

ROBERTO TADASHI KODAMA

**Purificação e caracterização de peptídeos presentes nos venenos
de serpentes africanas: à procura de inibidores de
peptidases de importância médica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

Agradecimento à agência de fomento

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e por suporte financeiro do projeto de doutorado intitulado “Purificação e caracterização de peptídeos presentes nos venenos de serpentes africanas: à procura de inibidores de peptidases de importância médica” (processo 2015/13124-5), que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

KODAMA, R. T. **Purificação e caracterização de peptídeos presentes nos venenos de serpentes africanas: à procura de inibidores de peptidases de importância médica.** 2019. 123 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As peptidases desempenham um papel importante para o bom funcionamento fisiológico dos mais diversos organismos. Quando desreguladas, estão associadas a patologias, por exemplo, a atividade exacerbada da elastase-1 está relacionada à pancreatite, e, da catepsina L, está envolvida na metástase de tumores. Portanto estas peptidases se tornaram potenciais alvos terapêuticos, no que se refere à procura por inibidores. O veneno de serpentes é composto por misturas complexas de moléculas que podem apresentar as mais derivadas funções, inclusive a inibição de enzimas. Tendo isto em vista, este trabalho teve como objetivo, purificar, caracterizar e estudar *in vitro* e *in silico* novos inibidores presentes nas porções de baixa massa molecular dos venenos de três gêneros de serpentes africanas, *Naja*, *Dendroaspis* e *Bitis*. Para isso, as porções de baixa massa molecular (<10 kDa) de cada veneno foram submetidas a uma cromatografia por RP-HPLC usando uma coluna C18. As frações foram coletadas e um *screening*, utilizando substratos FRET, foi feito para verificação da inibição sobre as peptidases estudadas neste trabalho. A identificação das frações de interesse foi realizada por espectrometria de massas, dentre as sequências obtidas, moléculas da classe das *three-finger-toxins* foram identificadas, e, pela primeira vez descritas como inibidores de peptidases. Outras moléculas, da classe dos Kunitz, que foram anteriormente descritas como bloqueadores de canais de Na⁺ e K⁺, também foram identificadas. O peptídeo DPSA8 (do veneno de *Dendroaspis polylepis*) se destacou por apresentar inibição semelhante da catepsina L e da elastase-1 no teste de *screening*. Este peptídeo, classificado como Kunitz, foi caracterizado como um inibidor incompetitivo para a elastase-1, com um K_i de 8 µM. A análise por ancoramento (ZDOCK) indicou modelos de interação deste peptídeo com a elastase-1, dentre estes modelos foram mostradas interações no sítio catalítico e em outras regiões da enzima. Utilizando estes modelos de interação, dois peptídeos foram desenhados para serem estudados quanto à possível inibição da elastase-1 e da catepsina L. O primeiro não apresentou atividade inibitória, entretanto, o segundo, um peptídeo cíclico nomeado PEP2 (contendo 30 resíduos de aminoácido), mostrou ser um inibidor competitivo, com K_i de 1,96 µM sobre a catepsina L. Além disso, foi realizada a análise de ancoramento dos BPPs, do veneno de *Bitis* spp, usando a ECA (enzima conversora de angiotensina I) como receptor. Estes resultados mostraram uma alta relação dos *scores* obtidos nos estudos *in silico* com os K_is obtidos e já publicados. Este trabalho descreve algumas toxinas de baixa massa molecular com a função inibitória de peptidases, isso pode contribuir para um entendimento maior do processo de envenenamento. Em adição, foi empregado o método de ancoramento molecular para o desenho de novas moléculas inibidoras, resultando no PEP2, um peptídeo capaz de inibir a atividade da catepsina L com uma baixa constante de inibição. Mostrando mais uma vez que esta metodologia pode contribuir para a procura de novas entidades biotecnológicas.

Palavras-chave: Elastase-1. Catepsina L. Enzima conversora de angiotensina I. Inibidores de peptidases. Veneno de serpentes. Kunitz. Three-Finger-Toxins. Peptídeo rico em prolina (PRO). Docagem molecular.

ABSTRACT

KODAMA, R. T. **Purification and characterization of peptides present in African snake venoms: searching for inhibitors of medical importance peptidases.** 2019, 123 p. Doctorate thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Peptidases play an important role for the proper physiological functions of the most diverse organisms. When unregulated, they are associated to pathologies, for example, the exacerbated activity of elastase-1 is related to pancreatitis, and, for the cathepsin L, it is involved in the tumor's metastasis. Therefore these peptidases have become potential therapeutic targets regarding the search for inhibitors. The venoms of snakes are composed by complex mixtures of molecules that can feature diverse functions, including the inhibition of enzymes. Considering this, the present work's objective was to purify, characterize and to study *in vitro* and *in silico* new inhibitors that are present in the low molecular weight fraction of the venoms from three African snakes genera, *Naja*, *Dendroaspis* and *Bitis*. For that, the low molecular weight fraction from each venom (<10 kDa) were submitted to RP-HPLC chromatographic fractioning, using a C-18 column. The fractions were then collected, and utilizing fluorescent substrates, the screening test was performed to verify the inhibition by the fractions over the peptidases studied in this work. The identification of the fractions of interest was carried out by mass spectrometry, among them, molecules from the three-finger-toxins class was identified, and, for the first time, described as peptidase inhibitors. Other molecules from Kunitz class, that were previously described as Na⁺ and K⁺ channel blockers, but not as peptidase inhibitors, were also identified. The peptide DPSA8P (from *Dendroaspis polylepis* venom) stood out due to the fact that it had similar cathepsin L and elastase-1 inhibition on the screening step. This peptide, classified as a Kunitz one, was characterized as an uncompetitive inhibitor for elastase-1, presenting a K_i of 8 μM. The docking (ZDOCK) analysis indicated interaction models of this peptide with elastase-1, in the catalytic site and in other regions of this enzyme. Using these interaction models, two peptides were designed to be studied as possible inhibitors of both elastase-1 and cathepsin L. The first one did not show inhibitory activity, however, the second, a cyclic peptide named as PEP2, which contains 30 amino acid residues, showed to be a competitive inhibitor, with K_i of 1.96 μM over cathepsin L. Furthermore, we performed re-docking analyses of the BPPs, from the *Bitis* spp venom, using the ACE (angiotensin converting enzyme) as receptor. These results showed high relation of the scores obtained in the *in silico* studies with the K_is previously determined. This work describes some low molecular weight toxins with a new function as peptidase inhibitors, and this could contribute to further understand the envenomation process. In addition, the efficiency of the docking technique to design new molecules was shown, aiming at the search molecular docking was used to the design new of peptidase inhibitors, which led to the PEP2, a peptide that is able to inhibit the cathepsin L activity with a low inhibition constant. Showing once again that this methodology may be used for the search of new biotechnological entities.

Keywords: Elastase-1. Cathepsin L. Angiotensin I Converting Enzyme. Peptidase inhibitors. Snake venom. Kunitz. Three Finger Toxins. Proline rich oligopeptide (PRO). Molecular Docking.

1 INTRODUÇÃO

“Lembre-se que o único sinal de vida é o movimento e o crescimento” foi uma frase dita por Swami Vivekananda, e que para mim faz todo o sentido. A vida somente chegou ao ponto em está por conta do crescimento, e para que haja crescimento é necessário o movimento. O movimento está presente em todo lugar e em todos os níveis, como por exemplo, na escala macro podemos citar movimentações e migrações de grandes populações de indivíduos, o que gera a dispersão de espécies e conquista de novos territórios. Há também o movimento no mundo micro, onde um espermatozoide vai em direção a um óvulo para fecundá-lo. Podemos observar movimento em níveis menores ainda, como por exemplo, dentro de uma célula, onde ocorre movimentação de organelas, de RNAs, de enzimas entre várias outras moléculas. Na bioquímica o melhor exemplo de movimento são as reações de catálise, a palavra catálise vem do grego *katálysis*, que significa decomposição ou dissolução. Os catalisadores são substâncias que promovem o aumento da velocidade das reações sem serem consumidas. São exemplos de catalisadores: enzimas, ácidos, bases, óxidos metálicos e metais. Na bioquímica, a área que estuda as reações catalíticas promovidas por enzimas é chamada de cinética enzimática, e, assim, chegamos à palavra cinética, que tem origem da palavra grega *kinetikós* que significa movimento.

As enzimas estão presentes em todos os organismos vivos, sendo de papel central para o bom funcionamento fisiológico dos mesmos. Pode ser citada a importância das enzimas em diversas reações no reino vegetal, como por exemplo, a bromelina e a papaína que além de serem enzimas importantes para o próprio vegetal, participando no amadurecimento, germinação e morte celular, estas também são utilizadas em alimentos, indústria e medicina. No reino animal, as enzimas estão presentes desde reações que possibilitam o piscar de um vagalume, onde está envolvida a enzima chamada luciferase, como até nas reações mais importantes para a fisiologia do corpo humano, como a digestão de alimentos, como a tripsina, pepsina e amilase, e a regulação da pressão arterial, onde podemos citar exemplos como a enzima conversora de angiotensina I e arginase.

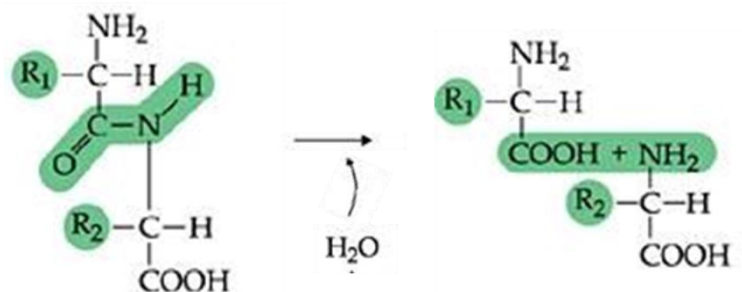
As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação química que catalisam e são distribuídas em seis grupos:

- Oxido-redutases: promovem reações de oxidação-redução;
- Transferases: promovem transferência de grupos funcionais, como amina, acil entre outros;

- Liases: catalisam quebra de ligações covalentes e remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico;
- Isomerases: realizam reações de interconversão entre isômeros;
- Ligases: estão envolvidas na formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes;
- Hidrolases: enzimas que associadas a moléculas de água, promovem a quebra de ligações covalentes (hidrólise).

A hidrólise é uma reação que promove a quebra ligações covalentes na presença de água e, na ausência de um catalisador, pode ser extremamente lenta e gerar subprodutos indesejáveis. Em contrapartida, na presença de um catalisador esta reação pode levar milissegundos, podemos citar as fosfolipases, maltases e peptidases como exemplos de hidrolases. Abaixo é apresentado um esquema de como ocorre a catálise de uma ligação peptídica por uma peptidase (Figura 1).

Figura 1- Esquema simplificado da hidrólise de um dipeptídeo por uma peptidase



Fonte: adaptado de “NOVI ENEM - Bioquímica das Proteínas - Texto: Bioquímica das Proteínas,” 2019

As peptidases foram o foco de estudo do presente trabalho, que por definição, são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas, como no exemplo acima. Atualmente, sabe-se que as oligopeptidases, por exemplo, são capazes de hidrolisar apenas ligações peptídicas de substratos com tamanho reduzido (peptídeos com até 20 resíduos de aminoácidos), não apresentando atividade sobre proteínas. Desta maneira, o termo “peptidases” tem sido recomendado, ao invés do termo “proteases” por englobar todas as enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas, independente das limitações de tamanho de substrato (União

Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular ou International Union of Biochemistry and Molecular Biology IUBMB).

Por conta de seu importante papel na regulação de diversos processos fisiológicos, as peptidases precisam estar presentes em quantidades e locais adequados. Além disso, as peptidases necessitam que suas atividades estejam em equilíbrio para que os processos fisiológicos funcionem de maneira saudável nos organismos. Assim, a atividade de uma peptidase pode ser controlada por fatores como pH, concentração de sais, inibidores endógenos, entre outros. Portanto, um pequeno desequilíbrio, tanto na quantidade quanto na atividade destas moléculas, pode contribuir para o aparecimento de patologias.

Tendo isso em vista, a busca de moléculas moduladoras de peptidases para o controle destas quando estão demasiadamente ativas é importante. Neste trabalho visamos a procura por inibidores de peptidases em venenos de serpentes africanas e, para isso, foram escolhidas três peptidases, cada uma pertencente a uma diferente classe de peptidases, que serão mais bem descritas abaixo.

