



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PRISCILA CORDEIRO LIMA FERNANDES

**ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS E ANTIPEPTIDÁSICAS DE PEÇONHAS  
BOTRÓPICAS**

CAMPINAS

2016



PRISCILA CORDEIRO LIMA FERNANDES

**ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS E ANTIPEPTIDÁSICAS DE PEÇONHAS  
BOTRÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP para a obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILA CORDEIRO LIMA FERNANDES, E ORIENTADA PELO PROF. DR. STEPHEN HYSLOP.

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134065/2014-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F391a Fernandes, Priscila Cordeiro Lima, 1984-  
Atividades peptidásicas e anti-peptidásicas de peçonhas botrópicas / Priscila Cordeiro Lima Fernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Stephen Hyslop.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Peçonhas. 2. Bothrops. 3. Peptídeo hidrolases. 4. Inibidores de proteases. I. Hyslop, Stephen, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Peptidase and anti-peptidase activities of Bothrops venoms

**Palavras-chave em inglês:**

Venoms

Bothrops

Peptide hydrolases

Protease inhibitors

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Stephen Hyslop [Orientador]

André Lisboa Rennó

Yoko Oshima Franco

**Data de defesa:** 28-03-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**PRISCILA CORDEIRO LIMA FERNANDES**

---

**Orientador PROF. DR. STEPHEN HYSLOP**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP**

**2. PROF. DR. ANDRÉ LISBOA RENNÓ**

**3. PROFA. DRA. YOKO OSHIMA FRANCO**

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

**Data: 28 de março de 2016**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho ao meu esposo, **Miquéias Fernandes**, por todo apoio, amor, carinho e paciência. Por sempre me incentivar e acreditar em mim! Obrigada meu amor, essa vitória também é sua!!!

Aos meus pais, **Milton e Pércia**, por terem me ensinado o caminho que devo andar, por serem meus exemplos de vida, por todo o seu amor!!!

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, a **Deus**, por ter me concedido mais essa vitória!

**Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop,**

Por ter aceitado me orientar ao longo desta jornada.  
Por todas as vezes que me socorreu em momentos difíceis.  
Pela sua simplicidade, sabedoria e carinho.

**A todos** do Laboratório de Farmacologia Bioquímica,  
que me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho,  
**especialmente** aos técnicos **José Ilton e Patrícia Panunto.**

Ao **Programa de Pós-Graduação** em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas,  
bem como aos coordenadores Profs. **Drs. Edson Antunes e Gabriel Forato Anhô,** pelas  
condições oferecidas para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa que tornou possível a realização desta dissertação.

**Agradeço em especial**

Ao meu esposo **Miquéias Fernandes**, por sempre me apoiar, incentivar e me compreender ao  
longo dessa jornada.

Meus pais **Milton e Pércia** por todo seu amor.

Aos meus sogros **Artur e Rubeneide**, por todo apoio

Aos meus cunhados **Keila e Micael**, pela divertida distração e companhia em momentos de  
estresse (que foram muitos, aliás).

A **Elionai Marcelino Pereira**, que foi um instrumento de Deus na minha vida nessa conquista.

“Entrega o teu caminho ao **Senhor**, confia Nele, e Ele tudo fará”

Salmos 37:5

“Mas em todas as coisas somos mais que vencedores, por Aquele que nos amou”

Romanos 8:37

“Agora, pois, ó Deus nosso, graças te damos, e louvamos o nome da Tua glória”

1 Crônicas 29:13

## LISTA DE DROGAS E REAGENTES

Acrilamida	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Agarose	USB (EUA)
Álcool etílico	SYNTH (SP, BRASIL)
Álcool metílico	SYNTH (SP, BRASIL)
Azul de Coomassie	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Caseína	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Ditiotreitol (DTT)	GE LIFESCIENCES (EUA)
Fosforamidon	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
HEPES	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
L-Leucina- <i>p</i> -nitroanilida	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Marcador de massa molecular para SDS-PAGE	GE LIFESCIENCES (EUA)
Metil-bis-acrilamida	GE LIFESCIENCES (EUA)
N-dansil-D-alanil-glicil- <i>p</i> -nitrofenil-alanilglicina	SIGMA CHEMICAL CO. (EUA)
Persulfato de amônia	GE LIFESCIENCES (EUA)
Reagente Folin-Ciocalteu	DINÂMICA (SP, BRASIL)
Q-Sepharose	GE LIFESCIENCES (EUA)
Superdex 75	GE LIFESCIENCES (EUA)
Tris base	BIOSCIENCES

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APA	Aminopectidase A
APB	Aminopectidase B
APM	Aminopectidase M
BPP	Peptídeos potencializadores de bradicinina ( <i>bradykinin-potentiating peptides</i> )
CNP	Peptídeos natriuréticos do tipo C
CO	Monóxido de carbono
CRISP	Proteínas ricas em cisteína ( <i>cysteine-rich secretory proteins</i> )
DPP IV	Dipeptidil peptidase IV
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECE	Enzima conversora da endotelina
ET-1	Endotelina-1
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
NEP 24.11	Endopeptidase neutral 24.11
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
PYY	Peptídeo YY
SVMP	Metaloprotease de peçonha ofídica ( <i>snake venom metalloprotease</i> )
SVSP	Serinoproteínases de peçonha ofídica ( <i>snake venom serine proteases</i> )
VEGF	Fator de crescimento vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Atividade da APM nas peçonhas botrópicas.....	33
<b>Figura 2</b>	Atividade da DPP IV nas peçonhas botrópicas.....	34
<b>Figura 3</b>	Comparação dos perfis de eluição das peçonhas botrópicas.....	35
<b>Figura 4</b>	Atividade APM nos perfis de gel filtração das peçonhas botrópicas.....	36
<b>Figura 5</b>	Atividade DPP IV nos perfis de gel filtração das peçonhas botrópicas.....	37
<b>Figura 6</b>	Efeito da fração de baixa massa molecular sobre a APM das peçonhas botrópicas.....	38
<b>Figura 7</b>	Efeito da fração de baixa massa molecular sobre a DPP IV das peçonhas botrópicas.....	39
<b>Figura 8</b>	Inibição da APM renal de rato pelas peçonhas botrópicas.....	40
<b>Figura 9</b>	Inibição da NEP 24.11 renal de rato pelas peçonhas botrópicas.....	41
<b>Figura 10</b>	Estimulação da DPP IV renal de rato pelas peçonhas botrópicas.....	42
<b>Figura 11</b>	Inibição da atividade da APM renal de rato pelos picos cromatográficos das peçonhas botrópicas.....	44
<b>Figura 12</b>	Estimulação da atividade enzimática da DPP IV renal de rato pelo pico cromatográfico PI das peçonhas botrópicas.....	45
<b>Figura 13</b>	Inibição da atividade enzimática da NEP 24.11 renal de rato pelos picos cromatográficos das peçonhas botrópicas.....	46
<b>Figura 14</b>	Perfil eletroforético dos picos cromatográficos PI ao PVIII da peçonha de <i>B. jararaca</i> .....	47
<b>Figura 15</b>	Atividade enzimática da NEP 24.11 renal incubada com os picos PIII, PIV e PV de <i>B. jararaca</i> .....	48
<b>Figura 16</b>	Atividade PLA <sub>2</sub> da peçonha de <i>B. jararaca</i> e do PVI resultante da exclusão molecular.....	49
<b>Figura 17</b>	Atividade inibitória de uma lectina de <i>B. jararacussu</i> sobre a atividade da NEP 24.11 comparada à do PVI.....	50
<b>Figura 18</b>	Atividade inibitória do PVI e fosforamidon sobre a atividade da NEP 24.11.....	51
<b>Figura 19</b>	Perfil de eluição do pico PVI de <i>B. jararaca</i> após troca iônica.....	52
<b>Figura 20</b>	Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos PVI de <i>B. jararaca</i> .....	53
<b>Figura 21</b>	Perfil de eluição do pico PVI de <i>B. jararaca</i> após troca iônica escalonada.	54
<b>Figura 22</b>	Eletroforese dos picos cromatográficos PVI-4 ao PVI-12 de <i>B. jararaca</i> ...	55
<b>Figura 23</b>	Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos da troca iônica do PVI de <i>B. jararaca</i> .....	56
<b>Figura 24</b>	Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos da troca iônica escalonada do PVI de <i>B. jararaca</i> .....	57

## LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Esquema 1</b> Alguns peptídeos endógenos e suas ações.....	16
<b>Tabela 1</b> Sequências de BPPs de peçonhas ofídicas.....	24

## RESUMO

Neste trabalho investigamos algumas atividades peptidásicas (aminopeptidase M – APM, dipeptidil peptidase IV – DPP IV e endopeptidase neutra 24.11 – NEP 24.11) em quatro peçonhas do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*) e avaliamos a influência da fração de baixa massa molecular destas peçonhas sobre a atividade das peptidases. Também estudamos o efeito das quatro peçonhas sobre as atividades das três peptidases em tecido renal de rato *in vitro*. As quatro peçonhas mostraram atividades APM e DPP IV localizadas nos picos de alta massa molecular do perfil cromatográfico obtido por gel filtração; nenhuma continha NEP 24.11. A remoção da fração de baixa massa molecular (<5 kDa) por filtração centrifugal (filtros Amicon) resultou em queda na atividade da APM em todas as peçonhas, e redução da atividade da DPP IV em duas peçonhas (*B. alternatus* e *B. moojeni*); a atividade foi restaurada com a reposição desta fração. A incubação de tecido renal com concentrações crescentes das peçonhas inibiu a APM e NEP 24.11, mas estimulou a atividade DPP IV. Os principais picos das peçonhas obtidos por gel filtração mostraram graus variados de inibição da APM e NEP 24.11, sem efeito na DPP IV exceto aumento de atividade com o pico que continha DPP IV da peçonha. A análise detalhada da ação dos picos da peçonha de *B. jararaca* sobre a atividade da NEP 24.11 e subsequente cromatografia por troca iônica do pico mais ativo (PVI) levou à identificação de um subpico com potente atividade inibitória sobre esta peptidase. Esta inibição, que não era devido à atividade proteolítica, fosfolipásica A<sub>2</sub> ou lectina, foi menos potente que aquela observada com o fosforamidon, inibidor específico da NEP 24.11. Estes resultados indicam que as peçonhas botrópicas contêm peptidases específicas cuja atividade pode ser modulada por componentes de baixa massa molecular da peçonha. As peçonhas também contêm componentes que inibem a atividade da APM e NEP 24.11 renais. A caracterização parcial de um pico da peçonha de *B. jararaca* indicou a presença de um inibidor potente da NEP 24.11 renal. A identificação do componente ativo deste pico poderia servir de ponto de partida para o desenvolvimento de nova ferramenta para pesquisa básica e aplicação terapêutica.

**Palavras-chaves:** aminopeptidase M, *Bothrops*, dipeptidil peptidase IV, endopeptidase neutra 24.11, peçonha ofídica, peptidases, peptídeos

## ABSTRACT

In this work, we investigated some peptidase activities (aminopeptidase M – APM, dipeptidyl peptidase IV – DPP IV and neutral endopeptidase 24.11 – NEP 24.11) in four *Bothrops* venoms (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*) and examined the influence of the low molecular mass fraction of these venoms on peptidase activity. We also assessed the effects of the four venoms on the activities of these three peptidases in rat renal tissue *in vitro*. The four venoms contained APM and DPP IV activities that eluted in the high molecular mass peaks of the gel filtration elution profile; none of the venoms had NEP 24.11 activity. Removal of the low molecular mass fraction (<5 kDa) by centrifugal filtration (Amicon filters) resulted in a decrease in the APM activity of all the venoms and a decrease in DPP IV activity in two venoms (*B. alternatus* and *B. moojeni*); activity was fully restored by recombining the fraction with the rest of the corresponding venom. The incubation of renal tissue with increasing venom concentrations inhibited APM and NEP 24.11, but stimulated DPP IV. The main peaks obtained by gel filtration of each venom showed varying degrees of inhibition of APM and NEP 24.11, but with no effect on DPP IV, except for an increase in activity with the peak containing venom DPP IV. Detailed analysis of the action of the gel filtration peaks of *B. jararaca* venom on NEP 24.11 activity followed by fractionation of the most active peak (PVI) by ion exchange chromatography resulted in the identification of a subpeak with potent inhibitory activity on this peptidase. This inhibition, which was not attributable to protease, phospholipase A<sub>2</sub> or lectin activity, was less potent than that observed with phosphoramidon, a specific inhibitor of NEP 24.11. These results indicate that *Bothrops* venoms contain specific peptidases, the activity of which is modulated by low molecular mass components of the venoms. The venoms also contain components that inhibit renal APM and NEP 24.11. Partial characterization of the active peak from *B. jararaca* venom indicated the presence of a potent inhibitor of renal NEP 24.11. The identification of the active component of this peak could serve as a starting point for the development of a new tool for basic research and possible therapeutic application.

**Keywords:** aminopeptidase M, *Bothrops* snake venom, dipeptidyl peptidase IV, neutral endopeptidase 24.11, peptidases, peptides

## SUMÁRIO

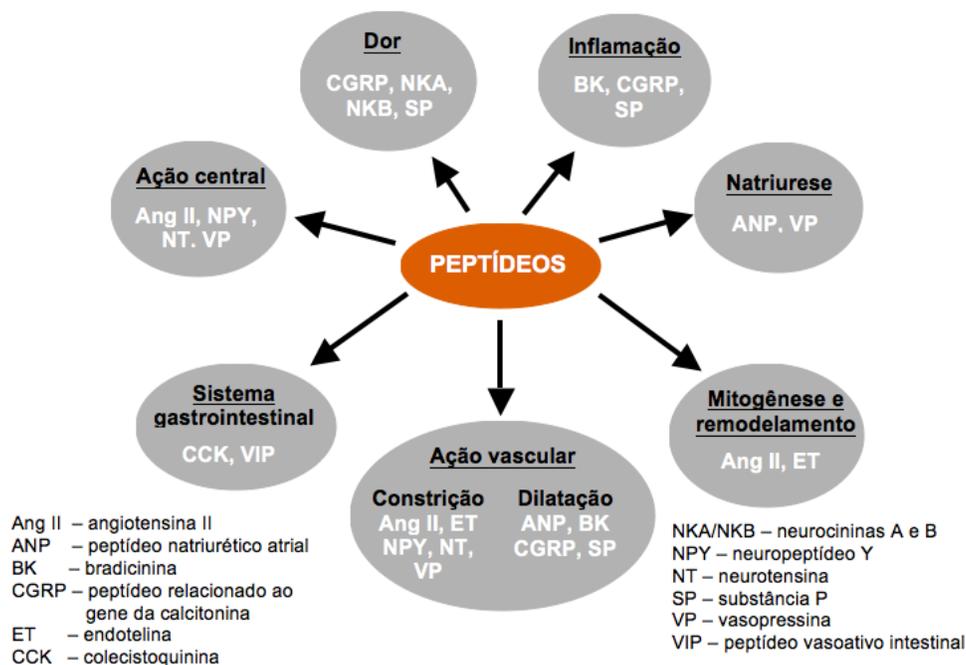
	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1. PEPTIDASES E PEPTÍDEOS ENDÓGENOS</b> .....	16
<b>1.2. PEPTIDASES E PEPTÍDEOS DE PEÇONHAS OFÍDICAS</b> .....	19
<b>1.2.1. Peptidases</b> .....	19
<b>1.2.2. Peptídeos</b> .....	21
<b>1.2.3. Ação sobre peptidases endógenas</b> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>3.1. REAGENTES E PEÇONHAS</b> .....	27
<b>3.2. ANIMAIS</b> .....	27
<b>3.3. OBTENÇÃO E HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO RENAL</b> .....	28
<b>3.4. ENSAIOS ENZIMÁTICOS</b> .....	28
<b>3.4.1. Aminopeptidase M (APM)</b> .....	28
<b>3.4.2. Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)</b> .....	29
<b>3.4.3. Endopeptidase neutra 24.11 (NEP 24.11)</b> .....	29
<b>3.4.4. Atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>)</b> .....	29
<b>3.4.5. Atividade proteolítica</b> .....	30
<b>3.5. CROMATOGRAFIA DAS PEÇONHAS</b> .....	30
<b>3.5.1. Gel filtração por exclusão molecular</b> .....	30
<b>3.5.2. Cromatografia de troca iônica</b> .....	31
<b>3.6. ELETROFORESE EM SDS-PAGE</b> .....	32

<b>3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS DAS PEÇONHAS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PEÇONHAS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.1. Exclusão molecular.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2. Atividades peptidásicas das frações cromatográficas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3. EFEITO DA FRAÇÃO DE BAIXA MASSA MOLECULAR NAS PEPTIDASES.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS RENAIIS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.1. Influência das peçonhas sobre peptidases renais.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.2. Influência das frações cromatográficas (gel filtração) sobre peptidases renais..</b>	<b>43</b>
<b>4.5. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA PEÇONHA DE <i>B. JARARACA</i> SOBRE A NEP 24.11.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6. FRACIONAMENTO DO PICO PVI POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....</b>	<b>52</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PEPTIDASES E PEPTÍDEOS ENDÓGENOS

A regulação hemodinâmica e cardiovascular envolve vários mediadores, tais como (1) gases voláteis como o óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e monóxido de carbono (CO), (2) mediadores lipídicos como leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, (3) autacóides endógenos, especialmente aminas como catecolaminas, histamina e serotonina, e (4) uma variedade bastante grande de peptídeos (cininas, endotelinas, neuropeptídios, peptídeos natriuréticos, etc.) liberados pela ação de peptidases. Os peptídeos possuem papel central na comunicação intercelular, podendo exercer efeitos diretos sobre a musculatura vascular, atuando como vasoconstritores (angiotensina II, vasopressina, endotelinas, neuropeptídeo Y e urotensina) ou vasodilatadores (bradicinina e cininas relacionadas, peptídeo intestinal vasoativo, substância P, neurotensina, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e adrenomedulina) (Esquema 1) [1].



**Esquema 1.** Alguns peptídeos endógenos e suas ações. Fonte: Linardi [2].

Há uma grande variedade de peptidases endógenas, mas na regulação cardiovascular as mais relevantes são a enzima conversora da angiotensina (ECA), a enzima conversora da endotelina (ECE; responsável pela liberação da endotelina 1 do precursor ‘big endotelina’), diversas aminopeptidases (aminopeptidases A, B e M/N), dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e endopeptidase neutra 24.11 (NEP 24.11). As mais estudadas em relação às peçonhas ofídicas são a ECA, APM, DPP IV e NEP 24.11.

A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase que catalisa a clivagem de dipeptídeos do carboxi-terminal da angiotensina I, convertendo esta em angiotensina II, um potente vasoconstritor. Ao mesmo tempo, a ECA degrada a bradicinina, potente vasodilatador, inativando-a. A angiotensina II, por sua vez, é removida rapidamente da circulação por uma variedade de peptidases, conhecidas como angiotensinases [3].

A APM tem diversas atividades biológicas, incluindo funções envolvidas nas respostas inflamatórias e imunológicas, transdução de sinal, processamento de antígeno, de neuropeptídeos e de degradação de citocinas [4]. Esta metaloenzima (dependente de Zn) é uma glicoproteína transmembrana do tipo II que desempenha um papel na progressão de tumores através do controle de alguns processos, tais como, proliferação, invasão tumoral e angiogênese. A APM apresenta elevada expressão em células malignas cancerosas [5]. A aminopeptidase A (APA) converte a angiotensina II em uma forma também ativa denominada angiotensina III, e essa é convertida em angiotensina IV pela ação da aminopeptidase M (APM), que pode também clivar a angiotensina IV para formar angiotensina-(4-8), que é inativa [6].

A endopeptidase neutra 24.11 (NEP 24.11), uma Zn-metalopeptidase ligada à membrana celular, cliva a angiotensina I em angiotensina (1-7) [7], mas também degrada um grande número de neuropeptídeos envolvidos na hipertensão, incluindo a adrenomodulina (ADM), um vasodilatador renal e potente peptídeo natriurético [8], a bradicinina, bem como a oxitocina,

peptídeos opióides, substância P, gastrina, peptídeo intestinal vasoativo, e a proteína beta amiloide [9]. Além destes, outros substratos incluem angiotensina II, cininas, peptídeos quimiotáticos, peptídeos semelhantes à bombesina, endotelina-1 (ET-1), encefalina, neuropeptídeo Y e peptídeo intestinal vasoativa (VIP) [10]. Possui afinidade pelos peptídeos natriuréticos na ordem de CNP>ANP>BNP (ver revisão de Vink *et al.* [11]).

A dipeptidil dipeptidase IV (DPP IV), uma serinoprotease transmembrana, mas também solúvel na circulação, degrada a bradicinina em bradicinina (1-5), uma forma mais estável e inativa da bradicinina. Ela pode ainda, ser degradada por outras aminopeptidases como a aminopeptidase P. Neste caso, a bradicinina é hidrolisada previamente pela aminopeptidase P, na ligação Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> e, depois, pela DPP IV na posição Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>. Além disto, há evidências de que a DPP IV regula o tônus vascular através de uma ação sobre o sistema de óxido nítrico [12]. A DPP IV exerce sua atividade enzimática quando na forma dimerizada [13], podendo, ainda, assumir a forma de tetrâmero quando há junção dos dímeros localizados em membranas de células diferentes [14].

Além de estar envolvida no controle hemodinâmico, a DPP IV participa de algumas disfunções metabólicas como, por exemplo, diabetes, obesidade e anorexia. O diabetes pode ser controlado através do uso de inibidores da DPP IV, uma vez que estes evitam a inativação da GLP-1 e da GIP (hormônios gastrointestinais, produzidas no intestino, responsáveis por aumentar a secreção de insulina e reduzir a secreção de glucagon em resposta à glicose em situações de hiperglicemia) [15]. Na obesidade, os níveis de DPP IV encontram-se aumentados na circulação sanguínea, e, na anorexia nervosa, a concentração sanguínea de DPP IV é menor quando comparada a uma pessoa saudável [16].

