

Alexandre Kazuo Kuniyoshi

**Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan:
obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de
interesse do veneno de *Bothrops jararaca***

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

São Paulo
2017

Alexandre Kazuo Kuniyoshi

**Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan:
obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de
interesse do veneno de *Bothrops jararaca***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra Fernanda Calheta
Vieira Portaro

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kuniyoshi, Alexandre Kazuo
Eficácia do soro antiostróptico produzido no
Instituto Butantan: obtenção, caracterização e
neutralização de serinopeptidases de interesse do
veneno de *Bothrops jararaca* / Alexandre Kazuo
Kuniyoshi; orientadora Fernanda Calheta Vieira
Portaro. -- São Paulo, 2017.
81 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Bothrops jararaca*. 2. Soro antiostróptico. 3.
Peptidases. 4. Peptídeos Bioativos. I. Portaro,
Fernanda Calheta Vieira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Alexandre Kazuo Kuniyoshi

Título da Tese: Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de interesse do veneno de *Bothrops jararacai*.

Orientador(a): Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

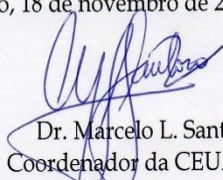
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de interesse do veneno de *Bothrops jararaca*", protocolo nº 1161/13, sob a responsabilidade de Fernanda Calheta Vieira Portaro e Alexandre Kazuo Kuniyoshi - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/13/2013.

This is to certify that the proposal "Efficacy of antithropic serum produced at Instituto Butantan: purification, characterization and neutralization serinopeptidases interest of *Bothrops jararaca*", protocol nº 1161/13, under the responsibility of Fernanda Calheta Vieira Portaro and Alexandre Kazuo Kuniyoshi, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/13/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
02/2014 - 12/2015 Laboratório de Imunoquímica	30 camundongos Balb/c 18-22g (M); 30 camundongos C57BL/6 18-22g (M)

São Paulo, 18 de novembro de 2013


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedicatória

À mulher da minha vida Nadia Yuri Suzuki que me faz viver.

Aos meus pais Luiz Antonio Kuniyoshi e Emília Shizue Shudo Kuniyoshi que me deram o mundo.

A toda a minha família porque sem eles nada vale a pena.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro pelas instruções, conversas, conselhos, oportunidades e amizade.

Aos meus amigos Daniela Cajado Carvalho, Roberto Kodama, Bruno Duzzi e Cristiane Castilho pela felicidade em trabalhar todos os dias.

Ao Dr. Wilmar Dias da Silva pelos ensinamentos em Imunologia

Aos colegas Ms Felipe Gidolin e Ms Angela Amadeu Megale pelo suporte nos ensaios imunoquímicos.

Ào Dr Leo Kei Iwai, Dr Eduardo Kitano e Ismael Lima pela colaboração nas análises de espectrometria de massas.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Imunoquímica que sem eles não teria condições para desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan e seus funcionários.

Agradecimento à agência de fomento

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro no projeto 2013/15344-7.

“Decisions are made by those who show up”

(Aaron Sorkin, *The West Wing*, 2002)

Resumo

KUNIYOSHI, A. K. Eficácia do soro antitoxinante produzido no Instituto Butantan: obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de interesse do veneno de *Bothrops jararaca*. 2017. 81 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O envenenamento ofídico representa uma questão de saúde pública para vários países do mundo e é considerada uma condição tropical negligenciada pela OMS. No Brasil, o gênero *Bothrops* é considerado o mais importante nos casos de envenenamento ofídico e, considerando que as enzimas proteolíticas das classes das metalopeptidases e das serinopeptidases são as principais toxinas do veneno da *B. jararaca*, este trabalho focou nesses componentes. Primeiramente, a fim de contribuir para o melhor entendimento da ação deste veneno, estudamos a atividade do veneno total sobre um conjunto de peptídeos biologicamente ativos (neuropeptídeo Y, peptídeo YY, polipeptídeo pancreático, somatostatina, substância P, cadeia B da insulina, Met-enkefalina e Leu-enkefalina) que podem estar relacionadas com sintomas do envenenamento. Observamos que a hidrólise dos peptídeos que foram substratos para a classe das serinopeptidases não era eficientemente bloqueada pelo soro antitoxinante do Instituto Butantan, fato já evidenciado pelo nosso grupo anteriormente. Portanto, as causas dessas falhas foram investigadas no presente trabalho. Inicialmente, purificamos quatro serinopeptidases que não foram eficientemente bloqueadas pelo soro antitoxinante produzido pelo Instituto Butantan. Avaliamos por estudos imunológicos com o soro comercial que, apesar de não bloquear as atividades, o mesmo é capaz de reconhecer as serinopeptidases purificadas. Assim, pudemos concluir que as serinopeptidases são imunogênicas e que as IgGs presentes no soro antitoxinante apresentam alta avididade. Deste modo, descartamos a falta de imunogenicidade das serinopeptidases como possível explicação para a falha de bloqueio apresentada pelo soro antitoxinante. Portanto, decidimos por obter soros experimentais específicos contra estas moléculas, utilizando duas linhagens de camundongos para melhor compreendermos o quanto o protocolo de imunização e/ou outros componentes do veneno da *B. jararaca* poderiam estar influenciando a produção de IgGs com maior afinidade ou avididade contra estas serinopeptidases e compará-las com as IgGs existentes no produto comercial. Os soros policlonais específicos obtidos contra as serinopeptidases não neutralizadas mostraram capacidade de reconhecimento e alta afinidade contra estas enzimas, e mais importante, que são capazes de neutralizar suas atividades *in vitro*.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*. Soro antitoxinante. Serinopeptidases. Peptídeos biologicamente ativos.

Abstract

KUNIYOSHI, A. K. Efficacy of the antiothropic serum produced by Butantan Institute: obtaining, characterizing and neutralizing serinepeptidases of interest from the *Bothrops jararaca* venom. 2017. 81 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Snakebite represents a public health issue for many tropical countries in the world and is considered a neglected tropical condition by WHO. In Brazil, the *Bothrops* genus is considered the most important involved in accidents with humans and, considering that proteolytic enzymes from metallopeptidases and serine peptidases families are the main toxins in the *B. jararaca* venom, this work has focused on them. Firstly, in order to better understand the action of this venom, we have studied the venom activity over bioactive peptides (neuropeptide Y, peptide YY, pancreatic polypeptide, somatostatin, substance P, insulin B chain, Met-enkephalin and Leu-enkephalin) that could be related to the envenomation symptoms. We observed that the hydrolysis of the peptides substrate for serinepeptidases was not efficiently blocked by the Butantan commercial antivenom, and this fact was already previously described by our group. Therefore, the causes of this flaw were investigated in this work. Initially, after we purified four serinepeptidases that are not blocked by the antiothropic serum, we observed by immunochemistry assays that the commercial antivenom is able to recognize these serinepeptidases. Thus, we concluded that this serinepeptidases are immunogenic and therefore, we discarded this possibility to explain the lack of neutralization by the commercial antivenom. Hence, we decided to raise specific experimental sera against these molecules, using two lineages of mice to better understand the immunization protocol influence and/or the presence of other components of the *Bothrops jararaca* venom over the avidity of the obtained IgGs in comparison with the commercial product. Both experimental sera obtained against these serinepeptidases - not neutralized by the commercial antivenom - recognized these enzymes and even more importantly, they were capable of neutralizing their activities *in vitro*.

Keyword: *Bothrops jararaca*. Bothropic antivenom. Serine proteases. Biologically active peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de imunização e sangria dos camundongos imunizados com o <i>pool</i> de serinopeptidases do VBJ (SVSPpool).....	31
Figura 2 - Perfil cromatográfico em C18-HPLC da hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos pelo VBJ.....	35
Figura 3 - Ensaio de inibição com o EDTA e o PMSF na hidrólise dos peptídeos bioativos pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	36
Figura 4 - Perfil cromatográfico dos fragmentos coletados após a hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos pelo VBJ.....	38
Figura 5 - Pontos de clivagem dos substratos peptídicos determinados através da espectrometria de massas.....	40
Figura 6 - Ensaio de soroneutralização do veneno total de <i>Bothrops jararaca</i> sobre os peptídeos biologicamente ativos utilizando o soro antitoxinico do Instituto Butantan.....	41
Figura 7 - Perfil cromatográfico de 250 µL de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (23 mg/mL) em coluna Shim-Pack DEAE de troca aniônica para HPLC.....	42
Figura 8 - Ensaio de inibição enzimática de F20 pelo SAB.....	43
Figura 9 - Perfil cromatográfico em C8-HPLC da fração 20 da cromatografia de troca iônica.....	44
Figura 10 - Ensaio de inibição enzimática de F20-9 pelo SAB (Painel A) e PMSF (Painel B).....	44
Figura 11 - Gel eletroforese 13% corado por nitrato de prata da subfração F20-9.....	45
Figura 12 - Perfis cromatográficos em C8-HPLC das frações 10 (Painel A), 11 (Painel B), 12 (Painel C) e 13 (Painel D).....	46
Figura 13 - Teste de atividade enzimática utilizando o substrato Abz-Serine (5µM) com as frações da cromatografia de fase reversa.....	46
Figura 14 - Gel eletroforese 13% corado por nitrato de prata contendo das subfrações F10-5, F11-5, F12-5 e F13-5.....	47
Figura 15 - Identificação e cobertura das serinopeptidases do VBJ não neutralizadas pelo SAB.....	49
Figura 16 - Perfil eletroforético dos soros experimentais.....	50
Figura 17 - Titulação dos soros experimentais e comerciais por ELISA.....	52
Figura 18 - Titulação em relação à concentração proteica do SAB e soros experimentais dos camundongos BALB/c e C57BL6.....	53
Figura 19 - Western Blot dos soros experimentais.....	54
Figura 20 - Ensaio de avidéz relativa.....	55
Figura 21 - Ensaio de soroneutralização <i>in vitro</i> da atividade de SVSPpool sobre o substrato FRET Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp pelos soros experimentais e comerciais..	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade específica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> para a hidrólise de peptídeos bioativos na presença de EDTA, PMSF e do soro antibotrópico.....	37
Tabela 2 - Ensaio de atividade enzimática das frações provenientes da DEAE-HPLC sobre o substrato Abz-Serine.....	43
Tabela 3 - Identificação das proteínas por espectrometria de massas.....	48
Tabela 4 – Resumo comparativo SAB vs soros experimentais.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Lista de abreviaturas

Abz	Radical fluorescente ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
ACN	Acetonitrila
CBI	Cadeia B da insulina
DEAE	Detilaminoetil
EDDnp	Grupo apagador da fluorescência 2,4-dinitrofenil
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FRET	“Free Resonance Energy Transfer”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
Leu-E	Leu-Encefalina
Met-E	Met-Encefalina
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMSF	Fenil metil sulfonil fluorido
PYY	Peptídeo YY
SAB	Soro antibotrópico do Instituto Butantan
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	Substância P

STT	Somatostatina
SVMP	Snake venom metalloproteinase
SVSP	Snake venom serineproteinase
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
UF	Unidade de Fluorescência
VBJ	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Acidentes com serpentes: uma visão geral	18
1.2 O veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj)	18
1.3 Resposta imune na produção de soros hiperimunes	20
1.4 Soroterapia	21
1.5 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Venenos e Reagentes	26
3.2 Ensaio de atividades enzimáticas com o peptídeo FRET: soroneutralização com o SAB e inibição com PMSF	26
3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	27
3.4 Ensaio de atividade enzimática do VBj sobre peptídeos biologicamente ativos, verificação da classe enzimática atuante e eficácia neutralizante do soro antibotrópico	28
3.5 Purificação das serinopeptidases não bloqueadas pelo soro antibotrópico	28
3.6 Eletroforese SDS-PAGE	29
3.7 Espectrometrias de Massas	29
3.7.1. <i>Análise de pontos de clivagem de substratos peptídicos</i>	29
3.7.2. <i>Identificação das serinopeptidases</i>	30
3.8 Imunização dos animais	30
3.8.1 <i>Animais</i>	30
3.8.2 <i>Imunização dos camundongos BALB/c e C57BL/6</i>	31
3.8.3 <i>Processamento dos soros e purificação das IgGs</i>	31
3.8.4 <i>Análise da imunogenicidade das serinopeptidases não neutralizadas pelo soro</i>	32
3.8.4.2 <u>ELISA</u>	32
3.8.4.2 <u>Western Blot</u>	32
3.8.4.3 <u>Avidez Relativa</u>	33
4 Resultados	34
4.1 Atividade do VBj sobre peptídeos bioativos	34
4.1.1 <i>Análise da hidrólise de peptídeos bioativos pelo VBj em HPLC</i>	34

<i>4.1.2 Determinação dos pontos de clivagem dos peptídeos bioativos pelo veneno total de B. jararaca na ausência e presença dos inibidores sítio dirigidos PMSF e EDTA.....</i>	38
<i>4.1.3 Ensaio de soroneutralização dos peptídeos biologicamente ativos in vitro por HPLC.....</i>	40
4.2 Estudo da imunogenicidade das serinopeptidases do VBJ não neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan.....	42
<i>4.2.1 Obtenção e caracterização das serinopeptidases não neutralizadas pelo SAB.....</i>	42
<i>4.2.2 Obtenção e purificação dos antisoros experimentais contra o SVSPpool em duas linhagens murinas.....</i>	50
<i>4.2.3 Reconhecimento e titulação do Soro antibotrópico do Instituto Butantan e soro experimental de camundongos contra o SVSPpool.....</i>	51
<i>4.2.4 Western Blot.....</i>	53
<i>4.2.5 Avidéz relativa.....</i>	54
<i>4.2.6 Soroneutralização das serinopeptidases in vitro.....</i>	55
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	67
Referências.....	68
Anexo A.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes com serpentes: uma visão geral

O envenenamento ofídico representa uma questão de saúde pública para vários países do mundo, e é considerada uma condição tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Williams et al. (2010) estimam que ocorram de 5,4 a 5,5 milhões de acidentes, mais de 400.000 amputações e cerca de 20.000 a 125.000 mortes por ano no mundo. No Brasil o envenenamento botrópico é responsável por 73,5% dos acidentes ofídicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) e nos casos atendidos pelo Hospital Vital Brazil (Instituto Butantan), em que a espécie foi identificada, este índice chega a 97,5% (RIBEIRO; JORGE, 1997).

As serpentes do gênero *Bothrops* são amplamente distribuídas na região neotropical, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina, estando ausentes apenas no Chile. A espécie *B. jararaca* ocorre do sul da Bahia ao norte da Argentina e Paraguai, distribuindo-se no Brasil nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, leste do Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul (GOMES; PUERTO, 1993).

1.2 O veneno de *Bothrops jararaca* (VBj)

Abordagens proteômicas e transcriptômicas mostram que o veneno de *Bothrops jararaca* é composto por diversas toxinas como: metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo C, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs), fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, peptídeos pontencializadores da bradicinina, peptídeos natriuréticos, entre outras. Apesar desta grande variedade de componentes, estes estudos demonstram que as duas classes de toxinas mais abundantes neste veneno são as metaloproteases (SVMPs, *Snake Venom Metalloproteases*) e as serinoproteases (SVSPs, *Snake Venom Serine Proteases*) (FOX; SERRANO, 2008; GONÇALVES-MACHADO et al., 2016; NICOLAU et al., 2017). Estas enzimas são responsáveis por diversos sintomas descritos nas vítimas, como: dor local, edema, bolhas, hemorragia, distúrbios na cascata de coagulação, hipotensão e falha renal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em geral, têm sido atribuído as metalopeptidases, principalmente, os efeitos hemorrágicos, degradando proteínas como laminina, fibronectina e colágeno

(MARKLAND; SWENSON, 2013), enquanto que as serinoproteases afetam a hemostasia, agindo em diversos componentes da cascata da coagulação e no sistema calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005). Porém, estudos mais recentes têm demonstrado que as metaloproteases podem ter um papel maior no envenenamento do que se pensava anteriormente, exercendo diversas atividades atribuídas historicamente às serinoproteases, como a atividade sobre o cininogênio e fibrinogênio (OKAMOTO et al., 2014; YAMASHITA et al., 2014). Além das clássicas endopeptidases (SVMPs e SVSPs), já foi reportado também a presença de exopeptidases no VBJ, como descrito por Gasparello-Clemente e Silveira (2002) que demonstraram uma atividade aminopeptidásica DPP IV símile. Como as serinoproteases serão o principal foco deste trabalho serão melhores descritas a seguir.

O mecanismo catalítico destas enzimas depende de um resíduo de serina agindo como o nucleófilo para hidrolisar a ligação peptídica. São amplamente distribuídas e extremamente numerosas, estando presentes em bactérias, arqueobactérias, eucariotos, bacteriófagos e vírus. Esta classe pode ser exemplificada pela tripsina pancreática, elastase e calicreína, que apresentam uma tríade catalítica conservada composta pelos resíduos Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ (numeração da quimotripsina). A grande maioria das serinoproteases de venenos de serpentes está classificada no clã PA, família S1 da quimotripsina (BARRETT; WOESSNER; RAWLINGS, 2012). A tripsina de mamíferos e as enzimas de venenos apresentam “fold” semelhante e, acredita-se, que evoluíram a partir de um ancestral comum (ITOH et al., 1988). Até o momento, sabe-se que as serinoproteases de venenos interferem especificamente nos mecanismos hemostáticos e apresentam uma notável resistência à inibição por inibidores plasmáticos de serinoproteases (serpinas) (PARRY et al., 1998). Em contraste com a tripsina, que apresenta uma vasta especificidade para a hidrólise de substratos, as enzimas de venenos são caracterizadas pela alta especificidade pelos seus substratos, como é o caso das serinoproteases de mamíferos que regulam a hemostasia (LEFEBVRE et al., 2001; MADHAVAN; JACOBS; LEVINE, 2002).

De forma geral as SVSP afetam a cascata da coagulação através da ativação de componentes envolvidos no processo de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária através de mecanismos que mimetizam enzimas de mamíferos envolvidas nestes processos. Algumas SVSPs por mimetizarem a ação da trombina foram denominadas enzimas tipo trombina ou TLEs (do inglês, *Thrombin Like Enzymes*), e estão presentes

em diversos venenos de serpentes. Elas são serinoproteases que apresentam massa molecular relativa variando entre 26-33 kDa, sendo que algumas apresentam glicosilação. Além das TLEs, algumas SVSPs podem liberar bradicinina pela clivagem do cininogênio, como a KN-BJ (SERRANO et al., 1998), denominadas como *kallikrein-like enzymes*. Em especial, os efeitos da bradicinina já foram bem descritos e são particularmente muito ativos sobre a musculatura vascular resultando em vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular (para revisão, KINI, 2006; SERRANO; MAROUN, 2005).

Além destas atividades bem caracterizadas das SVSPs também já foi demonstrado que a inibição do veneno total com o inibidor de serinoproteases PMSF, antes da injeção do VBj nas patas de camundongos reduziu parcialmente a atividade edematogênica, não na mesma extensão que os inibidores de metaloproteases, mas indicando uma pequena contribuição destas enzimas para este sintoma local (ZYCHAR et al., 2010). Mais ainda, duas serinoproteases do veneno de *Bothrops pirajai* foram isoladas, BpirSP27 e BpirSP41, e foram capazes de induzir por si só uma moderada atividade edematogênica quando injetadas em patas de ratos (MENALDO et al., 2013).

1.3 Resposta imune na produção de soros hiperimunes

A proteção contra substâncias e organismos exógenos mediada por anticorpos de alta afinidade é iniciada pela interação destes componentes com receptores presentes em células B *naive*. Este grupo de células é um de muitos outros presentes no variado repertório de células B produzidas na medula óssea através do processo de recombinação gênica aleatória. Depois desta interação inicial estas células se reproduzem e dentro de alguns dias elas se diferenciam em plasmócitos e começam a produzir anticorpos de baixa afinidade, dando origem aos centros germinativos. Nos centros germinativos, anticorpos de alta afinidade são produzidos, mas somente após diversas etapas de maturação e seleção que, basicamente, consistem em novas recombinações gênicas das regiões hipervariáveis dos anticorpos e seleção do clone por interação com o epítipo alvo. Apesar dos muitos estudos sobre o assunto, alguns aspectos da seleção dos clones de maior afinidade ainda são incertos (TARLINTON; GOOD-JACOBSON, 2013; ZHANG et al., 2013). Este processo possibilita a produção dos soros hiperimunes do Instituto Butantan, em especial o soro antibotrópico (SAB)

que será mais bem caracterizado a seguir. O modelo animal utilizado para produção dos soros são os cavalos, que são imunizados com uma mistura de venenos das espécies: *Bothrops alternatus* (12,5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%), sendo, portanto, denominado como um soro pentavalente. Após diversas etapas de imunização, o sangue desses animais é coletado e processado, sendo que o plasma é separado e armazenado enquanto que a porção celular é devolvida ao animal. O plasma por sua vez é submetido a diversas etapas de purificação, proteólise e controle de qualidade, chegando à forma do produto final como antiveneno comercial específico.

1.4 Soroterapia

O tratamento recomendado pela OMS e pelo Ministério da Saúde nos casos de acidentes ofídicos é a soroterapia, porém, no Brasil, existem várias espécies do gênero *Bothrops* que se diferenciam muito na composição de seus venenos e no que se refere à soroneutralização de seus componentes, como metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ e hialuronidases dificultando a elaboração de um soro antibotrópico de cobertura nacional (QUEIROZ et al., 2008; SOUSA et al., 2013). Porém, sabe-se que enzimas proteolíticas das classes das serino e metalopeptidases são reconhecidamente toxinas de grande relevância nos casos de acidentes botrópicos envolvendo humanos.

O soro do Instituto Butantan é um dos melhores da América Latina e se mostrou efetivo na neutralização de diversas atividades de vários venenos botrópicos, como, atividade letal, hemorrágica e coagulante, porém, não se mostrou muito efetivo na neutralização da atividade desfibrinogenante (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2011; SEGURA et al., 2010). Na verdade, o soro é capaz de reduzir os efeitos sistêmicos causados pelo envenenamento botrópico tendo assim salvo muitas vidas no decorrer dos anos, porém, não é eficaz em reverter eficientemente os efeitos locais observados nestes acidentes com humanos (CARDOSO et al., 1993).

A eficácia do soro do Instituto Butantan não se deve, provavelmente, a sua composição por fragmentos F(ab')₂, uma vez que León et al. (2000) demonstraram não haver uma diferença significativa na eficácia entre IgGs íntegras e fragmentos Fab em neutralizar efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*. O trabalho mostrou que a ação hemorrágica foi totalmente neutralizada quando os antivenenos foram pré-incubados com o veneno 30 min antes da aplicação, utilizando um volume de 500 µL de

antiveneno para neutralizar um miligrama de veneno. Porém, quando aplicados os antivenenos logo após o envenenamento experimental, somente 40% do efeito foi neutralizado. Ambos os antivenenos também foram eficientes em neutralizar o efeito mionecrótico quando utilizado o ensaio com pré-incubação, mas, novamente, quando utilizado o esquema de aplicação do antiveneno logo após o veneno, somente parte do efeito foi neutralizado. Por fim, foi também avaliado neste trabalho a formação de edema pelo veneno de *B. asper*, e estes resultados se mostraram interessantes, pois mesmo com uma pré-incubação de 30 min e utilizando doses de antiveneno chegando a 2000 µL por um miligrama de veneno não foi possível neutralizar totalmente o edema formado nos animais, restando ainda quase 40% de efeito residual do veneno. Apesar de este trabalho demonstrar que não existem diferenças significativas na eficácia de soros ricos em IgGs ou fragmentos F(ab')², já foi demonstrado que ocorre a produção da anafilatoxina C5a do Sistema Complemente somente no soro rico em IgGs (SQUAIELLA-BAPTISTÃO et al., 2014).