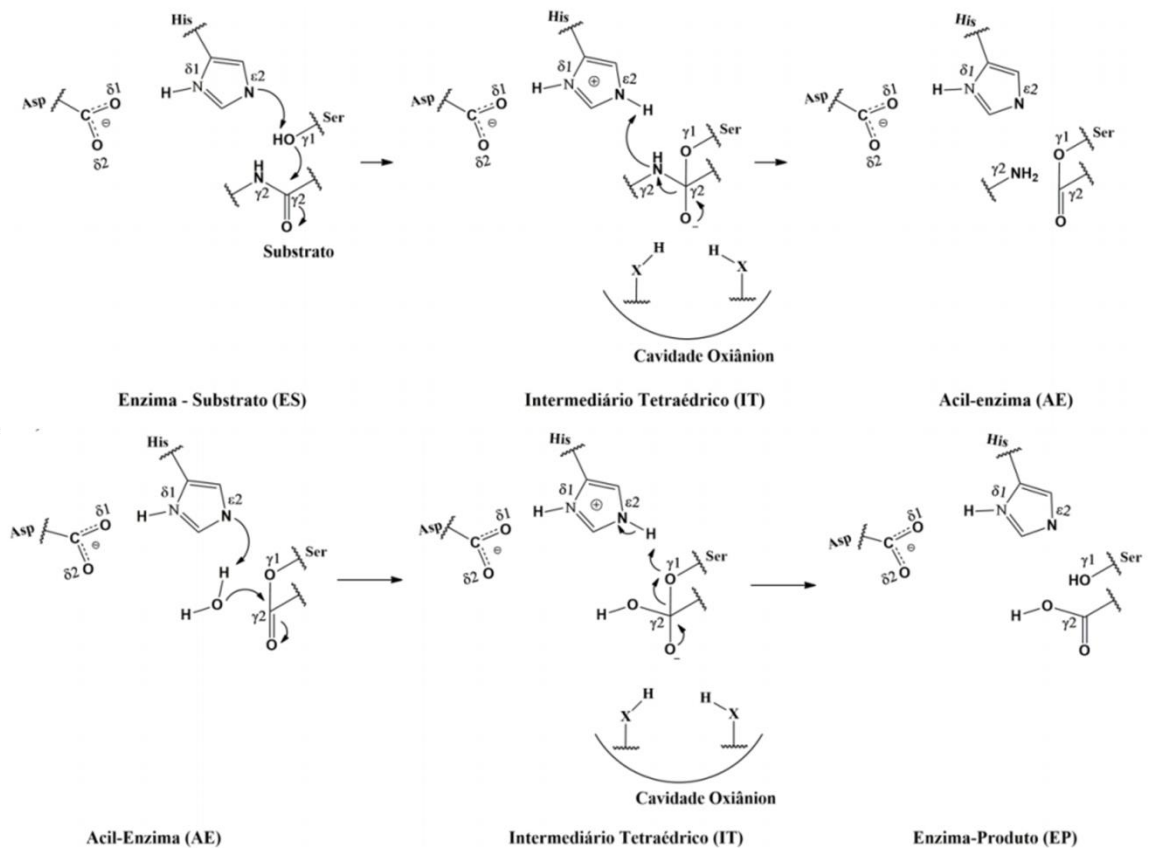
1.1 Serinopeptidases

As serinopeptidases são enzimas cujo mecanismo catalítico depende de um resíduo de serina agindo como o nucleófilo para hidrolisar a ligação peptídica. Estas são divididas em 12 clãs e mais de cinquenta famílias, de S1 a S85 (RAWLINGS et al., 2018). São amplamente distribuídas e extremamente numerosas, estando presentes desde grandes mamíferos até bactérias, arqueobactérias e vírus. Esta classe pode ser exemplificada pela tripsina, elastase e calicreína (família S1), que apresentam uma tríade catalítica composta pelos resíduos Asp, His, Ser.

O modelo usado para explicar a catálise por serinopeptidases é o da quimotripsina. Resumidamente, na primeira etapa da reação enzimática (acilação), um tetraedro intermediário é formado pela associação do substrato com a serina que compõe a tríade catalítica da enzima (Ser195), devido ao ataque nucleofílico da mesma à carbonila do substrato que é susceptível à hidrólise. A ligação C-N do substrato é hidrolisada e o intermediário tetraédrico se desfaz com a liberação da sequência N-terminal do substrato, formando a acil-enzima. Na segunda etapa da reação (desacilação), uma molécula de H₂O hidrolisa o complexo acil-enzima, formando um segundo intermediário tetraédrico. Novamente, pela ação da His57-H⁺, o intermediário tetraédrico se desfaz resultando na

liberação da parte C-terminal do substrato e a serinopeptidase volta à sua estrutura original. Este processo está ilustrado na figura 2 (HEDSTROM, 2002).

Figura 2 - Esquema do mecanismo de ação de um serinopeptidase



Fonte: Hedstrom L., 2002

Neste trabalho foram caracterizados inibidores da elastase pancreática (EC 3.4.21.36). Esta serinopeptidase pertence ao clã PA e família S1 (RAWLINGS et al., 2018). Quimicamente, a elastase é uma serinopeptidase com massa molecular de 33 kDa, e é um polipeptídeo de cadeia única de propriedade básica, apresentando pH ótimo entre 8 e 8,8 (BRENDA, 2019). A elastase pancreática, também chamada de elastase-1, é produzida em forma de zimogênio no pâncreas e ativada no duodeno. A elastase-1 é considerada um marcador para patologias pancreáticas, e estudos apontam uma relação direta na quantidade desta peptidase com a ocorrência de diabetes mellitus e pancreatite aguda (KATSCHINSKI et al., 1997; ALTAY, 2019). A elastase-1 tem como substratos descritos a elastina, α -2-

macroglobulina, serpinas, além da cadeia beta da insulina (MORTENSEN et al., 1981; DUMONT et al., 1994; ZANI et al., 2004; KSIAZEK et al., 2015).

Além da elastase pancreática, outra serinopeptidase denominada elastase-2 (EC 3.4.21.37) também é considerada alvo para o desenvolvimento de novos inibidores. Desde a primeira publicação sobre a existência de “leucopeptidases”, a constatação da importância da elastase-2 durante o processo inflamatório promoveu maior interesse da comunidade científica para o estudo da ação desses grânulos secretados por células leucocitárias (JANOFF, 1985; WIEDOW; MEYER-HOFFERT, 2005). Dentre elas, a elastase é destaque, pois, entre outras atividades, é capaz de causar grande dano tecidual durante a inflamação (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997).

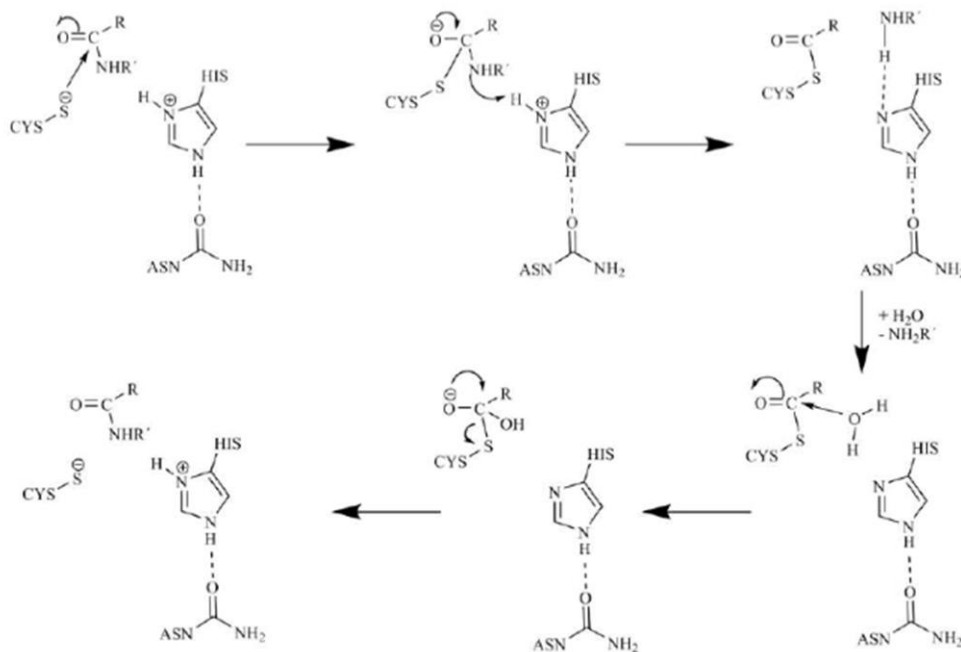
Segundo Janoff (JANOFF, 1985), a elastase de neutrófilos tem como substrato principal a elastina. Componentes de matriz (colágeno III e IV e fibronectina) e proteínas plasmáticas (fibrinogênio e proteínas do sistema complemento) também podem ser alvos dessa enzima. A cadeia beta da insulina também é referida como substrato para a elastase (BLOW, 1977). A atividade excessiva da elastase pode estar associada a patologias, como pode ser observado nos pulmões durante a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a qual se caracteriza por atividade inflamatória intensa devido à degradação de componentes da matriz extracelular, resultando em uma obstrução do fluxo aéreo (JANOFF, 1985; LAGENTE et al., 2005). Outras patologias, como a fibrose cística e a psoríase, também podem estar associadas com a atividade excessiva da elastase (JANOFF, 1985). Foi provada também a importância da elastase no desenvolvimento de doenças pulmonares em neonatos (OGDEN et al., 1983; SPEER et al., 1993; HILGENDORFF et al., 2011).

Neste trabalho, utilizamos a elastase-1 nos nossos processos de busca por inibidores. Porém, tanto a elastase-1 quanto a elastase-2 apresentam especificidades primárias semelhantes, com preferência marcante para a hidrólise de substratos contendo resíduos de valina e alanina na posição P1 (SCHECHTER; BERGER, 1967). Por conta destas semelhanças, as elastases 1 e 2 também compartilham inibidores, como α -2-macroglobulina, o CmPI-II (inibidor do tipo Kazal), a elafina entre outros (ABE; YAMAMOTO; SINOHARA, 1989; ZANI et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2007). Assim, por compartilharem substratos e inibidores, há fortes indícios de que se encontrado um inibidor para a elastase-1, o mesmo será eficiente na inibição da elastase-2.

1.2 Cisteíno peptidase

As cisteíno peptidases são uma classe de enzimas que possuem um grupo tiol de um resíduo de Cys, agindo como nucleófilo no mecanismo de catálise. As cisteíno peptidases são agrupadas em 11 clãs, CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP, CQ e CR (RAWLINGS et al., 2018). A papaína, pertencente ao clã CA e à família C1, é considerada o ancestral das cisteíno peptidases (BERTI; STORER, 1995). A atividade das cisteíno peptidases depende, geralmente, de uma tríade catalítica onde os outros resíduos componentes são a histidina e a asparagina. A maioria destas enzimas são endopeptidases, porém algumas podem agir com exopeptidases, como é o caso da catepsina X, que apresenta atividade carboxipeptidásica, e a catepsina B que apresenta atividades tanto endo quanto carboxipeptidásica. O mecanismo de ação proposto para as cisteíno peptidases é similar ao das serinopeptidases, onde o grupo tiol da Cys faz o ataque nucleofílico ao carbono da ligação peptídica susceptível à hidrólise, liberando a porção N-terminal do substrato e formando um tetraedro intermediário (acil-enzima). A desacilação da enzima ocorre da mesma forma descrita acima para as serinopeptidases (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do mecanismo de ação de um cisteíno peptidase



Fonte: adaptado de MORIN e PELLETIER, 2014

Há uma grande variedade de catepsinas descritas, sendo algumas pertencentes ao grupo das serinopeptidases, como a catepsina A, outras pertencentes ao grupo das aspartil peptidases, como a catepsina D, e também do grupo das cisteíno peptidases, como a catepsina L, estudada neste trabalho (RAWLINGS et al., 2018).