## 1.2. PEPTIDASES E PEPTÍDEOS DE PEÇONHAS OFÍDICAS

### 1.2.1. Peptidases

A presença de peptidases em peçonhas ofídicas é bem conhecida e inclui aminopeptidases (APA, APM, alanil, arginil, leucil, piroglutamil), catepsinas, dipeptidil peptidases (DPP I, II, III e IV) e enzimas do tipo calicreina, entre outras [17-28]. Enquanto algumas peptidases como a DPP IV mostram ampla distribuição, mas atividade variável, entre peçonhas de serpentes de diferentes famílias [26], outras são mais características de determinada família, como a L-leucil aminopeptidase que é abundante em peçonhas da família Elapidae [21-23]. A demonstração de que muitas das atividades peptídicas de peçonhas são características de peptidases celulares, e.g., peptidases citosólicas e lisossomais [23], sugere que estas enzimas possam ser derivadas da descamação e lise celular que acompanham a regeneração epitelial da glândula venenífera em vez de serem componentes específicos das peçonhas propriamente dito. Consoante com esta conclusão é a demonstração de atividade APA e DPP IV em exossomos (vesículas secretadas por uma variedade de células) na peçonha da serpente *Gloydius blomhoffii blomhoffii* [29]; a presença destas peptidases contribui para a capacidade destas vesículas de degradar peptídeos como a angiotensina II, substância P, o octapeptídeo de colicistocinina e peptídeo 1 do tipo glucagon. Apesar da presença conhecida de peptidases em diversas peçonhas, ainda pouco se sabe das suas reais funções no envenenamento, especialmente considerando que geralmente ocorrem em quantidades bastante reduzidas em relação a vários outros componentes, conforme atestada pela baixa detecção de peptidases em estudos transcriptômicos e proteômicos de peçonhas de várias famílias e gêneros [26,30,31]. Aird [27] sugeriu que a DPP IV contribui para a hipotensão através da sua capacidade de degradar peptídeos com ação hipertensora como a neuropeptídeo Y, substância P e peptídeo-1 do tipo glucagon (GLP-1). Apesar da sua presença em peçonhas ofídicas, até o momento poucas destas enzimas têm sido caracterizadas, as mais conhecidas sendo

a DPP IV [32] e a APM [33] da serpente asiática *Gloydius blomhoffii brevicaudus* e a rhiminopeptidase A, uma aminopeptidase A da peçonha da víbora africana *Bitis gabonica rhinoceros* [34].

No que diz respeito a peçonhas do gênero *Bothrops*, análises transcriptômicas [35-42] e proteômicas [43-54] mostram que as peçonhas botrópicas possuem grande variedade de proteínas enzimáticas e não enzimáticas. Entre as enzimáticas, as mais abundantes e bem caracterizadas são as metaloproteinases (*snake venom metalloproteinases* – SVMs), serinoproteinases (*snake venom serine proteases* – SVSPs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), lectinas do tipo C e L-aminoácido oxidases (LAO). A maioria dos efeitos sistêmicos causados pelo envenenamento botrópico é mediada por SVMs [55-59] e PLA<sub>2</sub> ácidas ou básicas [61]. Embora as SVMs e SVSPs exerçam atividade peptidásica como parte da sua ação proteolítica geral, há evidências de que as peçonhas botrópicas também possuam peptidases específicas como APM/N e DPP-IV [25], bem como atividade angiotensinase [62].

As peptidases presentes em peçonhas podem contribuir para as alterações cardiovasculares (hemorragia, coagulopatia, hipotensão, insuficiência renal) observadas após o envenenamento. No caso de peçonhas botrópicas, a relação entre as peptidases e seu papel no envenenamento tem sido estudada há mais de 65 anos, desde o trabalho pioneiro do Prof. Maurício Rocha-e-Silva e colegas que demonstraram a capacidade da peçonha de *Bothrops jararaca* em liberar bradicinina de bradicininogênio plasmático [63], sendo este peptídeo um mediador importante na hipotensão arterial característica destas peçonhas [64-67]. Historicamente, a liberação de bradicinina tem sido atribuída à ação de SVSPs com atividade do tipo calicreína [68-72], embora existam evidências para o envolvimento de SVMs nesta liberação também [73]. Além da formação de bradicinina, há a liberação de fibrinopeptídeos com

ação hipotensora durante a degradação de fibrinogênio por SVMs e SVSPs [26,60], bem como a degradação de peptídeos endógenos como a angiotensina II [62].

### 1.2.2. Peptídeos

As peçonhas ofídicas contêm uma diversidade de peptídeos, embora nem todos ocorrem no mesmo gênero ou espécie. Estes peptídeos incluem: (1) neurotoxinas pós-sinápticas clássicas (6-7 kDa), também conhecidas como toxinas *three-finger* (3-FTx) devido sua estrutura tridimensional de três ‘dedos’; estas toxinas são encontradas em peçonhas elapídicas principalmente dos gêneros *Bungarus* (Ásia), *Naja* (África e Ásia) e *Micrurus* (corais das Américas) e bloqueiam de forma competitiva os receptores nicotínicos pós-sinápticos em músculo esquelético [74-76], (2) miotoxinas de baixa massa molecular (~4 kDa), geralmente de natureza básica, encontradas em peçonhas de cascavéis do gênero *Crotalus*; incluem a crotamina de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel sul-americana) e miotoxinas I, II, III e a, e peptídeo c de algumas *Crotalus* (e.g., *C. viridis*) da América do Norte [77], (3) peptídeos básicos mas não miotóxicos (2-3 kDa), com forte ação cardiovascular (são cardiodepressores e causam hipotensão) presentes em peçonhas de *Crotalus* spp. norte-americanas [78-80], (4) sarafotoxinas (~2 kDa), do gênero *Atractaspis* do Oriente Médio e África, que são peptídeos vasoconstritores de 21 amino ácidos relacionadas às endotelinas de vertebrados [81-83], (5) peptídeos natriuréticos do tipo C (CNP; ~3-4 kDa), primeiramente identificados na peçonha da mamba verde africana *Dendroaspis angusticeps* (DNP) [84] e relacionados aos peptídeos natriuréticos atriais do tipo A (ANP) e B (BNP) de vertebrados. Estes peptídeos possuem ação natriurética e vasodilatadora através da ativação da guanilil ciclase membranar (levando à formação de GMP cíclico) que é parte integral dos receptores celulares NPR-A e NPR-B aos quais os peptídeos se ligam; são um substrato para a peptidase endógena NEP 24.11 (ver revisão de Vink *et al.* [11])

(6) waglerinas I e II (<2 kDa), peptídeos da serpente asiática *Trimeresurus wagleri* estruturalmente distintos de outros peptídeos conhecidos, embora possuam alguma semelhança (10%) com os peptídeos potencializadores da bradicinina [85,86]. A waglerinas agem nos receptores nicotínicos periféricos e receptores GABA do sistema nervoso central, sendo que, em camundongos, a waglerina I causa uma redução progressiva dos movimentos respiratórios, e indiretamente, em consequência disto, leva a distúrbios da pressão arterial e no eletrocardiograma, com óbito atribuído à asfixia devido ao bloqueio neuromuscular [87], (7) diversos peptídeos que servem como inibidores das SVMPs da própria peçonha [88-92] ou cuja ação biológica ainda não foi desvendada, tais como os peptídeos poliHis-poliGly (pHpG) [93-94], e (8) peptídeos potencializadores da bradicinina. Alguns destes peptídeos, especialmente os peptídeos potencializadores da bradicinina e peptídeos natriuréticos do tipo C, têm sido usados como ponto de partida para o desenvolvimento de novas moléculas de uso terapêutico [95-97].

A descoberta dos peptídeos potencializadores da bradicinina está intimamente associada ao trabalho do Rocha-e-Silva *et al.* [63] sobre a liberação da bradicinina de cininogênio plasmático pela peçonha de *B. jararaca*. Na década de 1960, o Prof. Sérgio H. Ferreira e colegas demonstraram que peptídeos da própria peçonha de *B. jararaca* eram capazes de potencializar as respostas biológicas à bradicinina [98-99]. A ação destes peptídeos, denominados peptídeos potencializadores da bradicinina (BPPs – *bradykinin-potentiating peptides*) [100], é mediada principalmente pela inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) [101] (para relatos sobre o desenvolvimento deste campo, ver Ferreira [102-104]). Esta inibição abole a formação de um potente vasoconstritor (angiotensina II) e prolonga a meia-vida de um potent vasodilatador (bradicinina), levando à hipotensão.

Desde a descoberta inicial por Ferreira, vários BPPs já foram identificados em outras peçonhas botrópicas [94,100,105-111], além de outros gêneros de serpentes, tais com

*Agkistrodon* [112-117], *Crotalus* [118-123], *Lachesis* [124], *Trimeresurus* [125] e *Vipera* [126], conforme mostra a Tabela 1.

Estruturalmente, a maioria dos BPPs têm massa molecular <1,5 kDa ( $\leq 15$  aminoácidos) e são ricos em resíduos de prolina (geralmente a região C-terminal apresenta Ile-Pro-Pro ou IPP), e ácido piroglutâmico na porção N-terminal. O polipeptídeo precursor é formado por um peptídeo sinal de ~25 aminoácidos na porção N-terminal, seguidos de uma sequência de BPPs ou análogos, com 5-13 aminoácidos, uma sequência ligante com cerca de 144 aminoácidos e uma sequência do CNP que possui 22 aminoácidos [108,125,127].

Embora classicamente considerados como inibidores da ECA, diversos estudos nos últimos anos indicaram que os BPPs possuem outras atividades além da inibição da ECA [96,128]. Tais atividades incluem uma ação hipotensora e bradicárdica independente da atuação na ECA [129], ativação da argininasuccinato sintetase [130], estimulação da produção do óxido nítrico [131-132], ativação de receptores muscarínicos do subtipo  $M_1$  [133-134], e mobilização de cálcio intracelular e liberação de glutamato e GABA no sistema nervoso central [135], além de possível interação com receptores nicotínicos [136] e uma ação neuroprotetora [137-138].

**Tabela 1:** Sequências de BPPs de peçonhas ofídicas. Fonte: Lopes *et al.* [123].

	-4	1	5	11
<b>Genus <i>Crotalus</i></b>				
<i>C. durissus cascavella</i>		P N L P N Y L G I P P		
<i>C. durissus terrificus</i>			Q N W K S P	
			Q A R E S P	
		Q R W P H L E I P P		
	Q W S	Q R W P H L E I P P		
<i>C. durissus collilineatus</i>		T P P A G P D G G P R		
<i>C. atrox</i>		Q L W P R P Q I P P		
	Q K W	P R P G P E I P P		
<i>C. adamanteus</i>		Q G G W P R N P I P P		
	Q Q W	P P G H H I P P		
<i>C. viridis viridis</i>		Q L W P H P H V P		
	Q S A	P G N E A I P P		
	Q G G	A P W N P I P P		
	Q G P	S P R H P I P P		
	Q G W	P P G H H I P P		
<b>Genus <i>Bothrops</i></b>				
<i>B. jararaca</i>			Q K W A P	
			E W P R P	
			Q S W P G P	
		Q D G	P I P P	
		Q W P	R P Q I P P	
		Q S W	P G P N I P P	
		Q N W	P R P Q I P P	
		Q N W	P H P Q I P P	
		Q G G	A G W P P I P P	
		Q W P	R P T P Q I P P	
		Q G R	A P G P P I P P	
		Q S A	P G N E A I P P	
		Q G R	P P G P P I P P	
		Q G W	A W P R P Q I P P	
		Q W G	R P P G P P I P P	
		Q W A	Q W P R P Q I P P	
	Q G G	W P R P G P E I P P		
	Q G G	L P R P G P E I P P		
	Q W A	Q W P R P T P Q I P P		
<i>B. alternatus</i> (III)		Q W P	D P S S D I P P	
<i>B. neuwiedi</i> (II)		Q W P	R P Q I P P	
		Q W P	R P T P Q I P P	
	Q G G	W P R P G P H I P P		
<i>B. jararacussu</i>		Q N W	P H P Q I P P	
		Q G R	P P G P P I P P	
		Q A R	P P H P P I P P	
	Q G G	W P R P G P H I P P		
<i>B. insularis</i> (II)			Q K W A P	
		Q W G	Q H P N I P P	
		Q N W	P H P Q I P P	
		Q L G	P P R P Q I P P	
		Q G G	P P R P Q I P P	
		Q L G	P P P R P Q I P P	
	Q G G	W P R P G P E I P P		
<b>Genus <i>Lachesis</i></b>				
<i>L. muta</i>			W P P R P Q I P P	
		Q E W	P P G H H I P P	
			D P P P I S P P	
		Q K P	W P P G H H I P P	
		Q K K	W P P G H H I P P	
<b>Genus <i>Agkistrodon</i></b>				
<i>A. halys blomhoffii</i>			Q G R P P G P P I P P	
		Q G L	P P R P K I P P	
		Q G L	P P G P P I P P	
		Q K W	D P P P V S P P	
		Q G R	P F G P P I P R	
		Q G L	P F G P P I P R	
		Q L W	P R P H I P P	
<i>A. p. piscivorus</i>			Q L W P R P H I P P	
<b>Genus <i>Trimeresurus</i></b>				
<i>T. flavoviridis</i>			Q G R P R S E V P P	
	Q S K	P G R S P P I S P		
<i>T. gramineus</i>		Q E K	P G R S P P I S P	
<b>Genus <i>Vipera</i></b>				
<i>V. aspis</i>			Q G W P G P K V P P	

### 1.2.3. Ação sobre peptidases endógenas

Embora historicamente o estudo da ação de peptídeos ofídicos, especialmente dos BPPs de peçonhas botrópicas, tenha focado na inibição da ECA, há várias outras peptidases endógenas (aminopeptidases, ECE, DPP IV, NEP 24.11; conforme indicado na seção 1.1.) envolvidas na regulação cardiovascular e renal que podem ser alvos de inibição por estes peptídeos. Assim, o estudo de componentes presentes em peçonhas botrópicas capazes de interferir na atividade destas enzimas pode servir como fonte para o desenvolvimento de novos inibidores com potencial terapêutico contra peptidases endógenas. Poucos estudos têm investigado esta possibilidade, entretanto a demonstração por Guerreiro *et al.* [130] da ativação da argininasuccinato sintetase por um BPP (Bj-BPP-10c) da *B. jararaca* e o papel desta ativação na hipotensão causada por este peptídeo indicam que há escopo para investigações nesta área. Alguns estudos de peptidases renais em camundongos tratados com peçonha de *B. jararaca* indicaram alterações (aumento ou diminuição) nas atividades de várias aminopeptidases (A, B e N, entre outras) e DPP IV, porém não ficou claro se estas alterações refletem uma ação direta dos componentes da peçonha sobre estas enzimas, ou se é um efeito indireto [139-140].

## 2. OBJETIVOS

Baseado nas considerações acima, este estudo tem como objetivos:

1. Investigar a presença das atividades APM, DPP IV e NEP 24.11 em algumas peçonhas botrópicas (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*).
2. Avaliar o efeito da fração de baixa massa molecular destas peçonhas sobre suas próprias atividades peptidásicas.
3. Avaliar o efeito destas peçonhas sobre a atividade da APM, DPP IV e NEP 24.11 em tecido renal de rato.
4. Investigar o componente da peçonha responsável pela ativação e/ou inibição da atividade enzimática detectada no item 3, com ênfase maior na NEP 24.11.

Escolhemos estudar a APM, DPP IV e NEP 24.11 por serem bem conhecidas quanto à sua estrutura e função, e pela sua importância na regulação cardiovascular (ver Introdução).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES E PEÇONHAS

Albumina de soro bovino, N-dansil-D-alanil-glicil-*p*-nitrofenil-alanilglicina, diprotina A, Gly-Pro- $\beta$ -naftilamina, HEPES, e L-Leu- $\beta$ -nitroanilida foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As resinas cromatográficas e os reagentes de eletroforese foram adquiridos da GE LifeSciences (Piscataway, NJ, EUA). Outros reagentes de grau analítico foram obtidos de Baker, Mallinkrodt ou Merck. As peçonhas de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram obtidas do Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) e a de *B. alternatus* foi fornecida pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG).

#### 3.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g) vindos do CEMIB-UNICAMP, mantidos a 22 °C em gaiolas plásticas (5/gaiola) sob ciclo de luz/escuro de 12 h com acesso livre à água e ração (NuviLab<sup>®</sup>). Os protocolos realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP, protocolo n. 3044-1) e realizados seguindo as recomendações éticas gerais da Sociedade Brasileira para Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL; [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)) e a legislação brasileira (Lei Federal no. 11,794, de 8 de outubro de 2008), em conjunto com as diretrizes para experimentação animal estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA; <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html>, e [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0234/234054.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0234/234054.pdf)).

### 3.3. OBTENÇÃO E HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO RENAL

Os ratos foram anestesiados com 2% isoflurano até atingirem um nível adequado de sedação para depois serem perfundidos. A perfusão foi através da aorta, com solução salina 0.9% e pressão de ~70 mmHg para remover o sangue dos órgãos. Os rins foram removidos e congelados rapidamente em N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, armazenados a -80 °C até o momento do uso. Para a medição de atividades enzimáticas, os rins foram homogeneizados com homogeneizador Politron<sup>®</sup>, a 4 °C em 5-10 volumes de 0,1 M de sacarose e 0,32 M Tris-sacarose, pH 7,4 (homogeneizações de 30 seg cada, com períodos de repouso de 30 seg; os tubos foram mantidos no gelo durante o processo). O homogenato foi centrifugado (3.000 g, 4 °C, 20-30 min) e, em seguida, o sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado (20.000 g, 4 °C, 25 min). O precipitado resultante foi colhido e lavado duas vezes com o tampão acima e resuspendido em tampão de ensaio. Este precipitado foi utilizado para medir as atividades da APM, DPP IV e NEP 24.11. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* [141], utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

### 3.4. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

#### 3.4.1. Aminopeptidase M (APM)

A atividade da APM foi medida por clivagem do substrato colorimétrico L-Leu-β-nitroanilida [142]. O meio de reação continha tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, substrato (concentração final 140 mM), peçonha ou fração cromatográfica e, quando necessário, alíquota de tecido renal. A atividade foi monitorada pelo aumento na absorbância em 410 nm (leitor de placas SpectraMax340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) durante 30 min a 37 °C. A atividade foi expressa em absorbância a 410 nm.

### 3.4.2. Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)

A atividade enzimática de DPP IV foi determinada usando o ensaio de Puschel *et al.* [13] e Imai *et al.* [143] modificado para placas de fundo escuro de 96 poços. A mistura de reação continha tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, substrato fluorogênico Gly-Pro- $\beta$ -naftilamina (concentração final 1 mM), peçonha ou fração cromatográfica e, quando necessário, alíquota de tecido renal (volume final no poço: 250  $\mu$ L). A fluorescência resultante foi mensurada a 410 nm após excitação em 335 nm em leitor de placas Biotek (AHSI, Italy), durante 10 min, à temperatura constante de 37 °C. A atividade foi expressa em unidades de fluorescência.

### 3.4.3. Endopeptidase neutra 24.11 (NEP 24.11)

A atividade da NEP 24.11 foi ensaiada usando N-dansil-D-alanil-glicil-*p*-nitrofenil-alanilglicina como substrato (modificado de Florentin *et al.* [144]). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com fundo escuro, a 37 °C. A fluorescência resultante foi mensurada a 562 nm após excitação em 342 nm em leitor de placas Biotek, durante 30 min, a 37 °C. A atividade foi expressa em unidades de fluorescência.

### 3.4.4. Atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>)

Para dosagem da atividade PLA<sub>2</sub>, foi preparado o reagente de ensaio misturando 5 mM de Triton X-100 com 2 mM de Hepes, 10 mM de CaCl e água Milli-Q (q.s.p.) [145]. O ensaio foi realizado em poços de 250  $\mu$ L em placa de ELISA. Em um bequer, foi misturado 20 mL do reagente de ensaio junto a 24,8 mg de azul de bromotimol e homogenizado. O pH dessa solução foi ajustado para 7,5 e colocada em banho a 37 °C por 15 min. Após a incubação, foi adicionada fosfatidilcolina (160 mg/mL de metanol) e o pH ajustado novamente para 7,5. Em cada poço,

pipetou-se 180  $\mu\text{L}$  desse reagente e, depois, 20  $\mu\text{L}$  da amostra. A curva padrão foi feita com HCl nas concentrações de 0,156, 0,312, 0,625, 1,25 e 2,5 mM (20  $\mu\text{L}$ /poço). A leitura foi feita a 620 nm por 6 min e a atividade foi calculada a partir da curva padrão e expressa em nM de HCl.

### 3.4.5. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica da fração inibitória da peçonha de *B. jararaca* foi avaliada essencialmente conforme descrita por Choedhury *et al.* [146], usando azocaseína (5 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8) como substrato. Após incubação por 90 min a 37 °C foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 5% para precipitar a azocaseína que não foi digerida. Após centrifugação (10.000 rpm, 8 min, 4 °C), uma alíquota do sobrenadante foi misturada com 150  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 M e a absorbância da cor resultante foi lida em 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima ( $\mu\text{g}$ ) que hidrolisa 1  $\mu\text{g}$  de azocaseína/min a pH 8,0 e 37 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em alguns protocolos, a fração ativa foi incubada EDTA 20  $\mu\text{M}$  por 1 h a 37 °C e a atividade proteolítica residual foi determinada conforme descrito acima.