O potencial de neutralização do soro antibotrópico, tanto com o tratamento dos animais antes ou imediatamente após a aplicação do veneno botrópico, foi estudado por Battellino et al. (2003) onde diferentes esquemas de aplicação do soro antibotrópico do Instituto Butantan foram estudados: antes (15 min), ao mesmo tempo e depois (15 min) da aplicação do veneno de *B. jararaca*. Os autores concluíram que a falta de neutralização não ocorria pela falta de anticorpos específicos, mas sim pela baixa interação dos anticorpos com os componentes do veneno, provavelmente pela dificuldade de distribuição dos fragmentos F(ab')² nos tecidos. É importante ressaltar que os resultados indicam a formação de lesões hemorrágicas mesmo com o procedimento de pré incubação *in vitro*, mas com uma proporção quase seis vezes menor quando comparada com o controle.

Diversos trabalhos também mostraram uma boa eficácia na neutralização dos efeitos locais por antivenenos, porém não uma inibição total. Picolo et al. (2002) avaliaram a eficácia de dois antivenenos botrópicos, do Instituto Butantan e o polivalente do Instituto Clodomiro Picado, em neutralizar os efeitos de hiperalgesia e edema dos venenos de *B. jararaca* e *B. asper*. Nos ensaios, quando ambos os venenos foram pré-incubados com seus respectivos antivenenos, o efeito de hiperalgesia foi eficientemente neutralizado. Porém, com ambos os venenos, o edema teve uma redução significativa, mas não houve uma inibição completa após o uso do antiveneno

equivalente. Galvão Nascimento et al. (2010) também observaram que, tanto com o procedimento de pré-incubação *in vitro* quanto no tratamento dos animais com o soro antes e após a aplicação do veneno, houve uma significativa redução na formação do edema pelo veneno de *B. moojeni*. Todavia, em todos os casos de tratamentos pós envenenamento ou mesmo no caso da pré-incubação *in vitro* com o antiveneno, pôde ser observado um efeito edematogênico residual que só foi restaurado totalmente após 60 min após a aplicação da mistura. Os resultados deste trabalho também mostram que a eficácia do soro antibotrópico no tratamento do edema fica claramente comprometida com o aumento do intervalo entre a aplicação do soro e a aplicação do veneno, pois os autores afirmam que os mediadores da cascata da inflamação na formação de edema já foram ativados. Além disso, os autores ressaltam que o soro por si não induziu edema nos camundongos testados.

Tanto o soro antibotrópico do Instituto Butantan quanto outros dois antivenenos (Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil) foram avaliados também por Da Silva et al. (2007), em ensaios cegos, na neutralização dos efeitos miotóxicos e hemorrágicos dos venenos da *B. jararaca* e *B. jararacussu* utilizando dois protocolos, tanto o processo de pré-incubação do veneno com os soros, quanto o pré-tratamento dos animais com o soro antes da injeção dos venenos. Este trabalho mostrou que após a pré-incubação do veneno de *B. jararacussu* com os diferentes soros houve uma significativa inibição da atividade miotóxica, mas somente quando foi utilizado a dose máxima de 4,0 mL/mg (volume de antiveneno/massa de veneno). As inibições variaram de 26% quando PAV C foi utilizado, 53% com PAV B e 67% com PAV A, e somente este último soro promoveu uma inibição de 28% da atividade miotóxica quando utilizando a dose menor de 1,2 mL/mg. Outro efeito analisado foi a hemorragia provocada por esses venenos, e novamente foram estudados os três antivenenos a fim de neutralizar esta atividade. Houve uma inibição significativa quando utilizado o protocolo de pré-incubação com 0,4 mL, mas não total. Mesmo quando foram usadas doses até 10 vezes maiores, o perfil de neutralização continuou sendo o mesmo, onde o mais eficiente foi PAV A (95%), seguido de PAV B (87%) e por último PAV C (74%), indicando que as atividades residuais desses venenos provavelmente se devem a falta de anticorpos específicos contra as enzimas responsáveis, já que o aumento da dose não alterou a porcentagem de inibição. O pré-tratamento dos animais com os soros se mostrou eficaz na neutralização do efeito hemorrágico do veneno de *Bothrops jararaca*. O estudo

demonstrou que o soro PAV A foi mais eficiente, porém, não é possível determinar a origem deste produto, pois os testes foram realizados com os soros identificados através de códigos, e também vale ressaltar que a concentração de 4,0 mL/mg de veneno é 10 vezes mais alta que a recomendada para uso.

1.5 Justificativa

A grande maioria dos estudos explora a ação das proteases de venenos de serpentes sobre substratos proteicos, porém, existem poucas informações sobre a atividade destas enzimas sobre peptídeos ativos. Os peptídeos são fragmentos de proteínas endógenas precursoras que sofreram clivagem por proteólise limitada ou fermentação e tem papel muito importante em vários processos fisiológicos de mamíferos, podendo atuar nos sistemas imune, endócrino, gástrico, vascular e nervoso (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015), e que podem ser importantes alvos das peptidases do VBj. Portanto, decidimos por estudar a ação do veneno sobre os peptídeos bioativos: neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY (PYY), polipeptídeo pancreático (PP), somatostatina (STT), substância P (SP), Met-enkefalina, Leu-enkefalina e cadeia B da insulina (CBI), uma vez que a possível hidrólise dos mesmos pode estar relacionada com determinados sintomas apresentados em casos de envenenamento humano. Além disso, também acreditamos ser importante verificar a eficácia do SAB em neutralizar estas novas atividades uma vez que já foi demonstrado que existe uma pequena margem para melhora do SAB e que estes sintomas possam estar ligados à atividade de peptidases.

O termo peptidase foi apresentado como a nomenclatura mais racional por Barrett e McDonald (1986) uma vez que engloba tanto enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas quanto de peptídeos, além de também se referir às enzimas com ações endo- ou exopeptidásicas e, portanto, o mesmo será utilizado daqui em diante.

2 OBJETIVOS

O presente projeto apresenta como objetivo geral a busca de novos substratos peptídicos para o veneno total da *B. jararaca* e o estudo de serinopeptidases presentes neste veneno cujas atividades não são bloqueadas pelo soro antibotrópico comercial, assim como o esclarecimento do motivo dessa falha. Para isso, o presente projeto apresenta os objetivos específicos:

- Buscar novos substratos para o peptidases do VBj e determinar a classe de peptidase atuante pelo uso do PMSF e EDTA
- Determinar os pontos de clivagens obtidos nos peptídeos bioativos que foram substratos quando utilizados o PMSF e EDTA
- Determinar a concentração ótima do soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan para o bloqueio da hidrólise do substrato FRET
- Após a verificação da condição ótima para o uso do SAB, verificar a soroneutralização das possíveis novas atividades do VBj sobre peptídeos bioativos.
- Obter um *pool* rico em serinopeptidases do VBj que não tem suas atividades neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan, através de técnicas de cromatografia.
- Determinar as sequências primárias das serinopeptidases não neutralizadas pelo soro antibotrópico por espectrometria de massas.
- Produzir anticorpos policlonais específicos contra estas enzimas, em duas linhagens murinas, BALB/c e C57BL/6, utilizando o *pool* de serinopeptidases como antígeno.
- Caracterizar os anticorpos policlonais obtidos contra o *pool* de serinopeptidases quanto ao potencial bloqueador das atividades enzimáticas *in vitro*
- Realizar ensaios imunológicos, como ELISA e *Western Blot*, para verificar o reconhecimento das serinopeptidases purificadas pelos soros experimentais e o soro comercial.
- Verificar a avidéz e eficácia dos soros experimentais comparados com o soro comercial.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Venenos e Reagentes

O veneno da *B. jararaca* (240 mg) foi fornecido pela Comissão de Venenos do Instituto Butantan. Dois lotes do soro antibotrópico foram utilizados no trabalho e foram fornecidos pela Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan (Lotes 0805063 e 056110).

Dentre os principais reagentes, o TFA e a Acetonitrila (J. T. Baker, Goiânia, GO, Brasil) são importantes para a utilização do HPLC. Os inibidores sítio-dirigidos, EDTA e PMSF, e os peptídeos angiotensina I, neuropeptídeo Y, peptídeo YY, polipeptídeo pancreático, somatostatina, substância P, cadeia B da insulina, Met-enkefalina e Leu-enkefalina, juntamente com o OPD (*orto*-fenil-diaminobenzidina), anticorpo secundário IgG anti-horse e Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O substrato FRET (Free Resonance Energy Transfer) Abz-Serine (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp) foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM e obtido pelo método de síntese em fase sólida. Este substrato já havia sido caracterizado anteriormente como seletivo para as serinopeptidases do VBJ (KUNIYOSHI et al., 2012).

A sílica SBA-15 utilizada na imunização dos camundongos foi gentilmente cedida pelo Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. A coluna HiTrap Protein A HP (1 ml) foi adquirida da GE Healthcare Life Sciences.

3.2 Ensaios de atividades enzimáticas com o peptídeo FRET: soroneutralização com o SAB e inibição com PMSF

Os ensaios de a atividade enzimática com o peptídeo FRET, Abz-Serine (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp), foram realizados em fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. A escolha da concentração do VBJ e do pool de serinopeptidases foi ajustada experimentalmente variando de 0,2 a 2,0 µg, objetivando a obtenção de cinéticas onde o consumo de substrato seja inferior a 10% (velocidades iniciais de hidrólise). As reações ocorreram em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, a 37 °C. O aumento da fluorescência foi monitorado no fluorímetro de leitura em placas e os valores de fluorescência gerados foram quantificados a cada 30 segundos durante 15

min, sendo que a placa de leitura é agitada pelo fluorímetro durante 2 segundo antes de cada leitura. Os resultados destes experimentos estão apresentados na forma de atividade específica, sendo adquirida pela razão da variação da fluorescência (UF) pelo tempo (min) pela quantidade de proteína utilizada no ensaio (μg). O inibidor sítio dirigido, PMSF (3 mM) e o SAB (1:200 *w/w*) foram utilizados para garantir a caracterização e a seleção de uma atividade de serinopeptidases não neutralizadas durante os processos de purificações. A capacidade dos soros em neutralizar a atividade peptidásica do *pool* de serinopeptidases foi estimada como descrito por Kuniyoshi et al. (2012). Resumidamente, os soros (comercial e experimentais) nas doses 50:1, 200:1 e 500:1 (massa antiveneno/massa veneno) foram pré-incubados por 30 min a temperatura ambiente com 0,25 μg de pool de serinopeptidases e, em seguida, foi adicionado o substrato FRET para iniciar a reação. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão demonstrados como a média \pm DP das porcentagens de inibição em comparação com o controle positivo (incubação sem os antivenenos).

3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A técnica de HPLC, empregando uma coluna C-18, foi utilizada para a análise da clivagem dos peptídeos bioativos e para a determinação dos pontos de clivagens naqueles que se comportaram como substratos para o VBJ, assim como o efeito inibitório do PMSF e do SAB sobre a hidrólise dos mesmos. Além disso, o sistema de HPLC, empregando colunas de troca iônica e C-8, também foi utilizado para a purificação das serinopeptidases do VBJ não neutralizadas pelo SAB. O sistema de HPLC utilizado em nosso laboratório é composto por um sistema binário onde existem duas bombas que trabalham com solventes diferentes (Solvente A e B, modelos LC 20AD); um desgaseificador, que é um módulo responsável por retirar eventuais bolhas da fase móvel através de vácuo (modelo DGU 20A3); um detector de UV capaz de medir 2 comprimentos de onda simultaneamente (modelo SPD 20A) e um detector de fluorescência que também trabalha com 2 comprimentos de onda: um de excitação e outro de emissão (modelo RF 10AXL). Trata-se de um sistema Shimadzu Prominence.

3.4 Ensaio de atividade enzimática do VBJ sobre peptídeos biologicamente ativos, verificação da classe enzimática atuante e eficácia neutralizante do soro antibotrópico.

O VBJ (2µg) foi incubado em tampão 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4, a 37 °C por 30-120 min, a fim de manter a taxa de hidrólise dos substratos abaixo de 10% , com os seguintes peptídeos, neuropeptídeo Y (23 µM), peptídeo YY (23 µM); polipeptídeo pancreático (22 µM); somatostatina (61 µM); substância P (74 µM) e cadeia B da insulina (71 µM). Um período de pré-incubação de 30 min foi realizado quando testados os inibidores PMSF (3 mM) e EDTA (100 mM) e o soro antibotrópico (10 µL) e, após, os peptídeos que se comportaram como substratos foram adicionados. Para as análises de atividade peptidásica, foi utilizado o sistema de HPLC descrito no item 3.3, uma coluna C-18 Shim-Pack (150 x 4,6 mm) e gradiente de 20%-60% B em 20 min [tampão A (H₂O/0,1%TFA) e tampão B (acetonitrila/tampão A na proporção de 9:1)], utilizando o comprimento de onda 214 nm para detecção. A análise foi feita através da comparação da área dos controles negativos (peptídeo em tampão) com seus respectivos grupos tratados (peptídeo incubado com o VBJ), e os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão expressos como média ± DP.

3.5 – Purificação das serinopeptidases não bloqueadas pelo soro antibotrópico

A purificação se iniciou com a precipitação do veneno total de *Bothrops jararaca* (240 mg) por sulfato de amônio em duas concentrações. As proteínas que não precipitaram em 350 g/L, mas que precipitaram em 650 g/L, foram submetidas à cromatografia de troca iônica em uma coluna Shim-Pack PA-DEAE (20 mm x 100 mm) para HPLC (descrito no item 3.3). Os tampões utilizados foram Tampão A: Tris 20 mM, NaCl 20 mM, pH 8,2 e Tampão B: Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, com gradiente de B de 0-80% em 80 min. Os picos foram coletados por tempo (intervalo de 2 min) e submetidos a *screening* por atividade com o substrato FRET (Abz-Serine) e ensaio de soroneutralização (como descrito no item 3.2). As frações selecionadas por *screening* foram submetidos a uma etapa em RP-HPLC (item 3.3) utilizando um gradiente isocrático de 20% de B por 5 min e, em seguida, de 20-50% de solução B em 35 min em coluna de fase-reversa Shim-Pack CLC-C8 [tampão A (H₂O/0,1%TFA) e tampão B (acetonitrila/tampão A na proporção de 9:1)] utilizando o comprimento de onda 214 nm para detecção. A determinação da concentração das amostras se deu pelo teste Quick

Start Bradford assay kit (BioRad Protein Assay; BioRad) de acordo com recomendações do fabricante. A seguir, a pureza das serinopeptidases foi verificada através de testes em gel de eletroforese e as identidades das enzimas confirmadas por espectrometria de massas.

3.6 Eletroforeses SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE 13% foi realizada, como descrito (LAEMMLI, 1970). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra, em condições redutoras, e separadas eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE a 13% de acrilamida, e, para o empilhamento das amostras, gel a 4%. A corrida foi realizada sob voltagem constante (180 V) no sistema BioRad (BioRad, EUA) e, em seguida, os géis foram corados por nitrato prata.

3.7 Espectrometria de Massas

As análises dos pontos de clivagem e também da identificação das serinopeptidases foram feitas em colaboração com o Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan.

3.7.1. Análise de pontos de clivagem de substratos peptídicos

Após verificação da atividade do VBJ sobre os peptídeos bioativos, os fragmentos foram coletados manualmente na saída do HPLC, secos e ressuspensos em solução de ácido fórmico e água 0,1% e analisado em nano HPLC Easy-nLCProxeon acoplado a LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização por nanoeletrospray. A separação foi realizada em uma coluna de 10 cm empacotada *in house* com *beads* de 5 µm Jupiter® C-18 beads (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) e os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-30% de acetonitrila, em 0,1% de ácido fórmico, em 45 min com fluxo de 300 nL/min. O espectrômetro foi operado em modo dado-dependente e os 10 picos mais intensos foram selecionados para a fragmentação por CID (*Collision Induced Dissociation*) após a aquisição de cada *scan*.

As configurações do espectrômetro foram definidas como: Alta resolução full MS (1 µscan; full MS intervalo de massas entre m/z de 200–2000 com R = 30 000 e um valor alvo de 1×10^4 íons; tempo máximo de injeção= 10 ms). Para os *scans* com fragmentação as definições foram: intervalo de isolamento de 2 Da, máximo do

tamanho da lista de 500, um intervalo de tempo de 30 s, um sinal mínimo de 5000, tempo de ativação de 10 ms e energia de colisão normal=35%.

Os arquivos raw foram submetidos à análise de sequenciamento *de novo* utilizando o software PEAKS Studio (versão 7, Bioinformatics Solution, Waterloo, Canadá) (ZHANG et al., 2012). Os parâmetros utilizados foram: nenhuma enzima específica, PMT ± 10 ppm e tolerância de massa dos fragmentos de $\pm 0,5$ Da, oxidação da metionina e amidação foram definidas como modificação pós traducionais. Os peptídeos identificados foram selecionados pela confiança ou Average Local Confidence (ALC $>85\%$).

3.7.2 Identificação das serinopeptidases

A identificação das serinopeptidases utilizou o método de *fingerprint* como descrito por Shevchenko et al. (1996), com modificações. Inicialmente as amostras purificadas foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE e, após, as bandas foram cortadas e submetidas à linearização com DTT (ditiotreitól), alquilação com a iodocetamida, digestão por tripsina, e por fim os fragmentos foram extraídos do gel. Os fragmentos foram analisados em LTQ OrbitrapVelos (ThermoScientific) e as sequências encontradas foram comparadas com o banco de dados *Serpentes* que contém exclusivamente proteínas destes animais (49427 sequências) através do MASCOT. Os parâmetros utilizados foram: tripsina, PMT ± 10 ppm e tolerância de massa dos fragmentos de $\pm 0,6$ Da, oxidação da metionina foi definido como modificação pós traducional facultativa e a carbamidometilação da cisteína como modificação fixa. Todas as serinopeptidases purificadas e identificadas que não tiveram suas atividades neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan (SAB) foram reunidas em um *pool* e esta amostra será denominada daqui em diante como SVSPpool.

3.8 Imunização dos animais, obtenção e caracterização dos soros experimentais

3.8.1 Animais

Um grupo de 7 camundongos adultos machos de duas linhagens, BALB/c e C57BL/6 (18-22 g) foram mantidos em condições de luz entre 7:00 e 18:00, 22 ± 2 °C e comida e água *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, Protocolo N° 1161/13).

3.8.2 Imunização dos camundongos BALB/c e C57BL/6

A análise da imunogenicidade das serinopeptidases purificadas foi realizada utilizando-se duas linhagens de camundongos isogênicos, BALB/c e C57BL/6. Sete animais de cada linhagem foram imunizados com 10 µg cada com o SVSPpool adsorvidos no adjuvante SBA-15 (CARVALHO et al., 2010), pela via subcutânea em uma diluição de 1:25 sendo o volume final injetado de 200 µL. Resumidamente, 80 µg de SVSPpool foi adicionado a 1.000 µg da sílica SBA-15 diluído em PBS em um volume final de 1.600 µL e mantido à 4 °C por 24 h, desta solução 200 µL foi injetado em cada camundongo. Sangrias de prova pela via plexo retro orbital, sangria de acompanhamento, sangria final e o esquema de imunização pode ser observado na Figura 1. Todo o desenvolvimento dos soros experimentais foi feito sob supervisão do Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

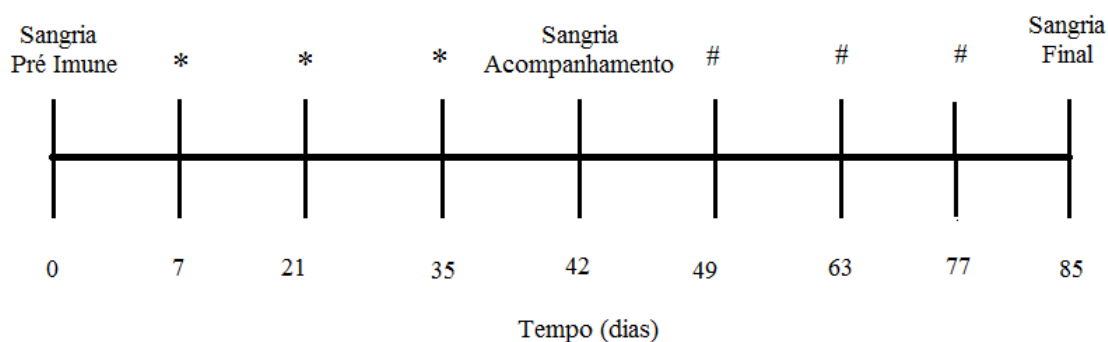


Figura 1- Esquema de imunização e sangria dos camundongos imunizados com o *pool* de serinopeptidases do VBj (SVSPpool). Os símbolos (*) e (#) correspondem às imunizações com o adjuvante SBA-15 e sem o adjuvante, respectivamente.

3.8.3 - Processamento dos soros e purificação das IgGs

O sangue de todos os animais foram coletados nos dias 0, 42 e 85 (final), incubados à 36 °C e, em seguida, foram mantidos a 4 °C overnight. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 800 g, os sobrenadantes foram coletados e submetidos novamente a esta etapa. Aproximadamente 200 µL de sangue de cada camundongo foram coletados para controle pré-imune e estas amostras foram analisadas conjuntamente. Entretanto, as amostras da sangria final de cada animal foram coletadas e analisadas separadamente. Os soros foram mantidos a -20 °C até as titulações e as análises quantitativas e qualitativas de reconhecimento epitópico.

Uma vez que proteínas plasmáticas poderiam interferir no ensaio de atividade enzimática por estarmos utilizando um substrato para serinopeptidases do VBJ, e também porque consideramos que IgGs purificadas serem uma amostra mais próxima do SAB, decidimos por isolar estas moléculas a partir do soro obtido na sangria final dos animais. Para isso, o soro oriundo da sangria final dos camundongos de ambas as linhagens, obtido como descrito acima, foi submetido à cromatografia de afinidade a proteína A utilizando a coluna HiTrap Protein A HP (GE Healthcare Life Sciences, IL, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.8.4 Análise da imunogenicidade das serinopeptidases não neutralizadas pelo soro

3.8.4.1 ELISA

Placas para ELISA de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com 1 µg do SVSPpool e incubados a 4 °C *overnight* e, após, as placas foram lavadas com PBS três vezes. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 2 h com PBS/BSA 5% a fim de impedir ligações não específicas. As placas foram lavadas e incubadas (em duplicata) com o soro dos camundongos (três animais de cada linhagem), IgGs purificadas (das ambas as linhagens de camundongos) e dois lotes do SAB. As diluições destas amostras partiram de 1:1.000 seguidas de diluições seriadas na proporção de 1:2 até o limite de 1:512.000 e incubadas por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-BSA 0,1%/Tween 0,05% e, em seguida, foram incubadas por 1 h a 37 °C com IgG de coelhos anti-horse (1:20.000) e IgGs de cabras anti-camundongo (1:2.000) ambos conjugados com a enzima peroxidase. A atividade da peroxidase foi mensurada utilizando o substrato O-fenilenodiamina (OPD) e as placas foram lidas no espectrofotômetro FLUOstar Omega (BMG Labtech) no comprimento de onda de 490 nm. A maior diluição que produziu uma D.O. de pelo menos duas vezes maior que a média do controle pré imune foi considerada o título das amostras (U-ELISA/mL).