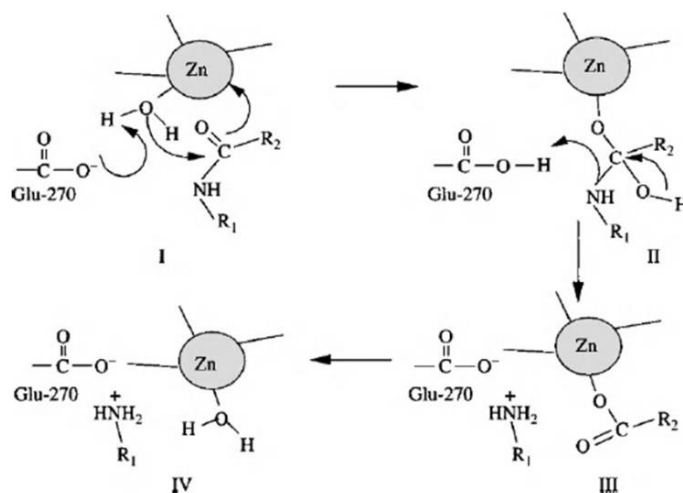
As catepsinas pertencentes à classe das cisteíno peptidases, em geral, trabalham em pH baixo e desempenham um papel importante na degradação e processamento de proteínas nos lisossomos. Atividades anômalas, como aumento da expressão, aumento da atividade, ou a presença destas enzimas em locais não usuais podem ser um fator chave no desenvolvimento de patologias. As catepsinas L, B e S são enzimas pertencentes à família C1 do clã CA das cisteíno peptidases, e podem ser encontradas nos mais variados organismos, como bactérias, vírus, plantas e animais. Estas catepsinas são caracterizadas por ter um sítio ativo composto por Cys25, His159 e Asn175, porém, como já mencionado, a catepsina B apresenta atividades endo e exopeptidásica, enquanto a catepsina L e S apresentam exclusivamente atividade endopeptidásica (LI; FANG; AO, 2017). As catepsinas B, L e S estão associadas em uma variedade de doenças humanas como, por exemplo, à invasão e metástase de tumores (LETO et al., 2010), também à pancreatite e infecções virais (CHANDRAN et al., 2005; SCHORNBERG et al., 2006), e à doenças autoimunes (BEN-ADERET et al., 2015; RUPANAGUDI et al., 2015). Assim, a procura de inibidores para estas catepsinas tem se tornado de interesse em relação ao seu potencial terapêutico. Com base nas semelhanças entre estas catepsinas, a catepsina L foi escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que um inibidor de catepsina L pode ser eficiente na inibição da catepsina B (PENNSYLVANIA, 2011; VIROBAY INC., 2012). Em adição, inibidores de catepsina L também podem ser eficazes na inibição da catepsina S, uma vez que diversos inibidores com capacidade para inibir ambas as enzimas já foram descritos (AMURA THERAPEUTICS LIMITED, 2009; HOFFMAN LA ROCHE INC., 2010, 2015; PENNSYLVANIA, 2011).

A catepsina L (EC 3.4.22.15) pode ser encontrada em mamíferos, anfíbios, peixes e alguns protozoários (BOHLEY; SEGLEN, 1992). É uma peptidase com atividade endopeptidásica e majoritariamente presente em lisossomos. A catepsina L participa no processamento de antígenos MHC II (NAKAGAWA et al., 1998) e, além de estar associada às patologias apresentadas acima, estudos realizados com ratos deficientes desta peptidase mostram que os animais apresentam comprometimento das funções do miocárdio, hiperplasia epidermal, acantose, hiperqueratinose e perda gradual da pelagem (PETERMANN et al., 2006).

1.3 Metalopeptidases

As metalopeptidases estão divididas em 16 clãs com mais de 70 famílias (M1 a M103). Estas peptidases são enzimas que geralmente apresentam a sequência consenso (**H-E-X-X-H**) no seu sítio catalítico, onde a letra X indica qualquer resíduo de aminoácido (HOOPER, 1994). Nas metalopeptidases um cátion metal divalente, geralmente zinco, ativa a molécula de água que é responsável pela catálise. Assim, o zinco é tetra coordenado pelos dois resíduos de His e um de Glu, além da molécula de água. Além destes, pelo menos outro resíduo é necessário para catálise, que é geralmente um resíduo de Glu. O mecanismo de ação das metalopeptidases é descrito pelo modelo da Carboxypeptidase A, onde o primeiro passo ocorre quando o resíduo Glu270 remove um próton da molécula de água ligada ao metal, permitindo o ataque a carbonila da ligação peptídica a ser clivada. No segundo passo o Glu270 age como um catalisador ácido doando um próton para a amina da ligação peptídica enquanto o tetraedro (Figura 4; passos II e III) se desfaz em dois produtos (passo III). No quarto passo o produto da porção N terminal deixa o sistema e a água retorna ao metal (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004).

Figura 4 - Esquema do mecanismo de ação de um metalopeptidase



Fonte: Handbook of proteolytic enzymes, Rawlings e Barret, 2004

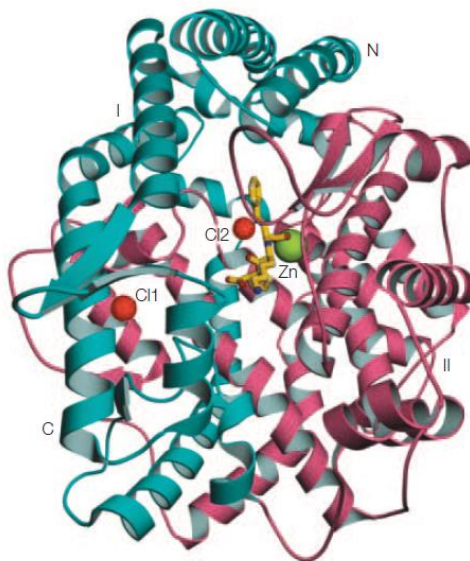
As metalopeptidases estão envolvidas nas mais variadas atividades como no desenvolvimento embrionário, na formação óssea, artrite e regulação da pressão arterial

(NAGASE; WOESSNER, 1999; BURRAGE; MIX; BRINCKERHOFF, 2006; HARRISON; ACHARYA, 2014).

Neste trabalho, a enzima conversora de angiotensina I, ECA (EC 3.4.15.1) foi utilizada como alvo de busca de inibidores. Esta enzima também é denominada de cininase II ou dipeptidilcarboxipeptidase I, e pertence à família M2 do clã MA das metalopeptidases. Ela é uma metalopeptidase zinco-dependente que cliva o dipeptídeo da porção C-terminal da angiotensina I para produzir o octapeptídeo vasopressor denominado angiotensina II (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956; RIEGER et al., 1993) e inativa o peptídeo hipotensor denominado bradicinina, também pela remoção do dipeptídeo C-terminal (YANG; ERDOS; LEVIN, 1970). A ECA apresenta dois sítios catalíticos semelhantes, denominados sítios C e N devido à suas respectivas proximidades às porções C e N terminais da cadeia proteica (HARRISON; ACHARYA, 2014). Porém, o sítio localizado próximo ao C-terminal é considerado o principal responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (WEI et al., 1991). O sítio próximo ao N-terminal metaboliza um hormônio-tetrapeptídeo (Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro-OH), que está envolvido na regulação negativa da hematopoiese (RIEGER et al., 1993; ROUSSEAU et al., 1994; AZIZI et al., 1996). Além disso, outro substrato específico para o sítio N é a angiotensina 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), sendo que ao mesmo tempo este peptídeo possui ação vasodilatadora e inibe a hidrólise da angiotensina I realizada pelo domínio C (DEDDISH et al., 1998). A bradicinina é inativada igualmente pelos sítios C e N (MASUYER et al., 2012). A ECA é a uma das enzimas de maior importância para o equilíbrio da pressão arterial, e o controle de sua atividade em indivíduos que apresentam hipertensão é de grande relevância. Assim, atualmente existe uma grande motivação para a busca de inibidores que sejam seletivos de ambos os sítios catalíticos da ECA, uma vez que os dois domínios hidrolisam diferentes substratos com diferentes intensidades.

A estrutura cristalográfica de alta resolução da ECA testicular humana (tACE) é mostrada abaixo (Figura 5), que é idêntica ao domínio C da ECA somática, e é usada para os estudos *in silico* de ancoramentos de novas moléculas (ACHARYA et al., 2003).

Figura 5 - Estrutura cristalográfica da enzima conversora de angiotensina testicular em associação ao lisinopril



Fonte: Acharya, R., 2003

1.4 As serpentes Africanas

As serpentes sempre tiveram sua história entrelaçada com a história da humanidade, seja na religião, na mitologia ou na ciência. Na religião e mitologia, a imagem das serpentes esteve vinculada ao homem, como na expulsão de Adão e Eva do paraíso, e até os dias de hoje a imagem de uma serpente enrolada em um bastão, o Bastão de Asclépio, representa a medicina no Ocidente. Em geral estas criaturas despertam medo e repugnância em grande parte da população, fato entendível, já que o envenenamento por serpentes representa um grave problema de saúde pública para diversos países tropicais. Porém, por outro lado, o veneno ofídico já se mostrou muito útil no combate contra patologias humanas. Assim, apesar dos venenos de serpentes serem responsáveis por enfermidades, que em muitos casos podem levar a morte se não tratadas pela administração de soros antiofídicos, os mesmos são considerados ricas misturas de moléculas, muitas delas úteis para a medicina e farmacologia, um exemplo é o peptídeo potencializador de bradicinina (BPP) denominado BPP 5A, <EKWAP (<E = piroglutaminil), que serviu como modelo para a concepção do captopril (ONDETTI; RUBIN; CUSHMAN, 1977), um dos mais potentes e bem sucedidos medicamentos contra a hipertensão humana até os dias de hoje. Ou seja, apesar dos componentes tóxicos dos venenos de serpentes serem importantes para levar a presa e, também, a vítima de acidentes ao colapso, os mesmos, em suas formas purificadas, podem

levar ao design de novos fármacos (ou protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos) tanto pela sua seletividade quanto pela sua potência. Ainda vale lembrar que as diversas serpentes se alimentam de mamíferos, principalmente pequenos roedores, o que pode explicar o fato destes venenos apresentarem alta toxicidade ao ser humano.

Acidentes ofídicos representam uma problemática para a saúde pública em diversos países do mundo, e estima-se que ocorram cerca de 5,5 milhões de acidentes, com mais de 400.000 destes resultando em amputações e cerca de 20.000 a 125.000 mortes por ano no mundo todo. Estes números ultrapassam outras doenças tropicais negligenciadas em ambos, número de ocorrência e fatalidades, as quais possuem um maior destaque relacionado com problemas de saúde pública, como a leishmaniose, dengue, esquistossomose, cólera e doença de chagas (WILLIAMS et al., 2010). O envenenamento ofídico entrou para a lista de doenças tropicais negligenciadas apenas recentemente, mostrando que não era visto como uma questão relevante para a saúde pública (“WHO | Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa”, 2017).

Na África, a história das serpentes e suas relações com o homem não são diferentes. O número de acidentes ofídicos é expressivo, chegando a 300.000 notificações por ano (KASTURIRATNE et al., 2008) e representando uma grande preocupação para a saúde pública de todo o continente africano. Apesar do grande número de acidentes, os componentes de venenos de serpentes africanas são pouco estudados funcionalmente, e mesmo com a pouca informação sobre estes venenos, pode-se verificar que estes são fontes de novas moléculas a serem descobertas (VAIYAPURI et al., 2010; DIOCHOT et al., 2012; KODAMA et al., 2015; VULFIUS et al., 2016). Além disso, muitas moléculas já descritas podem ter uma funcionalidade ainda desconhecida, o que torna o estudo destes venenos ainda mais necessário.

Com base no exposto acima, se faz essencial o estudo dos venenos de serpentes africanas, tanto pelo fato de ser uma condição negligenciada, ainda que seja a causa de muitos acidentes, quanto pela falta de informações sobre a funcionalidade dos seus componentes. Também importante, por serem ricas misturas de moléculas ainda não conhecidas, os venenos de serpentes africanas apresentam o potencial para a descoberta de novos inibidores de peptidases de importância médica.

O Instituto Butantan tem reconhecida tradição e excelência na produção de soros antiofídicos e, considerando a problemática dos envenenamentos por serpentes na África subsaariana, foi estipulado um plano de colaboração entre o Instituto e a Faculdade Eduardo Mondlane de Moçambique (Maputo). Nesta parceria, o Instituto Butantan deverá auxiliar

países africanos com seu conhecimento sobre a manutenção de serpentes em cativeiro, coleta de venenos e, principalmente, na produção de soros. Também é de interesse desta colaboração o estudo de componentes destes venenos que podem tanto auxiliar na compreensão do envenenamento quanto revelar novas moléculas de interesse médico e biotecnológico.