## 3.5. CROMATOGRAFIA DAS PEÇONHAS

### 3.5.1. Gel filtração por exclusão molecular

Para identificar os picos com atividades peptidásicas, amostras (75 mg) de cada peçonha foram dissolvidas em 1 mL de tampão bicarbonato de amônia (AMBIC) 0,05 M e pH 8,2, seguido por centrifugação (13.000 rpm, 12 min, 4 °C). O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Superdex G-75 (1,2 x 75 cm) equilibrada com o tampão descrito acima, acoplada a um sistema cromatográfico AKTÄprime (GE Healthcare). A coluna foi eluída com fluxo de 30 mL/h,

o volume coletado foi de 1,5 mL/tubo e o perfil cromatográfico foi monitorado em 280 nm. A atividade peptidásica dos picos resultantes foi avaliada usando os ensaios enzimáticos descritos anteriormente. Os picos foram armazenados a -80 °C.

### 3.5.2. Cromatografia de troca iônica

Baseado nos resultados obtidos com as frações cromatográficas por gel filtração, escolhemos a peçonha de *B. jararaca* para análise mais detalhada devida sua atividade inibitória sobre a NEP 24.11 renal mais marcante que as outras peçonhas. Para isso, realizamos a cromatografia de troca em duas modalidades: eluição com gradiente linear e eluição com gradiente escalonado (*step-wise*). Inicialmente, a fração ativa da gel filtração foi concentrada usando membrana Amicon com limite de filtração de 3 kDa (MilliPore) e clarificada por centrifugação (10.000 rpm, 5 min, 4 °C).

Para a troca iônica com eluição em gradiente linear, a fração ativa foi aplicada em uma coluna Q-Sepharose HiTrap (5 mL) equilibrada previamente com tampão HEPES 0,02 M, pH 8,0. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi realizada com tampão HEPES 0,02 M, pH 8,0 contendo NaCl 1 M em gradiente linear em 10 volumes de coluna (fluxo: 60 mL/h, volume coletado: 1 mL/tubo) e o perfil cromatográfico foi monitorado em 280 nm. A ação inibitória dos picos resultantes sobre a atividade da NEP 24.11 foi avaliada co-incubando-se a fração com a preparação de enzima seguido pelo ensaio enzimático descrito anteriormente. Os picos foram armazenados a -80 °C.

Para a troca iônica com eluição em gradiente escalonado, a amostra foi aplicada em uma coluna Q-Sepharose HiTrap (5 mL) equilibrada previamente com tampão HEPES 0,02 M, pH 8,0. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi realizada com gradiente de tampão A (HEPES 0,02 M, pH 8,0) e tampão B (HEPES 0,02 M, pH 8,0 contendo 1 M de NaCl), (fluxo: 1 mL/min,

volume coletado: 1 mL/tubo) e o perfil cromatográfico foi monitorado em 280 nm. A ação inibitória dos picos resultantes sobre a atividade da NEP 24.11 foi avaliada co-incubando-se a fração com a preparação de enzima seguido pelo ensaio enzimático descrito anteriormente. Os picos foram armazenados a -80 °C.

### **3.6. ELETROFORESE EM SDS-PAGE**

O perfil eletroforético das frações cromatográficas foi avaliado por SDS-PAGE usando géis de 12,5% de acrilamida [147] num sistema eletroforético Mighty Small SE260 (Hofer-Pharmacia). Após eletroforese a 150 V constantes, os géis foram corados com 0,1% de azul de Coomassie R250 em metanol:ácido acético:água destilada (40:10:50, v/v), ou com nitrato de prata, e depois descorados e documentados. Marcadores de massa molecular foram corridos em paralelo com as amostras.

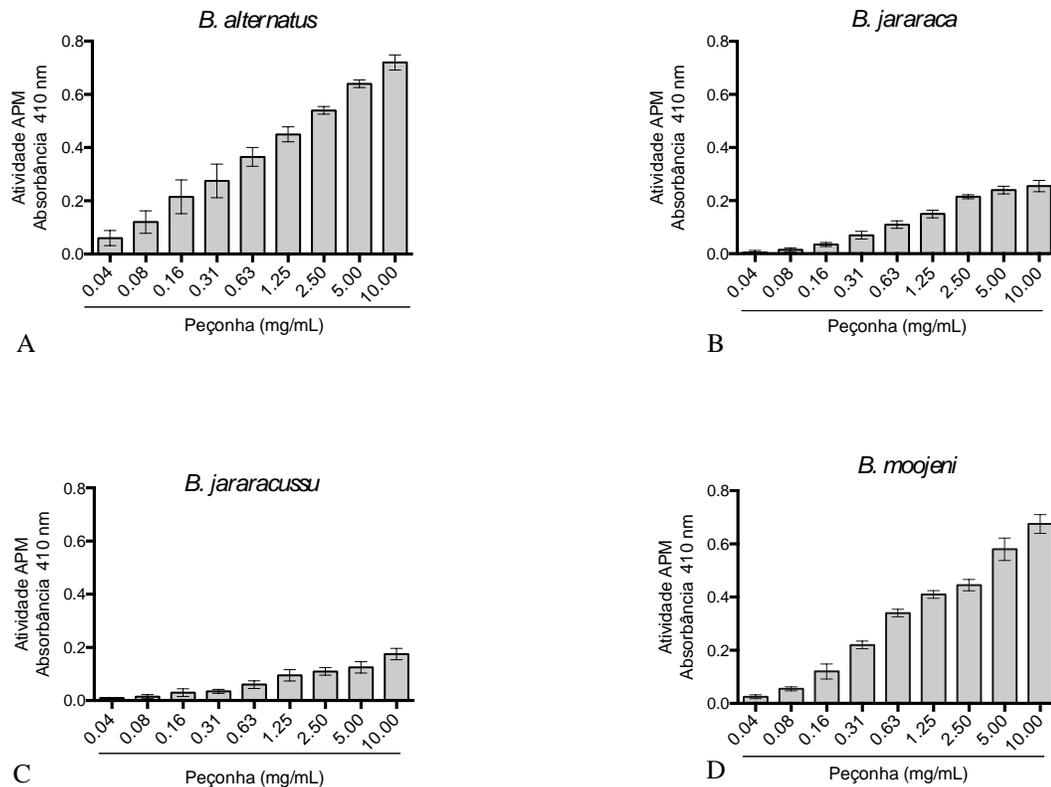
### **3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  DP do número de experimentos realizados. As comparações estatísticas foram feitas usando análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey, com valores de  $p < 0,05$  indicando significância. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism v.6 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

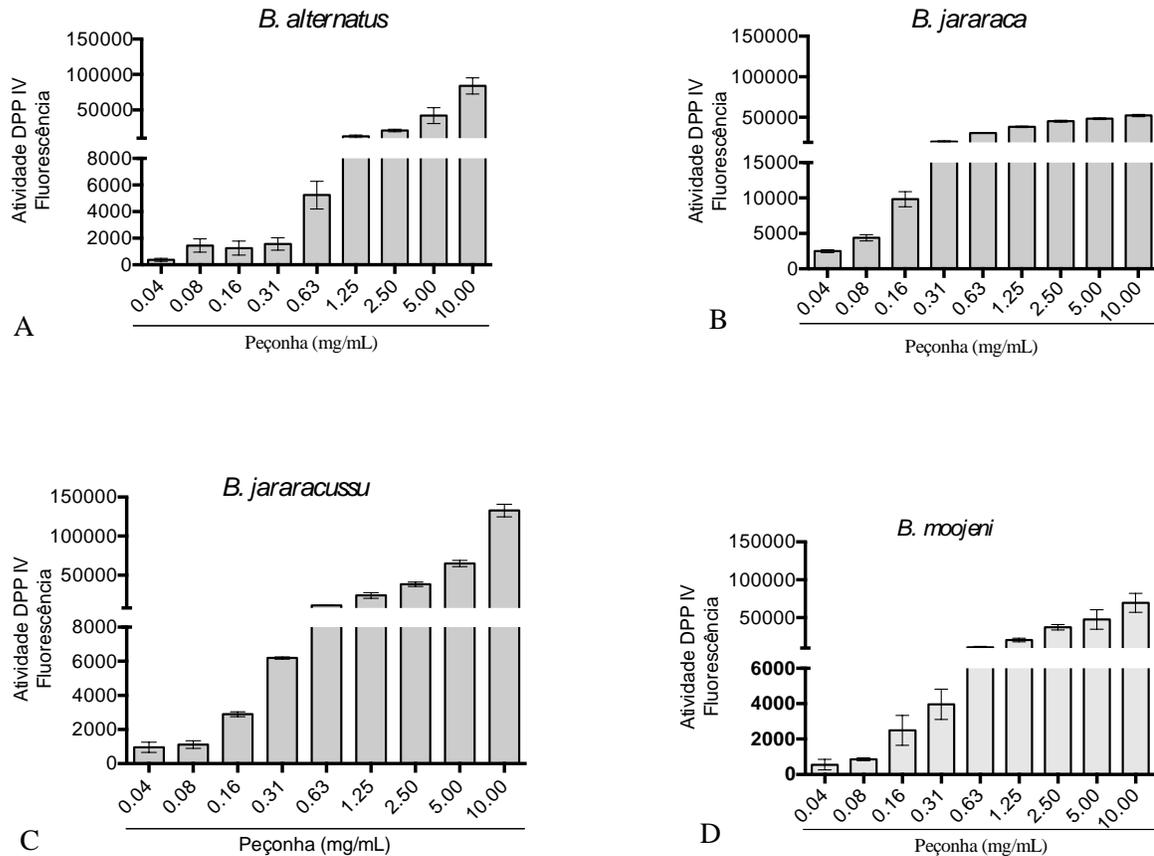
## 4. RESULTADOS

### 4.1. ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS DAS PEÇONHAS

Das três atividades peptidásicas pesquisadas, duas (APM e DPP IV) foram encontradas nas quatro peçonhas, enquanto a terceira (NEP 24.11) não foi encontrada em nenhuma delas. As Figuras 1 e 2 mostram as atividades APM e DPP IV das quatro peçonhas. Conforme esperado, nas quatro espécies as atividades das duas peptidases mostraram relação estreita com a concentração de peçonha testada. Baseado nestas curvas, a ordem de atividade (potência) das peçonhas foi *B. alternatus*/*B. moojeni* > *B. jararaca* > *B. jararacussu* para APM, e *B. jararacussu* > *B. alternatus* > *B. moojeni*/*B. jararaca* para DPP IV.



**Figura 1.** Atividade da APM nas peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). As concentrações indicadas no eixo X representam a concentração final no pocinho da placa.



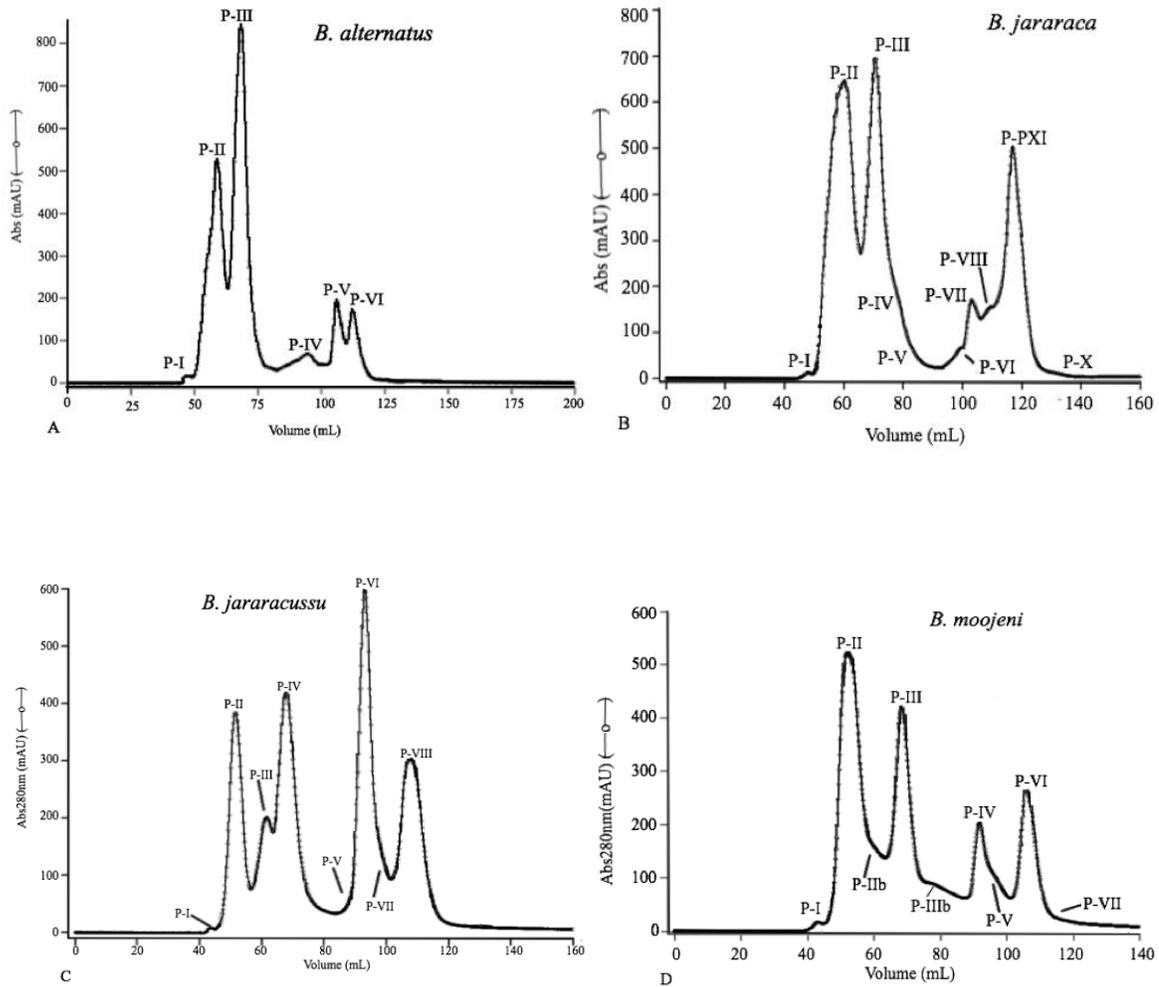
**Figura 2.** Atividade da DPP IV nas peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). As concentrações indicadas no eixo X representam a concentração final no pocinho da placa.

## 4.2. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PEÇONHAS

### 4.2.1. Exclusão molecular

Com o objetivo verificar o efeito da fração de baixa massa molecular sobre as endopeptidases estudadas, já tendo estudado a distribuição da APM, DPP IV e NEP 24.11 nas peçonhas, optou-se pela cromatografia de exclusão molecular para aumentar o rendimento das frações com baixa massa molecular, uma vez que a quantidade de material com massa molecular

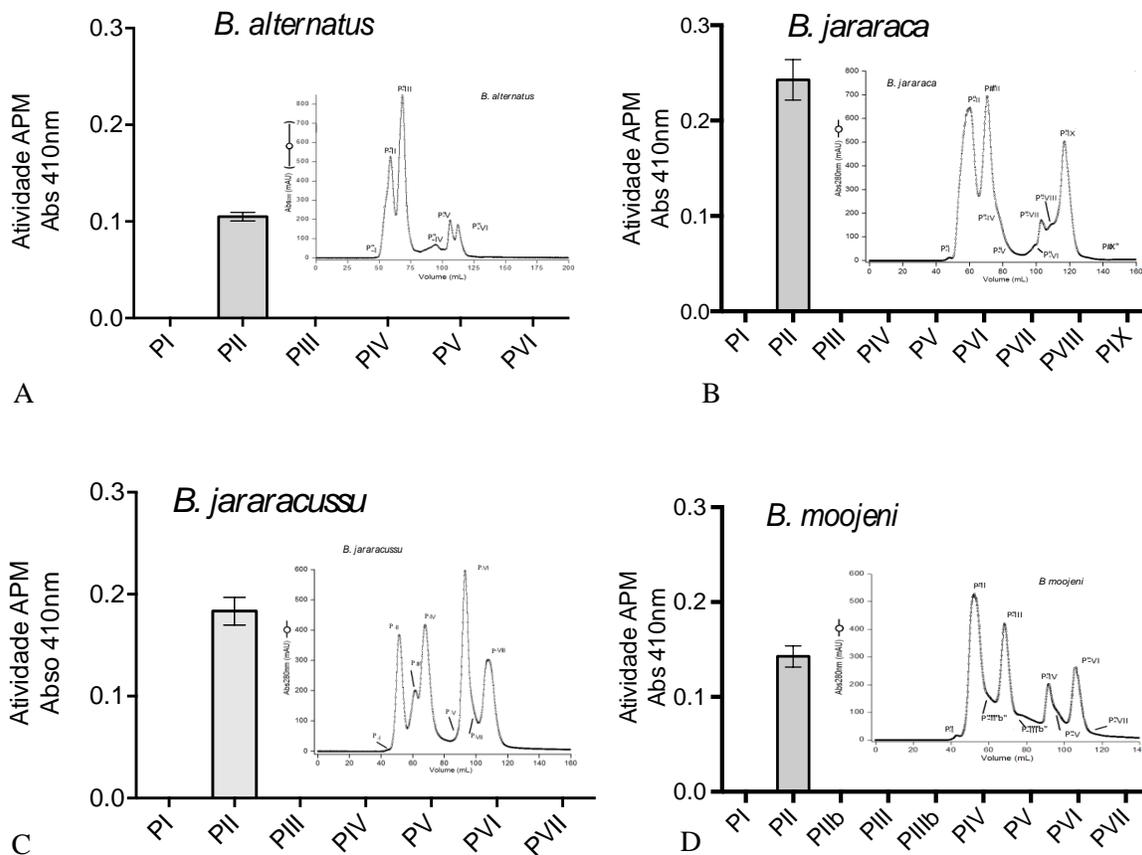
abaixo de 5 kDa era muito pequena. O fracionamento das peçonhas em coluna de Superdex-75 resultou nos perfis indicados na Fig. 3; a exclusão molecular da peçonha de *B. alternatus* resultou em seis picos (P-I-P-VI), a de *B. jararaca* em 10 picos (P-I-P-X), a de *B. jararacussu* em oito picos (P-I-P-VIII) e de *B. moojeni* em sete picos (P-I-P-VII).



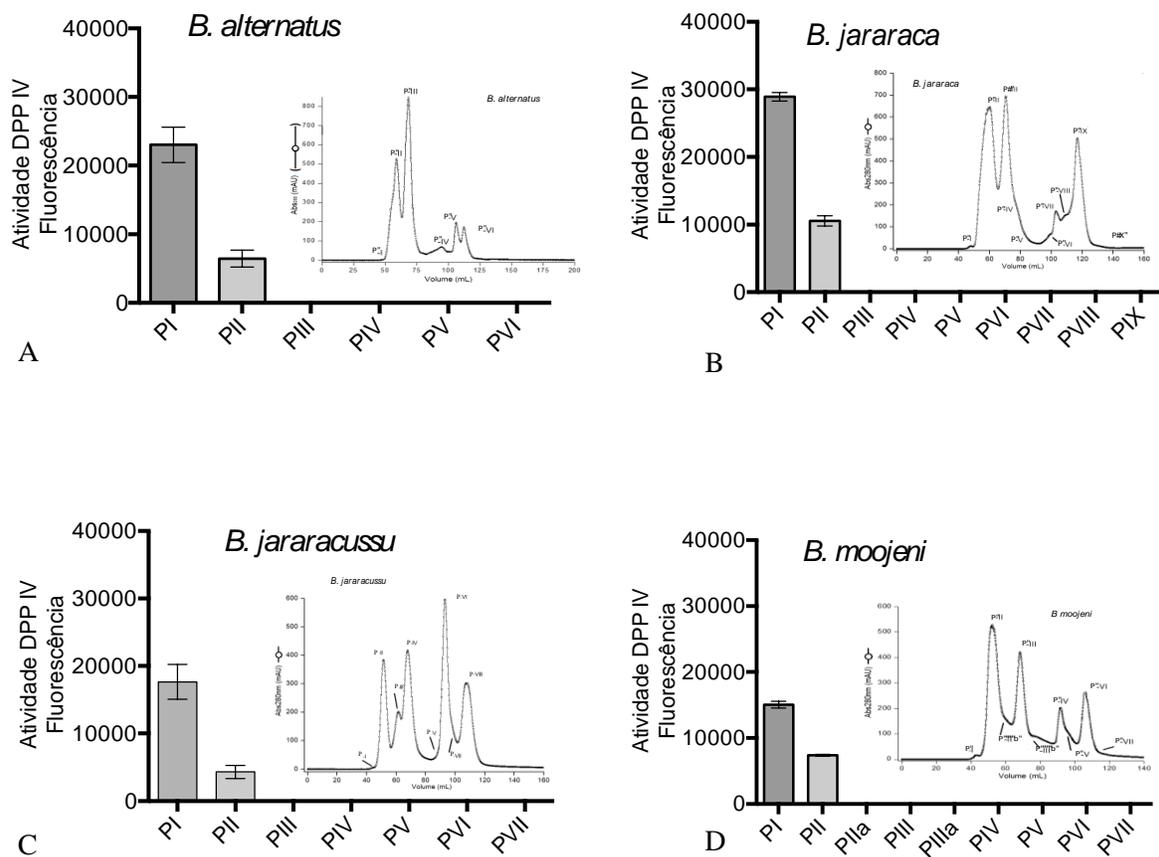
**Figura 3.** Perfis de eluição das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D) após gel filtração (exclusão molecular) em coluna de Superdex-75. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão AMBIC 50 mM, pH 8, sendo aplicados 75 mg de cada peçonha. A eluição foi monitorada em 280 nm e os picos resultantes foram designados como P-I, P-II, P-III, etc.