3.8.4.2 Western Blot

O SVSPpool (5 µg) foi diluído em tampão de amostra não redutor juntamente com o marcador de massa molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, ThermoFisher, Brasil) e aplicado ao gel eletroforese 13% como descrito anteriormente. Após a eletroforese, um dos géis foi corado por nitrato de prata enquanto outros dois

foram submetidos à transferência para membrana de nitrocelulose 0,45 mm utilizando o protocolo do fabricante (Bio-Rad, CA, EUA). As membranas foram incubadas overnight no tampão de bloqueio (PBS-BSA 5%), seguido de três lavagens com PBS por 5 min cada, e incubado por 1 h com leve agitação com as frações de imunoglobulinas purificadas dos camundongos BALB/c (1:5.000) e C57BL/6 (1:1000). As membranas foram lavadas três vezes por 5 min cada com PBS-BSA 0,1%-Tween20 0,05% e, em seguida, incubadas por 1 h com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina de cabra (molécula íntegra, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) diluído 1:7.500 em PBS-BSA 0,1% a temperatura ambiente sob leve agitação. Por fim, as membranas foram incubadas em uma solução reveladora contendo 5 mL do tampão AP (Tris 100 mM, NaCl 100 Mm e 5 MgCl₂ mM, pH 9.5), 33 µL de NBT (nitro blue tetrazolium, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) e 16,5 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA). Após 15 min, a reação foi parada pela lavagem da membrana com água destilada. O experimento foi realizado em duplicata.

3.8.4.3 Avidéz relativa

Este ensaio foi realizado como descrito em 3.8.4.1 exceto que as IgGs dos camundongos de ambas as linhagens foram diluídos à uma única concentração (1:3000), e incubados por 1 h a 37 °C com 1 µg por poço de SVSPpool, em seguida lavado com PBS-BSA 0,1%/Tween20 0,05% três vezes. Então, 100 µL de KSCN (4 M) foram adicionados aos poços tratados por 15 min. As placas foram lavadas novamente e todas as etapas para revelação decorreram como descritas no item 3.8.4.1. O experimento foi feito em triplicata e a avidéz relativa foi determinada como a porcentagem (\pm DP) de redução da D.O (leitura em 490 nm) quando comparada com o controle negativo. A comparação entre os grupos foi analisada através do teste *One-Way* Anova.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade do VBj sobre peptídeos bioativos

4.1.1 Análise da hidrólise de peptídeos bioativos pelo VBj em HPLC

Já foi demonstrado a atividade do VBj sobre peptídeos biologicamente ativos como a angiotensina I e a dinorfina 1-13 (KUNIYOSHI et al., 2012), e considerando que a identificação de substratos é um fato crucial no entendimento preciso do funcionamento das peptidases desse veneno, nós decidimos por continuar os estudos com um novo conjunto de peptídeos biologicamente ativos contendo os seguintes peptídeos: cadeia B da insulina (CBI), somatostatina (STT), substância P (SP), polipeptídeo pancreático (PP), neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY (PYY) Leu-encefalina (Leu-E) e Met-encefalina (Met-E). A hidrólise desses peptídeos pelo VBj foi analisada através da comparação da área controle negativo de cada substrato (apenas substrato em tampão) com seus respectivos grupos tratados com o VBj (Figura 2).

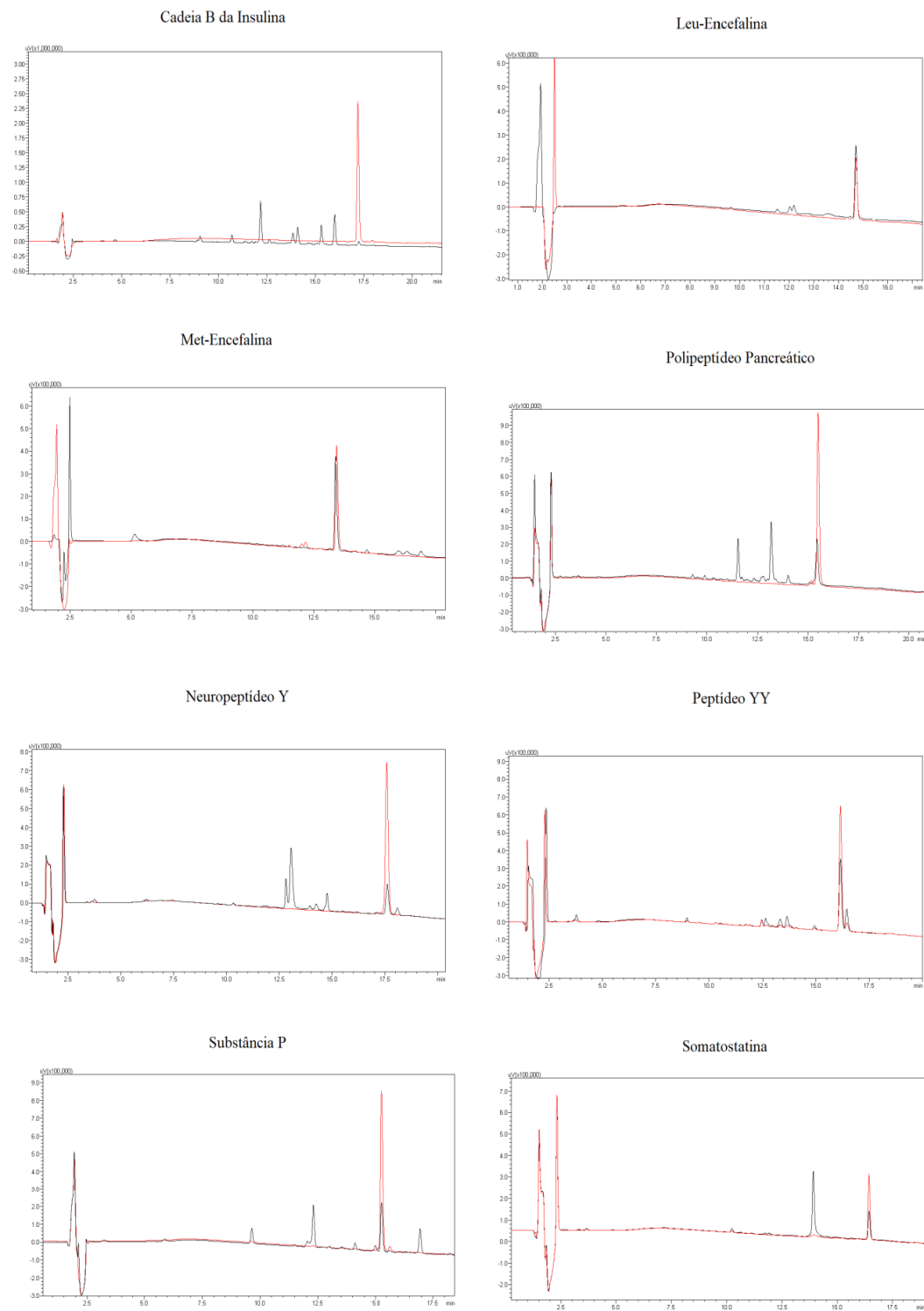


Figura 2 - Perfil cromatográfico em C18-HPLC da hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos pelo VBj. Em vermelho estão os controles negativos e em preto a amostra tratado com VBj. Resultado representativo de um experimento em triplicata.

Foi possível verificar que o NPY e PP foram notavelmente os melhores substratos para este veneno, com taxas de hidrólise cerca de 40 vezes superior à SP, que apresentou a menor taxa de hidrólise. Esta observação é interessante uma vez que estes dois peptídeos pertencem a família do neuropeptídeo Y. O NPY e PP foram hidrolisados preferencialmente por serinopeptidases, com inibições pelo PMSF variando de $59,5 \pm 13\%$ e $81 \pm 1,4\%$, respectivamente.

A STT foi hidrolisada exclusivamente por serinopeptidases, uma vez que o PMSF inibiu totalmente sua clivagem e, em contrapartida, a SP foi clivada somente por metalopeptidases com uma inibição total pelo EDTA e nenhuma inibição por PMSF (Figura 3). Finalmente, as encefalina, Leu-E e Met-E, não foram hidrolisados pelo VBj, mesmo após um período de incubação prolongado. Todas as atividades específicas de hidrólise (μM de substrato hidrolisado por mg de VBj por min, $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$) estão presentes na Tabela 1. O resultado obtido anteriormente com a dinorfina 1-13 (KUNIYOSHI et al., 2012) também foi adicionado à Tabela 1 para uma melhor compreensão dos resultados sobre a atividade peptidásica do VBj.

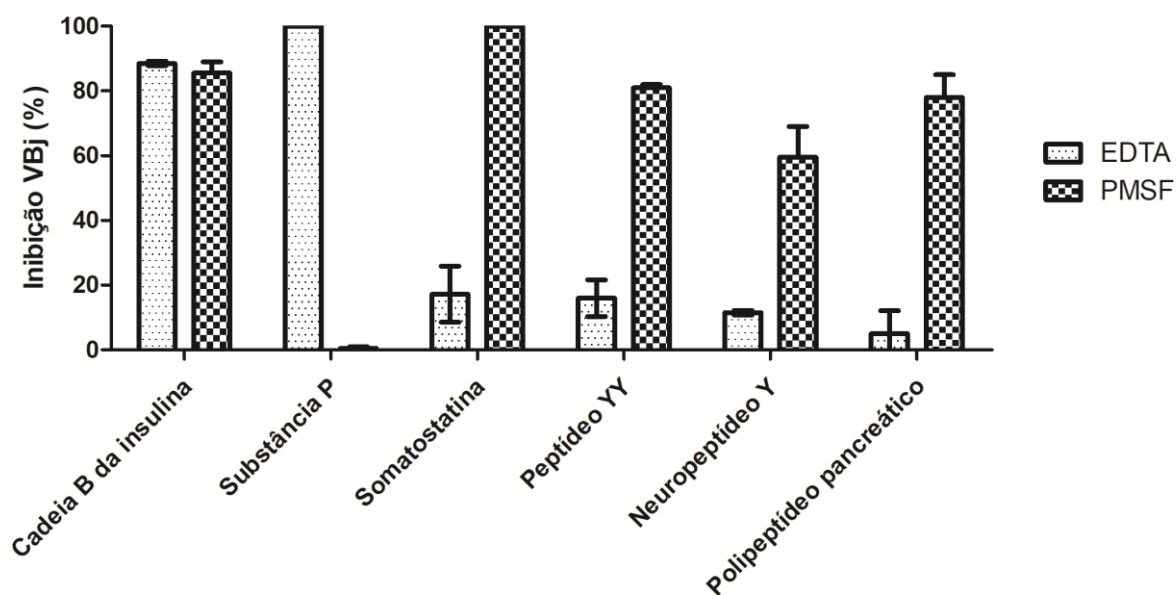


Figura 3 - Ensaio de inibição com o EDTA e o PMSF na hidrólise dos peptídeos bioativos pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Tabela 1 - Atividade específica do veneno de *Bothrops jararaca* para a hidrólise de peptídeos bioativos na presença de EDTA, PMSF e do soro antibotrópico.

	Controle ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)	EDTA ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)	PMSF ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)	SAB ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)
Cadeia B da insulina	$0,387 \pm 0,002$	$0,044 \pm 0,001$	$0,057 \pm 0,019$	$0,103 \pm 0,019$
Substância P	$0,013 \pm 0,006$	S.H.	$0,018 \pm 0,009$	$0,001 \pm 0,002$
Somatostatina	$0,146 \pm 0,021$	$0,121 \pm 0,012$	S.H.	$0,158 \pm 0,031$
Neuropeptídeo Y	$0,591 \pm 0,002$	$0,523 \pm 0,006$	$0,238 \pm 0,078$	$0,317 \pm 0,005$
Polipeptídeo pancreático	$0,514 \pm 0,004$	$0,484 \pm 0,037$	$0,113 \pm 0,052$	$0,113 \pm 0,004$
Peptídeo YY	$0,064 \pm 0,000$	$0,054 \pm 0,004$	$0,012 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,002$
Leu-encefalina	S.H.	–	–	–
Met-encefalina	S.H.	–	–	–
Angiotensin I*	0,18	0,23	S.H.	0,10

S. H. - Sem Hidrólise

* KUNIYOSHI et al., 2012

4.1.2- Determinação dos pontos de clivagem dos peptídeos bioativos pelo veneno total de *B. jararaca* na ausência e presença dos inibidores sítio dirigidos PMSF e EDTA

Os peptídeos que se mostraram substratos para o VBj tiveram os seus produtos de hidrólise coletados manualmente, como demonstrado na Figura 4, e submetidos a análise por espectrometria de massas. Somente os fragmentos cujas sequências apresentaram uma *Average Local Confidence* (ALC) maior ou igual 85% foram considerados como resultados positivos.

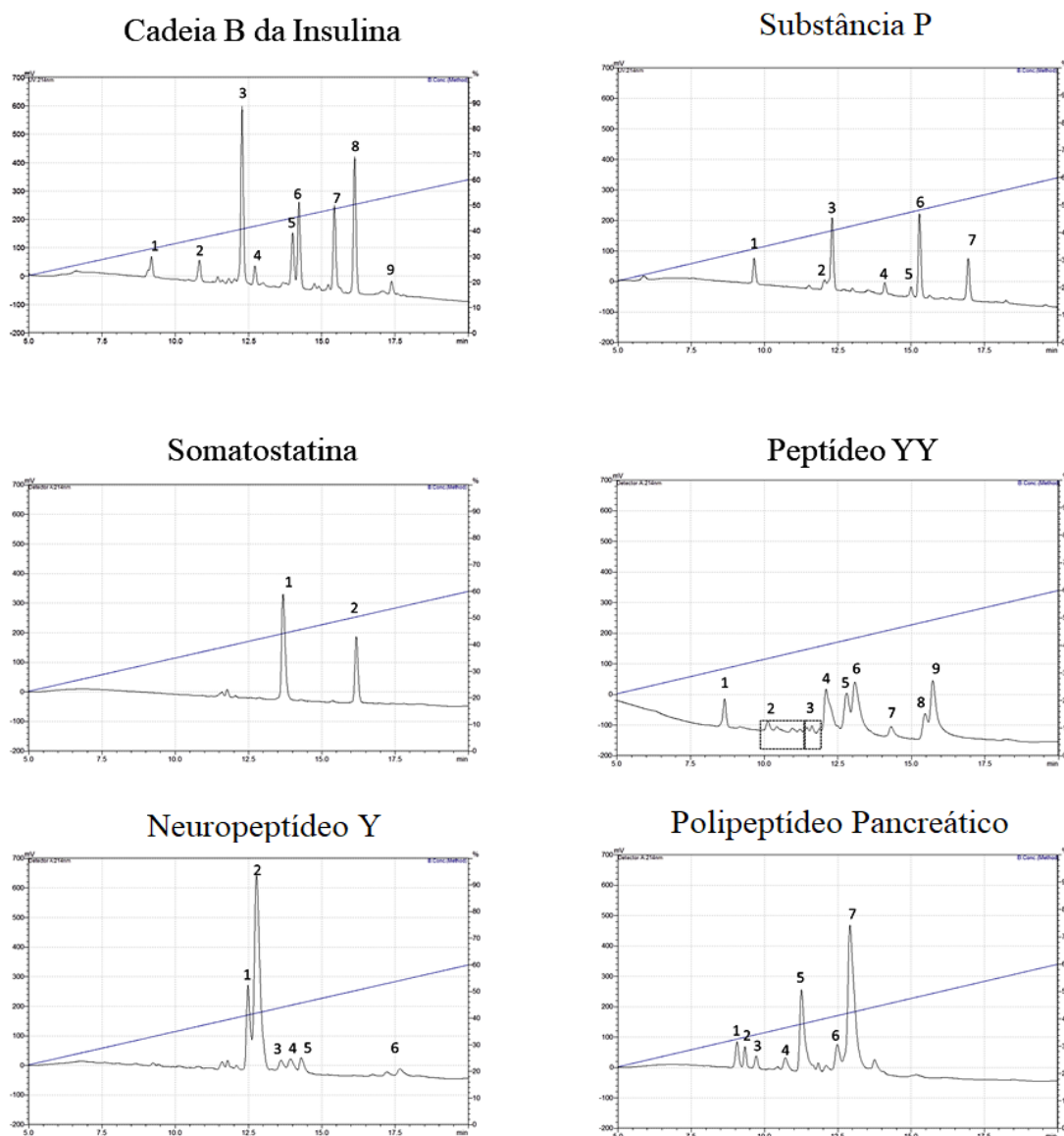


Figura 4 – Perfil cromatográfico dos fragmentos coletados após a hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos pelo VBj. O gradiente utilizado está representado pela linha em azul.

Muitos fragmentos de NPY, PYY e PP apresentaram resíduos de Arg ou Tyr na posição P1, indicando atividades tripsina e quimotripsina símile, respectivamente, uma vez que esses substratos foram hidrolisados preferencialmente por serinopeptidases. Além disso, a porção C-terminal comum a todos os três peptídeos contendo os resíduos Gln/Pro-Arg-Tyr, parece ser uma região muito suscetível à hidrólise, uma vez que foi hidrolisada nos três peptídeos (Figura 5, Painel A).

Além do tripeptídeo presente no C-terminal, foi observado um padrão complexo de hidrólise desses três substratos, pois mostraram que o VBj pode clivar sequências apresentando tanto resíduos hidrofóbicos, quanto polares e também resíduos carregados na posição P1. O número de fragmentos gerado na hidrólise dos membros dos peptídeos da família do neuropeptídeo Y variou entre 10 e 12 fragmentos diferentes (Figura 5, painel A).

A somatostatina foi clivada em pelo menos dois pontos por serinopeptidases, uma vez que o fragmento interno FFWK foi detectado nas análises por espectrometria de massas e, além disso, o PMSF foi capaz de inibir completamente a sua formação. Mais uma vez podemos ver que as serinopeptidases do VBj possuem uma ampla especificidade de clivagem, já que as ligações entre os resíduos N-F e K-T foram determinadas pelas análises por espectrometria de massas (Figura 5, painel B).

A substância P foi clivada em vários pontos por metalopeptidases, com pelo menos seis fragmentos detectáveis nas análises por MS. Os pontos de clivagem ocorreram entre Q-F, F-F, G-L e L-M, sendo que somente a região N-terminal não foi hidrolisada, restando o fragmento denominado SP 1-6 (Figura 5, painel B).

A cadeia B da insulina foi hidrolisada por ambas as classes de peptidases, gerando pelo menos oito diferentes fragmentos. Dois dentre os três pontos de clivagem gerados pela ação de metalopeptidases, observados na presença de PMSF, ocorreram quando o resíduo Leu estava presente na posição P1' da sequência hidrolisada (Figura 5, painel B).

A

Neuropeptídeo Y	YPSKPN↓PGED↓AP↓AEDMARY↓Y↓SAL↓R↓H↓Y↓INLITR↓QRY-NH ₂
Peptídeo YY	YPIKP↓E↓A↓PG↓EDASPEE↓LNR↓YY↓AS↓LR↓H↓Y↓LN↓LVTR↓Q↓RY-NH ₂
Polipeptídeo Pancreático	APLEPMYP↓GDYATHE↓QR↓A↓Q↓YETQL↓R↓R↓Y↓IN↓TLTR↓PRY-NH ₂

B

	Cadeia B da Insulina	Substância P	Somatostatina
VBJ	FVNQHLCG▲SHLVEA●LY▲LVCGERGFFYTPKA	RPKPQQ●F●FG●L●M	AGCKN▲FFWK▲TFTSC
EDTA	FVNQHLCG▲SHLVEALY▲LVCGERGFFYTPKA	N.H.	AGCKN▲FFWK▲TFTSC
PMSF	FVNQHLCGSHLVEA●LY●LVCGERGFFYTPKA	RPKPQQ●F●FG●L●M	N.H.
SAB	FVNQHLCG▲SHLVEALY▲LVCGERGFFYTPKA	N.H.	AGCKN▲FFWK▲TFTSC

Figura 5 - Pontos de clivagem dos substratos peptídicos. Pannel A: neuropeptídeo Y, peptídeo YY e polipeptídeo pancreático. Pannel B: cadeia B da insulina, substância P e somatostatina após hidrólise pelo veneno de *Bothrops jararaca* e análise das clivagens na presença de EDTA, PMSF e soro antibotrópico. N.H. - Não Hidrolisado. ▲ representa a hidrólise por serinopeptidases e ● representa a hidrólise por metalopeptidases.

4.1.3 Ensaio de soroneutralização da hidrólise dos peptídeos biologicamente ativos *in vitro* por HPLC

O soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de neutralizar quase completamente a atividade peptidásica do VBJ sobre a substância P (Tabela 1, Figura 6), que é hidrolisada exclusivamente por metalopeptidases uma vez que esta atividade foi totalmente inibida pelo EDTA (Tabela 1, Figura 3). Em contrapartida, o soro não foi capaz de bloquear a hidrólise da somatostatina (Tabela 1, Figura 6), que se mostrou um substrato específico para serinopeptidases do veneno com inibição total pelo PMSF (Tabela 1, Figura 3). A figura 6 e a Tabela 1 mostram que as hidrólises dos polipeptídeo pancreático e peptídeo YY foram eficientemente bloqueadas, alcançando quase 90%, mas não a do neuropeptídeo Y, cuja neutralização ficou em torno de 46%.

A hidrólise da cadeia B da insulina pelo VBj já foi reportada em diversos trabalhos (MANDELBAUM; CARRILLO; HENRIQUES, 1967; TANIZAKI et al., 1989), e apesar deste fenômeno não poder ser correlacionado com o envenenamento, este substrato foi uma ótima ferramenta de estudos uma vez a sua hidrólise foi inibida parcialmente pelo SAB, com neutralização acima de 70% (Tabela 1, Figura 6). Uma análise comparativa utilizando PMSF, EDTA e o soro, mostrou que a geração dos fragmentos produzidos pela clivagem por metalopeptidases foram completamente abolidos, enquanto que os fragmentos gerados por serinopeptidases continuaram a serem formados (Figura 5).

