a identificação, por PMF, da massa 13672,01 Da, qual seja, a proteína “Chain A, Piratoxin-II (PRTX-II)”, uma K49 PLA₂, aqui descrita pela primeira vez no veneno da serpente *B. jararaca*;
- Esta K49 PLA₂ do pico P1 pode ter contribuído com a atividade hipoglicemiante do *pool* dos picos RT1 a RT6, fracionados na primeira passagem em HPLC, visto que essa família de enzimas é conhecida por induzir a secreção de insulina na presença de inibidores;
- A existência de K49 PLA₂ no pico P1 não exclui a existência de exendinas 3 e 4, ou peptídeo semelhante, em outro(s) pico(s) do *pool* fracionado, já que além do efeito hipoglicemiante este *pool* apresentou positividade no EIA utilizando anticorpo monoclonal antiexendina-4;
- Os resultados do presente trabalho, ao indicarem tanto a existência de moléculas antigenicamente semelhantes à exendina-4, quanto de moléculas capazes de se ligar

ao receptor GLP-1R, corroboram a hipótese que preconiza a existência de uma molécula glucagon precursora dos peptídeos helodermina, helospectina, exendina-3 e exendina-4 (FRY et al., 2010) em répteis;

- Não há inibidores da DPP-IV humana na fração de baixo peso molecular (PM<3000 Da) do veneno de *B. jararaca*.

REFERÊNCIAS*

ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activities in plasma of monosodium glutamate obese and food-deprived rats. **Obesity**, v. 18, n.7, p. 1312-1317, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BALLANTYNE, G. H. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. **Obes. Surg.**, v. 16, n. 5, p. 651-658, 2006.

CALVET, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

KASSAN, B. H. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni***. 1999. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, SP, 1999.

CHEN, Y. E.; DRURCKER, D. J. Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4108-4115, 1997.

CHU, Z. L.; LEONARD, J. N.; AL-SAMMA, H. A.; JONES, R. M. **Terapia de combinação para o tratamento de diabetes e condições relacionadas com ele e para o tratamento de condições melhoradas através de aumento no nível de glp-1 no sangue**. BR Patente no. PI0606727-1, 9 jan. 2006. 257 p. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br>>. Acesso em: 19 jun. 2009.

CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R. A.; COELHO, E. A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARÍAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A.; MARIA, W. S.; Sanchez, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

COLAGIURI, S. Diabetes: therapeutic options. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 12, n. 6, p. 463-473, 2010.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COVEY, S. D.; WIDEMAN, R. D.; MCDONALD, C.; UNNIAPPAN, S.; HUYNH, F.; ASADI, A.; SPECK, M.; WEBBER, T.; CHUA, S. C.; KIEFFER, T. J. The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 291-302, 2006.

CHRISTEL, C. M.; DENARDO, D. F. Release of exendin-4 is controlled by mechanical action in Gila Monsters, *Heloderma suspectum*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 143, n. 1, p. 85-88, 2006.

CRAFT, S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia. **Arch. Neurol.**, v. 66, n. 3, p. 300-305, 2009.

CUSI, K. The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 4, p. 306-315, 2010.

DECISION RESORCES, INC. **Drug Market For Type 2 Diabetes Will Reach \$20.5 Billion In 2012**. Setembro 2003; Disponível em: <<http://news.biocompare.com/News/NewsStory/15486/Drug-Market-For-Type-2-Diabetes-Will-Reach-205-Billion-In-2012.html>> Acesso em: 01 jun. 2009.

DeFRONZO, R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. **Diabetologia**. v. 53, n. 7, p. 1270-1287, 2010.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696-1705, 2006.

DOSHI, L. S.; BRAHMA, M. K.; SAYYED, S. G.; DIXIT, A. V.; CHANDAK, P. G.; PAMIDIBOINA, V.; MOTIWALA, H. F.; SHARMA, S. D.; NEMMANI K. V. Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. **Metabolism**, v. 58, n. 3, p. 333-343, 2009.