#### 4.2.2. Atividades peptidásicas das frações cromatográficas

Considerando que não foi encontrada atividade da NEP 24.11 nas peçonhas no *screening* inicial, esta atividade não foi avaliada nas cromatografias. A atividade da APM mostrou-se maior na fração correspondente ao pico II (PII) da exclusão molecular (Fig. 4) enquanto a atividade da DPP IV foi maior no pico I (PI), um pico muito pequeno localizado antes do pico de maior massa molecular (Fig. 5). A atividade menor de DPP IV detectada no PII provavelmente representa um resquício da enzima do PI que contaminou este pico devido à baixa resolução cromatográfica dos dois picos.



**Figura 4.** Atividade APM nos perfis de gel filtração das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). Cada coluna representa a média  $\pm$  DP (n=3).

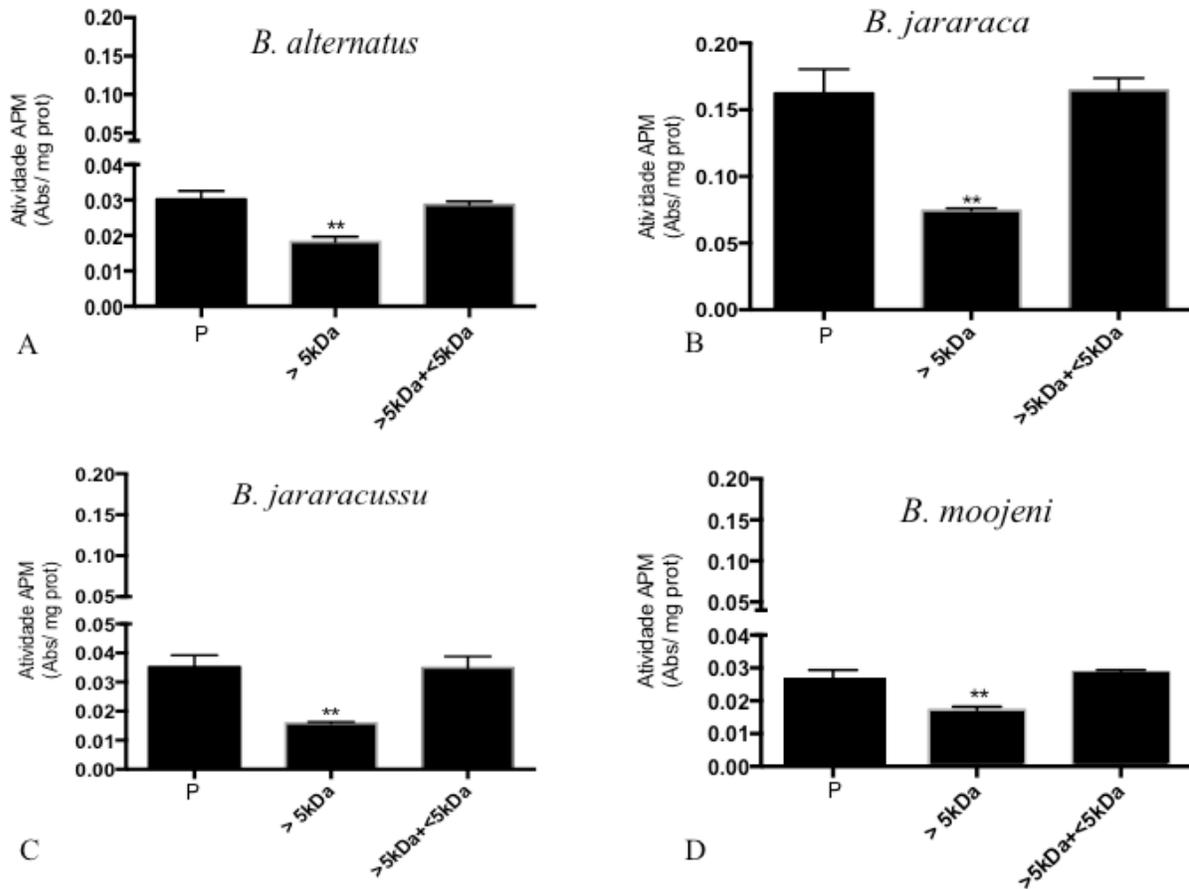


**Figura 5.** Atividade DPP IV nos perfis de gel filtração das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). Cada coluna representa a média  $\pm$  DP (n=3).

#### 4.3. EFEITO DA FRAÇÃO DE BAIXA MASSA MOLECULAR NAS PEPTIDASES

Para avaliar a influência da fração de baixa massa molecular (fração peptídica) sobre as atividades APM e DPP IV das peçonhas, as mesmas foram filtradas em filtro Amicon (*cut-off* nominal de 5 kDa) resultando em fração retida (>5 kDa) e fração filtrada (<5 kDa). As atividades foram mensuradas na peçonha antes de ser filtrada, na fração retida no Amicon (>5 kDa) e na mistura de peçonha retida mais a peçonha filtrada no Amicon (fração >5 kDa + fração <5 kDa).

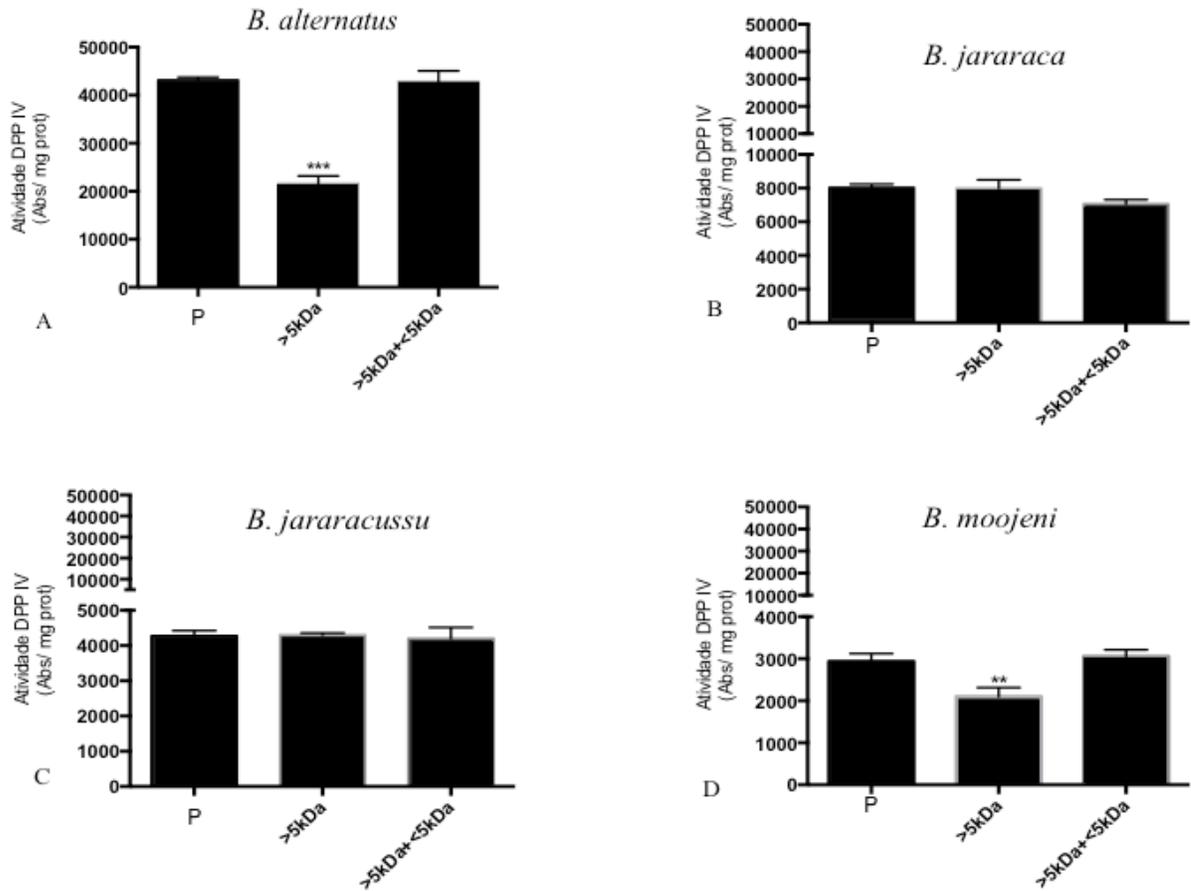
A Figura 6 mostra que a remoção da fração de 5 kDa resultou na diminuição da atividade da APM nas quatro peçonhas, que foi plenamente recuperada com a adição da fração <5 kDa.



**Figura 6.** Efeito da fração de baixa massa molecular das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D) sobre a atividade APM das mesmas. P= Peçonha; >5 kDa = fração retida; >5 kDa + <5 kDa = fração retida + fração filtrada. As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*\*p<0,01 comparado ao P.

Já no caso da DPP IV, a remoção da fração <5 kDa reduziu a atividade desta peptidase nas peçonhas de *B. alternatus* e *B. moojeni*, com efeito maior na primeira (redução de ~50%), sem porém afetar a atividade nas de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. A devolução da fração <5 kDa

à fração >5 kDa restaurou a atividade total, de modo semelhante àquilo que foi visto com a APM (Fig. 7).



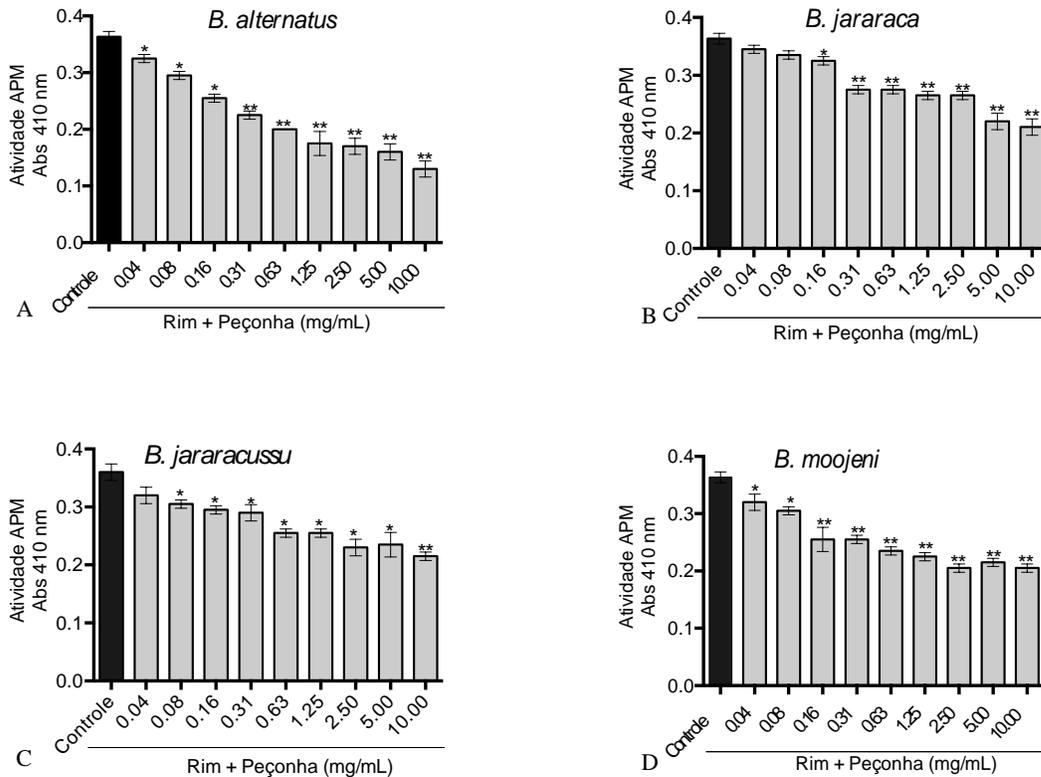
**Figura 7.** Efeito da fração de baixa massa molecular das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D) sobre a atividade DPP IV das mesmas. P=Peçonha >5 kDa = fração retida; >5 kDa + <5 kDa = fração retida + fração filtrada. As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado ao P.

#### 4.4. ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS RENAIIS

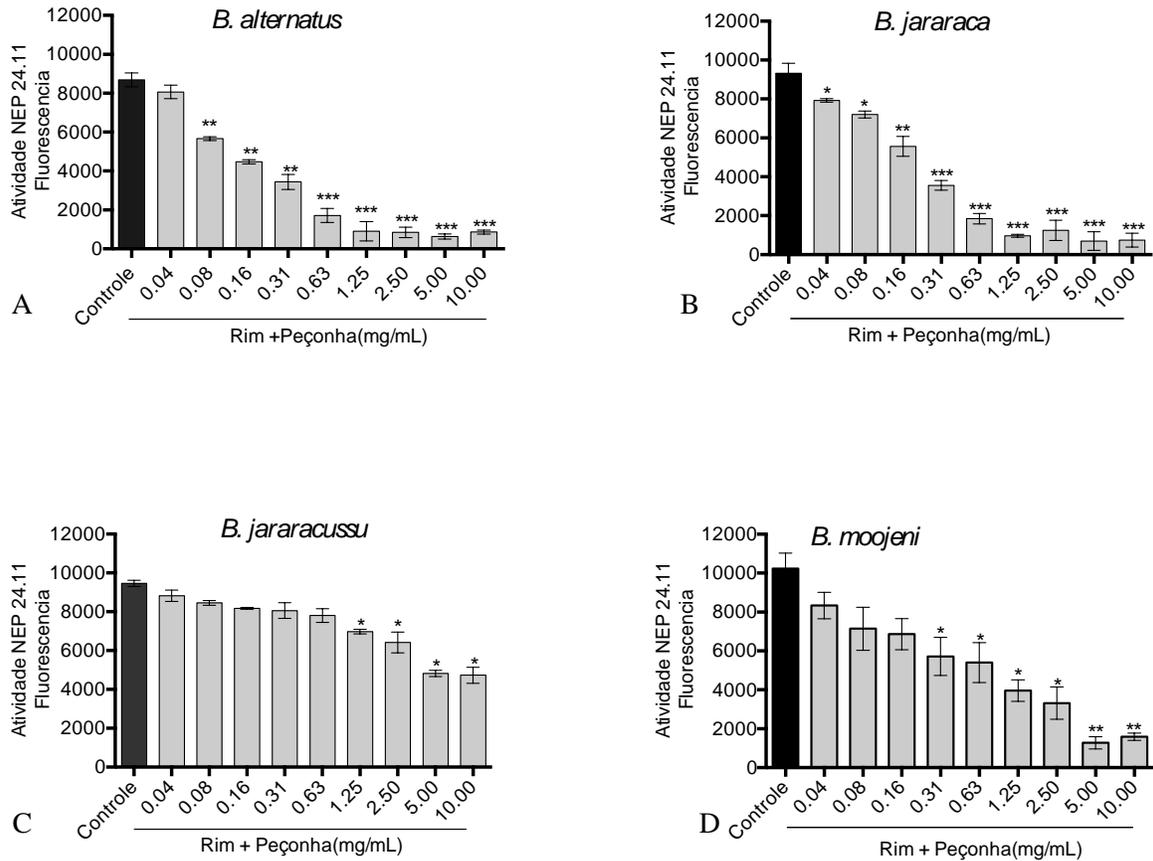
##### 4.4.1. Influência das peçonhas sobre peptidases renais

Para avaliar a influência das peçonhas sobre atividades peptidásicas, usamos como fonte de enzimas o tecido renal de ratos, uma vez que o mesmo possui as três enzimas estudadas

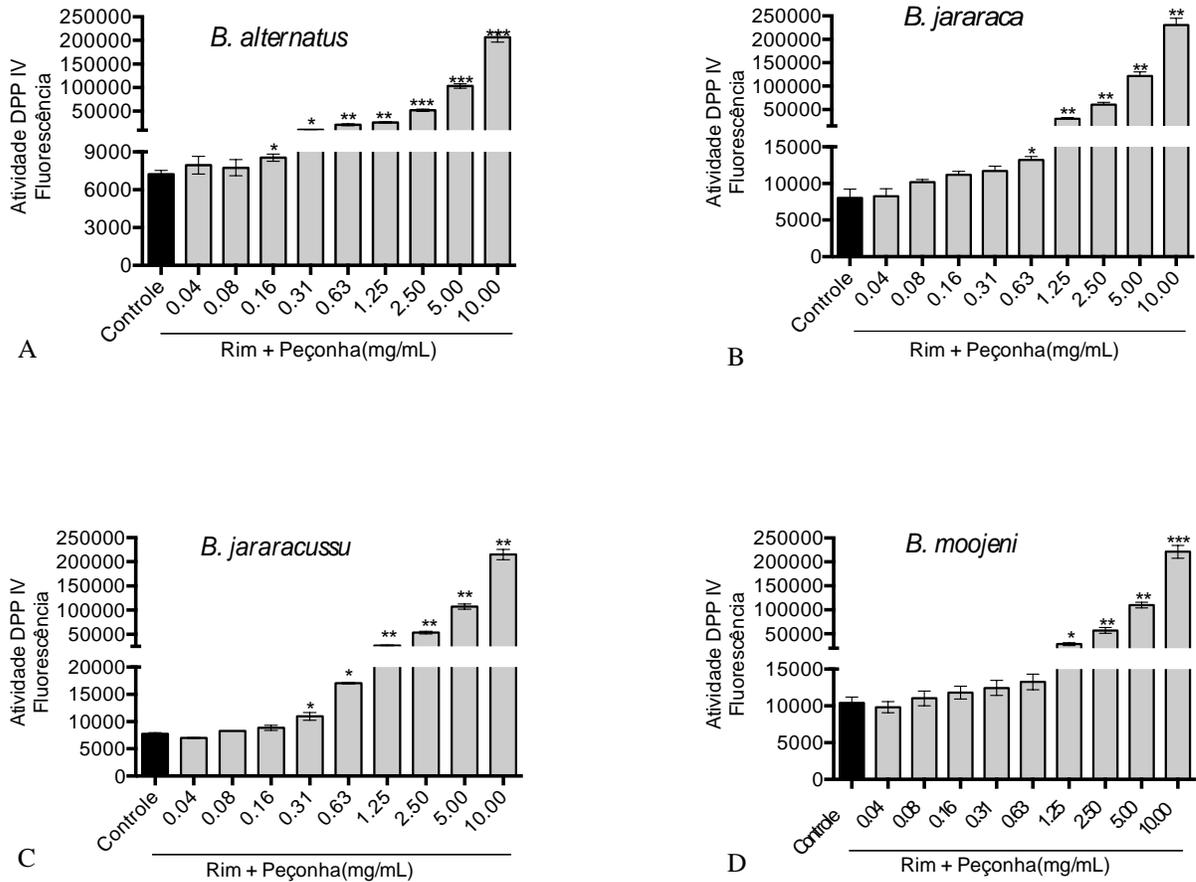
(APM, DPP IV e NEP 24.11). Nestes experimentos, concentrações crescentes das peçonhas foram adicionadas à uma quantidade fixa de tecido renal, sendo que as atividades peptidásicas encontradas nas próprias peçonhas já foram descontadas. Conforme mostram as Figuras 8 e 9, um aumento progressivo na concentração de peçonha resultou em diminuição correspondente na atividade peptidásica da APM e NEP 24.11 em comparação com o controle, sendo que a peçonha de *B. alternatus* foi mais ativa contra APM, e a *B. alternatus* e *B. jararaca* as mais ativas contra a NEP 24.11. Já, com a DPP IV (Fig. 10), houve aumento da atividade conforme aumentava a concentração das quatro peçonhas.