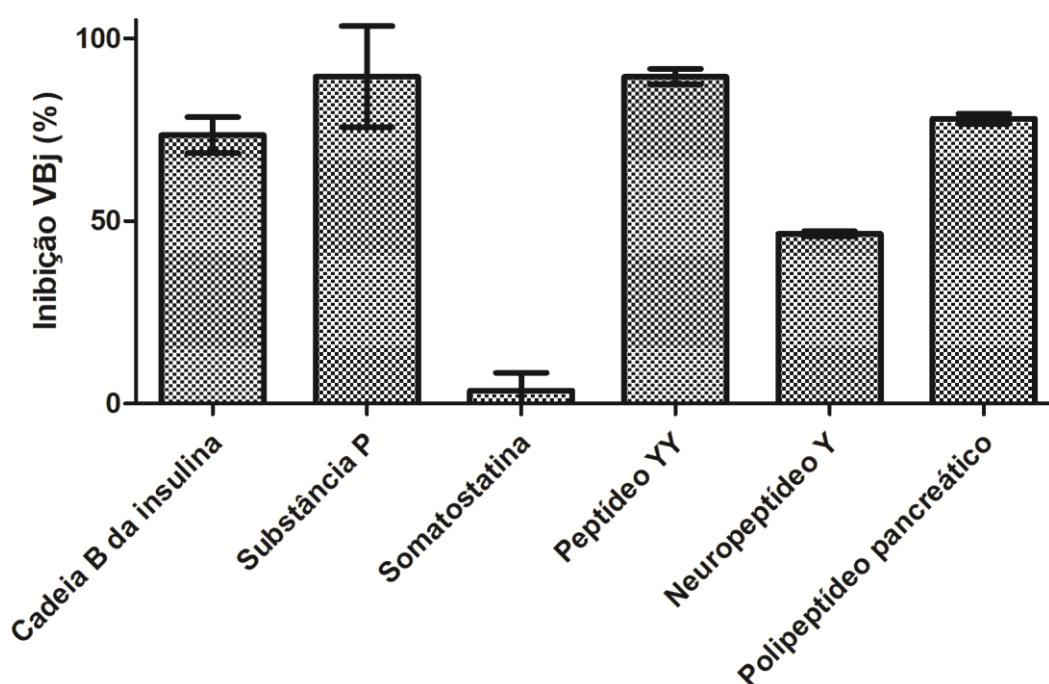


Figura 6 - Ensaio de soroneutralização do veneno total de *Bothrops jararaca* sobre os peptídeos biologicamente ativos utilizando o soro antivenenoso do Instituto Butantan.

Como os resultados de soroneutralização mostrados acima indicaram uma falha na neutralização de algumas serinopeptidases de VBj atuando sobre estes substratos, acreditamos que este problema possa estar relacionado à dor local persistente descrita por alguns pacientes, até mesmo depois de vários dias após o acidente e o tratamento (CARDOSO et al., 1993). Portanto, as causas desta falha foram mais bem estudadas e os resultados serão demonstrados a seguir.

4.2 Estudo da imunogenicidade das serinopeptidases do VBj não neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan

4.2.1 Obtenção e caracterização das serinopeptidases não neutralizadas pelo SAB

Um dos principais objetivos do presente projeto é estudar as causas da baixa neutralização das serinopeptidases presentes o VBj pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan, como pode ser observado nos resultados descritos acima e também no trabalho publicado pelo nosso grupo (KUNIYOSHI et al., 2012). Assim, decidimos pela purificação de serinopeptidases não bloqueadas pelo SAB para servirem como antígenos e obtenção de antissoros experimentais. Para isso, as proteínas do veneno de *B. jararaca* obtidas por precipitação por sulfato de amônio foram submetidas à cromatografia de troca aniônica em HPLC utilizando uma coluna preparativa Shim-Pack PA-DEAE (20 mm x 100 mm). Vinte frações foram coletadas, como mostra a Figura 7, e todas as frações foram estudadas com o substrato Abz-Serine (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp), seletivo para serinopeptidases desse veneno, e com o SAB, para a confirmação de estarmos selecionando uma atividade não bloqueada pelo antiveneno. Todas as 20 frações foram testadas, mas apenas algumas se mostraram boa atividade sobre o substrato (Tabela 2).

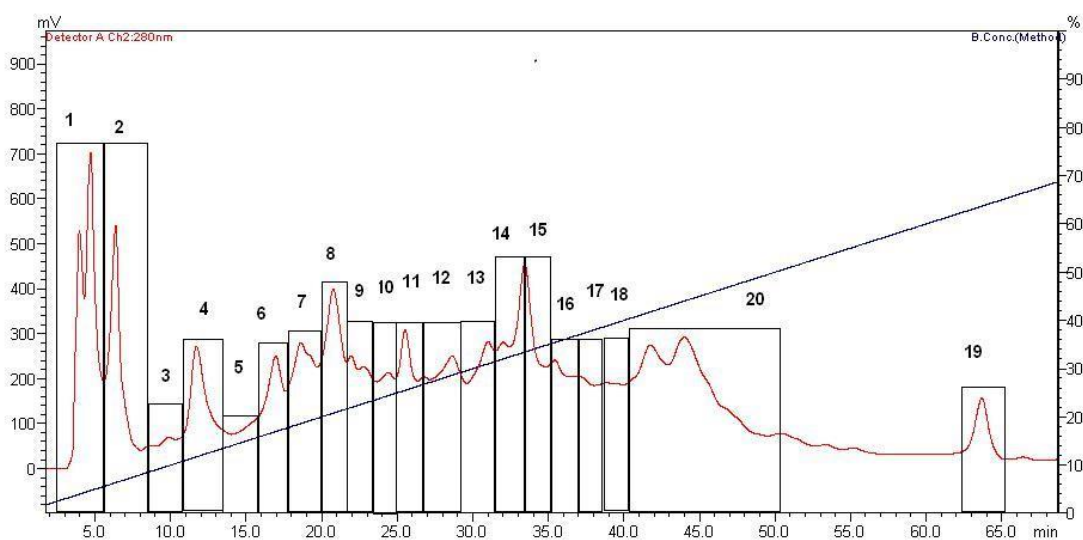


Figura 7 - Perfil cromatográfico de 250 µL de veneno de *Bothrops jararaca* (23 mg/mL) em coluna Shim-Pack DEAE de troca aniônica para HPLC. A linha diagonal indica o gradiente de eluição pelo tampão B (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M) variando de 0-80% em 80 min.

Tabela 2 - Ensaio de atividade enzimática das frações provenientes da DEAE-HPLC sobre o substrato Abz-Serine										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
UF/ min	40,8	19,8	20,5	45,3	59,8	78,1	294,4	115	123	881,4
	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
UF/ min	795,6	1510,7	1485,9	1503,3	1275,5	1324,3	2279,6	1872,2	115,7	3356

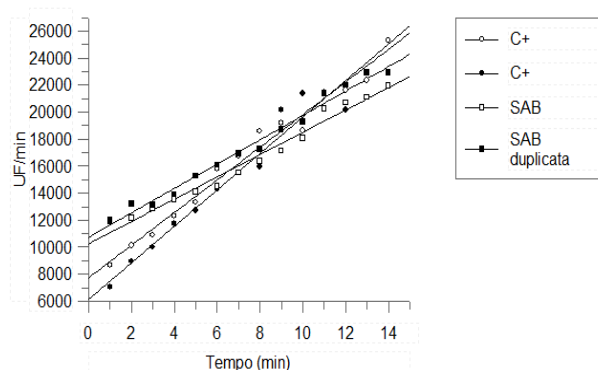


Figura 8 – Ensaio de inibição enzimática de F20 pelo SAB. F20 foi pré incubada com o SAB (10 μ L) em seguida 5 μ M do substrato FRET Abz-Serine foi adicionado. Os controles positivos estão indicados como C+, os grupos tratados com soro antibotrópico estão indicados como SAB.

A fração F20, como demonstrado acima, apresenta uma boa atividade sobre o substrato Abz-Serine, que não é bloqueada pelo uso do soro antibotrópico (Figura 8). A fim de prosseguirmos a purificação da fração F20, nós submetemos esta amostra a uma cromatografia em fase reversa utilizando uma coluna C8 em HPLC (Figura 9). Os picos foram coletados e a subfração F20-9, destacada na Figura 8, ainda se mostrou ativa e não teve sua atividade bloqueada pela pré-incubação com o SAB e foi inibida efetivamente pelo PMSF (Figura 10). A pureza da subfração F20-9 foi analisada em um gel SDS-PAGE 13% corado por nitrato de prata (Figura 11).

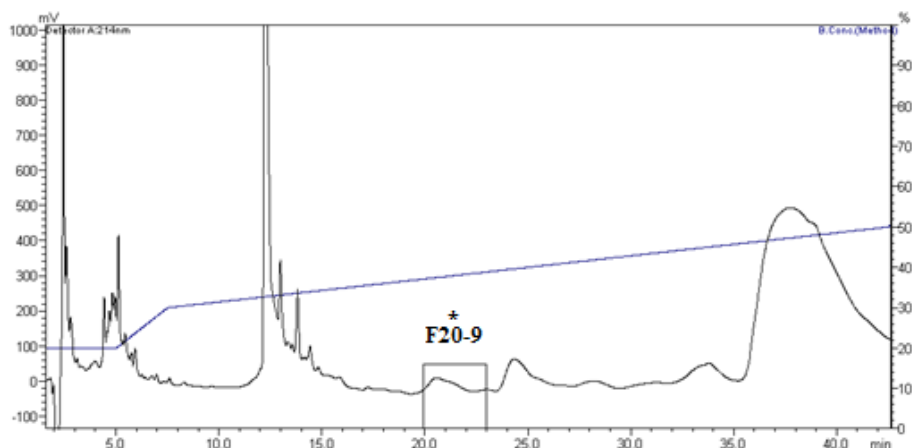


Figura 9 - Perfil cromatográfico em C8-HPLC da fração 20 da cromatografia de troca iônica. A subfração destacada apresentou atividade sobre o substrato Abz-Serine, porém não neutralizadas pelo soro antituberculoso. A linha azul representa o gradiente utilizado do tampão B do HPLC.

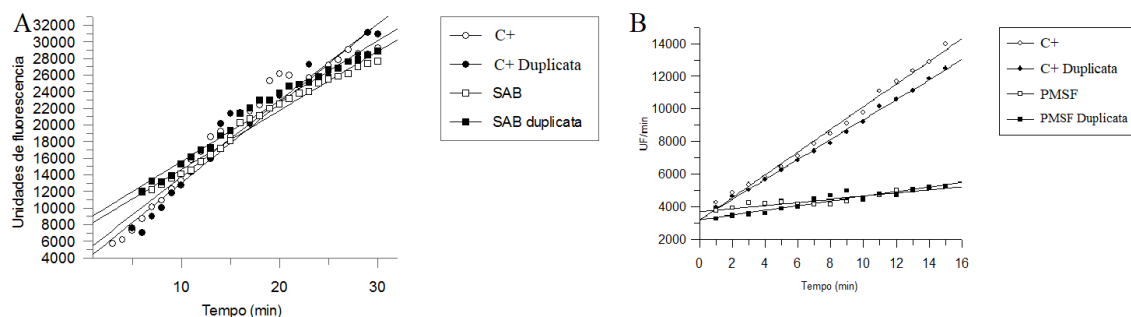


Figura 10 – Ensaio de inibição enzimática de F20-9 pelo SAB (Painel A) e PMSF (Painel B). F20-9 proveniente da cromatografia de fase reversa foi pré incubada com o SAB (10 μ L) e o PMSF (3 mM) em seguida adicionado 5 μ M do substrato FRET Abz-Serine. Os controles positivos estão indicados como C+, os grupos tratados com soro antituberculoso estão indicados como SAB e os grupos tratados com o PMSF estão indicados como PMSF.

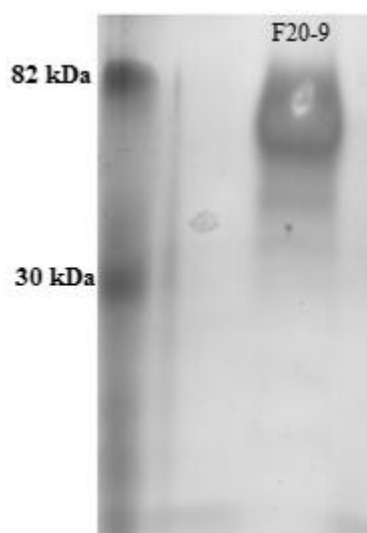


Figura 11 - Gel eletroforese 13% corado por nitrato de prata da subfração F20-9.

As frações F10 a F13 também mostraram boa atividade sobre o Abz-Serine (Tabela 2), mas também demonstraram a presença de contaminantes quando foram submetidas à cromatografia de fase reversa utilizando coluna C8. A figura 12 mostra os perfis em C8-RP-HPLC onde foram coletadas as subfrações de cada fração proveniente da cromatografia de troca iônica (F10 a F13). Todas foram analisadas junto ao substrato Abz-Serine e do soro antibotrópico do Instituto Butantan. As frações destacadas na figura 11 mostraram atividade sobre o substrato, porém não houve inibição da mesma pelo soro antibotrópico (Figura 13). O PMSF também foi utilizado para nos assegurarmos de estarmos selecionando serinopeptidases (resultados não mostrados).

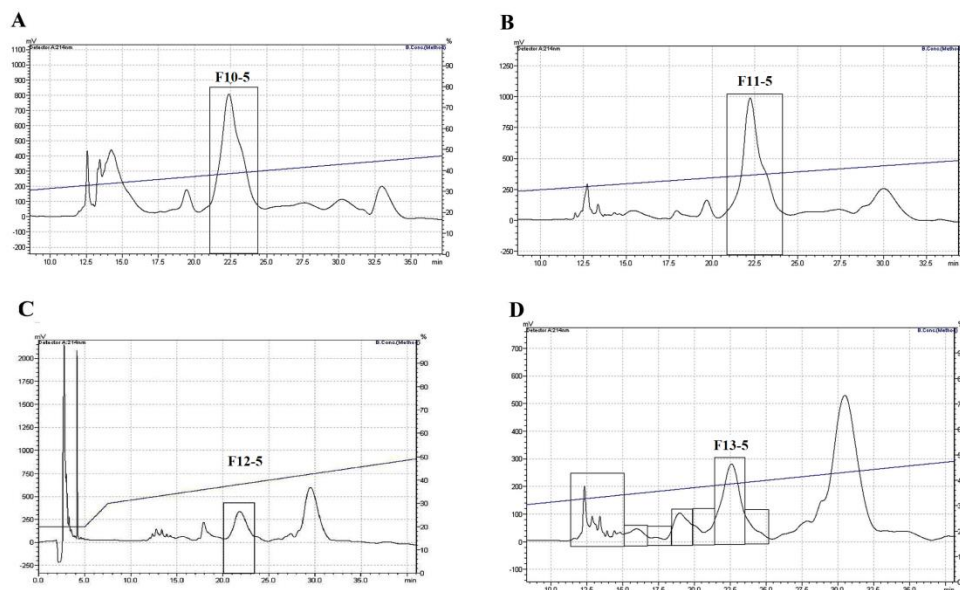


Figura 12 - Perfis cromatográficos em C8-HPLC das frações 10 (Painel A), 11 (Painel B), 12 (Painel C) e 13 (Painel D). As subfrações nomeadas apresentaram atividade sobre o substrato Abz-Serine, porém não neutralizadas pelo soro antibotrópico. Alinha azul representa o gradiente utilizado do tampão B do HPLC.

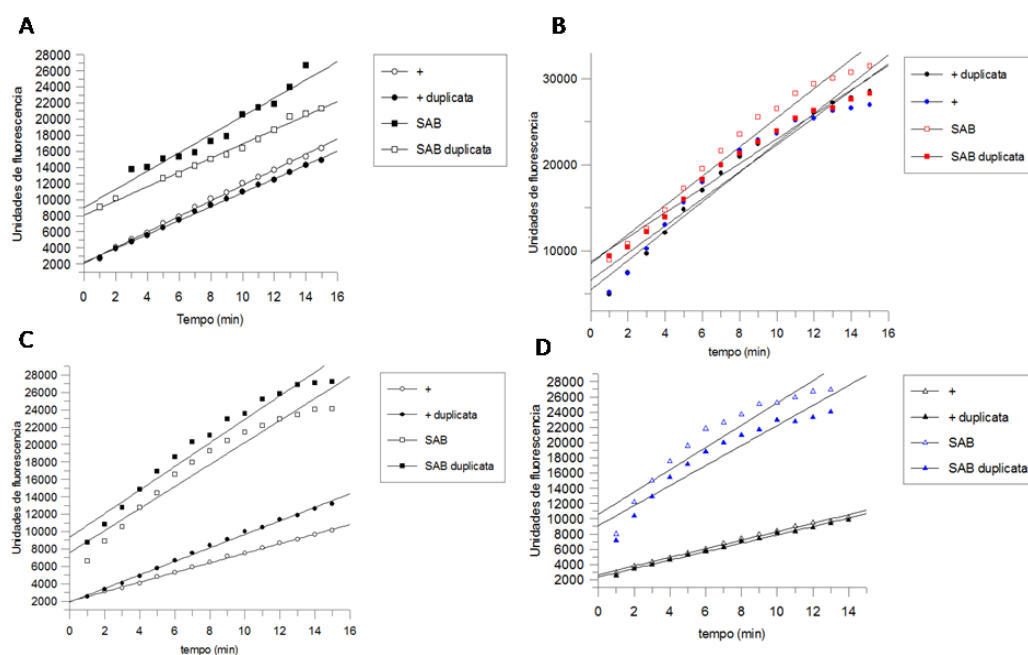


Figura 13 - Teste de atividade enzimática utilizando o substrato Abz-Serine ($5\mu\text{M}$) com as frações da cromatografia de fase reversa. A)F10-5, B)F11-5, C)F12-5 e D)F13-5. SAB = soro antibotrópico. Os controles positivos estão representados pelo sinal +.

Um perfil eletroforético de cada uma das subfrações pode ser observado na Figura 14, onde 2 µg de cada uma delas foi submetido a eletroforese em gel SDS-PAGE 13% e corado por nitrato de prata. Como esperado, as subfrações apresentaram perfis eletroforéticos similares, pois são provenientes de frações com intervalo muito próximo na cromatografia de troca iônica (Figura 7).

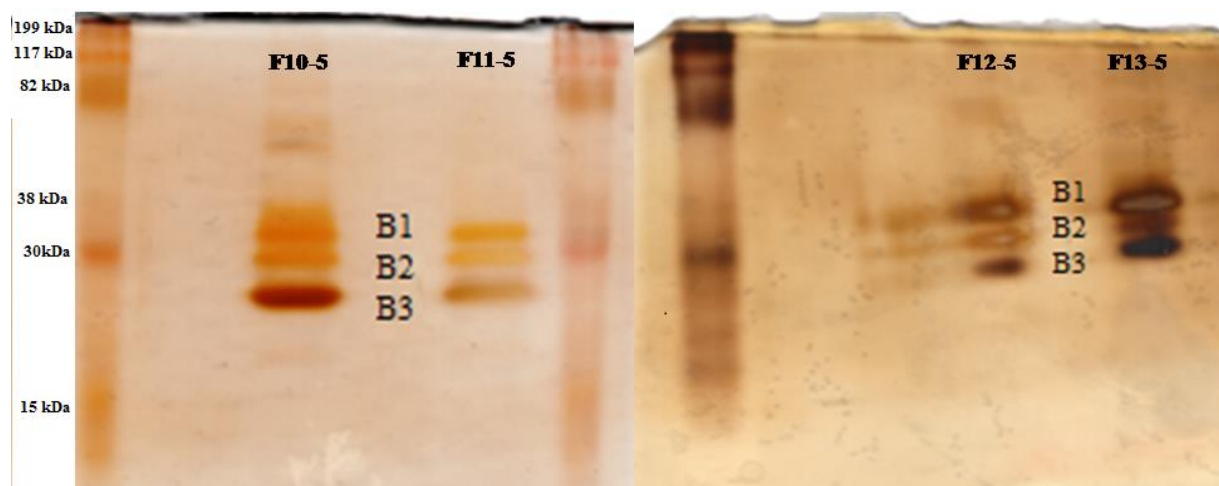


Figura 14 - Gel eletroforese 13% corado por nitrato de prata contendo das subfrações F10-5, F11-5, F12-5 e F13-5. As bandas B1-B3 de cada amostra foram recortadas separadamente e submetidas à análise por espectrometria de massas.

Para a identificação das proteínas presentes nas bandas B1-B3, todas elas foram recortadas separadamente e as proteínas foram identificadas através da espectrometria de massas. Como esperado, as bandas B1, B2 e B3 foram identificadas como as mesmas proteínas nas três frações analisadas. O resultado confirmou se tratarem de serinopeptidases de *Bothrops jararaca*, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3- Identificação das proteínas por espectrometria de massas					
Banda do Gel	Identificação	Massa	Score	Matches	Sequências
B1	O13069 KN-BJ2	28561	938	101(54)	13(13)
B2	Q5W960 HS112	28654	686	88(46)	13(11)
B3	Q5W959 HS114	28509	6585	301(225)	14(14)
F20-9	Q9PTU8 BPA	28724	459	43(26)	6(5)

Diversos fragmentos dessas proteases foram identificados na análise como demonstrado na figura 15, sendo que a HS114 teve mais da metade da sua sequência primária coberta com base nos resultados obtidos. É importante dizer que a sequência desta serinopeptidase só havia sido obtida anteriormente por técnicas de transcriptoma e, portanto, estão presentes as porções do peptídeo sinal e do pró-peptídeo. Assim, a cobertura da HS114, assim como as demais enzimas identificadas, seria ainda maior caso levássemos em consideração apenas as serinopeptidases maduras.

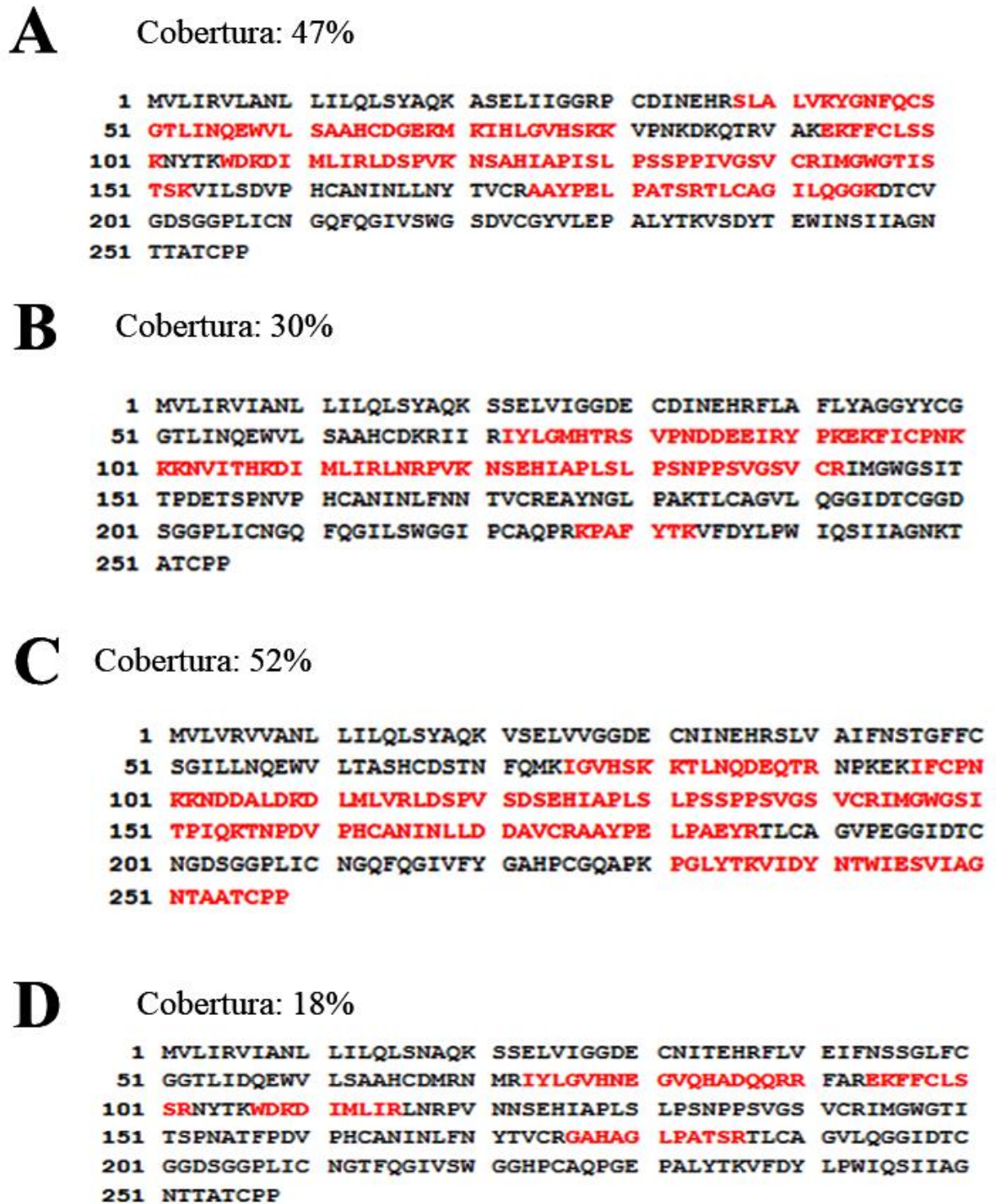


Figura 15 – Identificação e cobertura das serinopeptidases do VBJ não neutralizadas pelo SAB. A) KN-BJ; B) HS112; C) HS114; D) BPA. Em vermelho estão destacados os fragmentos encontrados nas análises por espectrometria de massas.