DUEZ, H.; SMITH, A. C.; XIAO, C.; GIACCA, A.; SZETO, L.; DRUCKER, D. J.; LEWIS, G. F. Acute dipeptidyl peptidase-4 inhibition rapidly enhances insulin-mediated suppression of endogenous glucose production in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 56-62, 2009.

DUPRÉ, J.; BEHME, M. T.; MCDONALD, T. J. Exendin-4 normalized postcibal glycemic excursions in type 1 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 7, p. 3469-3473, 2004.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FRERKER, N.; WAGNER, L.; WOLF, R.; HEISER, U.; HOFFMANN, T.; RAHFELD, J. U.; SCHADE, J.; KARL, T.; NAIM, H.Y.; ALFALAH, M.; DEMUTH, H. U.; VON HÖRSTEN, S. Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. **Peptides**, v. 28, n. 2, p. 257-268, 2007.

FRY, B. G.; ROELANTS, K.; WINTER, K.; HODGSON, W. C.; GRIESMAN, L.; KWOK, H. F.; SCANLON, D.; KARAS, J.; SHAW, C.; WONG, L.; NORMAN, J. A. Novel venom proteins produced by differential domain-expression strategies in beaded lizards and gila monsters (genus *Heloderma*). **Mol. Biol. Evol.**, v. 27, n. 2, p. 395-407, 2010.

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 584-588, 2006.

FRY, B. G.; WÜSTER, W.; KINI, R. M.; BRUSIC, V.; KHAN, A.; VENKATARAMAN, D.; ROONEY, A.P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **J. Mol. Evol.**, v. 57, n. 1, p. 110-129, 2003.

FUJIMURA, Y.; TITANI, K.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; OYAMA, R.; MATSUI, T.; FUKUI, H.; SUGIMOTO, M.; RUGGERI, Z. M. Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 1957-1964, 1991.

FUKUDA, K.; DOGGETT, T. A.; BANKSTON, L. A.; CRUZ, M. A.; DIACOVO, T. G.; LIDDINGTON, R. C. Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. **Structure**, v. 10, n. 7, p. 943-950, 2002,

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; SILVEIRA, P. F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1617-1626, 2002.

GE HEALTHCARE. **Gel filtration. Principles and methods**. Suécia: Ge Healthcare, 2007.

GIORGINO, F; LAVIOLA, L; LEONARDINI, A; NATALICCHIO, A. GLP-1: a new approach for type 2 diabetes therapy. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 74, p. S152-S155, 2006.

GORRELL, M. D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 108, n. 4, p. 277-292, 2005.

GRUNDEMAR, L.; HÖGESTÄTT, E.D. Vascular effects of helodermin, helospectin I and helospectin II: a comparison with vasoactive intestinal peptide (VIP). **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, n. 3, p. 526-528, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 80-92, 2008.

HAKONARSON, H.; GRANT, S. F.; BRADFIELD, J. P.; MARCHAND, L.; KIM, C. E.; GLESSNER, J. T.; GRABS, R.; CASALUNOVO, T.; TABACK, S. P.; FRACKELTON, E. C.; LAWSON, M. L.; ROBINSON, L. J.; SKRABAN, R.; LU, Y.; CHIAVACCI, R. M.; STANLEY, C. A.; KIRSCH, S. E.; RAPPAPORT, E. F.; ORANGE, J. S.; MONOS, D. S.; DEVOTO, M.; QU, H. Q.; POLYCHRONAKOS, C. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 591-594, 2007.

HAYASHI, M. A.; MURBACH, A. F.; IANZER, D.; PORTARO, F. C.; PREZOTO, B. C.; FERNANDES, B. L.; SILVEIRA, P. F.; SILVA, C. A.; PIRES, R. S.; BRITTO, L. R.; DIVE, V.; CAMARGO, A. C. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. **J. Neurochem.**, v. 85, n. 4, p. 969-977, 2003.