**Figura 8.** Inibição da APM renal (7  $\mu\text{g/mL}$ ) de rato pelas peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*p<0,05 e \*\*p<0,005 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



**Figura 9.** Inibição da NEP 24.11 renal de rato (9  $\mu\text{g/mL}$ ) pelas peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



**Figura 10.** Estimulação da DPP IV renal (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de rato pelas peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

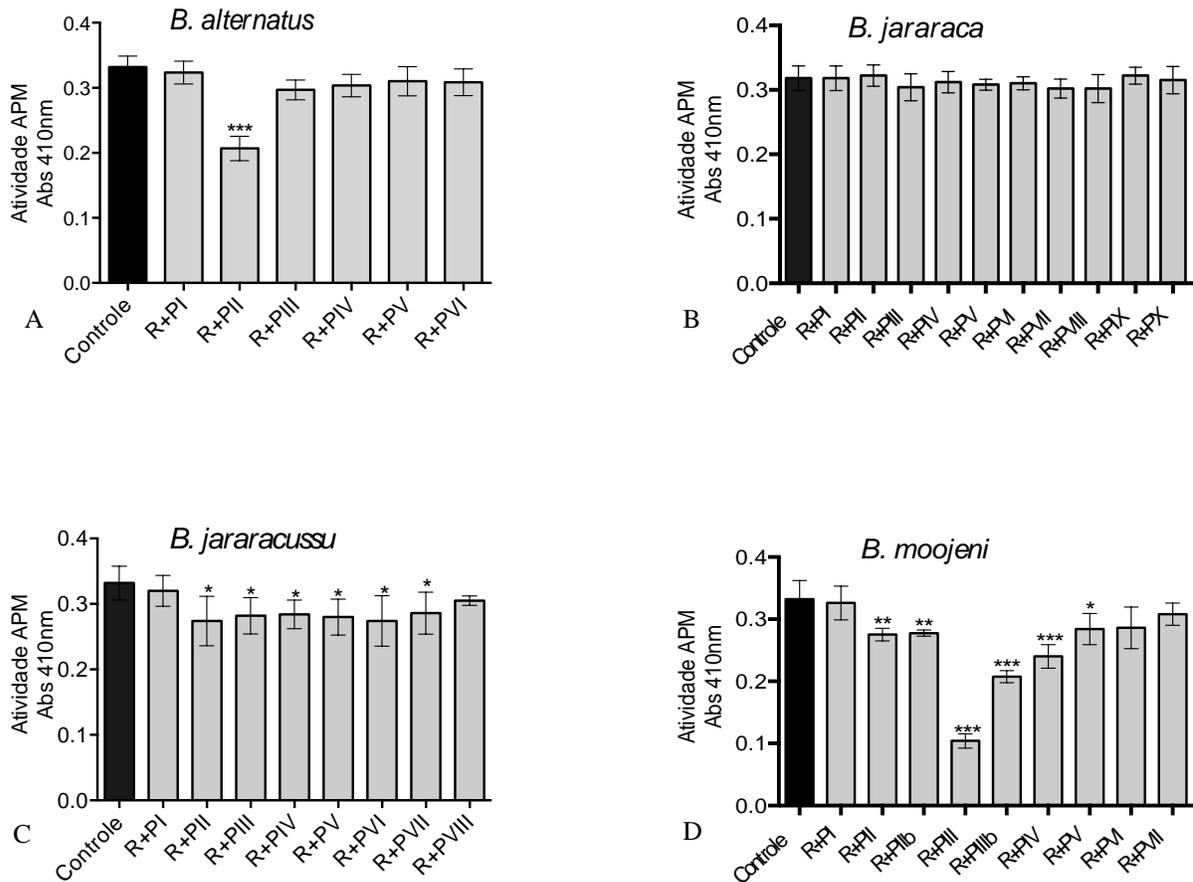
#### 4.4.2. Influência das frações cromatográficas (gel filtração) sobre peptidases renais

Tendo em vista a ação das peçonhas sobre as atividades peptidásicas endógenas, avaliamos então a ação dos picos cromatográficos (exclusão molecular) sobre as peptidases renais com o intuito de iniciar a identificação do pico (fração) responsável pelo efeito observado. Com a peçonha de *B. alternatus*, o pico PII causou redução de  $35,3 \pm 12,4\%$  na atividade APM renal; foi o único pico desta peçonha que mostrou atividade inibitória sobre esta atividade. Os picos de *B. jararaca* não reduziram significativamente a atividade da APM. Os picos PI a PVII da peçonha de *B. jararacussu* reduziram a atividade da APM em  $\sim 18\%$ , já o pico PIII de *B. moojeni* reduziu significativamente a atividade da APM ( $70,6 \pm 3\%$ ), assim como os picos PIIIb ( $39,7 \pm 2,4\%$ ), PIV ( $29,4 \pm 6\%$ ), PII ( $17,6 \pm 2,6\%$ ), PIIb ( $17,6 \pm 1,2\%$ ) e PV ( $29,4 \pm 0,5\%$ ) (Fig. 11).

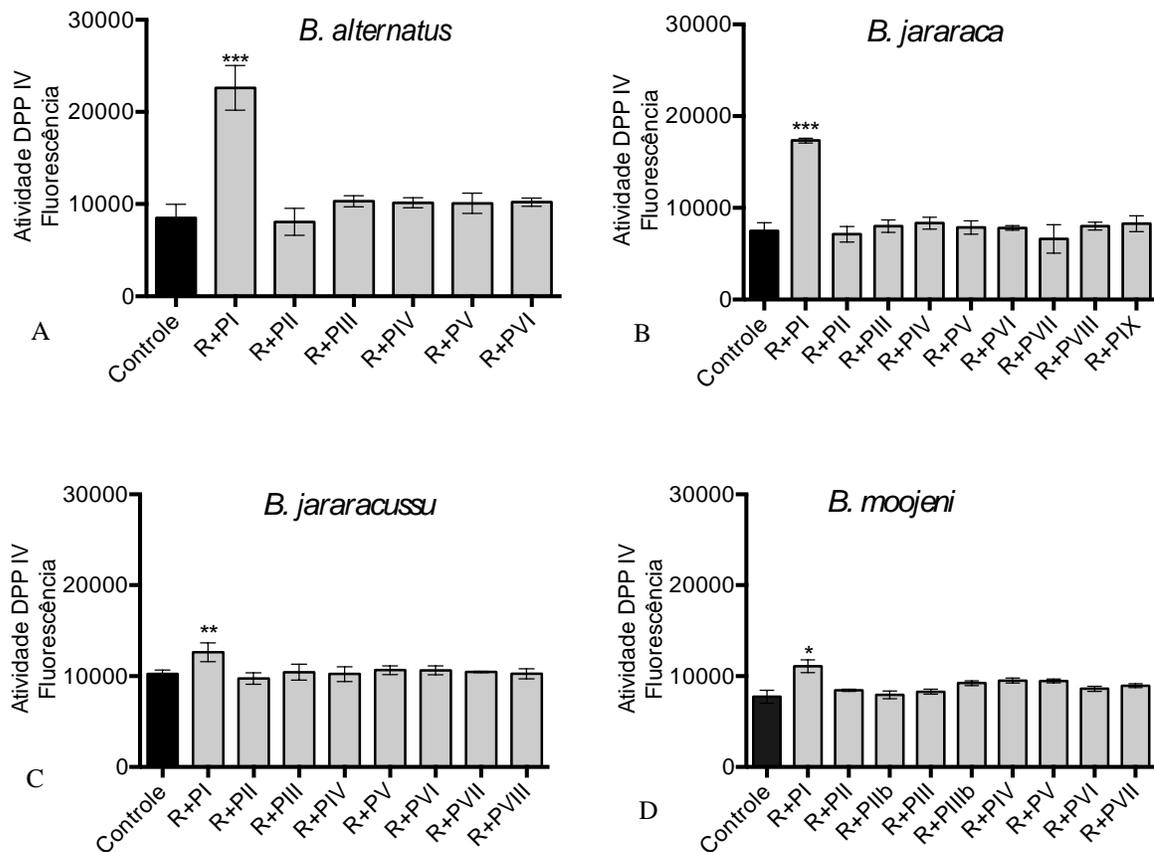
Com a DPP IV renal, houve um aumento da atividade enzimática apenas com o pico PI de todas as peçonhas: com *B. alternatus* houve um aumento de  $128 \pm 26\%$ , com *B. jararaca* de  $131,2 \pm 2,5\%$ , com *B. jararacussu* de  $26,8 \pm 8,7\%$ , e com *B. moojeni* de  $43\% \pm 7\%$ , quando comparados com o controle; nenhum dos outros picos das peçonhas afetou a atividade da DPP IV (Fig. 12). Lembrando ainda que destes resultados foi descontada a atividade DPP IV presente no próprio pico.

Em relação a NEP 24.11, a atividade foi reduzida significativamente pelos picos II ( $42,2\% \pm 8,2\%$ ), III ( $30,8 \pm 6,6\%$ ) e IV ( $61,2 \pm 10\%$ ) de *B. alternatus*. Com *B. jararaca*, observou-se que o pico VI resultou numa maior inibição da atividade da NEP 24.11 ( $81,4 \pm 17,8\%$ ), seguido pelos picos VII ( $68,5 \pm 28,4\%$ ), V ( $50,7 \pm 12,6\%$ ), IV ( $49,8 \pm 13,4\%$ ) e III ( $49,2 \pm 14,2\%$ ). Com *B. moojeni*, observou-se que os picos III e IIIa resultaram numa maior inibição da NEP 24.11 ( $76,3 \pm 22\%$  e  $76,3 \pm 8,1\%$ , respectivamente), seguido pelos picos II ( $59,2 \pm 16,4\%$ ),

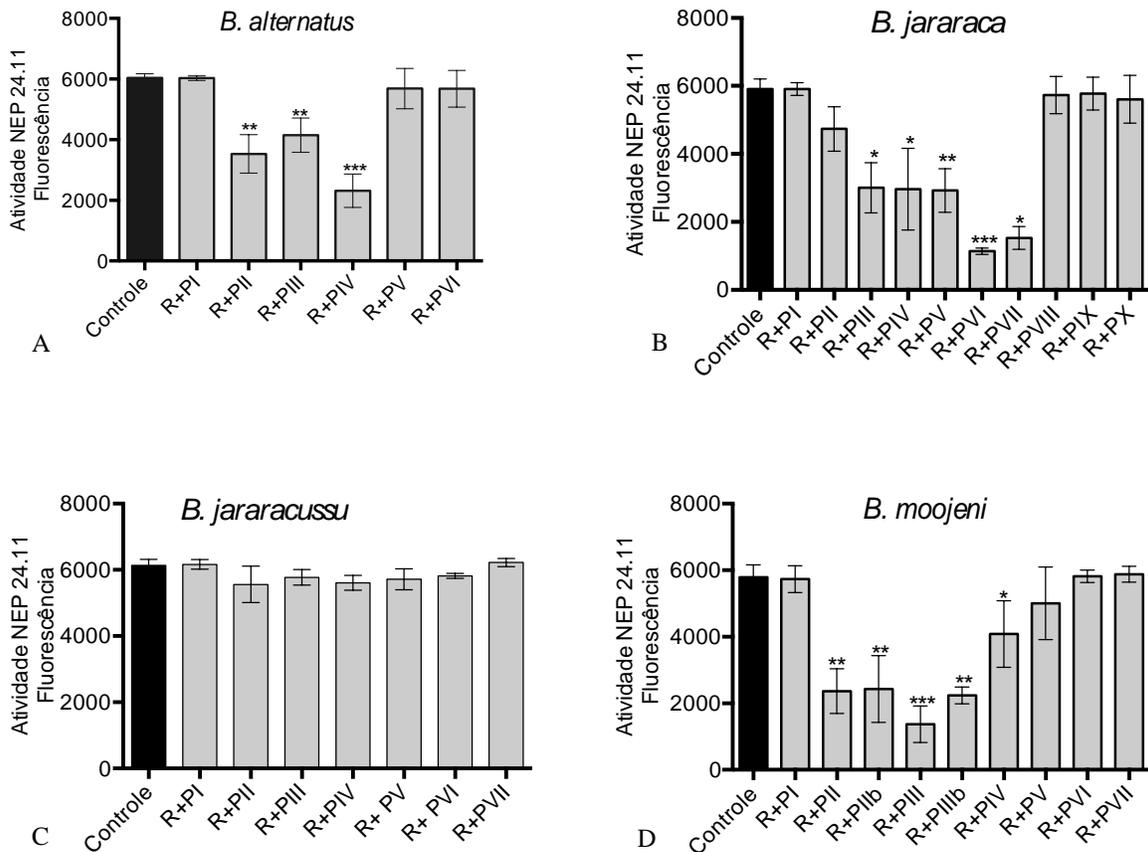
IIa ( $58,1 \pm 23,8\%$ ) e IV ( $29,5 \pm 14,1\%$ ). Não houve redução significativa da atividade da NEP 24.11 com os picos de *B. jararacussu* (Fig. 13).



**Figura 11.** Inibição da atividade da APM renal de rato (7  $\mu\text{g/mL}$ ) pelos picos cromatográficos das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



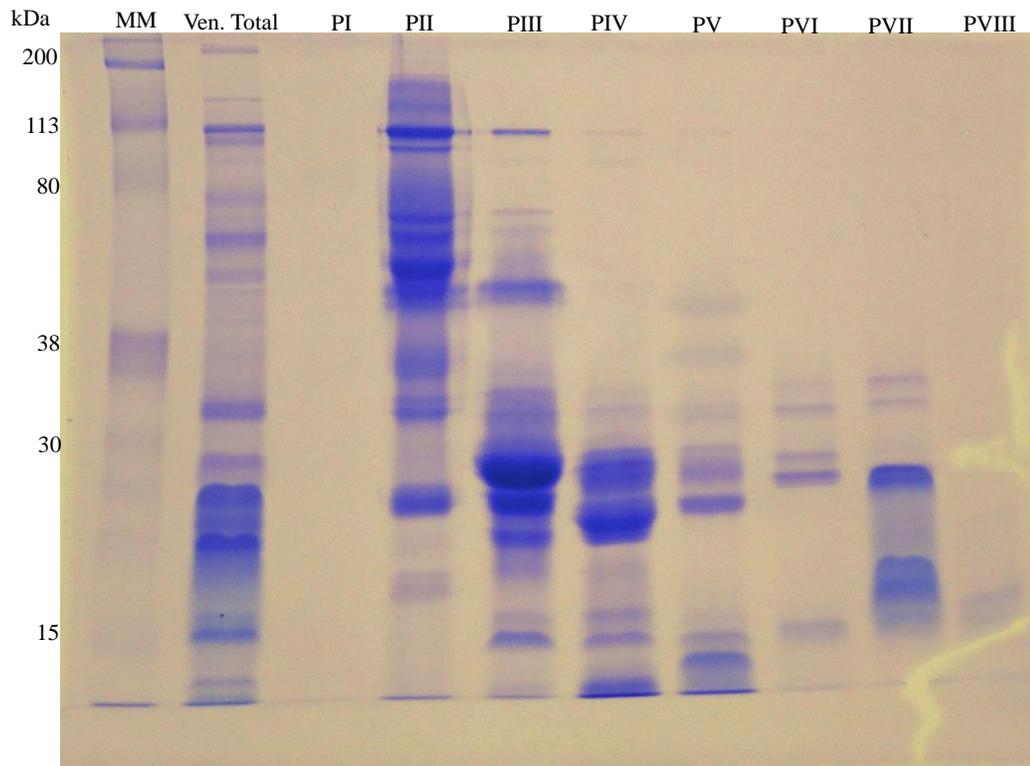
**Figura 12.** Estimulação da atividade enzimática da DPP IV renal de rato (0,2 µg/mL) pelo pico cromatográfico PI das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média ± DP (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



**Figura 13.** Inibição da atividade enzimática da NEP 24.11 renal de rato (9  $\mu\text{g/mL}$ ) pelos picos cromatográficos das peçonhas de *B. alternatus* (A), *B. jararaca* (B), *B. jararacussu* (C) e *B. moojeni* (D). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

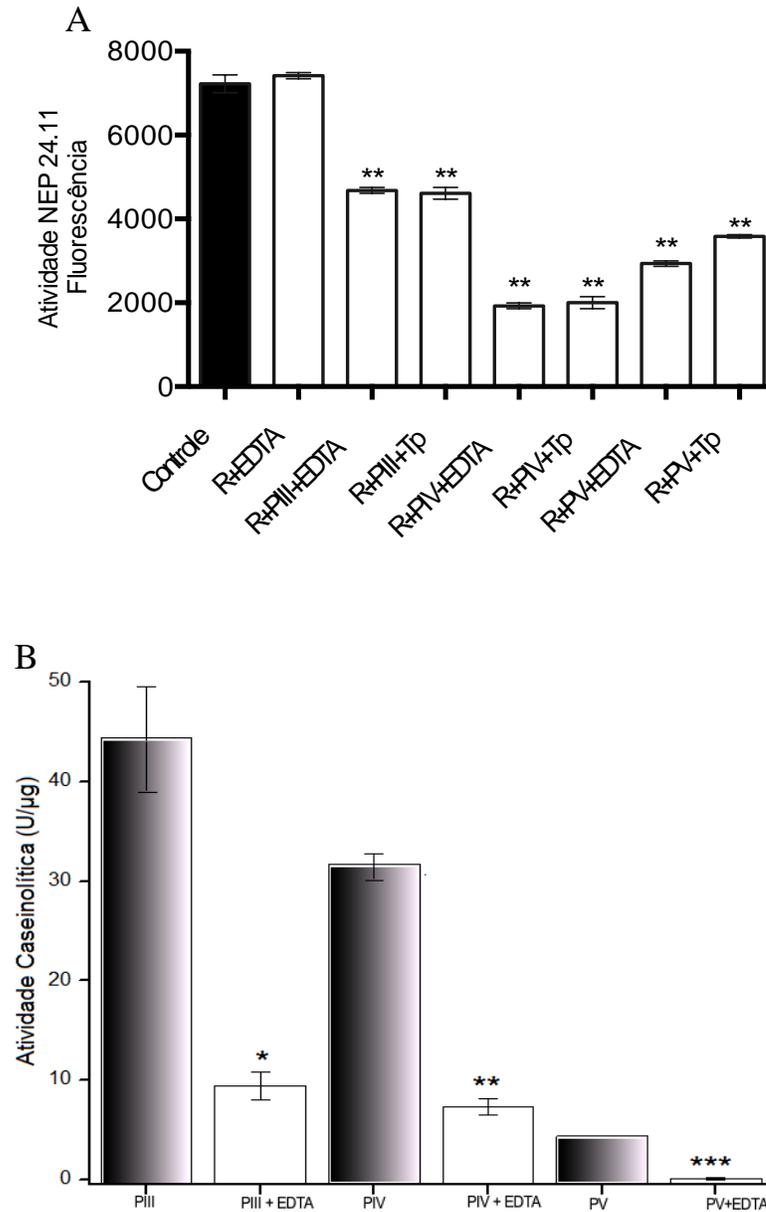
#### 4.5. ATIVIDADE INIBITÓRIA DA PEÇONHA DE *B. JARARACA* SOBRE A NEP 24.11

Tendo em vista que das três peptidases estudadas a NEP 24.11 foi a que mostrou a maior inibição com a fração de menor massa molecular entre as peçonhas, e que a peçonha de *B. jararaca* foi a mais potente, escolhemos a NEP 24.11 e a peçonha de *B. jararaca* para dar continuidade ao estudo. O pico escolhido para dar continuidade foi o pico VI (PVI) de *B. jararaca*. O perfil eletroforético das frações mostra que o PVI possui bandas em torno de 15 a 35 kDa (Fig. 14).



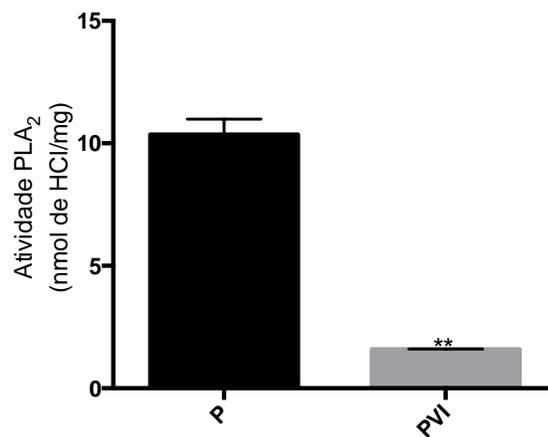
**Figura 14.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos picos cromatográficos PI ao PVIII da peçonha de *B. jararaca* obtidos por gel filtração. Foi usado um gel de acrilamida a 12,5%, sem DTT. Coloração com azul brilhante de Coomassie R250. MM – marcadores de massa molecular (indicados à esquerda, em kDa).

Para mostrar que a inibição da atividade da NEP 24.11 observada com picos III, IV e V não era devido à degradação da peptidase renal pela atividade proteolítica presente nestes picos, fez-se o tratamento dos picos com EDTA (quelante de zinco que é essencial para atividade de SVMPs). O painel A da Figura 15 mostra que o EDTA não afetou a atividade da ENP 24.11, mas inibiu potentemente a atividade proteolítica (caseinolítica) dos picos (painel B).



**Figura 15.** Atividade proteolítica da NEP 24.11 renal incubada com os picos PIII, PIV e PV da peçonha de *B. jararaca* (os mais ativos na inibição da NEP) na ausência (apenas tampão – Tp) e presença de EDTA (conc. final 5  $\mu$ M) (painel A) e a atividade caseinolítica destes mesmos picos sobre o substrato azocaseína na ausência e presença de EDTA (painel B). As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparando controle (rim + tampão de ensaio) com tratado (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). R – tecido renal.

Para testar se a inibição causada pelo pico PVI era resultado da atividade PLA<sub>2</sub> (uma vez que a eletroforese indicou a presença de componentes com massa molecular semelhante à PLA<sub>2</sub> monomérica: ~15 kDa) dosou-se a atividade PLA<sub>2</sub> nesse pico, comparado à peçonha total. A concentração proteica do pico e da peçonha foi ajustada para 1 mg/mL baseada na absorbância a 280 nm. A atividade PLA<sub>2</sub> do PVI foi significativamente menor que a da peçonha (Fig. 16), indicando ser pouco provável que a inibição fosse devida a esta atividade.

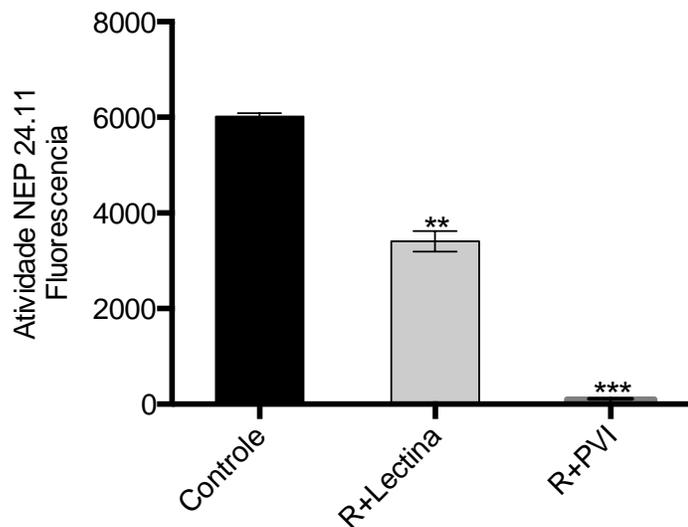


**Figura 16.** Atividade PLA<sub>2</sub> da peçonha de *B. jararaca* e do PVI resultante da exclusão molecular. As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*\*p<0,005 comparado com a peçonha total (ANOVA). P – peçonha.