Após confirmação do isolamento de quatro serinopeptidases do VBj, novas purificações foram realizadas a fim de se obter as cinco subfrações F10-5, F11-5, F12-5, F13-5 e F20-9. Estas subfrações foram as únicas a apresentarem bom rendimento e quantidades de proteínas suficientes para avançarmos para etapa de imunização dos camundongos. Porém, para isso, as cinco subfrações tiveram que ser compostas em uma única amostra, totalizando 2 mg de serinopeptidases, e denominamos esta amostra como SVSPpool.

4.2.2 Obtenção e purificação dos antissoros experimentais contra o SVSPpool em duas linhagens murinas

Sete animais de duas linhagens, BALB/c e C57BL/6, foram imunizados com o SVSPpool. Além da limitação de concentração de amostra, a escolha de imunizar os animais com um *pool* de serinopeptidases teve como base mimetizar o processo de imunização na produção do SAB, onde os cavalos são imunizados com um *pool* de venenos botrópicos, mas neste caso com uma única classe de toxinas. O sangue desses animais foram coletados na etapa de sangria final, processados para obtenção do soro e, posteriormente, as IgGs foram purificadas através da cromatografia de afinidade a proteína A para obtenção dos soros experimentais (Figura 16). Os camundongos BALB/c proveram aproximadamente 1,4 mg de IgGs purificadas, enquanto que os camundongos C57BL/6 forneceram cerca de 3 mg.

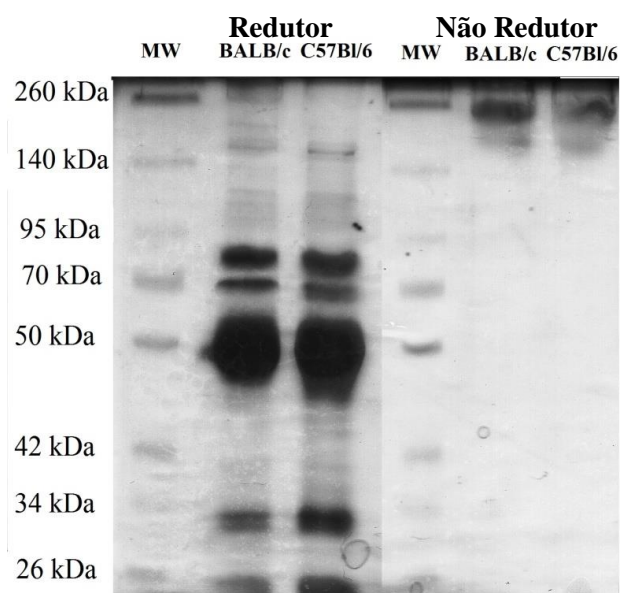


Figura 16 – Perfil eletroforético dos soros experimentais. 5 µg de IgGs purificadas do sangue dos camundongos BALB/c e C57BL/6 pela cromatografia de afinidade a proteína A foram submetidas a eletroforese em condições redutoras e não redutoras.

4.2.3 Reconhecimento e titulação do soro antibotrópico do Instituto Butantan e dos soros experimentais de camundongos contra o SVSPpool

A titulação de anticorpos específicos contra o SVSPpool foi estimada através de ELISA, e para isso placas de 96 poços *high binding* foram sensibilizadas com 1 µg do *pool* de serinopeptidases isoladas do VBJ que não tinham sua atividade neutralizada pelo SAB junto ao soro dos animais (1ª sangria), IgGs purificadas e dois lotes de SAB. Como visto na Figura 17 o soro comercial do Instituto Butantan reconhece e apresenta bons títulos contra estas proteínas, o que nos leva a concluir que estas serinopeptidases são imunogênicas e que o soro possui anticorpos específicos contra essas moléculas. Porém, como temos demonstrado, não há um impedimento suficiente por parte das imunoglobulinas presentes no soro antibotrópico que resulte na neutralização da atividade proteolítica. A imunogenicidade do SVSPpool também pôde ser comprovada pelos títulos dos antissoros experimentais (Figura 17). Assim, ambas as linhagens, BALB/c e C57BL/6, responderam de maneira satisfatória quando da imunização com o SVSPpool, porém os títulos dos camundongos BALB/c foram mais altos em todas as amostras analisadas, sejam do soro de animais individuais ou das IgGs purificadas. O título da amostra contendo as IgGs dos camundongos BALB/c foram comparáveis ao SAB 1 e até mais elevados que os títulos do lote SAB 2.

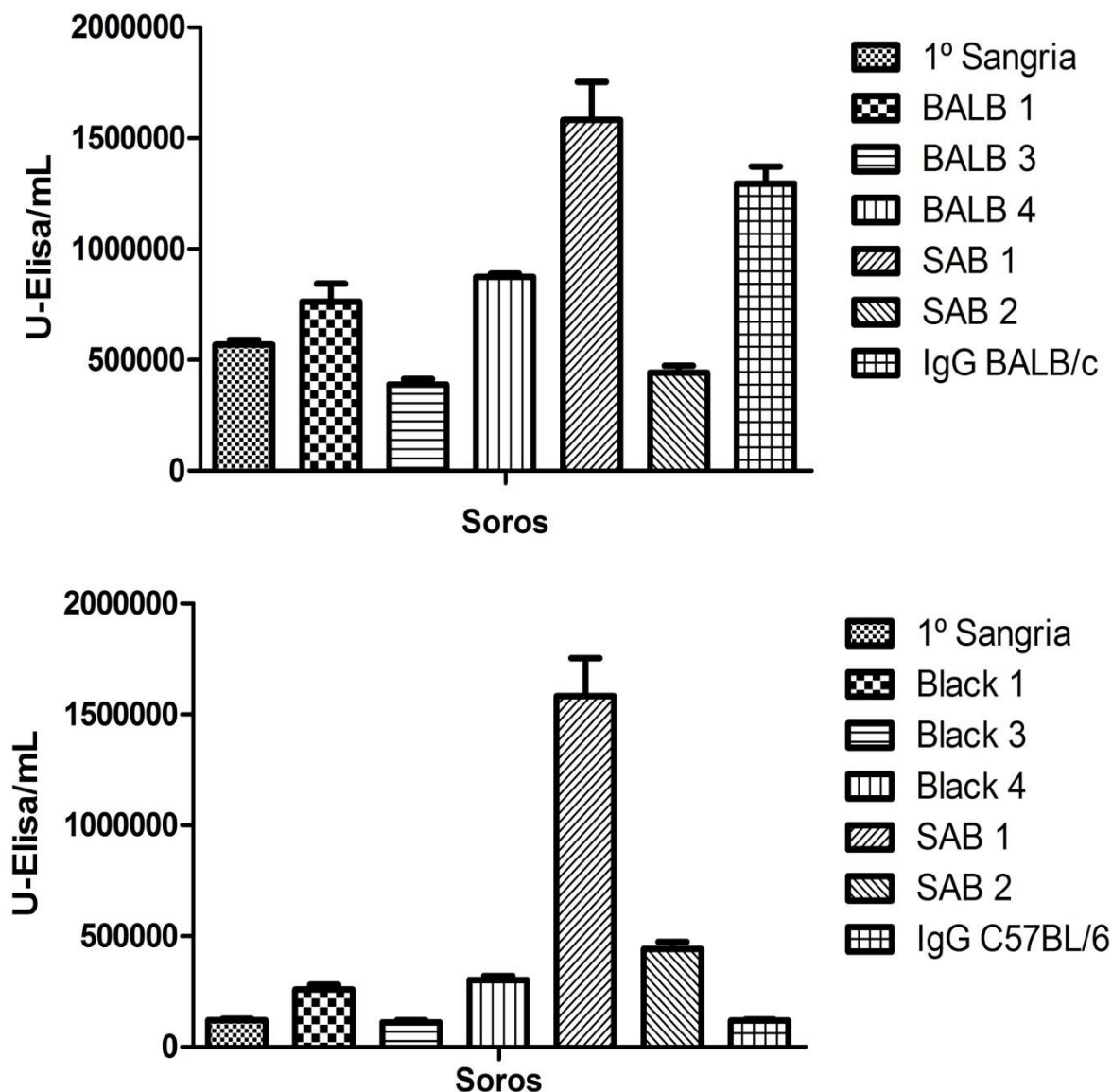


Figura 17 – Titulação dos soros experimentais e comerciais por ELISA. As placas foram sensibilizadas com o pool de serinopeptidases isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* e foram avaliados os títulos dos soros experimentais em relação ao SAB. A) Soros obtidos dos animais BALB/c, onde BALB 1- BALB 4 representam soros individuais, SAB 1-2 representam os lotes do antiveneno comercial e IgG BALB/c representa as imunoglobulinas purificadas. B) Soros obtidos dos animais C57BL/6, onde Black 1- Black 4 representam soros individuais, SAB 1-2 representam os lotes do antiveneno comercial e IgG C57BL/6 representa as imunoglobulinas purificadas.

Aparentemente os títulos das amostras contendo as IgGs dos camundongos C57BL/6 e BALB/c foram inferiores ao SAB 1, porém ao se levar em consideração a concentração proteica das amostras, ambos apresentam titulação específica superior aos SAB 1 e 2 (Figura 18). Esta análise não foi possível com os soros brutos dos animais uma vez que diversas proteínas plasmáticas e celulares estão presentes nas amostras

mesmo após as etapas de centrifugação, impedindo determinação da concentração apenas da porção das imunoglobulinas e, por isso, apenas os antissoros purificados foram utilizados nesta análise.

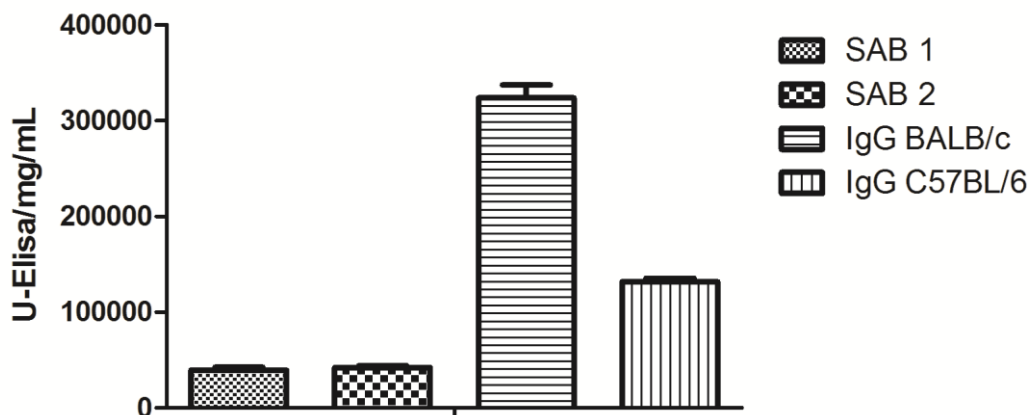


Figura 18 – Titulação em relação à concentração proteica dos SABs e soros experimentais purificados dos camundongos BALB/c e C57BL6

Consideramos que as IgGs purificadas de ambas as linhagens, além de apresentarem bons títulos e não apresentarem proteínas plasmáticas que poderiam interferir no ensaio de atividade enzimática por competir com o substrato FRET, são amostras mais próximas do SAB, uma vez que ele é composto somente por fragmentos de IgGs. Assim, decidimos prosseguir apenas com a caracterização dos antissoros experimentais purificados, como descrito a seguir.

4.2.4 Western Blot

As IgGs purificadas do soros dos camundongos BALB/c foram capazes de reconhecer quatro proteínas presentes no SVSPpool com massas em torno de 75 kDa, 50 kDa, 30 kDa e 25 kDa, enquanto que as IgGs dos camundongos C57BL/6 não reconheceram a proteína de 75 kDa (Figura 19, painel A). Comparando o SDS-PAGE que foi realizado em paralelo (Figura 19, painel B), podemos observar que, apesar da serinopeptidase BPA (Bothrops Protease A) que corresponderia a banda de 75 kDa não estar em concentrações altas no pool, os camundongos BALB/c ainda assim foram capazes de induzir uma resposta imune específica produzindo anticorpos contra ela. O mesmo aconteceu com a proteína de aproximadamente 50 kDa que também não é

revelado pela impregnação por prata porém induziu uma resposta imune em ambas as linhagens. Esta última pode ser um pequeno rastro de contaminação por queratina humana, e uma vez que o ensaio é extremamente sensível, ele foi capaz de reconhecer esta proteína mesmo em pequenas quantidades no SVSPpool. As bandas presentes entre 30 e 25 kDa correspondem as outras três serinopeptidases isoladas, KN-BJ2, HS112 e HS114.

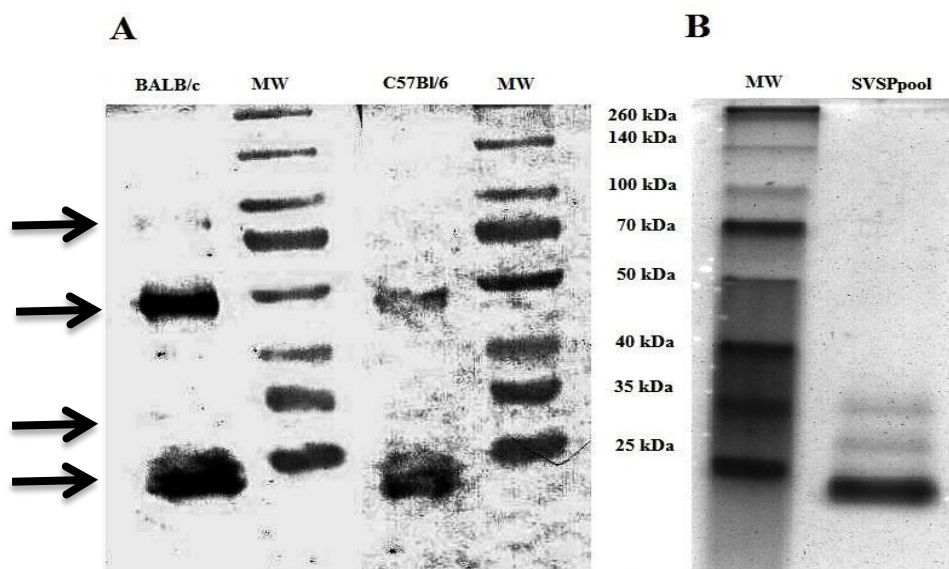


Figura 19 – Western Blot dos soros experimentais. Painel A – Ensaio de reconhecimento de SVSPpool pelos soros experimentais proveniente dos camundongos BALB/c e C57BL/6. Painel B – SDS-PAGE 12 % de SVSPpool feito em paralelo à transferência para o ensaio de reconhecimento.

4.2.5 Avidéz relativa

O agente caotrópico KSCN é capaz de dissociar interações fracas entre proteínas, neste caso a ligação antígeno-anticorpo. A figura 20 mostra que o tratamento com 4M de KSCN por 15 min foi capaz de reduzir em quase 78% e 79 % a ligação do soro experimental dos camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente, com as SVSPs presentes no pool de serinopeptidases purificadas, enquanto que reduziu apenas 26% e 35% a ligação do SAB 1 e SAB 2, respectivamente. O teste *One Way* ANOVA somente indicou ser estatisticamente significativa a diferença na redução da D.O. dos soros experimentais.

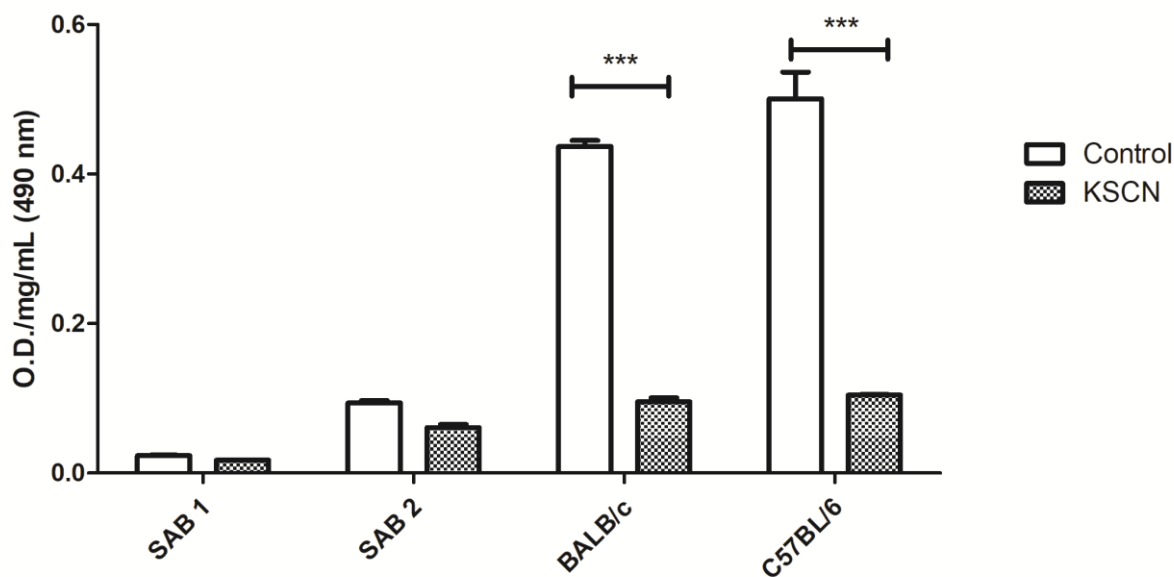


Figura 20 - Ensaio de avides relativa. As placas foram sensibilizadas com o SVSPpool e a avides dos soros experimentais proveniente dos camundongos BALB/c e C57BL/6 e do SAB (1 e 2) foram avaliados na presença do agente caotrópico KSCN. One way ANOVA *** $p < 0,001$

4.2.6 Soroneutralização das serinopeptidases *in vitro*

Três doses de antiveneno foram utilizadas na tentativa de verificar a eficácia dos soros experimentais quando comparados com o SAB para a neutralização do SVSPpool. Ambos os soros experimentais foram capazes de neutralizar a atividade peptidásica do SVSPpool sobre o substrato FRET em diferentes extensões. As IgGs dos camundongos BALB/c apresentaram um melhor potencial de neutralização (~80%) na maior dose (500:1) quando comparado com as IgGs dos camundongos C57BL/6 (~25%), porém, em doses menores, esta diferença foi reduzida (Figura 21). Como demonstrado nas tentativas de soroneutralização anteriores, o SAB não foi capaz de neutralizar as atividades do SVSPpool.

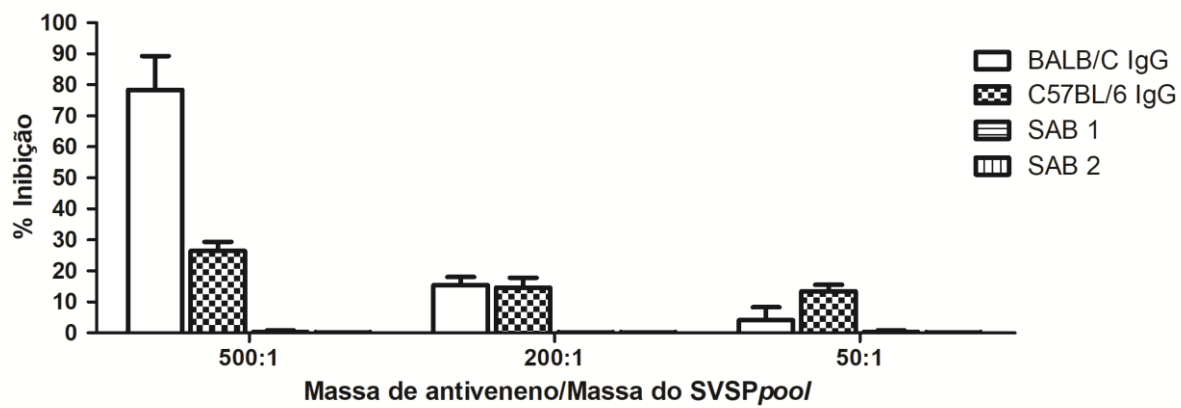


Figura 21 – Ensaio de soroneutralização *in vitro* da atividade de SVSPpool sobre o substrato FRET Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp pelos soros experimentais e comerciais.

5 DISCUSSÃO

Após a criação dos soros antivenenos pelo Instituto Butantan, há mais de 100 anos, muitas sequelas e mortes humanas foram evitadas no país. Ao longo destes anos o processo de produção do mesmo sofreu modificações objetivando uma maior eficácia e segurança. Atualmente os antídotos são compostos por fragmentos $F(ab')_2$ obtidos através da digestão das IgGs por pepsina e de etapas de cromatografia. Estas mudanças certamente melhoraram a segurança e a eficácia deste produto, mas acreditamos que podemos dar mais um passo neste sentido no futuro, uma vez que a neutralização de alguns sintomas ainda não são tão bem resolvidos (BATTELLINO et al., 2003; DA SILVA et al., 2007; GALVÃO NASCIMENTO et al., 2010; LEÓN et al., 2000; PICOLO et al., 2002). Neste sentido, este trabalho demonstrou que algumas serinopeptidases do veneno de *Bothrops jararaca* não são bem neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan. Porém, a inoculação de um pool contendo estas enzimas em modelos murinos foi capaz de produzir soros experimentais contendo imunoglobulinas com potencial neutralizante superior ao produto comercial em testes *in vitro*.