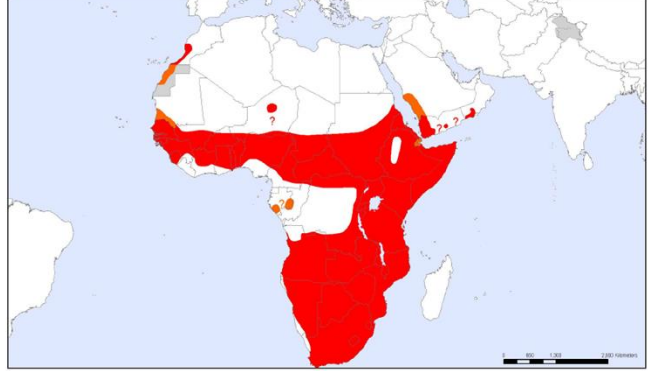
No presente trabalho foram estudados os venenos de três gêneros de serpentes, *Bitis*, *Naja* e *Dendroaspis*, considerados os maiores responsáveis por acidentes na África subsaariana.

1.4.1 O gênero *Bitis*

As espécies do gênero *Bitis*, pertencentes à família Viperidae, subfamília Viperinae, são também conhecidas como víboras do velho mundo. Estas serpentes possuem a dentição solenóglifa, uma apomorfia de Viperídeos, porém não possuem fosseta loreal, o que as difere das víboras do novo mundo, e.g. *Bothrops spp.* e *Crotalus spp.* As serpentes deste gênero apresentam diferenças em seu tamanho, fenótipo e, em níveis intra e interespecíficos, apresentam distinções na composição de seus venenos (CALVETE; ESCOLANO; SANZ, 2007). São encontradas em quase todo tipo de habitat, exceto desertos e florestas tropicais (centro e oeste africano). São muito encontradas em ambientes de pastagens rochosas E, embora sejam essencialmente terrestres, elas são capazes de nadar e até escalar árvores e rochas. Este é o gênero responsável por causar o maior número de fatalidades no continente africano, devido a fatores como sua ampla distribuição por todo o território, presença em áreas altamente populosas e agressividade. As espécies estudadas neste trabalho são três pertencentes ao grupo da *Bitis gabonica* (*B. rhinoceros*, *B. nasicornis* e *B. gabonica*), além da espécie *B. arietans*.

Figura 6 - *B. arietans*, *B. gabonica*, *B. nasicornis* e *B. rhinoceros* e suas respectivas distribuições pelo continente africano

A



B



C



D



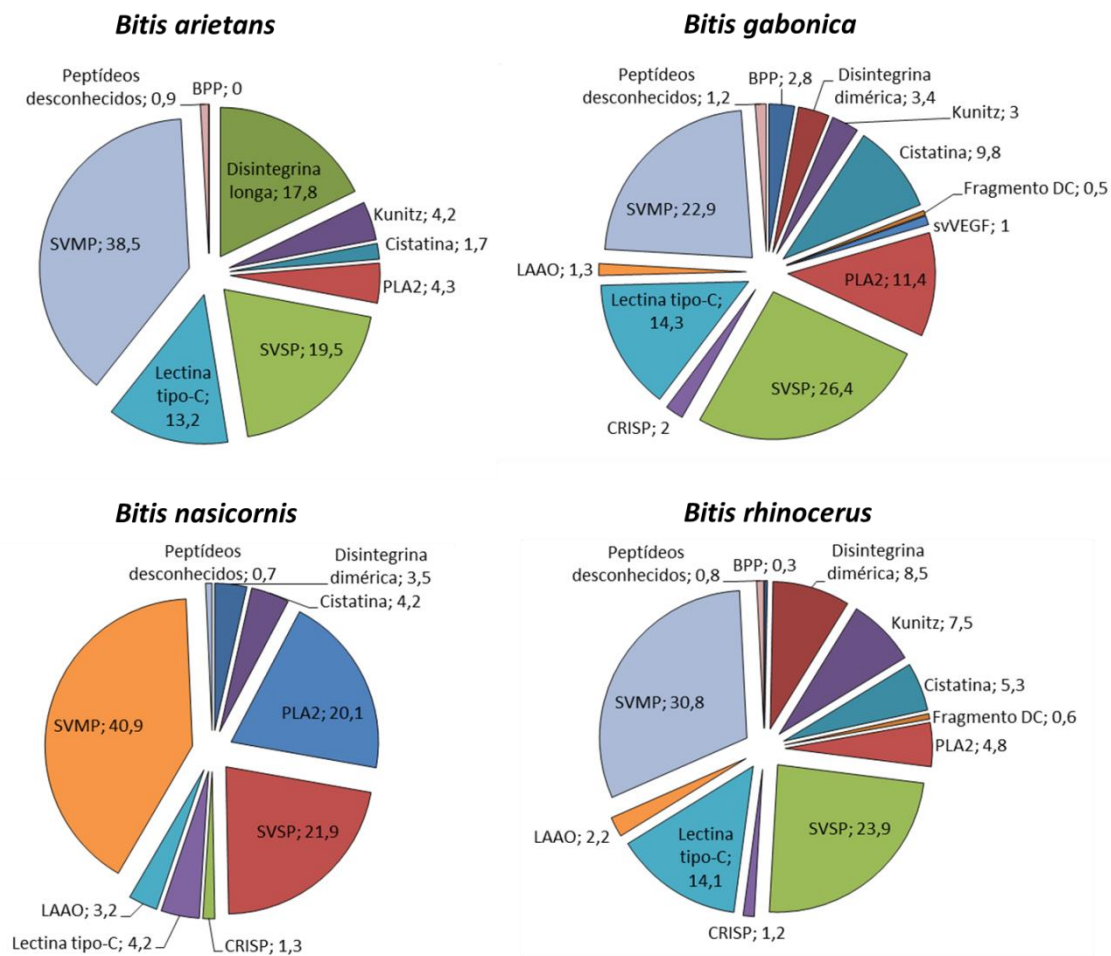
Fonte: adaptado de WHO, 2010

Legenda: A) à esquerda, uma foto de *Bitis arietans*, à direita sua distribuição geográfica; B) à esquerda, uma foto de *B. gabonica*, à direita sua distribuição geográfica; C) à esquerda, uma foto de *B. nasicornis*, à direita sua distribuição geográfica; D) à esquerda, uma foto de *B. rhinoceros*, à direita sua distribuição geográfica.

O envenenamento por *Bitis* pode causar graves danos locais (necrose), trombocitopenia, sangramento local espontâneo, hipotensão e bradicardia podendo, no caso da não administração de soro, levar a morte. Vale também dizer que já foi reportado um óbito de um paciente após uma queda abrupta na pressão arterial, mesmo na ausência de hemorragia (WARRELL; ORMEROD; DAVIDSON, 1975; SEGURA et al., 2010).

Análises proteômicas e genômicas mostraram que os venenos de serpentes do gênero *Bitis* são majoritariamente constituídos de proteínas pertencentes a quatro grandes grupos: metalopeptidases, serinopeptidases, disintegrinas e lectinas do tipo C (CALVETE; ESCOLANO; SANZ, 2007; CURRIER et al., 2010). Estudos funcionais demonstraram a presença de metalopeptidases com atividade sobre o colágeno e fibrinogênio (JENNINGS et al., 1999; CURRIER et al., 2010), uma serinopeptidase que libera calidina (Lys-bradicinina) a partir do cininogênio de baixa massa molecular (NIKAI et al., 1993) e lectinas que induzem a liberação de cálcio (OHKURA et al., 1996). A Figura 7 abaixo mostra as proporções, em porcentagens, dos componentes dos venenos, realizadas por abordagem proteômica (CALVETE; ESCOLANO; SANZ, 2007), de cada uma das espécies estudadas neste trabalho. Como indica a Figura 7, o veneno da *B. arietans* é composto majoritariamente por peptidases (metalo e serino), porém, estes estudos não observaram a presença de BPPs. Por outro lado, foram detectadas moléculas do tipo cistatina e Kunitz. Estas classes de moléculas possuem representantes capazes de inibir cisteína e serinopeptidases, respectivamente. Nos venenos de *B. gabonica* e *B. rhinoceros* também se pode observar a presença de cistatinas (9,8 e 5,3% respectivamente) e Kunitz (3 e 7,5 %, respectivamente), assim como de inibidores do tipo BPP (2,8 e 0,3 %, respectivamente), enquanto que em *B. nasicornis* observamos apenas a presença de cistatinas (4,2 %).

Figura 7 - Composição dos venenos de *Bitis arietans*, *B. gabonica*, *B. nasicornis* e *B. rhinocerus*



Fonte: adaptado de Calvete et al., 2007

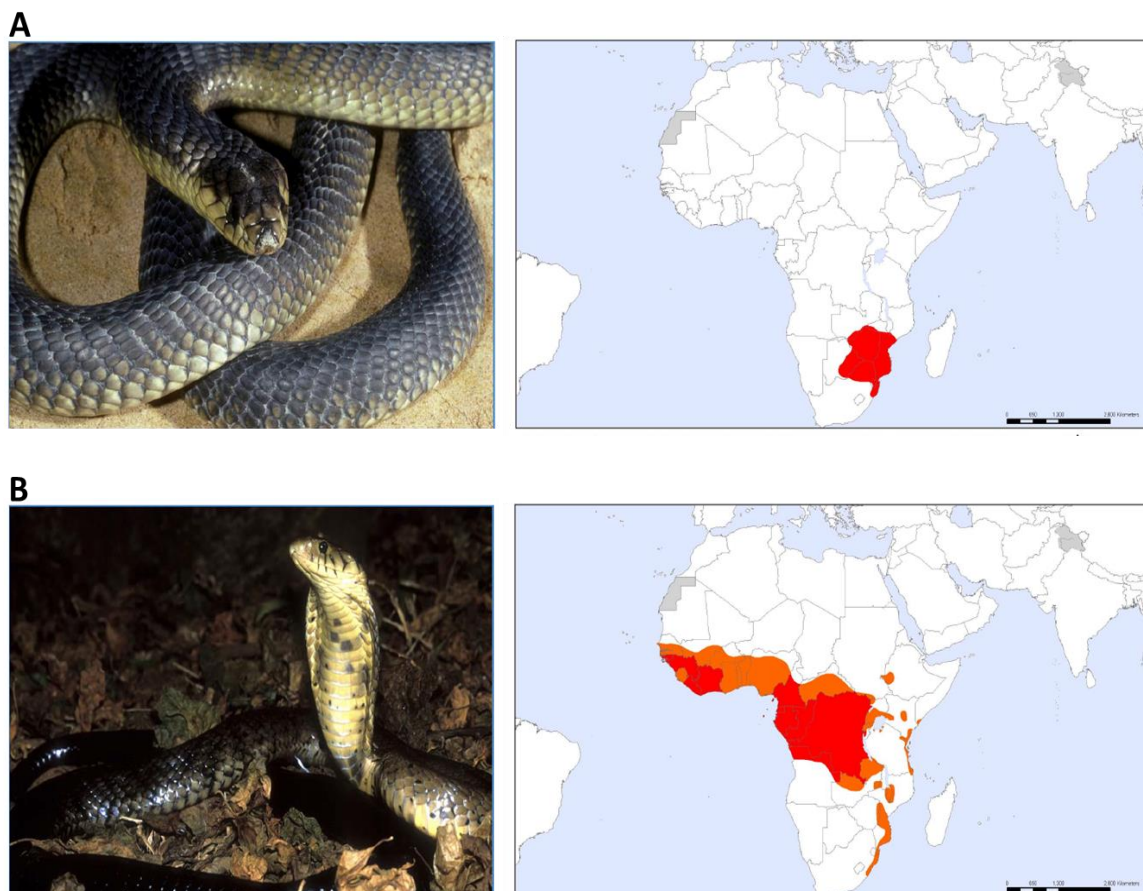
Legenda: As quantidades estão expressas em porcentagem, SVMP = metaloprotease de serpentes; SVSP = serinopeptidase de serpentes; PLA2 = fosfolipase A2; LAAO = L aminoácido oxidase; CRISP = proteína secretora rica em cicteína svVEGF = Fator de Crescimento do Endotélio Vascular de veneno de serpente; DC = Desintegrina-like e fragmentos derivados de PIII-SVMP

Entre os componentes peptídicos importantes presentes nesses venenos que já foram descritos, podemos citar a arietina e a gabonina, purificadas a partir dos venenos das *B. arietans* e *B. gabonica*, respectivamente, e que interferem com a agregação plaquetária (HUANG et al., 1991, 1992). Em 2015, nosso grupo purificou e caracterizou *in vivo* e *in vitro* BPPs presentes nos venenos das quatro espécies deste gênero estudadas neste trabalho, mostrando a presença de destas moléculas também em *B. arietans* (KODAMA et al., 2015), ao contrário dos resultados apontados pelas abordagens proteômicas descritos na Figura 7.