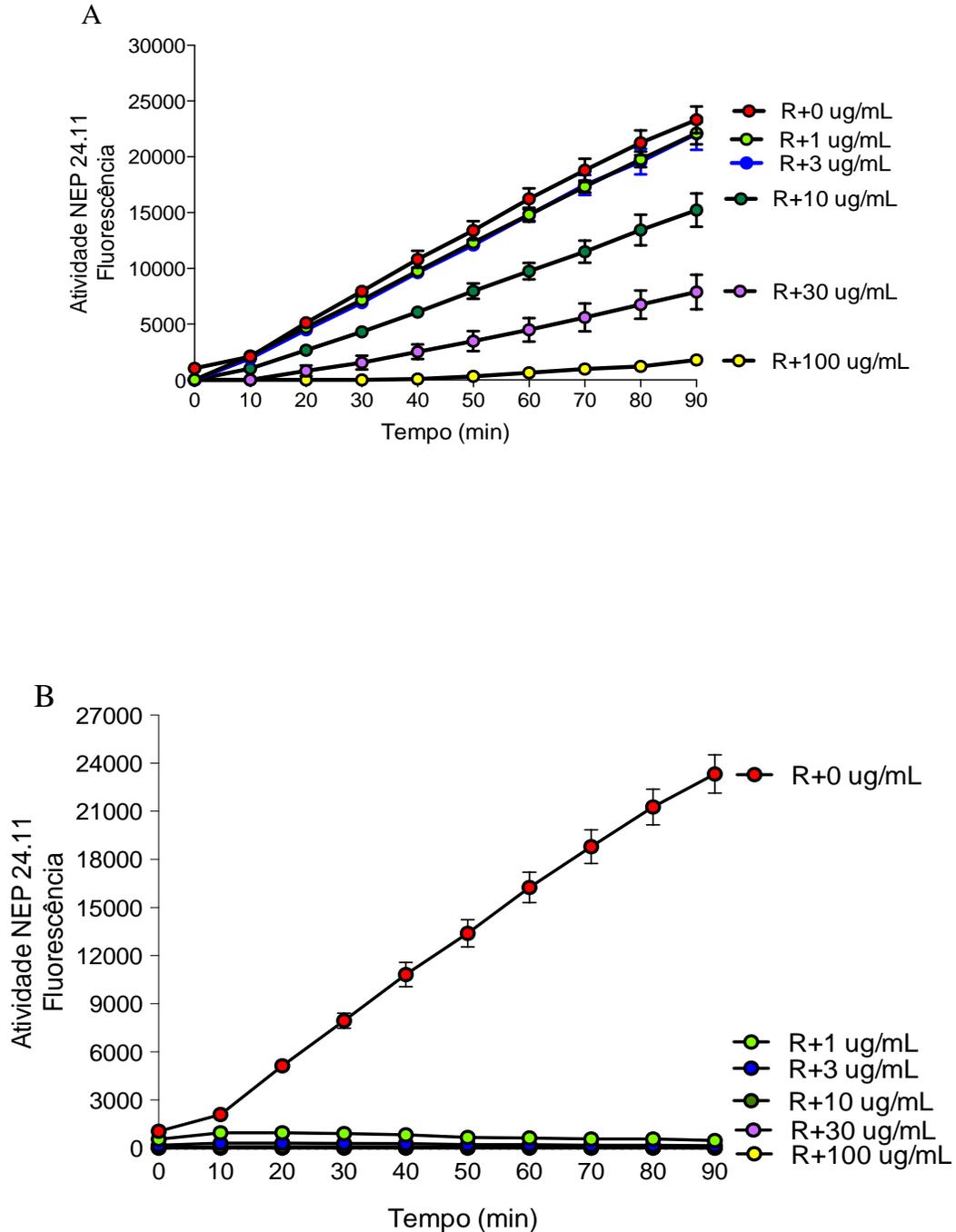
Pelo mesmo raciocínio, considerando que a forma monomérica de muitas lectinas que se ligam a açúcares tem massa molecular de ~15 kDa, avaliamos se a inibição pudesse ser causada por esta proteína. Para isso, incubou-se tecido renal (9  $\mu$ g/mL) com uma lectina isolada da peçonha de *B. jararacussu* (concentração final = 200  $\mu$ g/mL) e comparou-se a inibição com aquela observada com o PVI (concentração final= 70  $\mu$ g/mL). Conforme mostra a Figura 17,

embora a incubação com a lectina tenha reduzida a atividade da NEP 24.11, foi bem menos marcante que aquela observada com o pico PVI.

A Figura 18 mostra que a inibição da NEP 24.11 pelo pico PVI é dependente da concentração, porém bem menos potente que aquela causada pelo fosforamidon, inibidor específico da NEP 24.11.



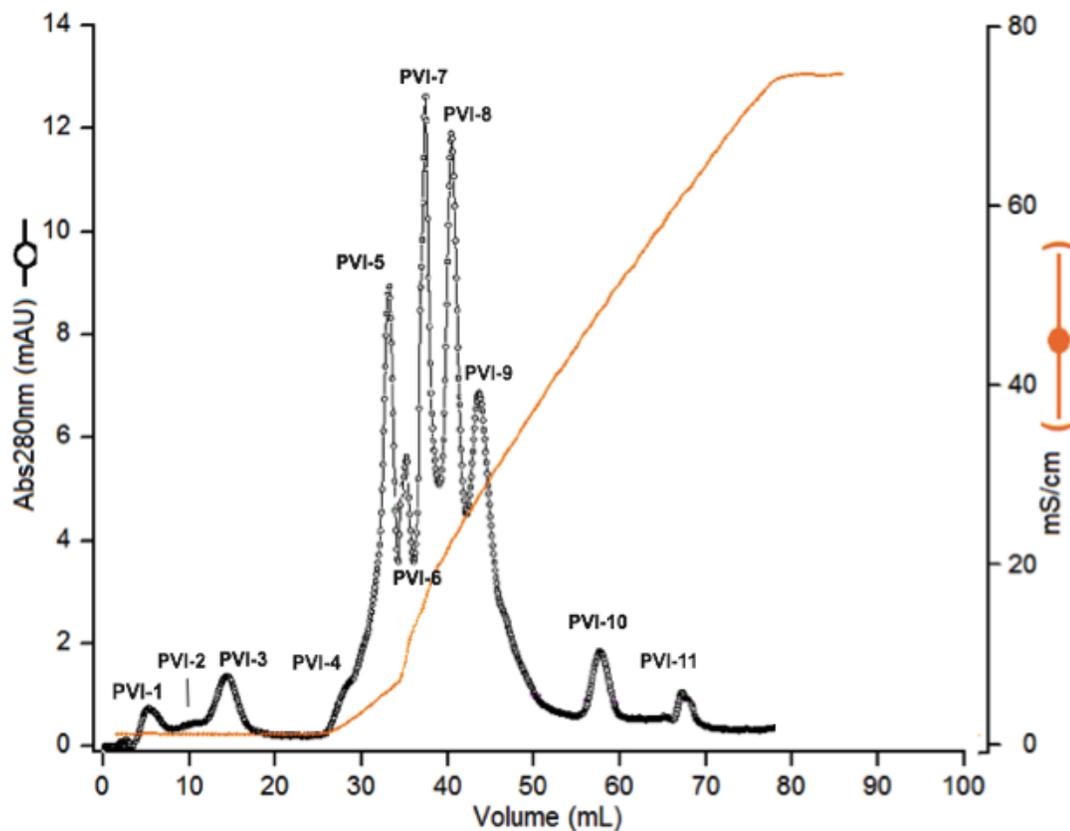
**Figura 17.** Influência de uma lectina de *B. jararacussu* sobre a atividade da NEP 24.11 comparada à do PVI. A lectina foi purificada por cromatografia de afinidade sobre resina Sepharose 4B e foi incubada com tecido renal nas mesmas condições usadas para avaliar o efeito da peçonha de *B. jararaca* e do pico PVI sobre a atividade da NEP 24.11 renal. As colunas representam a média ± DP (n=3). \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). R – tecido renal.



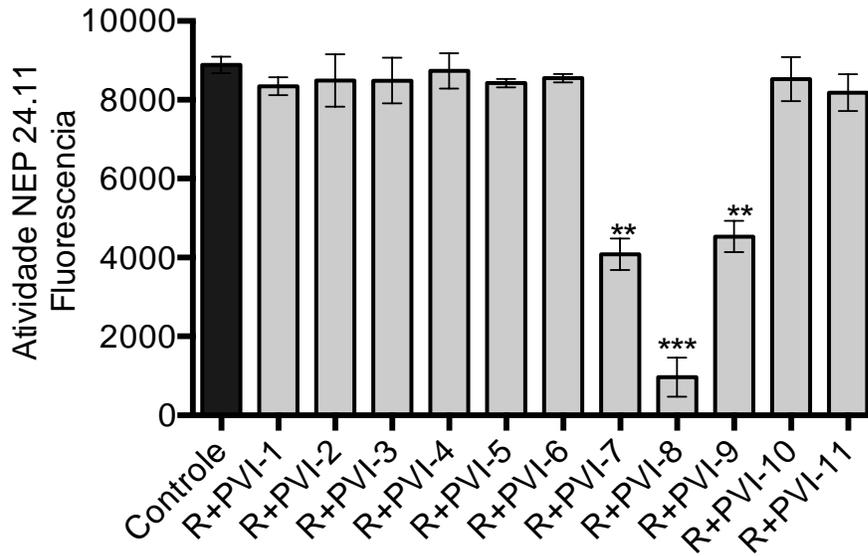
**Figura 18.** Atividade inibitória do PVI (A) e do fosforamidon (inibidor específico) (B) sobre a atividade da NEP 24.11. Ambos os ensaios foram feitos no mesmo dia, sob as mesmas condições. Quantidade de tecido renal: 9,1  $\mu\text{g/mL}$ . Os pontos representam a média  $\pm$  SD (n=3).

#### 4.6. FRACIONAMENTO DO PICO PVI POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Na próxima etapa cromatográfica, o pico PVI foi fracionado por cromatografia de troca iônica com gradiente linear de eluição para separar melhor os componentes deste pico. Utilizando esta técnica, o pico VI resultou em 11 subpicos (nomeados PVI-1 até PVI-12), conforme mostrado no perfil cromatográfico abaixo (Fig. 19). Dos 11 subpicos, os que causaram maior inibição foram os picos PVI-7, PVI-8 e PVI-9, que inibiram a atividade da NEP 24.11 em  $54 \pm 4,5\%$ ,  $89 \pm 5,5\%$  e  $49 \pm 4,5\%$ , respectivamente (Fig. 20).

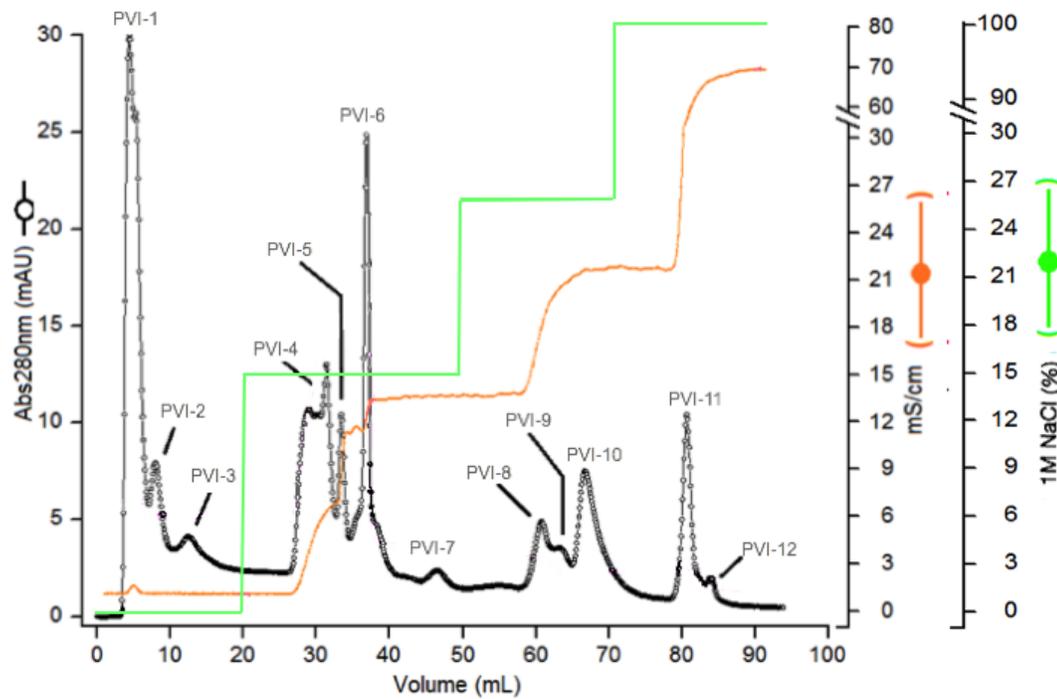


**Figura 19.** Perfil de eluição do pico PVI da peçonha de *B. jararaca* após troca iônica em coluna de Q-Sepharose. As proteínas foram eluídas (1 mL/min) em tampão HEPES 0,02 M, pH 8,0 contendo NaCl 1 M em gradiente linear em 10 volumes de coluna (fluxo: 60 mL/h, volume coletado: 1 mL/tubo) e o perfil cromatográfico foi monitorado em 280 nm. Foram identificados 11 subpicos principais, nomeados PVI-1 até PVI-11. Eixo Y direito: condutividade do gradiente de NaCl usado na eluição das proteínas.

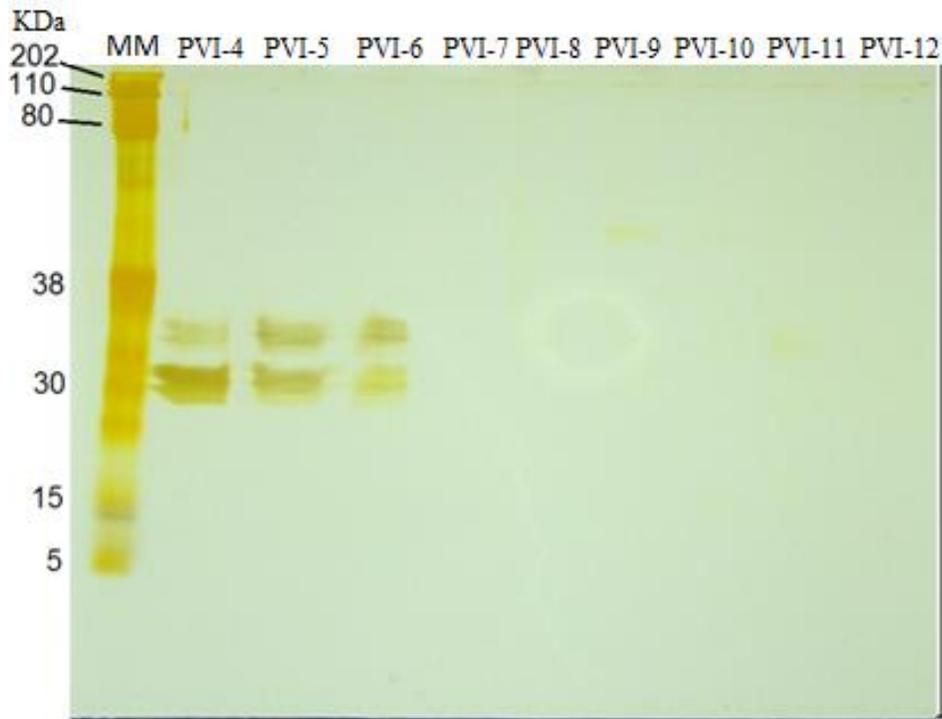


**Figura 20.** Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos resultantes da troca iônica do PVI da peçonha de *B. jararaca*. \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). R – tecido renal.

Para tentar melhorar a resolução dos picos, realizou-se uma cromatografia por troca iônica com eluição em gradiente escalonado, em condições um pouco diferentes da primeira troca iônica. Esta cromatografia que resultou em 12 subpicos, nomeados de PVI-1 até PVI-12 (Fig. 21). O perfil eletroforético de alguns picos desta troca iônica (PVI-4 a PVI-12) mostrou nos picos PVI-4, PVI-5 e PVI-6 duas bandas coradas mais fortemente, com massa molecular de 30-38 kDa (Fig. 22).

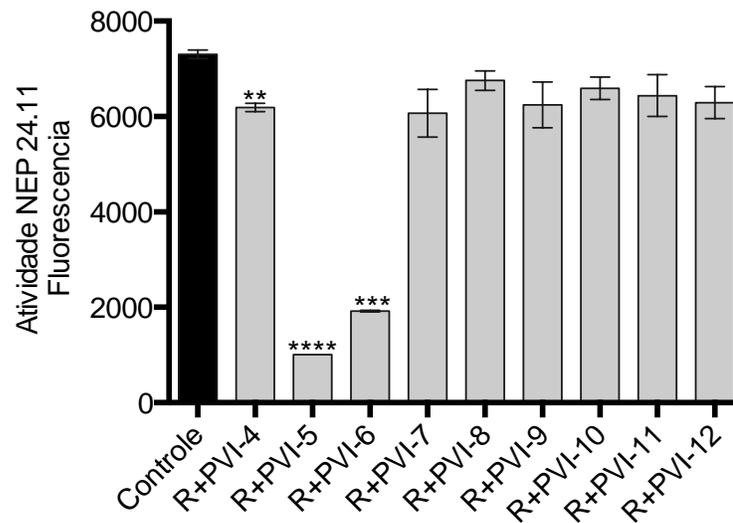


**Figura 21.** Perfil de eluição do pico PVI da peçonha de *B. jararaca* após troca iônica em coluna de Q-Sepharose. As proteínas foram eluídas (1 mL/min) em tampão HEPES 0,02 M, pH 8,0 contendo um gradiente escalonado (*step-wise gradient*) de 1 M de NaCl. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1 mL cada foram coletadas. Eixo Y direito: cor laranja – condutividade do gradiente escalonado de NaCl (cor verde) usado na eluição das proteínas.



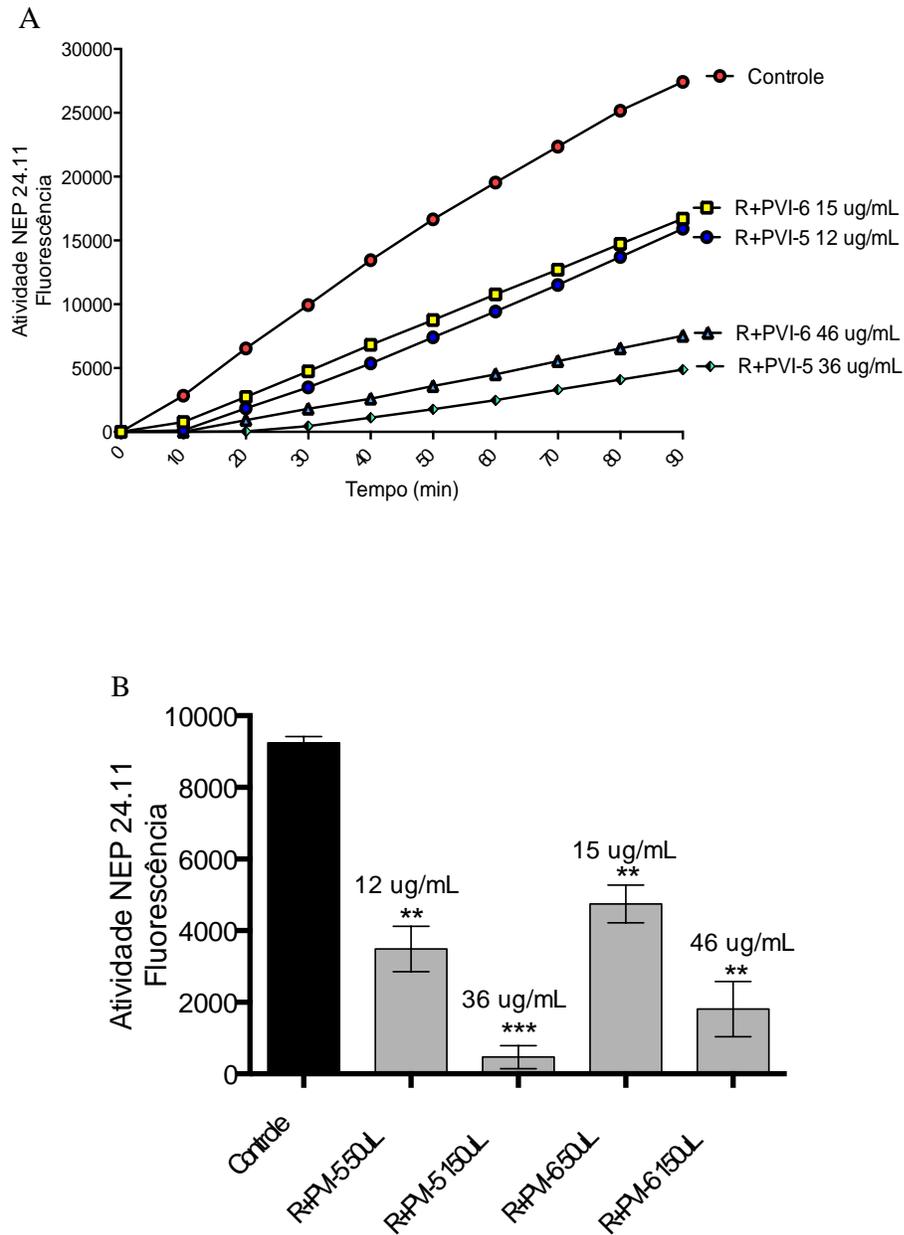
**Figura 22.** Eletroforese (SDS-PAGE) dos picos cromatográficos PVI-4 ao PVI-12 da peçonha de *B. jararaca* obtidos por troca iônica com gradiente de eluição escalonado. Foi usado um gel de acrilamida a 15%, sem DTT. Coloração de prata. MM – marcadores de massa molecular (massas indicadas à esquerda, em kDa).