Considerando que a identificação de substratos para as proteases de venenos é uma etapa crucial para o melhor entendimento das funções destas toxinas no envenenamento, decidimos por estudar a possível hidrólise de vários peptídeos biologicamente ativos pelo VBj. Assim, a primeira parte deste trabalho descreveu a atividade do VBj sobre peptídeos biologicamente ativos, mostrando que, além da habilidade de hidrólise de substratos macromoleculares, este veneno tem atividade sobre oligopeptídeos. Os peptídeos escolhidos para o desenvolvimento do presente trabalho estão relacionados com a manutenção de energia, regulação da pressão sanguínea, dor e regulação dos níveis de glicose/insulina e glucagon, principalmente.

O veneno total da *Bothrops jararaca* foi capaz de hidrolisar a maioria dos peptídeos ativos utilizados, com exceção para as encefalina (Leu-encefalina e Met-encefalina). Os peptídeos foram mais suscetíveis à hidrólise por serinopeptidases ao invés de metalopeptidases, que são os componentes mais abundantes neste veneno. Talvez, este fenômeno possa ser explicado pela observação recente de que o veneno da *B. jararaca* é susceptível à autólise quando comparado com o veneno tratado com inibidores de peptidases no momento da solubilização, porém a quantidade de

fragmentos encontrados de metalopeptidases foi sensivelmente superior ao das serinopeptidases, demonstrando que estas últimas são enzimas mais estáveis no veneno (NICOLAU et al., 2017). Contudo, a grande maioria dos trabalhos realizados com o veneno de *Bothrops jararaca* foi desenvolvida sem a adição de inibidores no momento da solubilização e, claramente, estes trabalhos demonstram quais são os substratos proteicos preferenciais de metalo- ou serinopeptidases tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, acreditamos ser mais provável que nossos resultados demonstrem a maior atividade serinopeptidásica sobre os peptídeos utilizados ao invés de uma maior presença destas enzimas pelas suas estabilidades no veneno.

Dentre os melhores substratos encontrados estão os peptídeos da família do neuropeptídeo Y, que é composta pelo neuropeptídeo Y, peptídeo YY e o polipeptídeo pancreático. Estes peptídeos são compostos por 36 resíduos de aminoácidos com amidação do resíduo de tirosina no C-terminal e apresentam uma estrutura tridimensional peculiar denominada PP-*fold*, uma vez que a primeira estrutura descrita foi a do polipeptídeo pancreático. Porém, a família é identificada como família do NPY por este peptídeo ser mais basal de todos no sentido evolutivo (CONLON, 2002). Todos os três foram preferencialmente hidrolisados pela classe das serinopeptidases do VBj. Apesar da homologia entre eles ser de cerca de 70%, a hidrólise de PYY foi quase dez vezes menor que a de NPY e PP, demonstrando certa especificidade por parte destas enzimas. Em adição, nossos resultados demonstraram que os níveis de neutralização da hidrólise destes substratos pelo SAB variaram bastante entre os membros desta família, sendo que a menor inibição ocorreu quando utilizado o NPY como substrato. Estes resultados também demonstraram que pelo menos uma serinopeptidase deste veneno não foi neutralizada pelo soro.

A análise dos pontos de clivagens indicaram que o VBj é capaz de remover o tríptido presente no C-terminal de todos os membros da família do NPY. O resíduo de tirosina amidada no C terminal dos peptídeos da família do NPY é muito importante para que possam executar suas atividades biológicas, uma vez que já foi demonstrado que a remoção deste resíduo causa a perda de suas funções *in vivo* por ser a região a se ligar aos seus receptores (GRUNDEMAR; HAKANSON, 1990). Os receptores da família do NPY pertencem à superfamília das rodopsinas acopladas a proteína G e possuem seis tipos em mamíferos, Y1 a Y6, sendo que NPY e PYY possuem maior afinidade por Y1, Y2 e Y5 enquanto que PP se liga preferencialmente ao Y3

(LARHAMMAR et al., 2001). Esta possível inativação do NPY e do PP pelo veneno pode estar associado com o sintoma de hipotensão apresentado por algumas das vítimas acidentadas, uma vez que estes peptídeos têm suas atividades relacionadas *in vivo* com o efeito de vasoconstrição (HODGES; SPARKS, 2014). Relacionado a este sintoma, é importante ressaltar alguns outros agentes presentes no VBj que também contribuem com a hipotensão, como: a existência da família dos peptídeos potencializadores da bradicinina (CAMARGO et al., 2012); a resistência à hidrólise da bradicinina e a hidrólise da angiotensina I pelo VBj (KUNIYOSHI et al., 2012); a presença de uma serinoprotease capaz de liberar bradicinina do cininogênio de baixa massa molecular denominada KN-BJ (SERRANO et al., 1998). Conjuntamente, estes novos resultados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de ação que acarretam o sintoma de hipotensão apresentados no quadro do envenenamento humano pelo VBj.

O PP e o PYY podem também inibir a secreção de insulina (BOEY et al., 2006; DENG; WHITCOMB, 2006), e a hidrólise destas moléculas pelo VBj poderia promover uma alteração energética durante o envenenamento. Esta observação está de acordo com resultados que descrevem uma alteração nos níveis da glicose plasmática em camundongos experimentalmente injetados com o veneno de *Bothrops jararacussu* (ZENI et al., 2007). Entretanto, alterações nos níveis de glicose no envenenamento experimental por *Bothrops alternatus* é controverso, uma vez que Mello et al. (2010) observaram um aumento nos níveis de glicose na urina de ratos envenenados experimentalmente, enquanto que Dias et al. (2012) não observaram alterações significativas nos níveis de glicose no sangue de cães anestesiados. Desta forma, nossos resultados em associação com esta controvérsia na literatura mostram que este fenômeno merece uma atenção maior em estudos futuros.

A escolha da SP para o desenvolvimento do nosso trabalho foi muito importante, uma vez que este peptídeo foi o único substrato exclusivamente hidrolisado por metalopeptidases do VBj. A análise por espectrometria de massas demonstrou que o único fragmento intacto da SP foi o SP₁₋₆, e este fragmento já foi reportado como incapaz de ativar o receptor da neurocinina-1 (VIGNA, 2001), indicando uma inativação da SP por metalopeptidases presentes no VBj. Okamoto et al. (2014) isolaram uma metaloprotease da classe P-I do veneno de *B. moojeni* também com atividade sobre a SP, e curiosamente, três dos quatro pontos de clivagens detectados no nosso trabalho coincidem com os resultados publicados, indicando a presença de uma

protease BmooMP α -I símile no VBj. Outra metalopeptidase denominada lebetase I, isolada do veneno da serpente *Vipera lebetina*, também foi capaz de hidrolisar a SP e um dos sítios de clivagem descrito para esta protease (Gly-Leu) coincidiu com os nossos resultados (TRUMMAL et al., 2000). O SAB foi capaz de quase completamente neutralizar a atividade do VBj sobre a SP, com ação similar ao EDTA, demonstrando a eficácia do soro comercial em neutralizar a(s) metalopeptidase(s) responsável(is) por esta atividade. A substância P pertence à família das taquicicninas, cujos membros compartilham uma sequência C-terminal comum Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde o X, no caso da SP, é um resíduo de fenilalanina. As taquicicninas apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, devido à existência de três ou mais subtipos de receptores. A SP é o mais potente ligante para o receptor de alta afinidade da neurocinina-1 (NK-1) que, por sua vez, pertence à superfamília de receptores ligados à Proteína G. A SP foi inicialmente descrita como um peptídeo com ação antinociceptiva dependente de receptores opioides (HALL; STEWART, 1983; YEOMANS; PROUDFIT, 1992), mas posteriormente, foi também caracterizada como um importante componente do sistema cardiovascular, modulando a frequência cardíaca e a pressão sanguínea (MISTROVA; KRUZLIAK; CHOTTOVA DVORAKOVA, 2016). A atividade antinociceptiva da SP é controversa, e aparentemente é dose dependente (DE FELIPE et al., 1998; FREDERICKSON et al., 1978; OEHME et al., 1980). A degradação deste peptídeo pelo VBj pode estar ligada a dor persistente no local da picada e também no sintoma de hipotensão apresentado por alguns acidentados.

Os três membros da família do neuropeptídeo Y e a substância P são substratos já caracterizados para a serinoprotease dipeptidilpeptidase IV (DPP IV), uma vez que esta apresenta especificidade primária para a remoção de dipeptídeos contendo resíduos de prolina ou alanina na segunda posição a partir do N-terminal de proteínas e peptídeos (MENTLEIN, 1999). A presença da DPP IV já foi detectada em diversos venenos de serpentes (AIRD, 2008) e, além disso, a atividade desta enzima já foi avaliada sobre substrato sintético específico utilizando o VBj (GASPARELLO-CLEMENTE; SILVEIRA, 2002). Entretanto, a atividade sobre estes peptídeos não foi observada empregando a metodologia descrita neste trabalho, que demonstrou somente a degradação da substância P por metalopeptidases e não houve a geração dos peptídeos NPY (3-36) e PYY (3-36). Isso talvez se deva a uma atividade preferencial por metalopeptidases no caso da substância P, formando o fragmento SP₁₋₆, ou então, uma

atividade preferencial de serinoendopeptidases, como no caso de NPY e PYY, que apesar de gerarem fragmentos que apresentam um resíduo de prolina na posição 2 a partir do N-terminal, não foram hidrolisados pela possível DPP IV símile do VBj.

Alguns estudos já demonstraram que a somatostatina (STT) possui um efeito antinociceptivo quando injetado em diferentes modelos animais, e que também foi capaz de inibir diversos tipos de dor. Portanto, a degradação deste peptídeo pelo VBj pode estar relacionado com a persistente dor local descrita pelos pacientes acidentados (RAI et al., 2015). O SAB não foi capaz de bloquear a hidrólise da STT, ao contrário do PMSF que inibiu completamente esta atividade do veneno. Não sabemos ao certo quantas são as serinopeptidases que atuam na hidrólise da STT, mas podemos afirmar que o soro comercial não foi capaz de neutralizar ao menos uma serinopeptidase do VBj. Um fenômeno idêntico, isto é, a falha do soro comercial em bloquear a atividade de serinopeptidases já foi observada quando estudada a hidrólise da dinorfina A, angiotensina I e substratos FRET seletivos para metalopeptidases e serinopeptidases do VBj (KUNIYOSHI et al., 2012).

Alguns estudos já demonstraram que a cadeia B da insulina pode ser degradada por metalopeptidases e serinopeptidases do VBj (MANDELBAUM; CARRILLO; HENRIQUES, 1967; TANIZAKI et al., 1989). E em relação à especificidade primária destas enzimas do veneno, este trabalho mostrou pontos de clivagem em comum quando comparado com as metaloproteases bothropasina e jararhagina (Ala-Leu e Tyr-Leu), e pontos similares com a serinoprotease BPA, Tyr-Leu, com resíduos hidrofóbicos aromáticos na posição P1 (FOX et al., 1986).

Este substrato foi hidrolisado por ambas as classes de proteases e claramente mostrou uma boa neutralização de metalopeptidases pelo SAB, uma vez que o ponto de clivagem em Ala-Leu foi totalmente extinto. Em contrapartida, o ponto de hidrólise em Tyr-Leu foi parcialmente inibido pelo soro, e uma vez que tanto metalo- quanto serinopeptidases clivam esta ligação, é possível que o mesmo fenômeno ocorrido com a STT, angiotensina-I e a dinorfina 1-13 também esteja ocorrendo nos estudos de hidrólise da cadeia B, ou seja, uma falha de bloqueio de atividade de serinopeptidases.

A Leu-encefalina e a Met-encefalina já foram descritas como substratos para o veneno de *Naja atra* (ANDERSON et al., 1998; ANDERSON; DUFTON, 1997), porém este não foi o caso neste estudo, uma vez que estes dois peptídeos foram resistente à hidrólise pelo VBj mesmo após longos períodos de incubação. Este fato já

esperado uma vez que os venenos das serpentes do gênero *Naja* levam as vítimas a um quadro de alterações neuromotoras do sistema gastrointestinal (HUNG; LIAU; LIN-SHIAU, 2003), mas não o VBj. Talvez a clivagem das encefalinas possam estar relacionadas com este fato, já que elas possuem um papel importante no controle neuronal da motilidade intestinal (HOYLE et al., 1990).

Assim, após estes estudos, pudemos concluir que o veneno total da *B. jararaca* é capaz de inativar a grande maioria dos peptídeos bioativos testados, porém, não podemos excluir a possibilidade de que os fragmentos gerados a partir das hidrólises possuam atividades biológicas ainda não descritas. Em adição, os estudos sobre a eficácia do SAB em prevenir as hidrólises dos peptídeos bioativos demonstrou uma baixa soroneutralização de serinopeptidases do VBj, e, como isto já havia sido observado com outros peptídeo biologicamente ativos, angiotensina I e dinorfina 1-13, iniciamos estudos visando um melhor entendimento deste fato. Todos os resultados de caracterização do VBj sobre os peptídeos bioativos foram publicados e estão presentes no Anexo A.

A fim de investigar a falta de neutralização de algumas serinopeptidases do VBj quatro delas, que tiveram comprovada falta de neutralização pelo SAB, foram isoladas e identificadas. KN-BJ2 é uma serinoprotease de 38 kDa com atividade liberadora de bradicinina e a fibrinogenolítica (SERRANO et al., 1998). As HS112 e HS114 são serinoproteases putativas que tiveram suas sequências determinadas por uma biblioteca de cDNA que utilizou uma sonda para KN-BJ a fim de procurar proteínas semelhantes (SAGUCHI et al., 2005), porém esta é a primeira vez que estas duas serinopeptidases foram purificadas do VBj. BPA é uma serinoprotease com atividade fibrinogenolítica altamente glicosilada de aproximadamente 67 kDa, muito estável em altas temperaturas (86 °C por 10 min) e diferentes pH (3-9) (HENRIQUES et al., 1958; PAES LEME et al., 2008).

Estas SVSP compuseram o SVSPpool, e a imunização dos camundongos com estas proteínas foi capaz de induzir a produção de anticorpos em ambas as linhagens estudadas. Entretanto os soros dos camundongos BALB/c apresentaram melhores títulos e, mais importante, melhor potencial neutralizante *in vitro* quando comparado com os soros obtidos dos camundongos C57BL/6. Esta diferença era esperada de certa maneira, uma vez que este fenômeno foi demonstrado anteriormente para diferentes antígenos (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010; VLKOVA et al., 2012), e esta característica foi

um dos motivos para estas duas linhagens terem sido escolhidas. Esta diferença pode ser explicada uma vez que estes animais apresentam diferentes respostas imunes, sendo que os camundongos BALB/c predominantemente apresentam uma resposta imune do tipo TH1 onde os linfócitos TCD4+ secretam IL-1, interferon- γ e linfotóxina, enquanto que os C57BL/6 apresentam resposta TH2 secretando IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (QUIMBY; LUONG, 2007). Assim, nossos resultados mostraram que a escolha dos animais influencia na obtenção do produto final, indicando que modelos animais com a resposta imune voltada preferencialmente para TH1 sejam mais adequados uma vez que as IgGs dos camundongos BALB/c apresentaram título de anticorpos específicos mais altos e um melhor potencial neutralizante da atividade *in vitro* quando comparado com as IgGs produzidas pelos C57BL/6.

A seguir serão mais bem exploradas as variáveis que podem explicar as diferenças entre o SAB e os soros experimentais, mas um quadro comparativo resumindo a caracterização dos soros está apresentado abaixo para melhor compreensão dos resultados.

Tabela 4 – Resumo comparativo do SAB vs soros experimentais			
	ELISA	Avidez relativa	Neutralização
SAB	+	++	-
BALB/c	+++	+	+++
C57BL/6	++	+	++

Um dos principais fatores que pode ajudar a explicar o sucesso dos soros experimentais que obtivemos, é a imunização dos animais com o SVSPpool em contraste ao protocolo padrão de imunização nos cavalos, que são imunizados com o veneno total de cinco serpentes (*B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacuçu* e *B. alternatus*), gerando uma concentração maior de imunoglobulinas específicas contra enzimas presentes nestes venenos, que não as serinopeptidases presentes no pool. Em adição, o soro comercial, apesar de apresentar bons títulos contra elas, não é capaz de produzir uma neutralização eficaz da sua atividade. Talvez isso se deva a um repertório menor contra os epítomos das serinopeptidases quando comparado com a imunização das mesmas isoladas. O ensaio de immunoblot demonstrou que serinopeptidases que se apresentavam em baixíssimas concentrações no SVSPpool, e que nem ao menos foram reveladas por nitrato de prata no gel realizado em paralelo ao ensaio, foram fortemente

reconhecidas, indicando possuírem um potencial imunogênico superior as outras proteínas. E, portanto, este fenômeno também pode estar ocorrendo em uma escala ainda maior quando utilizado o protocolo de imunização normal citado acima com todos os venenos juntos, o que explicaria uma resposta menor na produção de imunoglobulinas específicas e com menor variabilidade contra epítomos das serinopeptidases.

Outro fator que pode ter contribuído com a eficácia do soro experimental foram as imunizações realizadas com o adjuvante Santa Barbara Amorphous (SBA-15), que pode ter sido um auxílio importante para a produção destes anticorpos com potencial neutralizante. As partículas de SBA-15 têm uma estrutura altamente organizada e, por causa de suas propriedades físico-químicas, apresentam um grande potencial para aplicação em diferentes áreas. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas na superfície, mas também dentro dos nanoporos de aproximadamente 10 nm de diâmetro. Essa sílica é sintetizada em meio ácido e tem uma estrutura com notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica. Atualmente, vários estudos promissores estão em curso no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Já foi demonstrado que a sílica SBA-15 é eficiente na produção de antivenenos experimentais em ovelhas contra os venenos de *Apis mellifera* e *Crotalus durissus terrificus* (SEABRA FERREIRA JUNIOR et al., 2010). A utilização da SBA-15 como adjuvante também é capaz de induzir a produção de anticorpos em altos títulos, mesmo em camundongos que geneticamente foram caracterizados como maus respondedores para produção de anticorpos (CARVALHO et al., 2010).

Um fator que aparentemente não interferiu na eficácia do soro experimental foi sua avidéz relativa, uma vez que as D.Os. dos lotes do soro comercial não tiveram uma redução significativa na presença do agente caotrópico como aconteceu com os soros experimentais, indicando que a especificidade dos anticorpos para com as enzimas é mais importante que a sua força de ligação. Novamente, este fato pode ser explicado pela presença de anticorpos de alta avidéz no soro comercial, mas contra um epítomo que não causa uma alteração alostérico ou impedimento no centro ativo da peptidase. Ao contrário, no caso do soro experimental, onde somente as enzimas purificadas foram inoculadas, uma variedade maior de regiões delas podem ter sido apresentadas ao sistema imune dos camundongos.

O soro antibotrópico do Instituto Butantan é recomendado em todos os graus de

envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, se iniciando com 2 ampolas em casos leves, podendo chegar na aplicação de até 12 ampolas em casos severos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Neste último caso, a utilização de até 12 ampolas para o tratamento de um acidentado, corresponderia à aplicação de 120 mL de SAB, o que poderia corresponder a uma aplicação de 4.800 mg (concentração do SAB 1 utilizado neste trabalho) de proteínas heterólogas, ou até mais, dependendo do lote aplicado. Assim, a melhora na eficiência do produto geraria um benefício para a segurança dos acidentados, uma vez que já foi demonstrado que o número de pacientes que apresentaram reações anafiláticas imediatas após a aplicação de quatro ampolas é menor (83,3%) do que quando aplicado o dobro de ampolas (100%) (CARDOSO et al., 1993). Estes valores foram considerados muito altos pelos autores e, possivelmente, foram levados aos fabricantes uma vez que um novo estudo foi realizado anos mais tarde e demonstraram que 25% dos pacientes apresentaram reações anafiláticas imediatas (FAN et al., 1999). Esta foi uma redução impressionante que com certeza ocorreu em resposta a novos protocolos no processo de produção, mas mesmo assim é um percentual que deve ser melhorado considerando que ocorrem mais de 20.000 acidentes botrópicos por ano. Além disso, deve-se levar em consideração que dentre as reações adversas aos soros, o soro antibotrópico apresenta a maior frequência de reações adversas dentre todos os soros produzidos pelo Instituto Butantan (GATTÁS et al., 2017). Um novo processo de imunização poderia ser um grande passo para a obtenção de um produto final superior que necessite de doses ainda menores, diminuindo talvez o número de pacientes que apresentam reações adversas ao soro, e talvez, uma economia aos cofres públicos.

O Instituto Butantan foi o primeiro produtor de soros antivenenos da América Latina e estimulou o avanço de pesquisas na área do ofidismo. Até os dias atuais, nenhum método de neutralização de peçonha é mais eficaz do que o proposto por Vital Brazil, em 1898. Portanto, cabe aos pesquisadores em atividade, compreenderem a composição dos venenos, bem como suas atividades biológicas, visando expandir e aprimorar a qualidade dos antivenenos, que desde o final do século XIX, salvam inúmeras vidas.

Este trabalho demonstrou que a imunização dos animais com serinoproteases isoladas pode ser uma forma de tornar o produto melhor, mas isso só foi possível com duas etapas de cromatografia. Entretanto, nenhuma inovação do SAB poderá ser

considerada factível se os custos do processo não forem viáveis. Todavia, estratégias empregadas para a redução do custo dos lotes de antivenenos não podem desconsiderar a importância da qualidade do produto final. Assim, no futuro, mais estudos são necessários a fim de tornar o processo ainda mais exequível, como: obter as serinoproteases com apenas uma etapa de purificação e verificar a eficácia do esquema de imunização em cavalos e, após a obtenção do novo soro, compará-lo com o SAB.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou novos substratos peptídicos para o VBj que podem estar relacionados com o envenenamento por esta espécie. Pelo menos uma serinopeptidase não foi neutralizada pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan.

Este fenômeno nos levou a estudar as causas dessa falha e, para isso, quatro serinopeptidases foram selecionadas por não terem sua atividade neutralizada pelo SAB e isoladas com sucesso.

Estas enzimas purificadas foram fonte de material para a imunização de camundongos de duas linhagens, BALB/c e C57BL/6, e induziram a produção de anticorpos com potencial neutralizante superior ao soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan. Mesmo as IgGs dos camundongos C57BL/6 que apresentaram um potencial neutralizante menor quando comparado as IgGs dos camundongos BALB/c foram muito mais eficazes na neutralização das serinopeptidases quando comparado ao soro comercial.

Os resultados deste trabalho demonstram que o método de imunização por si é uma estratégia efetiva na obtenção melhores anticorpos independente do modelo animal utilizado ser imunologicamente bom ou mau respondedor. Espera-se que no futuro, com o aprofundamento dos estudos, que este ótimo produto que é o SAB do Instituto Butantan possa ser ainda melhor.