HILDEBRANDT, M.; REUTTER, W.; ARCK, P.; ROSE, M.; KLAPP, B. F. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. **Clin. Sci.**, v. 99, n. 2, p. 93-104, 2000.

HIRATA, K.; KUME, S.; ARAKI, S.; SAKAGUCHI, M.; CHIN-KANASAKI, M.; ISSHIKI, K.; SUGIMOTO, T.; NISHIYAMA, A.; KOYA, D.; HANEDA, M.; KASHIWAGI, A.; UZU, T. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 380, n. 1, p. 44-49, 2009.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

HOSHINO, M.; YANAIHARA, C.; HONG, Y. M.; KISHIDA, S.; KATSUMARU, Y.; VANDERMEERS, A.; VANDERMEERS-PIRET, M. C.; ROBBERECHT, P.;

CHRISTOPHE, J.; YANAIHARA N. Primary structure of helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. **FEBS Lett.**, v. 178, n. 2, p. 233-239, 1984.

IANZER, D.; SANTOS, R. A.; ETELVINO, G. M.; XAVIER, C. H.; DE ALMEIDA SANTOS, J.; MENDES, E. P.; MACHADO, L. T.; PREZOTO, B. C.; DIVE, V.; DE CAMARGO, A. C. Do the Cardiovascular Effects of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) I Involve ACE-Independent Mechanisms? New Insights from Proline-Rich Peptides of *Bothrops jararaca*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 322, n. 2, p. 795-805, 2007.

IDF. **IDF diabetes atlas**. 2009; Disponível em:
<<http://www.diabetesatlas.org/map>> Acesso em: 10 maio 2010.

IDF. **IDF Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome**. Disponível em:
<<http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429>> Acesso em 25 ago. 2005.

INSTITUTO BUTANTAN. **Soro antibotrópicos**. São Paulo: Instituto Butantan, 2007. Bula de remédio.

IRWIN, N.; MCCLEAN, P. L.; FLATT, P. R. Comparison of the subchronic antidiabetic effects of DPP-IV-resistant GIP and GLP-1 analogues in obese diabetic (ob/ob) mice. **J. Pept. Sci.**, v. 13, n. 6, p. 400-405, 2007.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. DE L.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; HO, P. L. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 571-575, 2004.

KHAN, N. A.; DI CELLO, F.; STINS, M.; KIM, K. S. Gp120-mediated cytotoxicity of human brain microvascular endothelial cells is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase activation. **J. Neurovirol.**, v. 13, n. 3, p. 242-251, 2007.

KRUIT, J. K.; KREMER, P. H. C.; DAI, L.; TANG, R.; RUDDLE, P.; DE HAAN, W.; BRUNHAM, L. R.; VERCHERE, C. B.; HAYDEN, M. R. Cholesterol efflux via atp-binding cassette transporter a1 (abca1) and cholesterol uptake via the ldl receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1110-1119, 2010.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 987-996, 2005.

LAMBEIR, A. M.; DURINX, C.; SCHARPE, S.; DE MEESTER, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP-IV. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 40, n. 3, p. 290-294, 2003.

LEE, D. E.; KEHLENBRINK, S.; LEE, H.; HAWKINS, M.; YUDKIN, J. S. Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1210-E1229, 2009.

LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28-36, 2001.

LEITING, B.; PRYOR, K. D.; WU, J. K.; MARSILIO, F.; PATEL, R. A.; CRAIK, C. S.; ELLMAN, J. A.; CUMMINGS, R. T.; THORNBERRY, N. A. Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. **The Biochemical Journal**, v. 371, n. 2, p. 525-532, 2003.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

MARTINS, R. D.; ALVES, R. S.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; EVANGELISTA, J. S.; EVANGELISTA, J. J.; XIMENES, R. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; SOUZA, A. J.; ORTS, D. J.; MARANGONI, S.; DE MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A(2) from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 413-420, 2009.