1.4.2 *Naja spp*

As serpentes do gênero *Naja*, também conhecidas como “verdadeiras cobras”, pertencem à família Elapidae. Estas serpentes tem comprimento médio de 80 a 130 cm, sendo que alguns indivíduos podem chegar a medir 250 cm. Apresentam coloração acinzentada, oliva ou marrom, com o ventre mais pálido. Este gênero compreende uma grande diversidade de espécies com mais de 30 já descritas. São serpentes de hábito majoritariamente terrestre, e são ativas a noite. Sua alimentação é composta principalmente por pequenos roedores, como ratos, porém elas podem se alimentar de répteis, pássaros e ovos. Neste trabalho foram analisados os venenos de três espécies deste gênero, *Naja annulifera*, *Naja melanoleuca* e *Naja mossambica* (Figura 8) como fonte de inibidores de peptidases.

Figura 8 - *Naja annulifera*, *N. melanoleuca* e *N. mossambica* e suas respectivas distribuições pelo continente africano



C

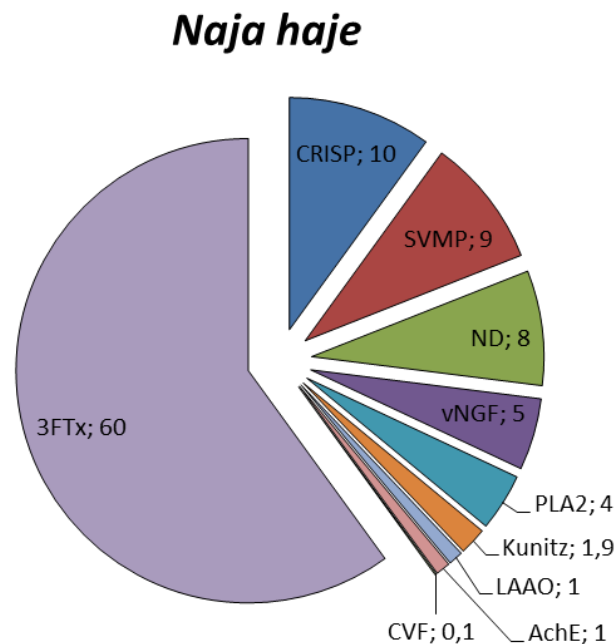


Fonte: adaptado de WHO, 2010

Legenda: A) à esquerda, uma foto de *Naja annulifera*, à direita sua distribuição geográfica; B) à esquerda, uma foto de *N. melanoleuca*, à direita sua distribuição geográfica; C) à esquerda, uma foto de *N. mossambica*, à direita sua distribuição geográfica.

As serpentes deste gênero são didaticamente separadas em dois grupos, as cobras não cuspidoras ou neurotóxicas (*N. annulifera* e *N. melanoleuca*, entre outras) e as cobras cuspidoras ou citotóxicas (*N. mossambica* e mais outras 5 espécies de *Naja*). O envenenamento por serpentes neurotóxicas, *N. annulifera* e *N. melanoleuca*, podem causar edema local sem necrose, e sintomas clássicos de neurotoxicidade aparecem cerca de trinta minutos após a picada, e podem evoluir para um quadro clínico fatal de paralisia respiratória no intervalo de 2 a 16 horas após a picada (WARRELL; BARNES; PIBURN, 1976; BLAYLOCK; LICHTMAN; POTGIETER, 1985). Ainda não foram feitos estudos proteômicos destas espécies, porém há o estudo do veneno de *N. haje* (MALIH et al., 2014), espécie muito próxima filogeneticamente de ambas (WUSTER et al., 2007). Na Figura 9 pode-se observar que o veneno é composto principalmente por toxinas do tipo *three-finger-toxins*, além da presença de hidrolases, como metalopeptidases e fosfolipases, e uma pequena porção de moléculas do tipo Kunitz (1,9%), conhecidos inibidores de serinopeptidases.

Figura 9 - Composição do veneno *Naja haja*, espécie filogeneticamente próxima às *N. annulifera* e *N. melanoleuca*

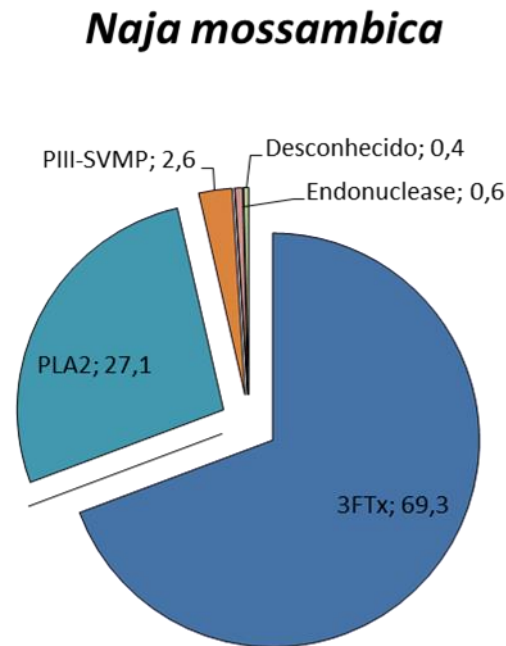


Fonte: Malih et al., 2014

Legenda: As quantidades estão expressas em porcentagem, 3FTX = *three-finger-toxin*; CRISP = proteína secretora rica em cicteína; SVMP = metaloprotease de serpentes; ND = não determinado; vNGF = venom nerve growth factor; PLA2 = fosfolipase A2; LAAO = L aminoácido oxidase; AchE = acetilcolinesterase; CVF = cobra venom factor

Acidentes com serpentes da espécie *N. mossambica*, representante das *Najas* cuspidadeiras ou cobras citotóxicas, levam a um quadro clínico distinto ao observado por acidentes com outras serpentes elapídicas, onde há necrose no local da picada e inchaço, sem o efeito neurotóxico. Os acidentes ocorrem geralmente à noite, enquanto as vítimas estão dormindo, e, imediatamente após a picada, há o registro de uma intensa dor, seguido de vômito (WHO, 2010). Análises proteômicas revelaram que o veneno de *Naja mossambica* é composto principalmente por toxinas do tipo *three-finger-toxin*, por fosfolipase A2, seguido de metalopeptidases do tipo III (PETRAS et al., 2011).

Figura 10 - Composição do veneno de *Naja mossambica*



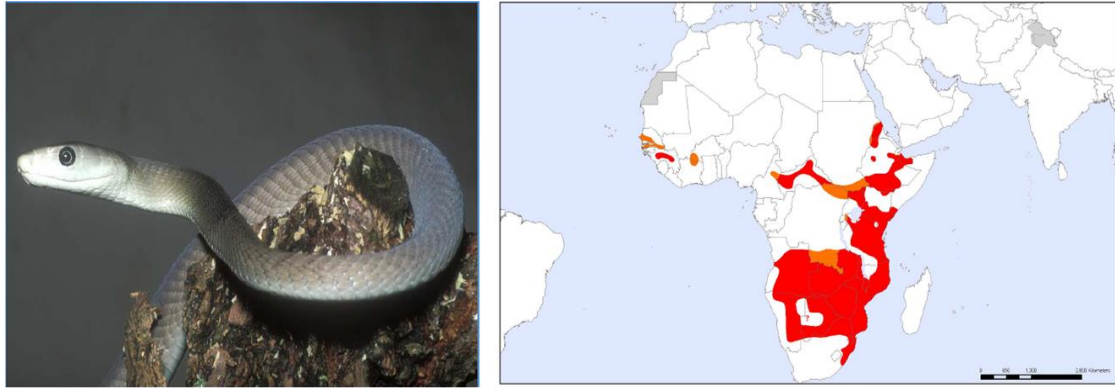
Fonte: adaptado de Petras et al., 2011

Legenda: As quantidades estão expressas em porcentagem, 3FTX = *three-finger-toxin*; PIII-SVMP = metaloprotease de serpentes de classe III; PLA2 = fosfolipase A2

1.4.3 *Dendroaspis polylepis*

Dendroaspis é um gênero composto por 4 espécies, *D. augusticeps* (mamba verde-verde-oriental), *D. jamesoni* (mamba de Jameson), *D. viridis* (mamba-verde-ocidental) e a espécie estudada neste trabalho, a *D. polylepis*, também conhecida como mamba negra. As mambas são representantes da família Elapidae, subfamília Elapinae. Os espécimes de *D. polylepis* apresentam comprimento médio total de 220 a 270 cm, chegando a medir 420 cm, têm a coloração marrom acinzentada ou marrom esverdeada, sendo o interior da boca mais escuro (fato que lhe conferiu o nome mamba negra). Como ato de defesa, elas se erguem em posição ereta, abrem a boca e silvam. São encontradas principalmente nas regiões central, leste, oeste e sul da África subsaariana (WHO, 2010; WHO, 2017), habitando savanas, florestas e pedreiras. Durante seu período ativo, mantem-se em ambientes abertos e, em períodos inativos, são encontradas em troncos ocos, fendas de rochas e tocas. Esta serpente se alimenta de pequenos mamíferos como rato, esquilos e morcegos, além de pequenas aves. Na Figura 11 podemos observar uma foto de um indivíduo representante da espécie *D. polylepis* à esquerda, e sua distribuição geográfica à direita.

Figura 11 - *Dendroaspis polylepis* e sua distribuição geográfica no continente africano

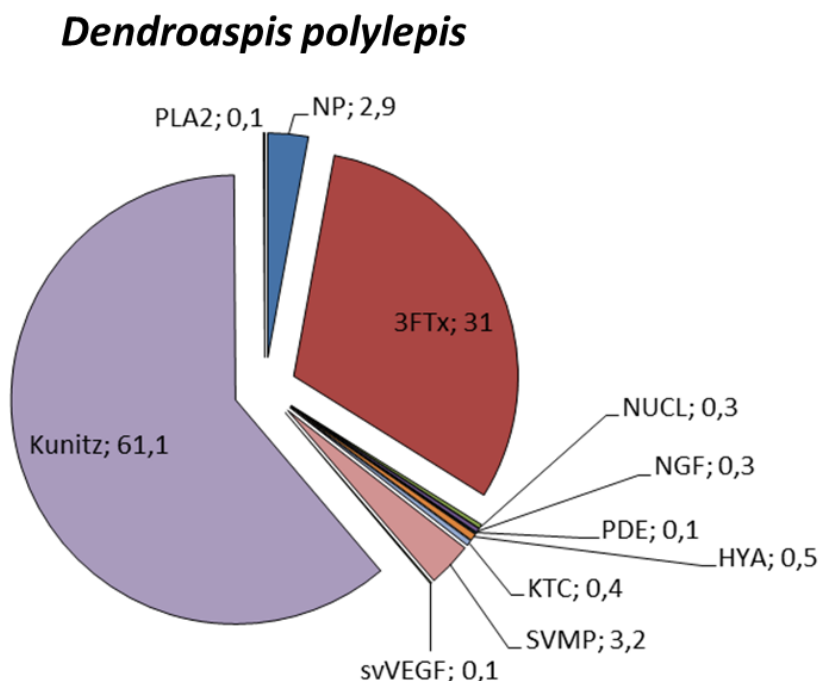


Fonte: adaptado de WHO, 2010

Legenda: à esquerda, uma foto de *Dendroaspis polylepis*, à direita sua distribuição geográfica

Vítimas de envenenamento por *D. polylepis* podem apresentar hipertensão, taquicardia, parestesia nos membros superiores e inferiores e falha respiratória como sintomas (ZAVADA et al., 2011). Um estudo proteômico realizado com o veneno de *D. polylepis*, revelou que este veneno é composto principalmente de moléculas do tipo Kunitz, que inclui as dendrotoxinas de mamba (61%), seguido pelas toxinas do tipo *three-finger-toxins* (31%) e metalopeptidases (3%) (LAUSTSEN et al., 2015). A Figura 12 mostra a distribuição destas moléculas em seu veneno. O fato deste veneno conter uma quantidade expressiva de moléculas do tipo Kunitz e de que estas ainda não foram caracterizadas como inibidores de peptidases, foi um dos principais motivos pela escolha deste veneno para o desenvolvimento do presente trabalho.