REFERÊNCIAS*

- AIRD, S. D. Snake venom dipeptidyl peptidase IV: Taxonomic distribution and quantitative variation. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 2, p. 222–228, 2008.
- ANDERSON, L. A.; DUFTON, M. J. the Action of Taiwan Methionine Enkephalin : Oligopeptidase Cobra Venom on a Useful Assay for. **Analysis**, v. 35, n. 1, 1997.
- ANDERSON, L.; BUSSLER, B.; MARTINS, H.; DUFTON, M. Enkephalin-processing oligopeptidases in cobra venom: Inhibition by thiorphan and bestatin reveals co-operative actions. **Toxicon**, v. 36, n. 5, p. 719–728, 1998.
- BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **The Biochemical journal**, v. 237, n. 3, p. 935, 1 ago. 1986.
- BARRETT, A. J.; WOESSNER, J. F.; RAWLINGS, N. D. **Handbook of proteolytic enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 1
- BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 583–593, 2003.
- BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5377–92, 21 set. 2015.
- BOEY, D.; LIN, S.; KARL, T.; BALDOCK, P.; LEE, N.; ENRIQUEZ, R.; COUZENS, M.; SLACK, K.; DALLMANN, R.; SAINSBURY, A.; HERZOG, H. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1360–70, 21 jun. 2006.
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e733, 2010.
- CAMARGO, A. C. M.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M. T. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 516–23, 15 mar. 2012.
- CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (Bothrops jararaca) in São Paulo, Brazil. **Q J Med**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARVALHO, L. V.; RUIZ, R. . C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. R.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C.; SANT'ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 7829–7836, 2010.

CONLON, J. M. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). **Peptides**, v. 23, n. 2, p. 269–78, fev. 2002.

DA SILVA, N. M.; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L.; MORAES, R. A.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by Bothrops snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 196–205, 2007.

DE FELIPE, C.; HERRERO, J. F.; O'BRIEN, J. A.; PALMER, J. A.; DOYLE, C. A.; SMITH, A. J.; LAIRD, J. M.; BELMONTE, C.; CERVERO, F.; HUNT, S. P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 394–7, 26 mar. 1998.

DENG, X.; WHITCOMB, D. C. Pancreatic Polypeptide. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2006. p. 1097–1107.

DIAS, L.; RODRIGUES, M. A. P.; SMAAL, A.; RENNÓ, A. L.; MELLO, S. M.; MORENO, H.; HYSLOP, S. Cardiovascular responses to Bothrops alternatus (Urutu) snake venom in anesthetized dogs. **Cardiovascular toxicology**, v. 12, n. 3, p. 243–57, 17 set. 2012.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Comment on “Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms”. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1109–1110, jun. 2011.

FAN, H. W.; MARCOPITO, L. F.; CARDOSO, J. L.; FRANÇA, F. O.; MALAQUE, C. M.; FERRARI, R. A.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for bothrops snake bites. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 318, n. 7196, p. 1451–2, 29 maio 1999.

FOX, J. W.; CAMPBELL, R.; BEGGERLY, L.; BJARNASON, J. B. Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. **European journal of biochemistry**, v. 156, n. 1, p. 65–72, 1 abr. 1986.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–30, jun. 2008.

FREDERICKSON, R. C.; BURGIS, V.; HARRELL, C. E.; EDWARDS, J. D. Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 199, n. 4335, p. 1359–62, 24 mar. 1978.

GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M. C.; AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 2–3, p. 343–52, fev. 2010.

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

GATTÁS, V. L.; BRAGA, P. E.; KOIKE, M. E.; LUCCHESI, M. B.; PRECIOSO, A. R.; GATTÁS, V. L.; BRAGA, P. E.; KOIKE, M. E.; LUCCHESI, M. B.; PRECIOSO, A. R. Perfil de segurança dos soros heterólogos produzidos pelo Instituto Butantan, São Paulo-SP, no período de 2012 a 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p. 639–647, jul. 2017.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 69–100, 1993.

GONÇALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L.; JORGE, R. J. B.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; DE MIRANDA, J.; NOWATZKI, J.; DE MORAIS-ZANI, K.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNÁNDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORRÊA-NETTO, C.; CALVETE, J. J. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 73–89, 1 mar. 2016.

GRUNDEMAR, L.; HAKANSON, R. Effects of various neuropeptide Y/peptide YY fragments on electrically-evoked contractions of the rat vas deferens. **British journal of pharmacology**, v. 100, n. 1, p. 190–2, maio 1990.

HALL, M. E.; STEWART, J. M. Substance P and antinociception. **Peptides**, v. 4, n. 1, p. 31–5, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6191314>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

HENRIQUES, O. B.; LAVRAS, A. C.; FICHMAN, M.; MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, S. B. The proteolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*. **The Biochemical journal**, v. 68, n. 4, p. 597–605, abr. 1958.

HODGES, G. J.; SPARKS, P. A. Noradrenaline and neuropeptide Y contribute to initial, but not sustained, vasodilatation in response to local skin warming in humans. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 2, p. 381–392, 1 fev. 2014.

HOYLE, C. H.; KAMM, M. A.; BURNSTOCK, G.; LENNARD-JONES, J. E. Enkephalins modulate inhibitory neuromuscular transmission in circular muscle of human colon via delta-opioid receptors. **The Journal of physiology**, v. 431, p. 465–78, dez. 1990.

HUNG, D.-Z.; LIAU, M.-Y.; LIN-SHIAU, S.-Y. The clinical significance of venom detection in patients of cobra snakebite. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 41, n. 4, p. 409–15, mar. 2003.

- ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7628–31, 5 jun. 1988.
- KINI, R. M. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4–5, p. 200–204, 19 maio 2006.
- KUNIYOSHI, A. K.; ROCHA, M.; CAJADO CARVALHO, D.; JULIANO, M. A.; JULIANO NETO, L.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. C. V. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 1, p. 124–31, jan. 2012b.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093545>>. Acesso em: 19 out. 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LARHAMMAR, D.; WRAITH, A.; BERGLUND, M. M.; HOLMBERG, S. K.; LUNDELL, I. Origins of the many NPY-family receptors in mammals. **Peptides**, v. 22, n. 3, p. 295–307, mar. 2001.
- LEFEBVRE, J. M.; QANADLI, S. D.; KACHER, S.; ABERKANE, L.; RIGAUD, M.; LACOMBE, P.; ROCHA, P. A new vascular sealant (Sealgel) to achieve rapid hemostasis after percutaneous angioplasty in anticoagulated patients: clinical feasibility and preliminary results. **European radiology**, v. 11, n. 3, p. 454–9, 15 fev. 2001.
- LEÓN, G.; VALVERDE, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 2, p. 233–44, fev. 2000.
- MADHAVAN, R.; JACOBS, B. S.; LEVINE, S. R. Stroke trials: what have we learned? **Neurological research**, v. 24 Suppl 1, p. S27-32, 2002.
- MANDELBAUM, F. R.; CARRILLO, M.; HENRIQUES, S. B. Proteolytic activity of *Bothrops* protease A on the B chain of oxidized insulin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 132, n. 2, p. 508–10, 15 mar. 1967.
- MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, fev. 2013.
- MELLO, S. M.; LINARDI, A.; RENNÓ, A. L.; TARSITANO, C. A. B.; PEREIRA, E. M.; HYSLOP, S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 470–480, 2010.
- MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S.; MAMEDE, C. C.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F.; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops*

pirajai snake venom on the complement system and the inflammatory response. **Int Immunopharmacol**, v. 15, n. 4, p. 764–771, 2013.

MENTLEIN, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. **Regulatory peptides**, v. 85, n. 1, p. 9–24, 30 nov. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde Brasília, , 2009 .

MISTROVA, E.; KRUZLIAK, P.; CHOTTOVA DVORAKOVA, M. Role of substance P in the cardiovascular system. **Neuropeptides**, v. 58, p. 41–51, 2016.

NICOLAU, C. A.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, 2017.

OEHME, P.; HILSE, H.; MORGENSTERN, E.; GÖRES, E. Substance P: does it produce analgesia or hyperalgesia? **Science (New York, N.Y.)**, v. 208, n. 4441, p. 305–7, 18 abr. 1980.

OKAMOTO, D. N.; KONDO, M. Y.; OLIVEIRA, L. C. G.; HONORATO, R. V.; ZANPHORLIN, L. M.; CORONADO, M. A.; ARAÚJO, M. S.; DA MOTTA, G.; VERONEZ, C. L.; ANDRADE, S. S.; OLIVEIRA, P. S. L.; ARNI, R. K.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; MURAKAMI, M. T.; GOUVEA, I. E. P-I class metalloproteinase from Bothrops moojeni venom is a post-proline cleaving peptidase with kininogenase activity: Insights into substrate selectivity and kinetic behavior. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 3, p. 545–552, mar. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Neglected Tropical Diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 24 jul. 2017.

PAES LEME, a F.; PREZOTO, B. C.; YAMASHIRO, E. T.; BERTHOLIM, L.; TASHIMA, a K.; KLITZKE, C. F.; CAMARGO, a C. M.; SERRANO, S. M. T. Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 6, n. 8, p. 1363–72, ago. 2008.

PARRY, M. A.; JACOB, U.; HUBER, R.; WISNER, A.; BON, C.; BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure (London, England : 1993)**, v. 6, n. 9, p. 1195–206, 15 set. 1998.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by Bothrops jararaca and Bothrops asper snake venoms. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 10, p. 1221–1228, 2002.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V; FURTADO, M. D. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of

Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 8, p. 842–51, 15 dez. 2008.

QUIMBY, F. W.; LUONG, R. H. Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse. **The Mouse in Biomedical Research**, v. 3, 2007.

RAI, U.; THRIMAWITHANA, T. R.; VALERY, C.; YOUNG, S. A. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 98–110, ago. 2015.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero Bothrops: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475–480, dez. 1997.

SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from Bothrops jararaca venom gland. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 72–83, 2005.

SEABRA FERREIRA JUNIOR, R.; PAVAN ANDERLINI, R.; AUGUSTO BRAZIL ESTEVES SANT' ANNA, O.; CARVALHO PIMENTA, D.; DE OLIVEIRA ORSI, R.; BARRAVIERA, B. New nanostructured silica adjuvant (SBA-15) employed to produce antivenom in young sheep using Crotalus durissus terrificus and Apis mellifera venoms detoxified by cobalt-60. **J Toxicol Environ Health A**, v. 73, n. 13–14, p. 926–933, 2010.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M. Y.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H. G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980–989, 2010.

SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; 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. **European journal of biochemistry**, v. 251, n. 3, p. 845–53, 1 fev. 1998.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1115–32, 15 jun. 2005.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14440–5, 10 dez. 1996.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.;

- SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2442, 12 set. 2013.
- SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARCELINO, J. R.; RIBEIRO DA CUNHA, L. E.; GUTIÉRREZ, J. M.; TAMBOURGI, D. V. Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab')₂ antivenoms. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 3, p. 574–84, mar. 2014.
- TANIZAKI, M. M.; ZINGALI, R. B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of Bothrops jararaca (jararaca). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 27, n. 7, p. 747–55, 1989.
- TARLINTON, D.; GOOD-JACOBSON, K. Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. **Science (New York, N.Y.)**, v. 341, n. 6151, p. 1205–11, 13 set. 2013.
- TRUMMAL, K.; VIJA, H.; SUBBI, J.; SIIGUR, J. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from Vipera lebetina snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1476, n. 2, p. 331–336, 2000.
- VIGNA, S. R. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. **Neuropeptides**, v. 35, n. 1, p. 24–31, fev. 2001.
- VLKOVA, M.; ROHOUSOVA, I.; HOSTOMSKA, J.; POHANKOVA, L.; ZIDKOVA, L.; DRAHOTA, J.; VALENZUELA, J. G.; VOLF, P. Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by Phlebotomus papatasi. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1719, 2012.
- WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. a; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89–91, 2 jan. 2010.
- YAMASHITA, K. M.; ALVES, A. F.; BARBARO, K. C.; SANTORO, M. L. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.
- YEOMANS, D. C.; PROUDFIT, H. K. Antinociception induced by microinjection of substance P into the A7 catecholamine cell group in the rat. **Neuroscience**, v. 49, n. 3, p. 681–91, ago. 1992.
- ZENI, A. L. B.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of Bothrops jararacussu venom in mice. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 664–676, 2007.
- ZHANG, J.; XIN, L.; SHAN, B.; CHEN, W.; XIE, M.; YUEN, D.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; LAJOIE, G. A.; MA, B. PEAKS DB: de novo sequencing assisted

database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 4, p. M111.010587, abr. 2012.

ZHANG, Y.; MEYER-HERMANN, M.; GEORGE, L. A.; FIGGE, M. T.; KHAN, M.; GOODALL, M.; YOUNG, S. P.; REYNOLDS, A.; FALCIANI, F.; WAISMAN, A.; NOTLEY, C. A.; EHRENSTEIN, M. R.; KOSCO-VILBOIS, M.; TOELLNER, K.-M. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 3, p. 457–64, 11 mar. 2013.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 227–234, 2010.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

In vitro cleavage of bioactive peptides by peptidases from *Bothrops jararaca* venom and its neutralization by bothropic antivenom produced by Butantan Institute: Major contribution of serine peptidases



Alexandre Kazuo Kuniyoshi^{a,1}, Roberto Tadashi Kodama^{a,1},
Luis Henrique Ferreira Moraes^a, Bruno Duzzi^a, Leo Kei Iwai^b, Ismael Feitosa Lima^b,
Daniela Cajado-Carvalho^a, Fernanda Vieira Portaro^{a,*}

^a Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

^b Special Laboratory of Applied Toxinology/Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

article info

Article history:

Received 9 May 2017

Received in revised form

19 July 2017

Accepted 20 July 2017

Available online 28 July 2017

Keywords:

Antivenom

Bioactive peptides

Bothrops jararaca venom

Metallopeptidases

Serine peptidases

abstract

In Brazil, envenomation by *Bothrops* pitvipers is responsible for over 73% of snakebites, and their venom is a rich source of proteolytic enzymes. Most studies have demonstrated that *Bothrops jararaca* venom acts on macromolecular substrates, causing an imbalance in the victim's hemostatic system. In contrast, fewer studies have examined the proteolytic activity on small molecules such as peptides. In this study, we used a set of bioactive peptides (insulin B chain, Met-enkephalin, Leu-enkephalin, neuropeptide Y, peptide YY, pancreatic polypeptide, substance P and somatostatin) to identify new peptide substrates for the metallopeptidases and serine peptidases from the *B. jararaca* venom. The majority of these peptides were substrates for the venom, but neuropeptide Y and pancreatic polypeptide presented higher hydrolyses rates. Although most of the peptides were simultaneously substrates for both classes of proteases, serine peptidases were the most active. Substance P was an exclusive substrate for metallopeptidases, while somatostatin was a selective substrate for serine peptidases. The neutralizing efficacy of the bothropic antivenom produced by the Butantan Institute was also assessed and found to totally prevent substance P hydrolysis, whereas somatostatin cleavage was not inhibited. Thus, the antivenom effectively inhibited metallopeptidase activity, but did not neutralize some of the serine peptidases. These results indicate that, in addition to cleaving proteins, the proteolytic enzymes from this venom also hydrolyze bioactive peptides, and this peptidase activity could effectively contribute to some of the many dire manifestations of envenomation.

© 2017 Elsevier Ltd. Open access under the [Elsevier OA license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Snakebite is a public health problem in tropical countries and, in Brazil, over 27,000 accidents are reported every year, with *Bothrops jararaca* being responsible for most of the cases (Ministério da Saúde, 2009). The administration of specific antivenom is the standard treatment for snakebite, as recommended by the World Health Organization (World Health Organization, 2010). Thus,

improvement in production, storage, distribution, as well as further studies on quality and safety of the sera produced, is of great importance to improve the current scenario.

Despite the great variety of components present in the venom from *Bothrops* species, proteomics and transcriptomics studies demonstrated that the *Bothrops jararaca* venom (BjV) is composed mainly of proteases (Fox and Serrano, 2008; Gonçalves-Machado et al., 2016; Nicolau et al., 2017). Also, SVMPs (snake venom metalloproteases) and SVSPs (snake venom serine proteases) are considered major toxins of the BjV. These enzymes are responsible for some of the severe symptoms described in patients, such as: strong local pain, bruising and blistering on the affected limb, spontaneous systemic bleeding in various organs, clotting

* Corresponding author. Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Prof. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: fernanda.portaro@butantan.gov.br (F.V. Portaro).

¹ These authors contributed equally to this study.

disturbances, hypotension, hemostatic disorders, shock and renal failure, when some of those symptoms can lead to death (Ministério da Saúde, 2009).

Classically, it has been attributed to SVMP mainly the role of hemorrhagic factors, degrading proteins such as laminin, fibronectin and collagen type IV (Markland and Swenson, 2013) while SVSPs are enzymes which affect the hemostatic system, acting on a variety of components of the coagulation cascade and on the fibrinolytic and kallikrein-kinin systems (Serrano and Maroun, 2005). However, recent studies have demonstrated that SVMP might have an even bigger part in the envenomation than was firstly thought, exerting several activities historically attributed to SVSPs like kininogenase and hypofibrinogenemia activities (Okamoto et al., 2014; Yamashita et al., 2014). It is also important to know that in addition to SVMPs and SVSPs, classified as endopeptidases, the presence of exopeptidases has also been reported as components of snake venoms. In this way, snake venom dipeptidyl peptidase IV and rhiminopeptidase A - serine peptidases presenting aminopeptidase activity ϵ have both already been described in several snake venoms (Aird, 2008; Ogawa et al., 2007, 2006; Vaiyapuri et al., 2010), even in BjV (Gasparello-Clemente and Silveira, 2002). Snake venom proteases are intensively explored, however, most studies usually focus on proteins as substrates. In contrast, little is known about the activity of these enzymes on biological active peptides that can also be important in envenomation. Notwithstanding, some studies using synthetic substrates, such as chromogenic and fluorescent peptides, can be found in the literature (Faiz et al., 1996; Kuniyoshi et al., 2012; Porto et al., 2007). Although less explored in the literature, we can hypothesized that endogenous peptides can be hydrolyzed by the venom. This inactivation/activation is of utmost importance, since these intracellular and intercellular signaling molecules regulate neural, endocrine and immune processes (Bhat et al., 2015).

Considering that snakebite is a public health issue, and that there is need for further information about BjV peptidase activity, we searched for biological active peptides as new substrates for metallopeptidases and serine peptidases in this venom, trying to understand some features of the bothropic envenomation. Furthermore, as the serum therapy is the recommended and used treatment for human envenomation, the efficacy of the anti-bothropic serum produced by the Butantan Institute was assessed to block these new activities.

1. Materials and methods

1.1. Reagents

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), neuropeptide Y (part number N5017), peptide YY (P1306), pancreatic polypeptide (P6410), substance P (S6883), insulin B chain (I6383), somatostatin (S9129), Met-enkephalin (M6638) and Leu-enkephalin (L9133) from Sigma-Aldrich. Acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from J.T. Baker.

1.2. Venoms and antivenoms

The lyophilized venom of *Bothrops jararaca* was provided by the Venom Section of the Butantan Institute. Stock solution was prepared in 50 mM sodium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.4 at 2.0 mg/mL final concentration. The bothropic antivenom (BAV) produced by the hyperimmunization of horses with venoms from *B. alternatus* (12.5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%) and *B. neuwiedii* (12.5%) was obtained from the Hyperimmune Plasmas Processing Section, Butantan Institute. The antivenom used (batch no. 0506110) had a protein concentration of

1.8 g/dL and each milliliter was able to neutralize 6.61 mg of *B. jararaca* venom (lethality test in mice). Protein measurements were made using a Quick Start Bradford assay kit (Bio Rad Protein Assay) according to the manufacturer's instructions.

1.3. HPLC analysis of bioactive peptides hydrolysis by BjV and its inhibition by EDTA and PMSF

BjV (2 mg) was incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 50 mM NaCl, at 37 °C for 30e120 min in a final volume of 100 mL, in order to maintain the hydrolysis levels below 10%, with the following bioactive peptides (25e75 mM): neuropeptide Y (NPY); peptide YY (PYY); pancreatic polypeptide (PP); substance P (SP); insulin B chain (IBC), somatostatin (STT); Leu-enkephalin (Leu-E) and Met-enkephalin (Met-E). The hydrolysis was analyzed using reverse-phase HPLC (Prominence, Shimadzu, Japan) at 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, as solvent A; and acetonitrile and solvent A (9:1), as solvent B. The separations were performed at a flow rate of 1 mL/min using a Restek Ultra C-18 column (4.6 × 150 mm) and a 20e60% gradient of solvent B over 20 min. In all cases, elution was followed by the measurement of ultraviolet absorption (214 nm). The inhibition of peptidase activity was determined using 100 mM EDTA and 3 mM of PMSF (the same volume of ethanol was used in the control group). The specific activities were expressed in mmoles of hydrolyzed substrate *per* mg of venom *per* minute (mmol/mg/min). All assays were performed in triplicate and the results were expressed as the mean ± SD.

1.4. Neutralization by antivenom *in vitro*

The ability of the antivenom to neutralize the peptidase activity of the venom was estimated as previously described (Kuniyoshi et al., 2012). Briefly, the antivenom (10 mL) was pre incubated for 30 min with 2 mg of BjV at room temperature, and this was followed by the addition of each bioactive peptide. BAV dose used for neutralization assays was stipulated through enzymatic neutralization curve (Supplementary Fig. 1) using selective FRET substrates for serinepeptidases (Abz-Ser) and metallopeptidases (Abz-Metal) (Kuniyoshi et al., 2012). The analysis was made at HPLC using a C-18 column, as described above, the experiments were conducted in triplicate and the results were expressed as the mean±SD (item 2.3).

1.5. Mass spectrometric analysis

The fragments generated by the hydrolysis of bioactive peptides using BjV were resuspended in 0.1% formic acid and analyzed in an Easy-nLC II nano HPLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) through a nano-electrospray ion source. The separation was carried out in a 10 cm column (75 mm I.D. × 350 mm O.D.) packed in-house with 5 mm Jupiter C-18 beads (Phenomenex). Peptides were eluted with a linear gradient of 5e95% acetonitrile, in 0.1% formic acid at a flow rate of 200 nL/min over 15 min. The nano-electrospray voltage was set to 2.1 kV, the source temperature to 200 °C and the spectrometer was operated in data-dependent mode where the 5 most intense peaks were selected for CID fragmentation after acquiring each full scan. The settings for the spectrometer were defined as: high-resolution full MS parameters (1 mscan; full MS mass range m/z of 200–2000 with a resolution of 60,000 and a target value of 1×10^4 ions; max injection time ¼ 100 ms). For fragment scans the settings were: isolation window of 2 Da, max list size of 500, exclusion duration time window of 15 s, a minimum signal of 5,000, activation time ¼ 10 ms and normalized collision energy ¼ 35%.

The raw data files were submitted to searches using PEAKS

Studio (version 7, Bioinformatics Solution, Waterloo, Canada) (Zhang et al., 2012). The search parameters were: no enzyme specificity; precursor mass tolerance set to ± 10 ppm and a fragment ion mass tolerance of ± 0.5 Da; oxidized methionine (M ± 15.994915 Da) and amidation (-0.98 Da) were set as variable modifications. The identified peptides were then sorted by their Average Local Confidence (ALC) $> 85\%$ to select the best spectra to annotate.

1. Results

1.1. HPLC analysis of bioactive peptide hydrolysis by BjV using EDTA and PMSF

Initially we examined the hydrolysis of the IBC, STT, SP, PP, NPY, PYY, Leu-E and Met-E by BjV and noted that NPY and PP were by far the best substrates for this venom, with hydrolysis rates around 40 times higher than for SP, the least hydrolyzed substrate. This observation is interesting since these two peptides belong to the neuropeptide Y family. NPY and PP were preferentially hydrolyzed by serine peptidases, with inhibition by PMSF varying from $59.5 \pm 13\%$ and $81 \pm 1.4\%$ when compared to positive controls. Somatostatin was hydrolyzed exclusively by serine peptidases, since PMSF totally inhibited its cleavage. In contrast, substance P was cleaved only by metallopeptidases with 100% inhibition by EDTA, there was no inhibition by PMSF (Fig. 1). Finally, Leu-E and Met-E were not hydrolyzed by BjV, even after prolonged incubation. All specific activities rates along with peptidase activity of BjV towards angiotensin I are shown in Supplementary Table 1.

1.2. Neutralization by antivenom

The commercial antivenom produced by the Butantan Institute (BAV) almost completely neutralized the cleavage of substance P, which is a substrate only for metallopeptidases. On the other hand, BAV did not prevent the hydrolysis of somatostatin, a specific substrate for venom serine peptidases ($< 10\%$ neutralization). The hydrolysis of pancreatic polypeptide (PP) and peptide YY was well neutralized by BAV, reaching $89 \pm 2.1\%$ inhibition; this was not the case for the neuropeptide Y, since the maximum inhibition obtained was $46.5 \pm 0.7\%$. Insulin B chain hydrolysis was also well neutralized by BAV, with $73.5 \pm 4.9\%$ inhibition (Fig. 1).

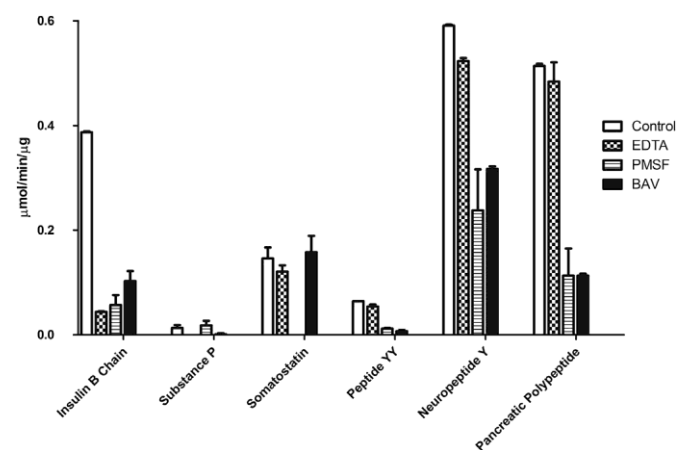


Fig. 1. Inhibition of bioactive peptide hydrolysis by BjV using EDTA, PMSF and BAV. Samples of BjV (2 mg) were incubated with the inhibitors (final volume $\frac{1}{4}$ 100 mL) and the results are expressed as specific activity of the venom (mmole//min/mg). Experiments were made in triplicate and are shown as means \pm SD.

1.3. Determination of cleavage points by mass spectrometry

The fragments of the biological active peptides, substrates for BjV, were manually collected (Supplementary Fig. 2) and analyzed by mass spectrometry, as shown in Fig. 2A (neuropeptide Y fragments, Supplementary Fig. 3) and Fig. 2B (IBC, STT and SP). It is important to note that only fragments with average local confidence (ALC) $> 85\%$ were considered for analysis. Several NPY, PYY and PP fragments presented Arg or Tyr residues at the P1 position (Schechter and Berger, 1967), indicating trypsin and chymotrypsin-like activities, since the hydrolysis of these substrates was preferentially inhibited by PMSF (Fig. 1). Also, the tripeptide C-terminus moiety (Gln/Pro-Arg-Tyr), present in all members of the neuropeptide Y family- and very important for performing their biological activities -was released in all three peptides by BjV. However, we observed a complex hydrolysis pattern of these three substrates, indicating that the BjV peptidases together can cleave sequences with hydrophobic, polar or charged amino acids at the P1 position. The number of different fragments generated from members of the neuropeptide Y family varied between 10 and 12 (Fig. 2A).

Somatostatin was cleaved at least at two points by serine peptidases, since PMSF totally inhibited formation of the FFWK fragment (Fig. 2B), which was the only one detected by mass spectrometry. Thus, somatostatin was cleaved between N-F and K-T, showing that BjV serine peptidases present a broad specificity of hydrolysis.

Substance P was cleaved in several points by metallopeptidases, with at least six fragments detected by mass spectrometry analysis. Only the N-terminal region of the peptide, RPKPQQ, was left intact (Fig. 2B).

Insulin B chain was hydrolyzed by both classes of peptidases, generating at least eight different fragments. Two out of three metallopeptidase cleavages detected in the presence of PMSF occurred when Leu was at the P1⁰ position (Ala-Leu and Tyr-Leu), which is in agreement with the specificity of SVMPs, such as bothropasin and atrolysin (Paes Leme et al., 2011). Again, one serine peptidase cleavage observed in the presence of EDTA, occurred when Tyr was at the P1 position, indicating chymotrypsin-like activity (Fig. 2B).

Comparison of the points of IBC cleavage when using BAV and EDTA, demonstrated that the hydrolysis between Ala-Leu residues was completely blocked by both, indicating an effectiveness of the commercial product to block metallopeptidases (Fig. 2B).

2. Discussion

Considering that identifying substrates is a crucial step to gain insights into the precise functions of venom peptidases and their mechanisms of action in biology and envenomation, we decided to study the possible hydrolysis of bioactive peptides by BjV. The main peptide substrates studied here are involved with the maintenance of energy homeostasis, blood pressure regulation, pain sensation and as regulators of glucose/insulin/glucagon levels. Surprisingly, the biological active peptides were most susceptible to serine peptidase degradation, instead of metallopeptidases, which are the most abundant toxins in BjV. This fact could be associated to the much higher autolysis rate described for SVMP than to SVSP, even in the presence of specific inhibitors (Nicolau et al., 2017). Although BjV hydrolyzed most of the peptides studied, not all were cleaved, as bradykinin and the enkephalins, which indicate a sort of selectivity of these enzymes toward some peptides, such as the members of the neuropeptide Y family. This family consists of 36 amino acid peptides exhibiting C-terminal amidation and includes the neuropeptide Y, peptide YY and the pancreatic polypeptide (Conlon, 2002). All three peptides were preferentially hydrolyzed

A

Neuropeptide Y	YPSKPN↓PGED↓AP↓AEDMARY↓Y↓SAL↓R↓H↓Y↓INLITR↓QRY-NH ₂
Peptide YY	YPIKP↓E↓A↓PG↓EDASPEE↓LNR↓YY↓AS↓LR↓H↓Y↓LN↓LVTR↓Q↓RY-NH ₂
Pancreatic Polypeptide	APLEPMYP↓GDYATHE↓QR↓A↓Q↓YETQL↓R↓R↓Y↓IN↓TLTR↓PRY-NH ₂

B

	Insulin Beta Chain	Substance P	Somatostatin
BjV	FVNQHLCG ▲SHLVEA●L●Y▲●LVCGERGFFYTPKA	RPKPQQ●F●FG●L●M	AGCKN▲FFWK▲TFTSC
EDTA	FVNQHLCG▲SHLVEAL▲LVCGERGFFYTPKA	N.H.	AGCKN▲FFWK▲TFTSC
PMSF	FVNQHLCGSHLVEA●L●Y●LVCGERGFFYTPKA	RPKPQQ●F●FG●L●M	N.H.
BAV	FVNQHLCG▲SHLVEAL▲LVCGERGFFYTPKA	N.H.	AGCKN▲FFWK▲TFTSC

Fig. 2. Pannel A Analysis of cleavage sites of Neuropeptide Y, Peptide YY and Pancreatic Polypeptide by mass spectrometry (BjV). Pannel B Analysis of cleavage sites of insulin B chain, substance P somatostatin by *Bothrops jararaca* venom (BjV). These bioactive peptide hydrolyses were studied in the presence of EDTA, PMSF and *Bothrops* antivenom (BAV), and the products were analyzed in Orb-Trap mass spectrometer. ▬ - represents serine peptidase hydrolysis; C - represents metallopeptidase hydrolysis.

by serine peptidases from BjV, and despite the 70% identity among them, the hydrolysis of PYY was almost 10 times lower than NPY and PP. Moreover, the serum neutralization levels varied greatly among them and the lowest level of inhibition was obtained using the NPY as substrate. Thus, the results obtained with the members of the neuropeptide Y family demonstrate that at least one serine peptidase isoform from the BjV was not blocked by commercial antivenoms produced by the Butantan Institute.

The C-terminal amidated tyrosine of the NPY peptide family is important for their biological activity, which is responsible for binding on its receptors, and the removal of tyrosine residue causes the loss of their *in vivo* functions (Grundemar and Hakanson, 1990). The results showed that BjV is able to remove the C-terminus tripeptide of the NPY hormone family after incubation with the venom, indicating that the BjV is able to inactivate these peptides. The effective hydrolysis and inactivation of neuropeptide Y and pancreatic polypeptide by the whole BjV *in vitro* could be associated with hypotension, since the intact members from the neuropeptide Y family have their *in vivo* activities related to vasoconstriction (Hodges and Sparks, 2014). It is important to note that a family of peptides with ACE inhibitory activity, the BPPs (Bradykinin-Potentiating Peptides), is present in the venom of *B. jararaca* (Camargo et al., 2012). Also, while bradykinin is totally resistant and angiotensin-I is degraded by BjV (Kuniyoshi et al., 2012), it contains a serine peptidase able to release bradykinin from the high molecular weight kininogen (KN-BJ) (Serrano et al., 1998). Together, the data presented here comes to contribute to the better understand the mechanisms of hypotension observed in cases of human envenomation by *B. jararaca*.

Pancreatic polypeptide and peptide YY can also inhibit insulin secretion (Boey et al., 2006; Deng and Whitcomb, 2006), and the hydrolysis of these molecules by BjV could promote unbalance of energy during the envenomation, such as alterations in plasmatic

glucose levels of mice experimentally envenomed by *Bothrops jararacussu* venom (Zeni et al., 2007). However, the glucose alterations associated to envenomation by *Bothrops alternatus* are controversial in the literature. Mello et al. (2010) observed glucose increment on rats urine envenomed by *Bothrops alternatus*, while Dias et al. (2012) observed no significant alterations in glucose levels in the blood of anesthetized dogs. In this way, our results, in association with this controversy in the literature, indicate that this phenomenon deserves further studies in the future.

Substance P is the most potent tachykinin ligand for the high-affinity neurokinin-1 receptor, and this peptide was the only substrate exclusively hydrolyzed by BjV metallopeptidases. SP was first described as an antinociceptive peptide that is opioid-receptor dependent (Hall and Stewart, 1983; Yeomans and Proudfit, 1992) but later was also characterized as an important factor in the cardiovascular system, modulating heart rate and blood pressure (Mistrova et al., 2016). The substance P antinociceptive activity is controversial, and it seems to be dependent on the dose used (De Felipe et al., 1998; Frederickson et al., 1978; Oehme et al., 1980). The mass spectrometry analysis demonstrated that the only intact fragment of SP was SP₁₋₆, and this fragment was reported to be unable to activate the neurokinin-1 receptor (Vigna, 2001), indicating the inactivation of substance P by the metallopeptidases present in the BjV. Okamoto et al. (2014) isolated a P-I SVMP from the venom of *B. moojeni* with proteolytic activity over substance P, and interestingly, three of the four cleavage points detected in this work were present in their work, indicating the presence of a BmooMPa-I like SVMP in the BjV. Another metallopeptidase called lebetase I, isolated from the venom of *Vipera lebetina* also hydrolyzed substance P and one of the sites (Gly-Leu) coincided with our results with BjV (Trummal et al., 2000). The BAV was able to practically fully block the SP hydrolysis, similar to EDTA, a metalloprotease inhibitor, showing the efficacy of the commercial

product to block the metalloproteases of the BjV.

SP is a known substrate for DPP IV, and the presence of this serine protease has already been detected in several snake venoms (Aird, 2008). Also, a DPP IV activity was measured in the BjV when using a synthetic substrate (Gasparello-Clemente and Silveira, 2002). However, this activity was not observed using the methodology described in the present study using SP as substrate, which shows its degradation by metalloproteases. Thus, we could hypothesize that the SP degrading activity could be related to a preferential metalloprotease activity when using the total BjV.

Some studies demonstrated that somatostatin has an antinociceptive effect when injected in different mammal models, and that it has been able to inhibit several kinds of pain. Therefore, the degradation of this peptide by BjV could be related to the persistent local pain described on the envenomed patients (Rai et al., 2015). The BAV was not able to block the STT hydrolysis, and since the PMSF, which is a serine protease inhibitor, fully blocked the STT hydrolysis by the venom, once more we assume that the BAV is unable to block at least one serine peptidase from this venom. An identical phenomenon, that is, the failure of the commercial antivenom to block serine peptidases, was observed when we studied the hydrolysis of dynorphin A, angiotensin I and FRET substrates selective for the metalloproteases and serine peptidases from BjV (Kuniyoshi et al., 2012).

Although Leu- and Met-enkephalins have been characterized as substrates for the *Naja atra* venom (Anderson et al., 1998; Anderson and Dufton, 1997) this was not the case for BjV which, differently from the *Naja* venom, does not present a neurotoxic effect during the envenomation process.

Other studies have already demonstrated that the insulin B chain can be degraded by metallo- and serine proteases from BjV (Mandelbaum et al., 1967; Tanizaki et al., 1989). Regarding the specificity of BjV proteases upon the oxidized insulin B chain, our work showed identical cleavage points when compared with results described by both metalloproteases bothropasin and jarrahagin, Ala-Leu and Tyr-Leu, and similar cleavage point by the serine protease BPA, with hydrophobic aromatic residue at P1 position (Fox et al., 1986). This substrate was hydrolyzed by both classes of proteases and it clearly showed a good BAV neutralization of metalloproteases, as the Ala-Leu cleavage point was totally abolished. In contrast, the Tyr-Leu bond hydrolysis by both serine and metalloproteases of the BjV is partially inhibited by BAV and, thus, we believe that the remaining activity is due to the lack of neutralization of the SVSPs responsible for this cleavage.

Although there is no information in the literature, we cannot rule out the possibility that the fragments generated from the hydrolysis of the peptides used in the present study may present biological activities.

1. Conclusions

In conclusion, our study presents new peptide substrates for the most abundant toxins in the BjV, the snake venom metallo and serine peptidases. The data presented in this study may contribute to the better understanding of the envenomation process, since these peptides show a wide spectrum of biological activities acting on the neural, endocrine, immune and gastric processes. Considering that these peptides are well degraded *in vitro* by the whole BjV, it could be expected, likewise, that they will be degraded *in vivo*. However, it is important to stress that *in vitro* techniques have limitations, and this work cannot confirm possible alterations in these biological peptides concentration *in vivo* and this possibility certainly must be studied in the future. Finally, aside from the effective inhibition of metalloproteases, the Brazilian antivenom used for human therapy was insufficient for the full *in vitro*

neutralization of the serine peptidase activities here demonstrated, indicating that further studies about SVSPs immunogenicity are necessary to significantly improve the efficacy of the anti-bothropic serum.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest whatsoever.

Funding

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo [Project 2015/15364-3, Project 2013/15344-7, Project 2015/13124-5, Project 2013/07467-1 and Project 2012/06677-00] and INCTTOX- CNPq.

Ethical statement

The authors guarantee that the works presented in this manuscript follow the rules of ethics and respect the duties of authors presented in the Elsevier's Ethical Guidelines for Journal Publication.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.020>.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.020>.

References

- Aird, S.D., 2008. Snake venom dipeptidyl peptidase IV: taxonomic distribution and quantitative variation. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 150, 222e228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.03.005>.
- Anderson, L.A., Dufton, M.J., 1997. The action of Taiwan methionine Enkephalin : oligopeptidase cobra venom on a useful assay for. *Analysis* 35.
- Anderson, L., Bussler, B., Martins, H., Dufton, M., 1998. Enkephalin-processing oligopeptidases in cobra venom: inhibition by thiorphan and bestatin reveals cooperative actions. *Toxicon* 36, 719e728. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00134-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00134-7).
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F., 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5377e5392. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>.
- Boey, D., Lin, S., Karl, T., Baldock, P., Lee, N., Enriquez, R., Couzens, M., Slack, K., Dallmann, R., Sainsbury, A., Herzog, H., 2006. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity. *Diabetologia* 49, 1360e1370. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0237-0>.
- Camargo, A.C.M., Ianzer, D., Guerreiro, J.R., Serrano, S.M.T., 2012. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon* 59, 516e523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.013>.
- Conlon, J.M., 2002. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* 23, 269e278.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brien, J.A., Palmer, J.A., Doyle, C.A., Smith, A.J., Laird, J.M., Belmonte, C., Cervero, F., Hunt, S.P., 1998. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 392, 394e397. <http://dx.doi.org/10.1038/32904>.
- Deng, X., Whitcomb, D.C., 2006. CHAPTER 151 e pancreatic polypeptide. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*, pp. 1097e1107. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012369442-3/50154-9>.
- Dias, L., Rodrigues, M.A.P., Smaal, A., Rennó, A.L., Mello, S.M., Moreno, H., Hyslop, S., 2012. Cardiovascular responses to *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in anesthetized dogs. *Cardiovasc. Toxicol.* 12, 243e257. <http://dx.doi.org/10.1007/s12012-012-9163-1>.
- Faiz, M.A., Falkous, G., Harris, J.B., Mantle, D., 1996. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 113, 199e204.
- Fox, J.W., Campbell, R., Beggerly, L., Bjarnason, J.B., 1986. Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. *Eur. J. Biochem.* 156, 65e72.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom

- metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016e3030. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>.
- Frederickson, R.C., Burgis, V., Harrell, C.E., Edwards, J.D., 1978. Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. *Science* 199, 1359e1362.
- Gasparello-Clemente, E., Silveira, P.F., 2002. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. *Toxicon* 40, 1617e1626. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00180-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00180-0).
- Gonçalves-Machado, L., Pla, D., Sanz, L., Jorge, R.J.B., Leitão-De-Araújo, M., Alves, M.L.M., Alvares, D.J., De Miranda, J., Nowatzki, J., de Moraes-Zani, K., Fernandes, W., Tanaka-Azevedo, A.M., Fernandez, J., Zingali, R.B., Gutiérrez, J.M., Correa-Netto, C., Calvete, J.J., 2016. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *J. Proteom.* 135, 73e89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.029>.
- Grundemar, L., Hakanson, R., 1990. Effects of various neuropeptide Y/peptide YY fragments on electrically-evoked contractions of the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 100, 190e192.
- Hall, M.E., Stewart, J.M., 1983. Substance P and antinociception. *Peptides* 4, 31e35.
- Hodges, G.J., Sparks, P.A., 2014. Noradrenaline and neuropeptide Y contribute to initial, but not sustained, vasodilatation in response to local skin warming in humans. *Exp. Physiol.* 99, 381e392. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075549>.
- Kuniyoshi, A.K., Rocha, M., Cajado Carvalho, D., Juliano, M.A., Juliano Neto, L., Tambourgi, D.V., Portaro, F.C.V., 2012. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. *Toxicon* 59, 124e131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.001>.
- Mandelbaum, F.R., Carrillo, M., Henriques, S.B., 1967. Proteolytic activity of *Bothrops protease A* on the B chain of oxidized insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 132, 508e510.
- Markland, F.S., Swenson, S., 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62, 3e18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>.
- Mello, S.M., Linardi, A., Rennó, A.L., Tarsitano, C.A.B., Pereira, E.M., Hyslop, S., 2010. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. *Toxicon* 55, 470e480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.018>.
- Ministério da Saúde, 2009. Guia de vigilância epidemiológica.
- Mistrova, E., Kruzliak, P., Chottova Dvorakova, M., 2016. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides* 58, 41e51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.12.005>.
- Nicolau, C.A., Carvalho, P.C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Teixeira-Ferreira, A., Junqueira, M., Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., 2017. An in-depth snake venom proteoepitome characterization: benchmarking *Bothrops jararaca*. *J. Proteom.* 151, 214e231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>.
- Oehme, P., Hilde, H., Morgenstern, E., Göres, E., 1980. Substance P: does it produce analgesia or hyperalgesia? *Science* 208, 305e307.
- Ogawa, Y., Mamura, Y., Murayama, N., Yanoshita, R., 2006. Characterization and cDNA cloning of dipeptidyl peptidase IV from the venom of *Gloydius blomhoffii brevicaudus*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 145, 35e42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.013>.
- Ogawa, Y., Murayama, N., Fujita, Y., Yanoshita, R., 2007. Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Gloydius blomhoffii brevicaudus*. *Toxicon* 49, 1172e1181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.012>.
- Okamoto, D.N., Kondo, M.Y., Oliveira, L.C.G., Honorato, R.V., Zanphorlin, L.M., Coronado, M.A., Araújo, M.S., da Motta, G., Veronez, C.L., Andrade, S.S., Oliveira, P.S.L., Arni, R.K., Cintra, A.C.O., Sampaio, S.V., Juliano, M.A., Juliano, L., Murakami, M.T., Gouvea, I.E., 2014. 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 - Proteins Proteom.* 1844, 545e552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.014>.
- Paes Leme, A.F., Escalante, T., Pereira, J.G.C., Oliveira, A.K., Sanchez, E.F., Gutiérrez, J.M., Serrano, S.M.T., Fox, J.W., 2011. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *J. Proteom.* 74, 401e410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.12.002>.
- Porto, B.N., Telli, C.A., Dutra, T.P., Alves, L.S., Bozza, M.T., Fin, C.A., Thiesen, F.V., Renner, M.F., 2007. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothrops bilineata* and *Bothrops taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 50, 270e277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.020>.
- Rai, U., Thrimawithana, T.R., Valery, C., Young, S.A., 2015. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: current view and potential applications. *Pharmacol. Ther.* 152, 98e110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.007>.
- Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157e162.
- Serrano, S.M., Hagiwara, Y., Murayama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Fink, E., 1998. 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.* 251, 845e853.
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115e1132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.
- Tanizaki, M.M., Zingali, R.B., Kawazaki, H., Imajoh, S., Yamazaki, S., Suzuki, K., 1989. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 27, 747e755.
- Trummel, K., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2000. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1476, 331e336. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00236-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00236-8).
- Vaiyapuri, S., Wagstaff, S.C., Watson, K.A., Harrison, R.A., Gibbins, J.M., Hutchinson, E.G., 2010. Purification and functional characterisation of rhiminopeptidase a, a novel aminopeptidase from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e796. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000796>.
- Vigna, S.R., 2001. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides* 35, 24e31. <http://dx.doi.org/10.1054/npep.2000.0840>.
- World Health Organization, 2010. WHO Guidelines for the Production and Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.
- Yamashita, K.M., Alves, A.F., Barbaro, K.C., Santoro, M.L., 2014. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002814>.
- Yeomans, D.C., Proudfit, H.K., 1992. Antinociception induced by microinjection of substance P into the A7 catecholamine cell group in the rat. *Neuroscience* 49, 681e691.
- Zeni, A.L.B., Becker, A., Krug, M., Albuquerque, C.A.C., 2007. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 664e676. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992007000300009>.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., Ma, B., 2012. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol. Cell. Proteom.* 11 <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.010587>. M111.010587.