MATSUZAWA, Y. Adiponectin: A Key Player in Obesity Related Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n.17, p. 1896-1901, 2010.

NOGUEIRA, T. C. A.; FERREIRA, F.; TOYAMA, M. H.; STOPPIGLIA, L. F.; MARANGONI, S.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Characterization of the insulinotropic action of a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. **Toxicon**, v. 45, n. 2, p. 243-248, 2004.

OLIVO, R. DO A.; TEIXEIRA, C. DE F.; SILVEIRA, P.F. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, n. 10, p. 1441-1450, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Diabetes**. 2008. Fact sheet nº 312. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>> Acesso em: 26 jan. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Obesity and overweight**. 2006. Fact sheet nº 311. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 31 jul. 2007.

OUCHTERLONY, O.; NILSSON, L. A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: **Handbook of experimental immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1978. p.19.16-19.28.

PARKER, D. S.; RAUFMAN, J. P.; O'DONOHUE, T. L.; BLEDSOE, M.; YOSHIDA, H.; PISANO J. J. Amino acid sequences of helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 19, p. 11751-11755, 1984.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 5, p. S10-16, 2006. Suplemento 1.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO, M. DE F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RAUFMAN, J. P.; JENSEN, R. T.; SUTLIFF, V. E.; PISANO, J. J.; GARDNER J. D. Actions of Gila monster venom on dispersed acini from guinea pig pancreas. **Am. J. Physiol.**, v. 242, n. 5, p. G470-474, 1982.

ROMANA-SOUZA, B.; NASCIMENTO, A. P.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 611, n. 1-3, p. 77-84, 2009.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908-917, 2008.

SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA, T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 32, n. 27, p. 6892-6897, 1993.

SERRANO, S. M.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.

SRINIVASAN, B. T.; JARVIS, J.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. **Postgrad. Med. J.**, v. 84, n. 996, p. 524-531, 2008.

STEEN, E.; TERRY, B. M.; RIVERA, E. J.; CANNON, J. L.; NEELY, T. R.; TAVARES, R.; XU, X. J.; WANDS, J. R.; DE LA MONTE, S. M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J. Alzheimers Dis.**, v. 7, n. 1, p. 63-80, 2005.

STRAUSS, A.; MOSKALENKO, V.; CHODNEVSKAJA, I.; TIMM, S.; THIEDE, A.; OTTO, C.; ULRICH, K. Exendin-4 improves the oral glucose tolerance in diabetic rats: pancreas regeneration, better function of pancreatic islets, or impaired glucose uptake? **Transplant Proc.**, v. 40, n. 2, p. 533-535, 2008.

TSUESHITA, T.; ONYÜKUSEL, H.; SETHI, V.; GANDHI, S.; RUBINSTEIN, I. Helospectin I and II evoke vasodilation in the intact peripheral microcirculation. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 65-69, 2004.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; OZEKI, Y.; NISHIO, K.; FUKUI, H.; TITANI, K. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 3, p. 928-932, 1993.

van den BERGH, C. J.; SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; AND DE HAAS, G. H. J. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity. **Cell. Biochem.** v. 39, n. 4, p. 379-390, 1989.

VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. **C. R. Biologies**, v. 332, n. 2-3, p. 129-139, 2009.

WALDRON-LYNCH, F.; VON HERRATH, M.; HEROLD, K. C. Towards a curative therapy in type 1 diabetes: remission of autoimmunity, maintenance and augmentation of beta cell mass. **Novartis Found Symp.**, v. 292, p. 146,455, 2008.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; MURENA-NUNES, C.; SILVEIRA, P. F. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Peptides**, v. 28, n. 8, p. 1586-1595, 2007a.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Res.**, v. 1170, p. 112-118, 2007b.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Prospective evaluation of aminopeptidase activities in plasma and peripheral organs of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Endocrinol Invest.** v. 31, n. 6, p. 492-498, 2008.