O ensaio enzimático mostrou que os picos PVI-4, PVI-5 e PVI-6 causaram inibição da NEP 24.11, sendo o PVI-5 o responsável pela inibição mais significativa, seguido do PVI-6. (Fig. 23). Os subpicos que causaram estas inibições coincidem com os subpicos que destacaram-se no perfil da eletroforese mostrado acima.



**Figura 23.** Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos resultantes da troca iônica do PVI da peçonha de *B. jararaca*. As colunas representam a média  $\pm$  DP (n=3). \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0001 comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). R – tecido renal.

Os subpicos foram quantificados pela leitura da absorbância de 280 nm. O mesmo perfil de inibição observado com o PVI da exclusão molecular se repetiu com os PVI-5 e PVI-6, ou seja, uma inibição dependente da concentração testada (Fig. 24).



**Figura 24.** Inibição da atividade da NEP 24.11 pelos subpicos resultantes da troca iônica escalonada do PVI da peçonha de *B. jararaca*. Os subpicos PVI-5 e PVI-6 inibiram a atividade da NEP. O painel A apresenta o curso temporal da reação na ausência e presença dos picos PVI-5 e PVI-6 (50  $\mu$ L e 150  $\mu$ L para cada um). O painel B mostra a atividade dos mesmos picos no tempo de 30 min. \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (rim + tampão de ensaio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). R – tecido renal.

## 5. DISCUSSÃO

As peçonhas botrópicas são ricas em atividade proteolítica exercida principalmente por SVMPs e SVSPs, as quais também possuem atividade peptidásica quando testadas em substratos sintéticos. Entretanto há evidências de que estas peçonhas também possuem atividades peptidásicas específicas como a APM, APB e DPP IV [25], L-leucil aminopeptidase [27] e angiotensinase [62]. O estudo mais abrangente até o momento foi o de Gasparello-Clemente e Silveira [25] que relataram a presença de APM e DPP IV nas peçonhas de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. moojeni*, além de *C. d. terrificus*, sendo as maiores atividades encontradas na peçonha de *B. alternatus*. Os resultados da presente investigação confirmam a presença de APM e DPP IV nas peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*, e demonstram a presença destas atividades na de *B. moojeni*, além de mostrar a ausência de NEP 24.11 nas quatro espécies. A presença das atividades de DPP IV e APM nos picos I e II do perfil cromatográfico de gel filtração, respectivamente, que contêm os componentes de maior massa molecular das peçonhas, está de acordo com as massas moleculares de 110 a 120 kDa relatadas para estas enzimas na peçonha de *G. b. brevicaudus* [32,33].

Devido ao número reduzido de estudos que têm investigado esta questão, ainda não está claro se as atividades peptidásicas detectadas em peçonhas refletem componentes específicos das peçonhas ou se são apenas decorrentes da degradação e lise de células epiteliais comuns ao ciclo normal do epitélio glandular [148,149]. A detecção de várias destas peptidases em análises transcriptômicas da glândula venenífera do gênero *Bothrops* (e de outros gêneros) aponta para a primeira possibilidade, enquanto que a variação observada na ocorrência destas atividades dentro de determinada peçonha ou grupo de peçonhas (como, por exemplo, a detecção de APM e DPP IV e a ausência de NEP 24.11 nas quatro peçonhas botrópicas estudadas) sugere que há realmente

uma regulação específica da biossíntese destas enzimas pela glândula. A presença de APM e DPP IV em peçonhas botrópicas está de acordo com o papel cardiovascular sugerido para estas enzimas em peçonhas ofídicas de modo geral [26], especialmente na hipotensão no caso de peçonhas botrópicas. A presença da DPP IV em especial em diversas peçonhas é notória e abrange as famílias Elapidae (elapídeos australianos, *Bungarus*, *Micrurus*, *Naja*, etc.), Crotalidae (principalmente *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Trimeresurus*) e Viperidae (víboras do Velho Mundo – *Atheris*, *Bitis*, *Daboia*, *Vipera*, etc.), sendo um dos motivos para a sugestão de que esta peptidase possui papel importante no envenenamento [26,27].

A regulação da atividade proteolítica das proteases e peptidases das peçonhas durante a estocagem na glândula venenífera é um aspecto importante na manutenção da integridade do epitélio glandular e na proteção contra a autólise dos componentes da peçonha [92,150]. Os reguladores destas atividades incluem baixo pH do lúmen glandular [92], íons metálicos [151,152], moléculas orgânicas como citrato [92,153], peptídeos de baixa massa molecular, especialmente tripeptídeos [88-92] e até proteínas como as cistatinas (12-13 kDa), inibidores de cisteína proteases (como catepsinas B, L, S e papaína) [154-156] e as bothrojaracinas [157,158], que inclui a bothroalternina [159], inibidores da família que lectinas do tipo C (~27 kDa, com subunidades de 13-15 kDa) inicialmente isolados da peçonha de *B. jararaca* mas presentes em várias peçonhas botrópicas e de *Lachesis* [160]; as bothrojaracinas inibem (pro)trombina endógena, e possivelmente também as enzimas tipo trombina de peçonhas botrópicas. Curiosamente, os BPPs de modo geral não inibem SVMPs de peçonhas ofídicas [92].

Esta diversidade de mecanismos de inibição levanta a possibilidade da existência de inibidores em peçonhas botrópicas capazes de inibirem a atividade das peptidases da peçonha e das peptidases endógenas. Usamos duas abordagens para avaliar estas possibilidades. Primeiro,

avaliamos a atividade das peptidases endógenas das peçonhas antes e depois da remoção da fração de baixa massa molecular, e após reconstituição com esta fração. Ao contrário do que esperávamos [um aumento na atividade devido à remoção de eventual(is) inibidor (es)], houve redução na atividade da APM em todas as peçonhas após remoção da fração de baixa massa molecular, enquanto que para a DPP IV, houve redução apenas para *B. alternatus* e *B. moojeni*, sem alteração para *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Estes achados sugerem que, em vez da existência de inibidores destas peptidases, as peçonhas aparentemente contêm componentes de baixa massa molecular que são essenciais para a atividade plenas destas enzimas. Com os dados disponíveis no momento, não é possível afirmar se estes ativadores são de natureza inorgânica (íons metálicos) [151], [152], ou orgânica (peptídeos). Entretanto, vale notar que as atividades da APM e DPP IV podem ser moduladas pela presença de metais bivalentes, como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  (ver revisões de Bauvoirs e Dauzonne [161] e Mentlein [162]).

A segunda abordagem usada para avaliar a presença de inibidores peptidásicos nas peçonhas foi avaliar a atividade das mesmas sobre a APM, DPP IV e NEP 24.11 de tecido renal de ratos. Tendo em vista o atual interesse em usar peptídeos de peçonhas para desenvolver novas moléculas de uso terapêutico [11,95-97] e tendo em vista que alguns estudos já demonstraram alterações em algumas atividades peptidásicas em tecido renal de camundongos envenenados com peçonha de *B. jararaca* [139,140], avaliamos o possível efeito das quatro peçonhas e suas frações cromatográficas sobre as atividades da AMP, DPP IV e NEP 24.11. Todas as peçonhas inibiram a atividade da APM e da NEP 24.11 de maneira dependente da concentração, sendo o efeito mais marcante para a NEP 24.11; já para DPP IV, ocorreu o inverso, ou seja, um aumento progressivo na atividade com concentrações maiores de peçonha. Este achado aponta para a presença de substância(s) com ação inibitória sobre as duas primeiras enzimas, mas estimulatória

sobre a última. Considerando que as peçonhas botrópicas são ricas em SVMPs com forte atividade proteolítica, a inibição da APM e da NEP 24.11 poderia ter sido causada pela ação proteolítica inespecífica da peçonha degradando as peptidases no tecido renal, de modo análogo à degradação proteolítica que estas peçonhas exercem sobre seus próprios componentes [92,150]. Entretanto, o fato de não termos observado inibição semelhante com a DPP IV argumenta contra esta hipótese.

Tendo em vista que tanto as SVMPs quanto a APM e NEP 24.11 são metaloenzimas, cuja atividade depende do  $Zn^{2+}$ , não foi possível usar quelantes deste metal (EDTA, o-fenantrolina) para inibir a atividade das SVMPs para avaliar se tal inibição reduziria a inativação da APM e NEP 24.11. Para contornar este problema, resolvemos fracionar as peçonhas inicialmente por gel filtração, que separa os componentes por massa molecular, e testar a atividade inibitória dos picos resultantes sobre as peptidases. A avaliação da atividade inibitória dos picos individuais contra as peptidases mostrou que apenas alguns deles de cada peçonha influenciaram estas enzimas, e que estes picos não necessariamente era os mesmos entre peçonhas. No caso da APM, apenas o pico II de *B. alternatus* afetou a atividade enzimática, houve ligeira redução de atividade com vários picos de *B. jararacussu*, marcada redução com alguns picos de *B. moojeni* e nenhum efeito dos picos de *B. jararaca*. O motivo da divergência entre a inibição progressiva da APM vista com as peçonhas brutas e a inibição variável e inconsistente vista com os picos não está claro, mas pode refletir em parte uma atividade sinérgica entre alguns componentes das peçonhas que, quando separados por fracionamento, não atuam sozinhos. A inibição mais consistente com aquela vista com a peçonha ocorreu com a NEP 24.11, cuja atividade foi amplamente inibida por vários picos das peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararaca* e *B. moojeni*, porém sem nenhum efeito dos picos de *B. jararacussu*. O caso extremo foi com a DPP IV onde apenas um dos picos das

peçonhas afetou esta enzima, aumentando sua atividade; este pico correspondia ao que também continha a atividade DPP IV da peçonha (embora esta atividade da peçonha tenha sido descontada durante o cálculo da atividade). Um aspecto digno de nota foi a diferença de sensibilidade entre peptidases. Por exemplo, os picos de *B. jararaca* não afetaram a atividade da APM e apenas um afetou a DPP IV, mas vários deles inibiram marcadamente a NEP 24.11.

Apesar da variabilidade vista entre a atividade inibitória dos picos das peçonhas e das diferentes sensibilidades das peptidases a esta inibição, no geral estes resultados indicam que as peçonhas botrópicas contêm substâncias capazes de modular a atividade destas peptidases. Novamente, parece pouco provável que esta atividade seja resultado de uma proteólise inespecífica uma vez que os picos cromatográficos que geralmente contêm as SVMPs destas peçonhas (picos II, III e IV, principalmente) não mostraram efeitos consistentes sobre as peptidases: às vezes inibiam determinada peptidase, às vezes não. Além disso, conforme demonstramos para *B. jararaca*, apesar dos picos PIII, PIV e PV terem atividade proteolítica, a inibição desta atividade com EDTA (em uma concentração sem efeito sobre NEP 24.11) não afetou a atividade inibitória destes picos sobre a NEP 24.11, indicando que a atividade proteolítica não era um fator importante nesta inibição.

Para focar melhor a investigação dada a grande variedade de picos com atividade contra a APM e NEP 24.11, optamos por estudar a ação do pico VI da *B. jararaca* sobre a NEP 24.11 por ser a mais ativa de todos sobre as peptidases, e também pelo fato de aparentemente ser específico para esta peptidase uma vez que não afeta a atividade APM ou DPP IV. A análise do perfil cromatográfico de exclusão molecular mostrou que o PVI é um ombro do PVII, o que explica por que o PVII também inibiu significativamente a NEP 24.11, com atividade semelhante ao PVI.

A análise eletroforética do pico PVI revelou a presença de vários componentes com massas moleculares entre 15 kDa e 35 kDa. Há diversos componentes de peçonhas botrópicas com massa molecular nesta faixa, incluindo SVMPs da classe PI (~20-28 kDa), PLA<sub>2</sub> diméricas (~28-30 kDa; monômeros de 14-15 kDa), lectinas com afinidade para açúcares (~28-30 kDa; monômeros de 14-15 kDa), bothrojaracinas (~28 kDa; monômeros de 13-15 kDa) e possivelmente cistatinas (12-13 kDa), entre outros. A análise enzimática mostrou que o pico PVI não tem atividade proteolítica sobre asocaseína e que também possui baixa atividade PLA<sub>2</sub> quando comparado com a peçonha, eliminando assim estas duas possibilidades como componentes deste pico. É pouco provável também que a inibição seja devido à atividade de uma lectina uma vez que, embora tenha ocorrido inibição da atividade da NEP 24.11 na presença da BjuL de *B. jararacussu*, a inibição observada com o pico PVI era muito mais potente e numa concentração muito menor que a da lectina. Por outro lado, a inibição da NEP 24.11 pelo pico PVI foi muito menos potente que aquela observada com a fosforamidon, inibidor específico amplamente usado para abolir a atividade desta enzima.

Através da cromatografia de troca iônica, foi possível separar o pico PVI em vários subpicos, independentemente da forma de eluição (gradiente linear ou escalonado – de degraus), que foram testados quanto à sua atividade inibitória. Esta etapa cromatográfica resultou em dois ou três picos com potente atividade inibitória sobre a NEP 24.11. A análise eletroforética mostrou que os picos mais ativos (PVI-5 e PVI-6, no caso da eluição com gradiente escalonado) tinham componentes na faixa de 30-35 kDa (componentes com massas semelhantes foram vistos nos picos ativos obtidos por eluição com gradiente linear; não mostrados). De modo semelhante àquilo que foi visto com o pico PVI, a inibição pelos picos PVI-5 a PVI-6 foi dependente da concentração testada. Ainda será necessária pelo menos mais uma etapa cromatográfica para

isolar a proteína responsável pela inibição observada nesta investigação. Com a proteína isolada, será possível estudar alguns aspectos cinéticos da sua atividade inibitória e também sequenciá-la para identificar sua estrutura.

A demonstração da presença de um potente inibidor da NEP 24.11 na peçonha de *B. jararaca* (e, por inferência, nas de *B. alternatus* e *B. moojeni* pelo perfil de inibição observado com estas) é bastante interessante e promissor devido à ampla variedade de atividades fisiológicas exercidas por esta peptidase em vertebrados, especialmente mamíferos. Estas atividades vão desde a metabolização de peptídeos vasoativos [163] e a modulação da dor até a modulação da resposta imune por ser a NEP 24.11 idêntica ao CD10, molécula de adesão em células inflamatórias. Do ponto de vista de desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas, devido à semelhança estrutural entre a NEP 24.11 e peptidases como a ECE (enzima conversora da endotelina) [164], e em grau menor, a ECA e APN, vários estudos têm investigado a possibilidade de produzir moléculas que inibem simultaneamente a NEP 24.11 e a ECA e ECE (os chamados ‘inibidores de vasopectidases’) [165-169], e também a combinação NEP 24.11/APN [170] (para revisão geral ver Macdonald [171]). Neste contexto, seria interessante testar o inibidor de *B. jararaca* na atividade ECA e eventualmente na ECE para ver se inibe estas peptidases também.

Por fim, a identificação estrutural do inibidor descrito aqui será de extrema importância pois permitirá avaliar a possível existência de inibidores endógenos da NEP 24.11 (baseado em análises estruturais) uma vez que até o momento os únicos inibidores endógenos conhecidos desta peptidase são a (1) sialorfina, um peptídeo produzido pela glândula salivar e próstata de ratos e cuja produção aumenta em situações de estresse [172], (2) a opiorfina, um peptapeptídeo identificado em saliva humana [173], mas que também ocorre no sistema reprodutor masculino e

glândulas mamárias e lacrimais [174], e (3) a spinorfina, um heptapeptídeo identificado na medula espinhal bovino [175,176]. Todos estes peptídeos inibem a atividade da NEP 24.11 e abolem a capacidade da enzima de degradar encefalinas, sendo, portanto, peptídeos altamente analgésicos, com eficácia semelhante à da morfina [177].

## 6. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados desta investigação, concluímos que:

1. As peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* contêm APM e DPP IV ativas de alta massa molecular, mas estão destituídas de NEP 24.11.
2. Estas peçonhas também possuem componentes de baixa massa molecular que são necessários para a atividade plena da APM e DPP IV.
3. Quando testadas sobre atividades peptidásicas em tecido renal, as peçonhas causam inibição (APM, NEP 24.11) ou estimulação (DPP IV), que pode ser atribuídas à fração PI, com respostas que variam entre peçonhas e peptidases.
4. A peçonha de *B. jararaca* contém um potente inibidor da NEP 24.11 de massa molecular elevada (>15 kDa, pico VI-5), mas que aparentemente não está associada a SVMPs, PLA<sub>2</sub> ou lectina da peçonha.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Reid IA. Peptídeos vasoativos. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (orgs). *Farmacologia Básica e Clínica*. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre:AMGH. 2013; pp. 295-312.
2. Linard A. Atividades e expressão de peptidases em ratos tratados cronicamente com L-NAME, um inibidor de biossíntese de óxido nítrico, e em ratos espontaneamente hipertensos. Campinas. Tese [Doutorado em Farmacologia], Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2004.
3. Santos RA, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008; 93:519-527.
4. Aozuka Y, Koizumi K, Saitoh Y, Ueda Y, Sakurai H, Saiki I. Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer Lett* 2004; 216:35-42.
5. Saitoh Y, Koizumi K, Minami T, Sekine K, Sakurai H, Saiki I. A derivative of aminopeptidase inhibitor (BE15) has a dual inhibitory effect of invasion and motility on tumor and endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29:709-712.
6. Albiston AL, Ye S, Chai SY. Membrane-bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. *Protein Pept Lett* 2004; 11:491-500.
7. Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocr Rev* 2002; 23:647-664.
8. Lisy O, Jougasaki M, Schirger JA, Chen HH, Barclay PT, Burnett JC. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the natriuretic actions of adrenomedullin. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 275:F410-F414.
9. Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Murphy MP, Klein RL, Hersh LB. Circulating neprilysin clears brain amyloid. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45:101-107.
10. Mentlein R. Cell surface peptidases. *Rev Cytol* 2004; 235:165-213.

11. Vink S, Jin AH, Poth KJ, Head GA, Alewood PF. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. *Toxicon* 2012; 59:434-445.
12. Shah Z, Pineda C, Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Racoma I, Deuliis J, Xu X, Sun Q, Bruce SM, Villamena F, Rajagopalan S. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vasc Pharmacol* 2011; 55:2-9.
13. Puschel G, Mentlein R, Heymann E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 1982; 126:359-365.
14. Engel M, Hoffmann T, Wagner L, Wermann M, Heiser U, Kiefersauer R, Brandstetter H. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:5063-5068.
15. Singh AK. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: novel mechanism of actions. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18:753-759.
16. Stengel A, Goebel-Stengelb M, Teuffela P, Hofmanna T, Bubea P, Kobelta P, Rosea M, Klappa BF. Obese patients have higher circulating protein levels of dipeptidylpeptidase IV. *Peptides* 2014; 61:75-82.
17. Tu AT, Chua A, James GP. Peptidase activities of snake venoms. *Comp Biochem Physiol* 1965; 15:517-523.
18. Tu AT, Toom PM. The presence of a L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide hydrolyzing enzyme in snake venoms. *Experientia* 1967; 23:439-440.
19. Tu AT, Toom PM. Hydrolysis of peptides by snake venoms of Australia and New Guinea. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1967; 45:561-567.
20. Tu AT, Toom PM. Hydrolysis of peptides by Crotalidae and Viperidae venoms. *Toxicon* 1968; 5:201-205.
21. Aird SD, Silva NJ Jr. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol B* 1991; 99:287-294.

22. Boumrah D, Suckling CJ, Dufton MJ. Characteristics of the peptidase activity contained in Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Toxicon* 1993; 31:1293-1303.
23. Faiz MA, Falkous G, Harris JB, Mantle D. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. *Comp Biochem Physiol* 1996; 113B:199-204.
24. Anderson L, Bussler B, Martins H, Dufton M. Enkephalin-processing oligopeptidases in cobra venom: inhibition by thiorphan and bestatin reveals co-operative actions. *Toxicon* 1998; 36:719-728.
25. Gasparello-Clemente E, Silveira PF. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. *Toxicon* 2002; 40:1617-1626.
26. Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 2002; 40:335-393.
27. Aird, SD. Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. *Comp Biochem and Physiol Part B: Biochem Mol Bio* 2005; 140:109-126.
28. Porto BN, Telli CA, Dutra TP, Alves LS, Bozza MT, Fin CA, Thiesen FV, Renner MF. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 2007; 50:270-277.
29. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami Y, Yanoshita R. Exosome-like vesicles in *Gloydius blomhoffii blomhoffii* venom. *Toxicon* 2008; 51:984-993.
30. St. Pierre L, Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Gorman JJ, de Jersey J, Masci PP, Lavin MF. Diversity of toxic components from the venom of the evolutionarily distinct black whip snake, *Demansia vestigiata*. *J Proteome Res* 2007; 6:3093-3107.
31. Casewell NR, Harrison RA, Wüster W, Wagstaff SC. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics* 2009; 10:564-576.

32. Ogawa Y, Mamura Y, Murayama N, Yanoshita R. Characterization and cDNA cloning of dipeptidyl peptidase IV from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2006; 145:35-42.
33. Ogawa Y, Murayama N, Fujita Y, Yanoshita R. Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. *Toxicon* 2007; 49:1172-1181.
34. Vaiyapuri S, Wagstaff SC, Watson KA, Harrison RA, Gibbins JM, Hutchinson EG. Purification and functional characterisation of rhiminopeptidase A, a novel aminopeptidase from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e796.
35. Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 2002; 299:279-291.
36. Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, Faria M Jr, Xavier MA, Fontes MR, Giglio JR, França SC. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I – gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochimie* 2004; 86:211-219.
37. Cidade DA, Simão TA, Dávila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Bon C, Zingali RB, Albano RM. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 2006; 48:437-461.
38. Neiva M, Arraes FB, de Souza JV, Rádis-Baptista G, Prieto da Silva AR, Walter ME, Brigido Mde M, Yamane T, López-Lozano JL, Astolfi-Filho S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* 2009; 53:427-436.
39. Cardoso KC, Da Silva MJ, Costa GG, Torres TT, Del Bem LE, Vidal RO, Menossi M, Hyslop S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics* 2010; 11:605-627.