Figura 12 - Composição do veneno *Dendroaspis polylepis*



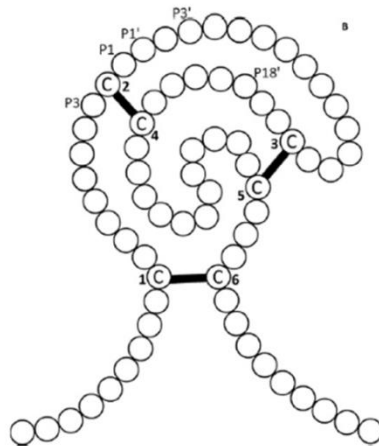
Fonte: adaptado de Lustsen et al., 2015

Legenda: as quantidades estão expressas em porcentagem, KUN= Kunitz; 3FTX = three-finger-toxin; MP = metalopeptidase; svVEGF: fator de crescimento vascular endotelial; NUCL = nucleotidase; PDE = phosphodiesterase; HYA = hialuronidase; KTC = prokineticin; PLA2 = fosfolipase A2; NGF = nerve growth factor; NP = componentes não proteicos

1.5 Inibidores do tipo Kunitz

A primeira molécula do tipo Kunitz foi purificada a partir da soja e descrita como potente inibidor de tripsina (KUNITZ, 1945). Logo após, muitos outros inibidores com características e propriedades similares foram identificados não somente em plantas, mas também em animais, fato que continua ocorrendo até os dias de hoje. Atualmente, um inibidor do tipo Kunitz é classificado como tal por apresentar um motivo composto por uma cadeia de cerca de 60 aminoácidos, estabilizado por três pontes dissulfeto e apresentando um enovelamento como mostrado na Figura 13 (RANASINGHE; MCMANUS, 2013). Até o presente momento, há cerca de 500 moléculas diferentes de Kunitz cujas sequências estão depositadas no banco de dados Uniprot e, apesar desta família de inibidores ser associada à inibição de serinopeptidases, já foram descritos Kunitz capazes de inibir cisteíno e aspartil peptidases (BENDRE; RAMASAMY; SURESH, 2018), com exceção das metalopeptidases.

Figura 13 - Estrutura predita de uma molécula do tipo Kunitz



Fonte: adaptado de Ranasinghe e McManus, 2013

Legenda: Estrutura predita de um inibidor do tipo Kunitz mostrando as seis Cys características, as três ligações de dissulfeto e a região de ligação com a protease P3-P3'

1.6 Procura por inibidores de peptidases

Por conta de seu importante papel na regulação de diversos processos fisiológicos humanos, as peptidases, quando estão em desequilíbrio, podem contribuir para patologias ou doenças. Levando isto em conta, se faz necessária a procura de moduladores de peptidases, com principal foco nas enzimas de importância médica.

Inibidores de peptidases são encontrados na natureza em diversos organismos. Diversos inibidores provenientes do reino vegetal já foram caracterizados como, por exemplo, inibidores denominados Kunitz em soja, inibidores de tripsina descritos em plantas da espécie *Sinapis alba* (SILVA-LOPEZ, 2009), entre outros. No reino animal também são encontrados diversos inibidores de peptidases como é o caso das cistatinas e dos Kunitz, encontradas desde invertebrados até em humanos (MARLOR et al., 1997; LEFEBVRE et al., 2004; RANASINGHE; MCMANUS, 2013; TSIOLAKI et al., 2015).

Uma ordem que tem sido estudada na procura de inibidores é a dos squamata, mais especificamente a subclasse ophidia, clado que compreende todas as serpentes. Algumas destas serpentes são consideradas peçonhentas e são providas de aparelho injetor e glândulas de veneno. Os venenos ofídicos são compostos por uma grande diversidade de substâncias e já se mostrou promissor para a procura de moléculas de interesse biotecnológico e médico. Um exemplo mais antigo é o do fármaco captopril, cuja molécula foi desenvolvida a partir de

um peptídeo presente no veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965; CAMARGO et al., 2012). Outro inibidor caracterizado mais recentemente é uma molécula denominada de mambalgina, descrita no veneno de *Dendroaspis polylepis*. A mambalgina apresenta propriedades analgésicas mediadas através da inibição de canais iônicos (DIOCHOT et al., 2012).

Apesar de vários venenos de serpentes já terem sido estudados enquanto fonte de inibidores de peptidases é possível que novas moléculas, ou novas atividades de moléculas já descritas, ainda possam ser caracterizadas. Este fato ainda é mais relevante quando venenos de serpentes pouco estudadas são utilizados, como é o caso das espécies encontradas no continente africano. Tendo tudo isso em vista, os venenos das seguintes espécies foram selecionados para o estudo de procura de inibidores de peptidases: *Bitis arietans*, *B. gabonica*, *B. nasicornis*, *B. rhinocerus*, *Naja annulifera*, *N. melanoleuca*, *N. mossambica* e *Dendroaspis polylepis*.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrada a inibição da elastase-1 e da catepsina L por peptídeos presentes nas porções de baixas massas moleculares dos venenos de serpentes africanas de três diferentes gêneros. Os estudos foram realizados por meio da purificação, sequenciamento, testes enzimáticos e estudos *in silico* de ancoramento molecular com os peptídeos e seus respectivos alvos. Também foram feitas análises de ancoramento molecular com os BPPs presentes nos venenos de serpentes do gênero *Bitis* e a ECA. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- 1) A elastase-1 teve sua atividade catalítica inibida por diversas frações dos venenos de *Naja* e *Dendroaspis*, mas não pelas frações de *Bitis*.
- 2) A catepsina L teve sua atividade catalítica inibida por diversas frações de todos os venenos estudados nesta tese.
- 3) O sequenciamento das frações de interesse mostrou que os inibidores da elastase-1 e catepsina L pertencem à basicamente dois grupos de toxinas, as *three-finger toxins* e as moléculas do tipo Kunitz.
- 4) Foi demonstrado que moléculas Kunitz dos venenos de *Naja* e *Dendroaspis*, anteriormente descritas apenas como bloqueadores de canais iônicos, também são capazes de inibir peptidases.
- 5) A fração DPSA8 foi capaz de inibir em intensidade semelhante a catepsina L e a elastase-1, mostrando-se um inibidor de duas classes de peptidases.
- 6) O peptídeo DPSA8P apresentou um K_i de 8 μM para a inibição da elastase-1, e o mecanismo de inibição determinado foi o competitivo.
- 7) As análises de ancoramento da elastase-1 com o peptídeo DPSA8P mostrou interações deste peptídeo com diferentes regiões da enzima, inclusive com o sítio catalítico.
- 8) Os resultados dos ancoramentos moleculares do DPSA8P com a elastase-1, juntamente com o conhecimento sobre a especificidade primária da catepsina L, serviram de base para a estratégia de síntese do PEP2. Este peptídeo sintético se mostrou eficiente para a inibição da catepsina L, apresentando K_i de 1,96 μM , e o mecanismo de inibição determinado foi o competitivo.
- 9) Os resultados de ancoramento molecular dos BPPs do veneno das *Bitis* com a ECA mostraram boa correlação entre os valores de afinidade calculados e os valores de K_i , e mostraram as interações ligante/enzima destas moléculas.

REFERÊNCIAS

- ABE, R.; YAMAMOTO, K.; SINOHARA, H. Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and α -macroglobulin. **Journal of Biochemistry**, v. 106, n. 4, p. 564–568, 1989.
- ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D.; RIORDAN, J. F.; EHLERS, M. R. W. **ACE revisited: A new target for structure-based drug design** *Nature Reviews Drug Discovery* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2003.
- ALTAY, M. Which Factors Determine Exocrine Pancreatic Dysfunction in Diabetes Mellitus? **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 22, p. 2699–2705, jun. 2019.
- AZIZI, M.; ROUSSEAU, A.; EZAN, E.; GUYENE, T. T.; MICHELET, S.; GROGNET, J. M.; LENFANT, M.; CORVOL, P.; MENARD, J. Acute Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Increases the Plasma Level of the Natural Stem Cell Regulator N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 3, p. 839–844, fev. 1996.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. United States: Elsevier Academic Press, 2004.
- BEN-ADERET, L.; MERQUIOL, E.; FAHHAM, D.; KUMAR, A.; REICH, E.; BEN-NUN, Y.; KANDEL, L.; HAZE, A.; LIEBERGALL, M.; KOSINSKA, M. K.; STEINMEYER, J.; TURK, B.; BLUM, G.; DVIR-GINZBERG, M. Detecting Cathepsin Activity in Human Osteoarthritis via Activity-Based Probes. **Arthritis research & therapy**, v. 17, p. 69, mar. 2015.
- BENDRE, A. D.; RAMASAMY, S.; SURESH, C. G. Analysis of Kunitz Inhibitors from Plants for Comprehensive Structural and Functional Insights. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 933–943, jul. 2018.
- BERTI, P. J.; STORER, A. C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n. 2, p. 273–283, 17 fev. 1995.
- BLAYLOCK, R. S.; LICHTMAN, A. R.; POTGIETER, P. D. Clinical Manifestations of Cape Cobra (*Naja Nivea*) Bites. A Report of 2 Cases. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 68, n. 5, p. 342–344, ago. 1985.
- BLOW, A. M. Action of Human Lysosomal Elastase on the Oxidized B Chain of Insulin. **The Biochemical journal**, v. 161, n. 1, p. 13–16, jan. 1977.
- BOHLEY, P.; SEGLEN, P. O. Proteases and Proteolysis in the Lysosome. **Experientia**, v. 48, n. 2, p. 151–157, fev. 1992.
- BOTES, D. P.; VILJOEN, C. C. The Amino Acid Sequence of Three Non-Curarimimetic toxins from *Naja Nivea* Venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 446, n. 1, p. 1–9, set. 1976.

BRENDA - Information on EC 3.4.21.36 - pancreatic elastase. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.21.36>>.

BURRAGE, P. S.; MIX, K. S.; BRINCKERHOFF, C. E. Matrix Metalloproteinases: Role in Arthritis. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 529–543, jan. 2006.

CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake Venomics 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, jul. 2007.

CAMARGO, A. C. M.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M. T. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516–523, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835190>>.

CARLSSON, F. H.; JOUBERT, F. J. Snake venom toxins The isolation and purification of three cytotoxin homologues from the venom of the forest cobra (*Naja melanoleuca*) and the complete amino acid sequence of toxin VIII. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 336, n. 2, p. 453–469, 1974.

CARLSSON, F. H. Snake Venom Toxins. The Primary Structure of Protein S4C11. A Neurotoxin Homologue from the Venom of Forest Cobra (*Naja Melanoleuca*). **Biochimica et biophysica acta**, v. 400, n. 2, p. 310–321, ago. 1975.

CHABBAT, J.; PORTE, P.; TELLIER, M.; STEINBUCH, M. Aprotinin Is a Competitive Inhibitor of the Factor VIIa-Tissue Factor Complex. **Thrombosis research**, v. 71, n. 3, p. 205–215, ago. 1993.

CHANDRAN, K.; SULLIVAN, N. J.; FELBOR, U.; WHELAN, S. P.; CUNNINGHAM, J. M. Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5728, p. 1643–1645, jun. 2005.

CHIPPAUX, J. P. **Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!** **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** BioMed Central Ltd., 8 ago. 2017.

CIOLEK, J.; REINFRANK, H.; QUINTON, L.; VIENGCHAREUN, S.; STURA, E. A.; VERA, L.; SIGISMEAU, S.; MOUILLAC, B.; ORCEL, H.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; DROCTOVE, L.; BEAU, F.; NEVOUX, J.; LOMBES, M.; MOURIER, G.; DE PAUW, E.; SERVENT, D.; MENDRE, C.; WITZGALL, R.; GILLES, N. Green Mamba Peptide Targets Type-2 Vasopressin Receptor against Polycystic Kidney Disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 27, p. 7154–7159, jul. 2017.

CURRIER, R. B.; HARRISON, R. A.; ROWLEY, P. D.; LAING, G. D.; WAGSTAFF, S. C. Intra-Specific Variation in Venom of the African Puff Adder (*Bitis Arietans*): Differential Expression and Activity of Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 4, p. 864–873, abr. 2010.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue Injury in Neutrophilic Inflammation.

Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society. [et al.], v. 46, n. 10, p. 382–391, out. 1997.

DEDDISH, P. A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H. L.; WANG, H. Z.; SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. N-Domain-Specific Substrate and C-Domain Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: Angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 31, n. 4, p. 912–917, abr. 1998.

DIOCHOT, S.; BARON, A.; SALINAS, M.; DOUGUET, D.; SCARZELLO, S.; DABERT-GAY, A.-S.; DEBAYLE, D.; FRIEND, V.; ALLOUI, A.; LAZDUNSKI, M.; LINGUEGLIA, E. Black Mamba Venom Peptides Target Acid-Sensing Ion Channels to Abolish Pain. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 552–555, out. 2012.

DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. Domain Inhibitory and Bacteriostatic Activities of the Five-Domain Kazal-Type Serine Proteinase Inhibitor from Black Tiger Shrimp *Penaeus Monodon*. **Developmental and comparative immunology**, v. 33, n. 4, p. 481–488, abr. 2009.

DUMONT, L.; VERNEUIL, B.; WALLACH, J.; JULIEN, R. Purification and characterization of an alkaline elastase from *Myxococcus xanthus*. **European journal of biochemistry**, v. 223, n. 3, p. 775–82, 1 ago. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8055953>>.

ENG, W. S. et al. Kunitz Peptides. In: **Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology, and Biodiscovery**. Oxford: Oxford University Press, 2015. p. 281–290.
FERREIRA, S. H. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF BOTHROPS JARARCA. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 24, p. 163–169, fev. 1965.

FOROUHAR, F.; HUANG, W.-N.; LIU, J.-H.; CHIEN, K.-Y.; WU, W.; HSIAO, C.-D. Structural Basis of Membrane-Induced Cardiotoxin A3 Oligomerization. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21980–21988, jun. 2003.

FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual Dimorphism in Venom of Bothrops Jararaca (Serpentes: Viperidae). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 4, p. 401–410, set. 2006.

GLENN, J. L.; STRAIGHT, R. Mojave Rattlesnake *Crotalus Scutulatus Scutulatus* Venom: Variation in Toxicity with Geographical Origin. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 16, n. 1, p. 81–84, 1978.

GONCALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L.; JORGE, R. J. B.; LEITAO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; DE MIRANDA, J.; NOWATZKI, J.; DE MORAIS-ZANI, K.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNANDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIERREZ, J. M.; CORREA-NETTO, C.; CALVETE, J. J. Combined Venomics, Venom Gland Transcriptomics, Bioactivities, and Antivenomics of Two Bothrops Jararaca Populations from Geographic Isolated Regions within the Brazilian Atlantic Rainforest. **Journal of proteomics**, v. 135, p. 73–89, mar. 2016.

GONZÁLEZ, Y.; PONS, T.; GIL, J.; BESADA, V.; ALONSO-DEL-RIVERO, M.;

TANAKA, A. S.; ARAUJO, M. S.; CHÁVEZ, M. A. Characterization and comparative 3D modeling of CmPI-II, a novel “non-classical” Kazal-type inhibitor from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca). **Biological chemistry**, v. 388, n. 11, p. 1183–94, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976011>>.

GUERCIO, R. A. P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Ontogenetic Variations in the Venom Proteome of the Amazonian Snake *Bothrops Atrox*. **Proteome science**, v. 4, p. 11, maio 2006.

HARRISON, C.; ACHARYA, K. R. ACE for All - a Molecular Perspective. **Journal of cell communication and signaling**, v. 8, n. 3, p. 195–210, set. 2014.

HARVEY, A. L.; ROBERTSON, B. Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 23, p. 3065–3072, dez. 2004.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr000033x>>.

HILGENDORFF, A.; PARAI, K.; ERTSEY, R.; JAIN, N.; NAVARRO, E. F.; PETERSON, J. L.; TAMOSIUNIENE, R.; NICOLLS, M. R.; STARCHER, B. C.; RABINOVITCH, M.; BLAND, R. D. Inhibiting lung elastase activity enables lung growth in mechanically ventilated newborn mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 184, n. 5, p. 537–46, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562133>>.

HOOVER, N. M. Families of Zinc Metalloproteases. **FEBS letters**, v. 354, n. 1, p. 1–6, out. 1994.

HUANG, T. F.; PENG, H. C.; PENG, I. S.; TENG, C. M.; OUYANG, C. An Antiplatelet Peptide, Gabonin, from *Bitis Gabonica* Snake Venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 298, n. 1, p. 13–20, out. 1992.

HUANG, T. F.; WANG, W. J.; TENG, C. M.; OUYANG, C. Mechanism of Action of the Antiplatelet Peptide, Arietin, from *Bitis Arietans* Venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1074, n. 1, p. 144–150, maio 1991.

INC., H.-L. R. Sánchez Rubén; Alvarez; Banner; David; Ceccarelli Simona; M.; Grether; Uwe; Haap; Wolfgang; Hartman; Peter; Hartmann; Guido; Hilpert; Hans; Kuehne; Holger; Mauser; Harald; Plancher; Jean-Marc. **Preparation of proline dipetidyl nitrile derivatives as cathepsin particularly cathepsin S and L inhibitor.**, v. US20100267, 2010. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US43442628&_cid=P12-JZLN XU-69163-1>.

INC., H.-L. R. Lilli, Anselm David, Banner Wolfgang, Haap Bernd, Kuhn Thomas, Luebbers Jens-Uwe, Peters Beat, Spinnler. **Novel pyridine derivatives as cathepsin inhibitors and their preparation**, v. US20150307, 2015. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US152956410&_cid=P12-JZLOFP-71743-1>.

INC., V. Booth, Robert. **Cathepsin inhibitors for the treatment of bone cancer and bone cancer pain**, v. WO20121513, 2012. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012151319&_cid=P12-JZLJXN-46355-1>.

JANOFF, A. Elastases and Emphysema. Current Assessment of the Protease-Antiprotease Hypothesis. **The American review of respiratory disease**, v. 132, n. 2, p. 417–433, ago. 1985.

JENNINGS, B. R.; SPEARMAN, C. W.; KIRSCH, R. E.; SHEPHARD, E. G. A Novel High Molecular Weight Fibrinogenase from the Venom of Bitis Arietans. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1427, n. 1, p. 82–91, mar. 1999.

JOUBERT, F. J.; STRYDOM, D. J. Snake venoms. The amino-acid sequence of trypsin inhibitor E of Dendroaspis polylepis polylepis (Black Mamba) venom. **European journal of biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 191–8, 1 jun. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/668688>>.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, a R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, 4 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2577696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KATSCHINSKI, M.; SCHIRRA, J.; BROSS, A.; GOKE, B.; ARNOLD, R. Duodenal Secretion and Fecal Excretion of Pancreatic Elastase-1 in Healthy Humans and Patients with Chronic Pancreatitis. **Pancreas**, v. 15, n. 2, p. 191–200, ago. 1997.

KODAMA, R. T.; CAJADO-CARVALHO, D.; KUNIYOSHI, A. K.; KITANO, E. S.; TASHIMA, A. K.; BARNABÉ, B. F.; TAKAKURA, A. C.; SERRANO, S. M. T.; DIAS-DASILVA, W.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. V. New Proline-Rich Oligopeptides from the Venom of African Adders: Insights into the Hypotensive Effect of the Venoms. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 6, p. 1180–1187, jun. 2015.

KOLKENBROCK, H.; TSCHESCHE, H. A New Inhibitor of Elastase from the Sea Anemone (Anemonia Sulcata). **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 368, n. 2, p. 93–99, fev. 1987.

KSIAZEK, M.; MIZGALSKA, D.; ENGHILD, J. J.; SCAVENIUS, C.; THOGERSEN, I. B.; POTEPA, J. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen Tannerella forsythia, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 1, p. 658–70, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389290>>.

KUNITZ, M. CRYSTALLIZATION OF A TRYPSIN INHIBITOR FROM SOYBEAN. **Science (New York, N.Y.)**, v. 101, n. 2635, p. 668–669, jun. 1945.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. **Journal of molecular biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, maio 1982.

LAGENTE, V.; MANOURY, B.; NENAN, S.; LE QUEMENT, C.; MARTIN-CHOULY, C.; BOICHOT, E. Role of Matrix Metalloproteinases in the Development of Airway Inflammation and Remodeling. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 38, n. 10, p. 1521–1530, out. 2005.

LANCELIN, J. M.; FORAY, M. F.; PONCIN, M.; HOLLECKER, M.; MARION, D. Proteinase Inhibitor Homologues as Potassium Channel Blockers. **Nature structural biology**, v. 1, n. 4, p. 246–250, abr. 1994.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, out. 2011.

LAUSTSEN, A. H.; LOMONTE, B.; LOHSE, B.; FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. **Journal of Proteomics**, v. 119, p. 126–142, 4 abr. 2015.

LEFEBVRE, C.; COCQUERELLE, C.; VANDENBULCKE, F.; HOT, D.; HUOT, L.; LEMOINE, Y.; SALZET, M. Transcriptomic Analysis in the Leech *Theromyzon Tessulatum*: Involvement of Cystatin B in Innate Immunity. **The Biochemical journal**, v. 380, n. Pt 3, p. 617–625, jun. 2004.

LENK, P.; KALYABINA, S.; WINK, M.; JOGER, U. Evolutionary Relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 19, n. 1, p. 94–104, abr. 2001.

LETO, G.; SEPPORTA, M. V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C.; TUMMINELLO, F. M. Cathepsin L in Metastatic Bone Disease: Therapeutic Implications. **Biological chemistry**, v. 391, n. 6, p. 655–664, jun. 2010.

LI, Y. Y.; FANG, J.; AO, G. Z. **Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present)**Expert Opinion on Therapeutic Patents Taylor and Francis Ltd, 3 jun. 2017.

LIMITED, A. T. Quibell, Martin Watts, John Paul Flinn, Nicholas Sean. **Preparation of fuopyrrolyl amino acid amides as dual cathepsin S and K inhibitors.**, v. WO20091128, 2009. Disponível em:
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2009112839&tab=PCTBIBLIO&_cid=P12-JZLJO3-44684-1>.

MA, B.; ZHANG, K.; HENDRIE, C.; LIANG, C.; LI, M.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. PEAKS: Powerful Software for Peptide de Novo Sequencing by Tandem Mass Spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 20, p. 2337–2342, 2003.

MALIH, I.; AHMAD RUSMILI, M. R.; TEE, T. Y.; SAILE, R.; GHALIM, N.; OTHMAN, I. Proteomic analysis of Moroccan cobra *Naja haje legionis* venom using tandem mass spectrometry. **Journal of proteomics**, v. 96, p. 240–52, 16 jan. 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269350>>.

MARLOR, C. W.; DELARIA, K. A.; DAVIS, G.; MULLER, D. K.; GREVE, J. M.; TAMBURINI, P. P. Identification and Cloning of Human Placental Bikunin, a Novel Serine Protease Inhibitor Containing Two Kunitz Domains. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 18, p. 12202–12208, maio 1997.

MASUYER, G.; SCHWAGER, S. L. U.; STURROCK, E. D.; ISAAC, R. E.; ACHARYA, K. R. Molecular Recognition and Regulation of Human Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Activity by Natural Inhibitory Peptides. **Scientific reports**, v. 2, p. 717, 2012.

MORIN, J.; PELLETIER, J. M. **Density functional theory : principles, applications and analysis**. United States: Nova Science Publishers Inc, 2013

MORTENSEN, S. B.; SOTTRUP-JENSEN, L.; HANSEN, H. F.; PETERSEN, T. E.; MAGNUSSON, S. Primary and secondary cleavage sites in the bait region of alpha 2-macroglobulin. **FEBS letters**, v. 135, n. 2, p. 295–300, 7 dez. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6172288>>.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. J. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491–21494, jul. 1999.

NAKAGAWA, T.; ROTH, W.; WONG, P.; NELSON, A.; FARR, A.; DEUSSING, J.; VILLADANGOS, J. A.; PLOEGH, H.; PETERS, C.; RUDENSKY, A. Y. Cathepsin L: Critical Role in Ii Degradation and CD4 T Cell Selection in the Thymus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5362, p. 450–453, abr. 1998.

NIKAI, T.; MOMOSE, M.; OKUMURA, Y.; OHARA, A.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Kallidin-Releasing Enzyme from Bitis Arietans (Puff Adder) Venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 307, n. 2, p. 304–310, dez. 1993.

NOVI ENEM - **Bioquímica das Proteínas - Texto: Bioquímica das Proteínas**. Disponível em: <<http://www.universiaenem.com.br/sistema/faces/pagina/publica/conteudo/texto-html.xhtml?redirect=19842728264572572428864281699>>.

ODDEPALLY, R.; SRIRAM, G.; GURUPRASAD, L. Purification and Characterization of a Stable Kunitz Trypsin Inhibitor from Trigonella Foenum-Graecum (Fenugreek) Seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26–36, dez. 2013.

OGDEN, B. E.; MURPHY, S.; SAUNDERS, G. C.; JOHNSON, J. D. Lung Lavage of Newborns with Respiratory Distress Syndrome. Prolonged Neutrophil Influx Is Associated with Bronchopulmonary Dysplasia. **Chest**, v. 83, n. 5 Suppl, p. 31S–33S, maio 1983.

OHKURA, M.; MIYASHITA, Y.; NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; OHIZUMI, Y. Properties of Ca⁺⁺ Release Induced by Puff Adder Lectin, a Novel Lectin from the Snake Bitis Arietans, in Sarcoplasmic Reticulum. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 277, n. 2, p. 1043–1048, maio 1996.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. **Science (New York, N.Y.)**, v. 196, n. 4288, p. 441–444, abr. 1977.

ORGANIZATION, W. H. WHO Guidelines for the production and control and regulation of

Snake antivenom immunoglobulins. 2010.

PASQUALOTO KFM, SILVA BAVG, KODAMA RT, et al. Exploring the C-domain inhibition of angiotensin converting enzyme through novel bradykinin potentiating peptides. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 6, 9 nov. 2018.

PENNSYLVANIA, T. T. of the U. of. Diamond, Scott, L.; Beavers, Mary, Pat; Huryn, Donna; Myers, Michael, C.; Smith, Amos, B.; Shah, Parag, P.; Liu, Zhuqing; **Inhibitors of human cathepsin L, cathepsin B, and cathepsin S**, v. US20110207, 2011. Disponível em: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2009136997&_cid=P12-JZLKAE-48649-1>.

PETERMANN, I.; MAYER, C.; STYPMANN, J.; BINIOSSEK, M. L.; TOBIN, D. J.; ENGELN, M. A.; DANDEKAR, T.; GRUNE, T.; SCHILD, L.; PETERS, C.; REINHECKEL, T. Lysosomal, Cytoskeletal, and Metabolic Alterations in Cardiomyopathy of Cathepsin L Knockout Mice. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 8, p. 1266–1268, jun. 2006.

PETRAS, D.; SANZ, L.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; SOLANO, D.; VARGAS, M.; LEÓN, G.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G.; HARRISON, R. A.; DURFA, N.; NASIDI, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of African spitting cobras: toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the pan-African EchiTAb-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 3, p. 1266–80, 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21171584>>.

PIERCE, B. G.; WIEHE, K.; HWANG, H.; KIM, B.-H.; VREVEN, T.; WENG, Z. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 12, p. 1771–1773, jun. 2014.

PIERCE, B.; WENG, Z. ZRANK: Reranking Protein Docking Predictions with an Optimized Energy Function. **Proteins**, v. 67, n. 4, p. 1078–1086, jun. 2007.

PIERCE, B.; WENG, Z. A Combination of Rescoring and Refinement Significantly Improves Protein Docking Performance. **Proteins**, v. 72, n. 1, p. 270–279, jul. 2008.

POH, S. L.; MOURIER, G.; THAI, R.; ARMUGAM, A.; MOLGO, J.; SERVENT, D.; JEYASEELAN, K.; MENEZ, A. A Synthetic Weak Neurotoxin Binds with Low Affinity to Torpedo and Chicken Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. **European journal of biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4247–4256, set. 2002.

RANASINGHE, S.; MCMANUS, D. P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. **Developmental and comparative immunology**, v. 39, n. 3, p. 219–27, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186642>>.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for Micro-Purification, Enrichment, Pre-Fractionation and Storage of Peptides for Proteomics Using StageTips. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.;

FINN, R. D. The MEROPS Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors in 2017 and a Comparison with Peptidases in the PANTHER Database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624–D632, jan. 2018.

REY-SUAREZ, P.; NUNEZ, V.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Proteomic and Biological Characterization of the Venom of the Redtail Coral Snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 2, p. 655–667, dez. 2011.

RIEGER, K. J.; SAEZ-SERVENT, N.; PAPET, M. P.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; MORGAT, J. L.; THIERRY, J.; VOELTER, W.; LENFANT, M. Involvement of Human Plasma Angiotensin I-Converting Enzyme in the Degradation of the Haemoregulatory Peptide N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. **The Biochemical journal**, v. 296 (Pt 2, p. 373–378, dez. 1993.

ROBERTSON, B.; OWEN, D.; STOW, J.; BUTLER, C.; NEWLAND, C. Novel Effects of Dendrotoxin Homologues on Subtypes of Mammalian Kv1 Potassium Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes. **FEBS letters**, v. 383, n. 1–2, p. 26–30, mar. 1996.

ROUSSEAU, M. F.; MELIN, J.; BENEDICT, C. R.; AHN, S.; RAPHAEL, D.; BORNEMANN, M.; POULEUR, H. Effects of Nisoldipine Therapy on Myocardial Perfusion and Neuro-Hormonal Status in Patients with Severe Ischaemic Left Ventricular Dysfunction. **European heart journal**, v. 15, n. 7, p. 957–964, jul. 1994.

RUPANAGUDI, K. V.; KULKARNI, O. P.; LICHTNEKERT, J.; DARISIPUDI, M. N.; MULAY, S. R.; SCHOTT, B.; GRUNER, S.; HAAP, W.; HARTMANN, G.; ANDERS, H.-J. Cathepsin S Inhibition Suppresses Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis Because Cathepsin S Is Essential for MHC Class II-Mediated CD4 T Cell and B Cell Priming. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 2, p. 452–463, fev. 2015.

SASAKI, S. D.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; TANAKA, A. S. An Unexpected Inhibitory Activity of Kunitz-Type Serine Proteinase Inhibitor Derived from *Boophilus microplus* Trypsin Inhibitor on Cathepsin L. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 341, n. 1, p. 266–272, mar. 2006.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, abr. 1967.

SCHORNBERG, K.; MATSUYAMA, S.; KABSCH, K.; DELOS, S.; BOUTON, A.; WHITE, J. Role of Endosomal Cathepsins in Entry Mediated by the Ebola Virus Glycoprotein. **Journal of virology**, v. 80, n. 8, p. 4174–4178, abr. 2006.

SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rpaid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. **Behavior and Analysis of Rpaid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**, v. 60, n. 1, p. 220–221, 1975.

SEGURA, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; LEON, G.; HARRISON, R.; DURFA, N.; NASIDI, A.; CALVETE, J. J.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GUTIERREZ, J. M. Preclinical Assessment of the Efficacy of a New Antivenom (EchiTAb-Plus-ICP) for the Treatment of Viper Envenoming in Sub-Saharan Africa. **Toxicon : official journal of the**

International Society on Toxinology, v. 55, n. 2–3, p. 369–374, 2010.

SERVENT, D.; WINCKLER-DIETRICH, V.; HU, H. Y.; KESSLER, P.; DREVET, P.; BERTRAND, D.; MENEZ, A. Only Snake Curaremimetic Toxins with a Fifth Disulfide Bond Have High Affinity for the Neuronal Alpha7 Nicotinic Receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24279–24286, set. 1997.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; AMIR, M.; BAIG, M. A.; QURESHI, M. I.; ALI, S.; FATIMA, S. Allium Sativum Protease Inhibitor: A Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Garlic Is a New Comrade of the Serpin Family. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0165572, 2016.

SIGLE, R.; HACKETT, M.; AIRD, S. D. Primary Structures of Four Trypsin Inhibitor E Homologs from Venom of Dendroaspis Angusticeps: Structure-Function Comparisons with Other Dendrotoxin Homologs. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 3, p. 297–308, mar. 2002.

SILVA-LOPEZ. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Proteases Inhibitors Originated from Plants: Useful Approach for Development of New Drug Estado da Arte / State of the Art **Revista Fitos**. v. 4, 2009.

SKEGGS, L. T. J.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The Preparation and Function of the Hypertensin-Converting Enzyme. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 3, p. 295–299, mar. 1956.

SMITH, D.; TIKHONOVA, I. G.; JEWURST, H. L.; DRYSDALE, O. C.; DVOŘÁK, J.; ROBINSON, M. W.; CWIKLINSKI, K.; DALTON, J. P. Unexpected activity of a novel kunitz-type inhibitor Inhibition of cysteine proteases but not serine proteases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 37, p. 19220–19234, 2016.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

SPEER, C. P.; RUESS, D.; HARMS, K.; HERTING, E.; GEFELLER, O. Neutrophil elastase and acute pulmonary damage in neonates with severe respiratory distress syndrome. **Pediatrics**, v. 91, n. 4, p. 794–9, abr. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464669>>.

STRYDOM, D. J. Snake Venom Toxins. The Amino Acid Sequences of Two Toxins from Dendroaspis Polylepis Polylepis (Black Mamba) Venom. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, n. 12, p. 4029–4042, jun. 1972.

STRYDOM, D. J. Snake venom toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom. **European journal of biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 169–76, 1 out. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/991854>>.

TSIOLAKI, P. L.; LOUROS, N. N.; HAMODRAKAS, S. J.; ICONOMIDOU, V. A.

Exploring the “aggregation-Prone” Core of Human Cystatin C: A Structural Study. **Journal of structural biology**, v. 191, n. 3, p. 272–280, set. 2015.

VAIYAPURI, S.; HARRISON, R. A.; BICKNELL, A. B.; GIBBINS, J. M.; HUTCHINSON, G. 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, mar. 2010.

VULFIUS, C. A.; SPIROVA, E. N.; SEREBRYAKOVA, M. V; SHELUKHINA, I. V; KUDRYAVTSEV, D. S.; KRYUKOVA, E. V; STARKOV, V. G.; KOPYLOVA, N. V; ZHMAK, M. N.; IVANOV, I. A.; KUDRYASHOVA, K. S.; ANDREEVA, T. V; TSETLIN, V. I.; UTKIN, Y. N. Peptides from Puff Adder Bitis Arietans Venom, Novel Inhibitors of Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 121, p. 70–76, out. 2016.

WANG, C.-I. A.; REEKS, T.; VETTER, I.; VERGARA, I.; KOVTUN, O.; LEWIS, R. J.; ALEWOOD, P. F.; DUREK, T. Isolation and Structural and Pharmacological Characterization of Alpha-Elapitoxin-Dpp2d, an Amidated Three Finger Toxin from Black Mamba Venom. **Biochemistry**, v. 53, n. 23, p. 3758–3766, jun. 2014.

WARRELL, D. A.; BARNES, H. J.; PIBURN, M. F. Neurotoxic Effects of Bites by the Egyptian Cobra (Naja Haje) in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 1, p. 78–79, 1976.

WARRELL, D. A.; ORMEROD, L. D.; DAVIDSON, N. M. Bites by Puff-Adder (Bitis Arietans) in Nigeria, and Value of Antivenom. **British medical journal**, v. 4, n. 5998, p. 697–700, dez. 1975.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The Two Homologous Domains of Human Angiotensin I-Converting Enzyme Are Both Catalytically Active. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002–9008, maio 1991.

WEISE, K. H.; CARLSSON, F. H.; JOUBERT, F. J.; STRYDOM, D. J. Snake Venom Toxins. The Purification of Toxins VIII1 and VII2, Two Cytotoxin Homologues from Banded Egyptian Cobra (Naja Haje Annulifera) Venom, and the Complete Amino Acid Sequence of Toxin VIII1. **Hoppe-Seyler’s Zeitschrift fur physiologische Chemie**, v. 354, n. 10–11, p. 1317–1326, 1973.

WHO | Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa. **WHO**, 2017. Acesso em: 20 ago 2019

WIEDOW, O.; MEYER-HOFFERT, U. Neutrophil Serine Proteases: Potential Key Regulators of Cell Signalling during Inflammation. **Journal of internal medicine**, v. 257, n. 4, p. 319–328, abr. 2005.

WILLIAMS, D.; GUTIERREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: An Antidote for Snake Bite. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9708, p. 89–91, jan. 2010.

WUSTER, W.; CROOKES, S.; INEICH, I.; MANE, Y.; POOK, C. E.; TRAPE, J.-F.; BROADLEY, D. G. The Phylogeny of Cobras Inferred from Mitochondrial DNA Sequences:

Evolution of Venom Spitting and the Phylogeography of the African Spitting Cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja Nigricollis* Complex). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 45, n. 2, p. 437–453, nov. 2007.

YANG, H. Y.; ERDOS, E. G.; LEVIN, Y. A Dipeptidyl Carboxypeptidase That Converts Angiotensin I and Inactivates Bradykinin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 214, n. 2, p. 374–376, ago. 1970.

YANG, W.; FENG, J.; WANG, B.; CAO, Z.; LI, W.; WU, Y.; CHEN, Z. 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, fev. 2014.

ZANI, M.-L.; NOBAR, S. M.; LACOUR, S. A.; LEMOINE, S.; BOUDIER, C.; BIETH, J. G.; MOREAU, T. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. **European journal of biochemistry**, v. 271, n. 12, p. 2370–8, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182352>>.

ZAVADA, J.; VALENTA, J.; KOPECKY, O.; STACH, Z.; LEDEN, P. Black Mamba *Dendroaspis Polylepis* Bite: A Case Report. **Prague medical report**, v. 112, n. 4, p. 298–304, 2011.