40. Durban J, Juárez P, Angulo Y, Lomonte B, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Sasa M, Sanz L, Gutiérrez JM, Dopazo J, Conesa A, Calvete JJ. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 2011; 12:259-275.
41. de Paula FF, Ribeiro JU, Santos LM, de Souza DH, Leonardecz E, Henrique-Silva F, Selistre-de-Araújo HS. Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2014; 12:74-83.
42. Suntravat M, Uzcategui NL, Atphaisit C, Helmke TJ, Lucena SE, Sánchez EE, Acosta AR. Gene expression profiling of the venom gland from the Venezuelan mapanare (*Bothrops colombiensis*) using expressed sequence tags (ESTs). *BMC Mol Biol* 2016; 17:7-25.
43. Guércio RA, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CA. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci* 2006; 4:11-25.
44. Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Angulo Y, Rucavado A, Warrell DA, Calvete JJ. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res* 2008; 7:4396-4408.
45. Tashima AK, Sanz L, Camargo AC, Serrano SM, Calvete JJ. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *J Proteomics* 2008; 71:473-485.
46. Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Díez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J, Sanz L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics* 2009; 72:227-240.

47. Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, Calvete JJ. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon* 2009; 54:938-948.
48. Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics* 2009; 73:57-78.
49. Valente RH, Guimarães PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AG, Soares MR, Chapeaurouge A, Trugilho MR, León IR, Rocha SL, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Dutra DL, Leão LI, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Zingali RB, Perales J, Domont GB. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *J Proteomics* 2009; 72:241-455.
50. Öhler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, Betzel C. The venomomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *J Proteome Res* 2010; 9:2422-2437.
51. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis HM, Mourão RH, Furtado MF, Moura-Da-Silva AM. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics* 2011; 74:510-527.
52. Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *J Proteomics* 2012; 75:2181-2195.
53. Mora-Obando D, Guerrero-Vargas JA, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, Gutiérrez JM, Ayerbe S, Lomonte B. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *J Proteomics* 2014; 96:159-172.

54. Gay C, Sanz L, Calvete JJ, Pla D. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. *Toxins (Basel)* 2015; 8:9-22.
55. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000; 82:841-850.
56. Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005; 45:969-985.
57. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005; 45:997-1011.
58. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez, JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* 2011; 74:1781-1794.
59. Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 2005; 45:1115-1132.
60. Serrano SM. The long road of research on snake venom serine proteases. *Toxicon* 2013; 62:19-26.
61. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42:915-931.
62. Kuniyoshi AK, Rocha M, Cajado Carvalho D, Juliano MA, Juliano Neto L, Tambourgi DV, Portaro FC. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* 2012; 59:124-131.
63. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949; 156:261-273.

64. Santos EP, Resende ES, Portella da Silveira PV, Fagundes DJ. Efeitos do soro antibotrópico nas alterações hemodinâmicas induzidas em cães pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Acta Cir Bras 2000; 15:1. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>.
65. Rabelo RC, Melo MM, Silva-Júnior PG, Lúcia M. Avaliação das pressões venosa e arterial em cães submetidos a diferentes tipos de hipotensão. Arq Bras Med Vet Zootec 2005; 57:741-748.
66. Evangelista IL, Martins AMC, Nascimento NRF, Havt A, Evangelista JAM, Norões TBS, Toyama MH, Diz-Filho EB, Toyama DO, Fonteles MC, Monteiro HSA. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A<sub>2</sub>. Toxicon 2010; 55:1061-1070.
67. Dias L, Rodrigues MA, Smaal A, Rennó AL, Mello SM, Moreno H Jr, Hyslop S. Cardiovascular responses to *Bothrops alternatus* (urutu) snake venom in anesthetized dogs. Cardiovasc Toxicol 2012; 12:243-257.
68. Lee CY, Lee SY. Cardiovascular effects of snake venoms. In: Lee CY (Ed.), Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 52. Berlin: Springer. 1979; pp. 547-590.
69. Rothschild AM, Rothschild MZ. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee CY (Ed.), Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 52. Berlin: Springer. 1979; pp. 591-628.
70. Zaganelli GL, Zaganelli MGM, Magalhães A, Diniz CR, de Lima ME. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). Toxicon 1996; 34:807-819.
71. Serrano SMT, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CAM, Camargo ACM, Fink E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. Eur J Biochem 1998; 251:845-853.

72. Sant'Ana CD, Bernardes CP, Izidoro LF, Mazzi MV, Soares SG, Fuly AL, Zingali RB, Magro AJ, Braz AS, Fontes MR, Stábeli RG, Sampaio SV, Soares AM. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 2008; 90:500-507.
73. Okamoto DN, Kondo MY, Oliveira LCG, Honorato RV, Zanphorlin LM, Coronado MA, Araújo MS, da Motta G, Veronez CL, Andrade SS, Oliveira PSL, Arni RK, Cintra ACE, Sampaio SV, Juliano MA, Juliano L, Murakami MT, Gouvea IE. P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom is a post-proline cleaving peptidase with kininogenase activity: insights into substrate selectivity and kinetic behavior. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1844:545-552.
74. Nirthanan S, Gwee MC. Three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharmacol Sci* 2004; 94:1-17.
75. Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 2010; 56:855-867.
76. Utkin YN. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom – milestones of discovery. *Toxicon* 2013; 62:50-55.
77. Mebs D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther* 1990; 48:223-236.
78. Bonilla CA. Rapid isolation of basic proteins and polypeptides from salivary gland secretions by adsorption chromatography on polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 1969; 32:522-529.
79. Bonilla CA. Hypotensin – a hypotensive peptide isolated from *Crotalus atrox* venom: purification, amino acid composition and terminal amino acid residues. *FEBS Lett* 1976; 68:297-302.

80. Bonilla CA, Fiero MK. Comparative biochemistry and pharmacology of salivary gland secretions. II. Chromatographic separation of the basic proteins from some North American rattlesnake venoms. *Chem Biol Interact* 1971; 4:1-10.
81. Takasaki C, Tamiya N, Bdolah A, Wollberg Z, Kochva E. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon* 1988; 26:543-548.
82. Wollberg Z, Shabo-Shina R, Intrator N, Bdolah A, Kochva E, Shavit G, Oron Y, Vidne BA, Gitter S. A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations. *Toxicon* 1988; 26:525-534.
83. Ducancel F. Endothelin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2828-2839.
84. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267:13928-13932.
85. Weinstein SA, Schmidt JJ, Berheimer AW, Smith LA. Characterization and amino-acid sequences of two lethal peptides isolated from venom of Wagler's viper, *Trimeresurus wagleri*. *Toxicon* 1991; 29:227-236.
86. Schmidt JJ, Weinstein SA, Smith LA. Molecular properties and structure function relationships of lethal peptides from venom of Wagler's pit viper, *Trimeresurus wagleri*. *Toxicon* 1992; 30:1027-1036.
87. Lin WW, Smith LA, Lee CY. A study of the cause of death due to waglerin-I, a toxin from *Trimeresurus wagleri*. *Toxicon* 1995; 33:111-114.
88. Robeva A, Politi V, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50:769-773.
89. Francis B, Kaiser II. Inhibition of metalloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. *Toxicon* 1993; 31:889-899.

90. Huang KF, Hung CC, Wu SH, Chiou SH. Characterization of three endogenous peptide inhibitors for multiple metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:562-568.
91. Munekiyo SM, Mackessy SP. Presence of peptide inhibitors in rattlesnake venoms and their effects on endogenous metalloproteases. *Toxicon* 2005; 45:255-263.
92. Marques-Porto R, Lebrun I, Pimenta DC. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: the metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 147:424-433.
93. Favreau P, Cheneval O, Menin L, Michalet S, Gaertner H, Principaud F, Thai R, Ménez A, Bulet P, Stocklin R. The venom of the snake genus *Atheris* contains a new class of peptides with clusters of histidine and glycine residues. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21:406-412.
94. Tashima AK, Zelanis A, Kitano ES, Ianzer D, Melo RL, Rioli V, Sant'Anna SS, Schenberg ACG, Camargo ACM, Serrano SMT. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11:1245-1262.
95. Hodgson WC, Isbister GK. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:173-176.
96. Camargo AC, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SM. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon* 2012; 59:516-523.
97. Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. *Toxicon* 2012; 59:497-506.
98. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol* 1965; 24:163-169.

99. Amorim DS, Manço, JC, Ferreira SH, Tanaka A, Cardoso SS. Hemodynamic effects of bradykinin potentiated by a factor contained in the *Bothrops jararaca* venom. Comparative results with eleodoisin. *Acta Physiol Lat Am* 1967; 17:258-266.
100. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 1970; 9:2583-2593.
101. Green LJ, Camargo AC, Krieger EM, Stewart JM, Ferreira SH. Inhibition of the conversion of angiotensin I to II and potentiation of bradykinin by small peptides present in *Bothrops jararaca* venom. *Circ Res* 1972; 31(Suppl 2):62-71.
102. Ferreira SH. History of the development of inhibitors of angiotensin I conversion. *Drugs* 1985; 30 Suppl 1:1-5.
103. Ferreira SH. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27:1693-1698.
104. Ferreira SH. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. *Semin Perinatol* 2000; 24:7-10.
105. Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER., Kocy O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry* 1971; 10:4033-4039.
106. Cintra ACO, Vieira CA, Giglio JR. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. *J Prot Chem* 1990; 9:221-227.
107. Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MBC, Prezoto BC, Andreoni ASS, Zelnik R, Habermehl G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). *Toxicon* 1992; 30:33-40.
108. Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T, de Camargo AC. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops*

- jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:1189-1193.
109. Hayashi MA, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FCV, Prezoto BC, Fernandes BL, Silveira PF, Silva CA, Britto LRC, Dive V, Camargo ACM. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. J. Neurochem 2003; 85:969-977.
  110. Ianzer D, Konno K, Marques PR, Portaro FCV, Stöcklin R, Camargo ACM, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. Peptides 2004; 25:1085-1092.
  111. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. J Proteome Res 2010; 9:2278-2291.
  112. Kato H, Suzuki T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them potentiators B and C. Biochemistry 1971; 10:972-980.
  113. Kato H, Suzuki T, Okada K, Kimura T, Sakakibara S. Structure of potentiator A, one of the five bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Experientia 1973; 29:574-575.
  114. Chi CW, Wang SZ, Xu LG, Wang MY, Lo SS, Huang WD. Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys pallas*). Peptides 1985; 6:339-342.
  115. Ferreira LAF, Mollring T, Lebrun ZFLAS, Raida M, Znottko R, Habermehl GG. Structure and effects of a kinin potentiating fraction F (AppF) isolated from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. Toxicon 1995; 33:1313-1319.

116. Yanoshita R, Kasuga A, Inoue S, Ikeda K, Samejima Y. Blomhotin: a novel peptide with smooth muscle contractile activity identified in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Toxicon* 1999; 37:1761-1770.
117. Murayama N, Michel GH, Yanoshita R, Samejima Y, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, Higuchi S. cDNA cloning of bradykinin potentiating peptides-C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffii*. *Eur J Biochem* 2000; 267:4075-4080.
118. Politi V, De Luca G, Di Stazio G, Schinina E, Bossa F. A new peptide from *Crotalus atrox* snake venom. *Peptides (Suppl)* 1985; 3:343-346.
119. Wermelinger LS, Dutra DLS, Oliveira-Carvalho AL, Soares MR, Bloch Jr C, Zingali RB. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19:1703-1708.
120. Higuchi S, Murayama N, Saguchi KI, Ohi H, Fujita Y, Silva NJ, Aird SD. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem and Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; 144:107-121.
121. Gomes CL, Konno K, Conceição IC, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Rádis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Camargo AC, Hayashi MA. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:1350-1360.
122. Coutinho-Neto A, Caldeira CAS, Souza GHMF, Zaqueo KD, Kayano AM, Silva RS, Zuliani JP, Soares AM, Stabeli RG, Calderon LA. ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a Hybrid Qq-oeTOF mass spectrometer. *Toxins* 2013; 5:327-335.
123. Lopes DM, Junior NEG, Costa PPC, Martins PL, Santos CF, Carvalho EDF, Carvalho MDF, Pimenta DC, Cardi BA, Fonteles MC, Nascimento NRF, Carvalho KM. A new

- structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom (South American rattlesnake). *Toxicon* 2014; 90:36-44.
124. Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Zingali RB, Ho PL. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon* 2005; 46:31-38.
125. Higuchi S, Murayama N, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Ogawa T, Deshimaru M, Ohno M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. *Immunopharmacology* 1999; 44:129-135.
126. Komori Y, Sugihara H. Characterization of a new inhibitor for angiotensin converting enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis*. *Int J Biochem* 1990; 22:767-771.
127. Menin L, Perchuć A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, Wilmer M, Stöcklin R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* 2008; 51:1288-1302.
128. Morais KL, Ianzer D, Miranda JR, Melo RL, Guerreiro JR, Santos RA, Ulrich H, Lameu C. Proline rich-oligopeptides: diverse mechanisms for antihypertensive action. *Peptides* 2013; 48:124-133.
129. Paschoal JF, Yamaguchi J, Miranda JR, Carretero G, Melo RL, Santos RA, Xavier CH, Schreier S, Camargo AC, Ianzer D. Insights into cardiovascular effects of proline-rich oligopeptide (Bj-PRO-10c) revealed by structure-activity analyses: dissociation of antihypertensive and bradycardic effects. *Amino Acids* 2014; 46:401-413.
130. Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Lebrun I, Serrano SM, Camargo AC. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J Biol Chem* 2009; 284:20022-20033.
131. Lameu C, Pontieri V, Guerreiro JR, Oliveira EF, da Silva CA, Giglio JM, Melo RL, Campos RR, de Camargo AC, Ulrich H. Brain nitric oxide production by a proline-rich

- decapeptide from *Bothrops jararaca* venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2010; 33:1283-1288.
132. Ianzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, Mendes EP, Camargo AC, Santos RA. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2011; 5:281-295.
133. Morais KL, Hayashi MA, Bruni FM, Lopes-Ferreira M, Camargo AC, Ulrich H, Lameu C. Bj-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B<sub>2</sub> and M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 2011; 81:736-742.
134. Negraes PD, Lameu C, Hayashi MA, Melo RL, Camargo AC, Ulrich H. The snake venom peptide Bj-PRO-7a is a M1 muscarinic acetylcholine receptor agonist. *Cytometry A* 2011; 79:77-83.
135. Lameu C, Hayashi MA, Guerreiro JR, Oliveira EF, Lebrun I, Pontieri V, Morais KL, Camargo AC, Ulrich H. The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom. *Cytometry A* 2010; 7:220-230.
136. Nery AA, Trujillo CA, Lameu C, Konno K, Oliveira V, Camargo AC, Ulrich H, Hayashi MA. A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides – reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *Peptides* 2008; 29:1708-1715.
137. Martins NM, Ferreira DAS, Carvalho Rodrigues MA, Cintra AC, Santos NA, Sampaio SV, Santos AC. Low-molecular-mass peptides from the venom of the Amazonian viper *Bothrops atrox* protect against brain mitochondrial swelling in rat: potential for neuroprotection. *Toxicon* 2010; 56:86-92.
138. Martins NM, Santos NA, Sartim MA, Cintra AC, Sampaio SV, Santos A. A tripeptide isolated from *Bothrops atrox* venom has neuroprotective and neurotrophic effects on a cellular model of Parkinson's disease. *Chem Biol Interact* 2015; 235:10-16.

139. Barone JM, Alponi RF, Frezzatti R, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. *Toxicon* 2011; 57:148-156.
140. Barone JM, Frezzatti R, Silveira PF. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. *Toxicon* 2014; 79:1-10.
141. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
142. Blackmon D, Watson AJM, Montrose M. Assay of apical membrane enzymes based on fluorogenic substrates. *Anal Biochem* 1992; 200:352-358.
143. Imai K, Hama T, Kato T. Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem* 1983; 93:431-437.
144. Florentin D, Sassi A, Roques BP. A highly sensitive fluorometric assay for “enkephalinase”, a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins. *Anal Biochem* 1984; 141:62-69.
145. Prince JA. A colorimetric assay for measuring phospholipase A<sub>2</sub> degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. *Biochem Biophys Methods* 2007; 70:441-444.
146. Chowdhury MAR, Miyoshi SC, Shinoda S. Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. *Infect Immun* 1990; 58:4159-4162.
147. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
148. Kochva E. Oral glands of the Reptilia. In: Gans C, Gans KA (Eds.), *The Biology of the Reptilia*, Vol. 8. Physiology. London:Academic Press. 1978; pp. 43-161.
149. Kochva E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 1987; 25:65-106.

150. Sousa JR, Monteiro RQ, Castro HC, Zingali RB. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon* 2001; 39:787-792.
151. Friederich C, Tu AT. Role of metals in snake venoms for haemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Biochem Pharmacol* 1971; 20:1549-1556.
152. Bieber AL. Metal and non-protein constituents in snake venoms. In: Lee CY (Ed.), *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 52*. Berlin:Springer. 1979; pp. 295-206.
153. Francis B, Seebart C, Kaiser II. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* 1992; 30:1239-1246.
154. Evans HJ, Barrett AJ. A cystatin-like cysteine proteinase inhibitor from venom of the African puff adder (*Bitis arietans*). *Biochem J* 1987; 246:795-797.
155. Brillard-Bourdet M, Nguyễn V, Ferrer-di Martino M, Gauthier F, Moreau T. Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Biochem J* 1998; 331:239-244.
156. Richards R, St Pierre L, Trabi M, Johnson LA, de Jersey J, Masci PP, Lavin MF. Cloning and characterisation of novel cystatins from elapid snake venom glands. *Biochimie* 2011; 93:659-668.
157. Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin MC, Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 1993; 32:10794-10802.
158. Zingali RB, Ferreira MS, Assafim M, Frattani FS, Monteiro RQ. Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005; 34:160-163.
159. Castro HC, Dutra DL, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998; 36:1903-1912.

160. Castro HC, Fernandes M, Zingali RB. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon* 1999; 37:1403-1416.
161. Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 2006; 26:88-130.
162. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999; 85:9-24.
163. Fielitz J, Dendorfer A, Pregla R, Ehler E, Zurbrugg HR, Bartunek J, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Neutral endopeptidase is activated in cardiomyocytes in human aortic valve stenosis and heart failure. *Circulation* 2002; 105:286-289.
164. Bur D, Dale GE, Oefner C. A three-dimensional model of endothelin-converting enzyme (ECE) based on the X-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (NEP). *Protein Eng* 2001; 14:337-341.
165. Trapani AJ, De Lombaert S, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Chou M, Jeng AY. CGS 34043: a non-peptidic, potent and long-acting dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* 2000; 67:1025-1033.
166. Trapani AJ, Beil ME, Bruseo CW, Fink CA, Hoyer D, Savage P, Jeng AY. Effects of the ECE/NEP inhibitor CGS 34225 on the big ET-1-induced pressor response and plasma atrial natriuretic peptide concentration in conscious rats. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103(Suppl 48):102S-106S.
167. Jeng AY, Savage P, Beil ME, Bruseo CW, Hoyer D, Fink CA, Trapani AJ. CGS 34226, a thiol-based dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103(Suppl 48):98S-101S.
168. Rossi GP. Dual ACE and NEP inhibitors: a review of the pharmacological properties of MDL 100240. *Cardiovasc Drug Rev* 2003; 21:51-66.
169. Birner C, Ulucan C, Bratfisch M, Götz T, Dietl A, Schweda F, Riegger GA, Luchner A. Antihypertrophic effects of combined inhibition of the renin-angiotensin system (RAS) and

- neutral endopeptidase (NEP) in progressive, tachycardia-induced experimental heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012; 385:1117-1125.
170. Poras H, Bonnard E, Dangé E, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. New orally active dual enkephalinase inhibitors (DENKIs) for central and peripheral pain treatment. *J Med Chem* 2014; 57:5748-5763.
171. Macdonald PS. Combined angiotensin receptor/neprilysin inhibitors: a review of the new paradigm in the management of chronic heart failure. *Clin Ther* 2015; 37:2199-2205.
172. Rougeot C, Messaoudi M, Hermitte V, Rigault AG, Blisnick T, Dugave C, Desor D, Rougeon F. Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8549-8554.
173. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdj A, Marcel A, Ungeheuer MN, Rougeot C. Human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:17979-17984.
174. Dufour E, Villard-Saussine S, Mellon V, Leandri R, Jouannet P, Ungeheuer MN and Rougeot C. Opiorphin secretion pattern in healthy volunteers: gender difference and organ specificity. *Biochem Anal Biochem* 2013; 2:136.
175. Nishimura K, Hazato T. Spinorphin, a new inhibitor of enkephalin-degrading enzymes derived from the bovine spinal cord. *Masui* 1993; 42:1497-1503.
176. Nishimura K, Hazato T. Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:713-719.
177. Mizerska-Dudka M, Kandefers-Szerszeń M. Opioids, neutral endopeptidase, its inhibitors and cancer: is there a relationship among them? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015; 63:197-205.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

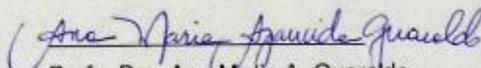
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

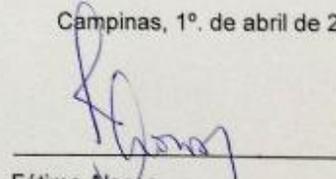
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES PEPTIDÁSICOS EM PEÇONHA BOTRÓPICA" (protocolo nº 3044-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Stephen Hyslop / Priscila Cordeiro Lima Fernandes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 1º. de abril de 2013.

Campinas, 1º. de abril de 2013.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva