



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Patrícia da Rocha Mendes

**Caracterização bioquímica, estrutural e funcional dos
peptídeos hipotensores do veneno da serpente
*Crotalus durissus terrificus***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador (a): Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

**Botucatu
(2016)**

Patrícia da Rocha Mendes

Caracterização bioquímica, estrutural e funcional
dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente
Crotalus durissus terrificus

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador (a): Profa.Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Prof.Dr. Rui Ferreira Seabra Junior

Botucatu
(2016)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rocha Mendes, Patrícia.

Caracterização bioquímica, estrutural e funcional dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* / Patrícia Rocha Mendes. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 20801017

1. Serpente peçonhenta - Peçonha. 2. Cobra venenosa.
3. Peptídeos. 4. Medicina tropical.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus* ; Peptídeos hipotensores; Veneno de serpente .

Nome do Autor: Patrícia da Rocha Mendes

Título: Caracterização bioquímica, estrutural e funcional dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Orientadora

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP

Prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Membro

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Alaor Aparecido Almeida

Membro

CEATOX – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Pedro Magalhães Padilha

Membro

Departamento de Química – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Membro

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC

Data da defesa: 15 de fevereiro de 2016.

*Quando amamos acreditamos do fundo de nossa alma em
algo,
nos sentimos mais fortes que o mundo e somos tomados de
uma serenidade
que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé.
Essa força estranha faz com que sempre tomemos as
decisões certas
na hora exata, e quando atingimos nosso objetivo
ficamos surpresos com a nossa própria capacidade.*

Paulo Coelho

*O que faz a gente ser grande é não perder o futuro de vista.
É chegar a uma porta, fincar a bandeira da conquista e,
nesse mesmo instante, começar a buscar outros portos.
É criar desafios, calcular riscos, avançando sempre.
Porque a grande aventura é viver. E a vida, assim como as ondas,
tem um jeito diferente de se repetir.
De prometer descobertas e abrigar todos os tipos de sonhos e embarcações.
O que faz a gente ser grande é ser como o mar:
incansável na sua procura pela onda perfeita,
até descobrir que a perfeição está na própria busca.*

Autor desconhecido.

*À minha mãe Kátia, a pessoa mais importante da minha vida.
Ao meu pai Antônio, com toda a minha saudade.*

*“Pois o amor transformou meu sonho em suas vontades,
minhas tristezas em suas lágrimas
e minhas alegrias em suas vitórias.”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pela família maravilhosa que me deu e a vida privilegiada que tão poucas pessoas neste país têm a oportunidade de desfrutar. Obrigada Deus por mais uma etapa vencida e que muitas conquistas ainda sejam alcançadas.

A **Profª. Drª. Lucilene Delazari dos Santos**, minha orientadora, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, por toda a ajuda nunca dispensada, pela paciência, exigência e por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e a conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior**, meu coorientador por todo apoio, auxílio, dedicação, ensinamentos e pela oportunidade de realizar este trabalho, o que tornou possível a realização e mais uma etapa.

Ao **Prof. Dr. Benedito Barraviera**, por me acolher estes quatro anos no Cevap, por toda a ajuda, conselhos, confiança e dedicação durante todo este tempo em que estive lá e por todos os ensinamentos científicos.

Agradeço aos técnicos e amigos **Airton Lourenço Junior** (in memoriam) e principalmente a **Luciana Curtolo de Barros** pelos ensinamentos, paciência, conselhos e auxílio neste trabalho.

À **Banca Examinadora** pela disponibilidade e atenção.

Ao **Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães** e ao **Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá** da Universidade Federal do Ceará, por abrirem as portas de seus laboratórios e permitirem a realização de meus estudos e experimentos. Agradeço a eles e também principalmente aos alunos **Helder Veras Ribeiro Filho**, **Patrícia da Fonseca Magalhães** e **Teresinha Silva de Brito** por todo o auxílio, disponibilidade, ensinamentos e amizade nos meses em que passei em Fortaleza, além do auxílio nas técnicas e leitura dos resultados.

A **Profª Drª Eliane Candiane Arantes** e ao **Ernesto Lopes Pinheiro Junior** da Universidade de São Paulo, por abrirem as portas de seu laboratório, permitir a realização de meus estudos e experimentos e me auxiliar nas técnicas e leitura dos resultados.

A **Leticia Araújo Cunha** e **Jéssika de Oliveira Francisco** pela disponibilidade, paciência, competência e prontidão em ajudar. Muito obrigada!

Aos funcionários do Cevap: Juliana, Selma, Granieri, Marcos, Sheila, Sandra, Marília, Marli e Sérgio pelas colaborações e momentos de descontração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida tornando possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação: Bruna Quirino Jorgetto, Solange Sako Cagliari, Regina Célia Spadin e Diego C. B. de Oliveira por todos os auxílios, paciência, “quebra-galhos”, e curtos momentos de descontração.

Agradeço a todos do Departamento de Doenças Tropicais, meus amigos pessoais e de trabalho, as maiores conquistas profissionais que consegui nesses 4 anos foram ao lado de vocês, porque bons resultados dependem também de um bom ambiente de trabalho. Sou muito grata especialmente ao pessoal do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) por dividirem tudo o que sabem e por terem muita paciência comigo, aprendi muito com vocês nestes anos. Obrigada a todos, principalmente, Airton, Luciana, Ricardo Orsi, Paty Orsi, Elenize, Aline, Claudia, Priscila, Bel, Camila, Aristóteles, Tauane, Josias, André, Léo, Rafael, Denis, Vivian, Natalia, Paty Lima, Clary, Fausto, Letícia, Maurício, Lucas, Gustavo, Eduardo, Laudicéia, Lidiane, não só pela ajuda, e ensinamentos, mas também pelos momentos de descontração (cafezinhos, bolos, churrascos), conversas, conselhos, apoio e amizade. Vocês são muito importantes pra mim.

Agradeço as minhas grandes amigas Aline, Bel, Claudinha e Priscila. Obrigada por sempre me ajudarem não só neste, mas em outros trabalhos. Obrigada pelas conversas, conselhos, caronas, festinhas, por serem minhas amigas e estarem comigo, sempre. Eu adoro vocês!!

Agradeço minha mãe Kátia, você é uma pessoa maravilhosa, cuidou de mim, me alimentou, protegeu e me amou incondicionalmente, obrigada sempre por me apoiar em tudo, pelos anos de infância e juventude a mim dedicados. Obrigada pela oportunidade que me deu de estudar, sou eternamente grata, pois tudo que conquistei hoje não somente veio do meu esforço, mas também do seu sacrifício.

Pai! Você faz muita falta, sinto saudade de tê-lo ao meu lado cuidando de mim, me orientando e me apoiando, mas sei que mesmo longe você está bem e feliz a espera do dia em que vamos nos reencontrar novamente. Sei que mesmo longe está orgulhoso por tudo que já conquistei em minha vida e ainda hei de conquistar, dedico a você com muito carinho esta monografia. Obrigada por tudo o que fez por mim.

Agradeço meus tios, Fião, Lana, Rocha e Paulinho pelos conselhos e paciência, vocês são muito mais do que tios, são meus amigos e sei que sempre estarão comigo, seja

para me consolar nos momentos de tristeza ou vibrar comigo nos momentos felizes, e também me dando puxões de orelha quando eu precisar, amo muito vocês!

Agradeço a minha família, as tias, primos e primas que sempre me apoiam em tudo que faço e torcem por mim.

*Agradeço ao **Thalles**. Muito obrigada por você ter aparecido no momento em que eu mais precisava. Obrigada pelo carinho que sempre me deu, e pela paciência que teve comigo em alguns momentos. Você é muito importante em minha vida. Adoro você!!*

*Agradeço aos meus amigos! Ter conhecido vocês foi um grande presente pra mim. Obrigada por todos os momentos de descontração, as conversas, as bagunças, as risadas, as choradeiras, as bebedeiras, por tudo de melhor que vocês podem me oferecer, vocês são a família que Deus me permitiu escolher. São muitas as pessoas importantes na minha vida, mas agradeço especialmente aos amigos do **Bar do Zóio (Visconde 766)**.*

*Agradeço aos amigos do **Crossfit Cuesta**, principalmente aos coaches **Eduardo e Fábio** e as lindas amigas "**Peppas**". Obrigada por todos os ensinamentos, dedicação, incentivo, paciência e confiança que vocês depositam em mim todos os dias. Cada dia um novo desafio, e o que eu aprendi principalmente com o Crossfit: Nunca desistir!! E isso a gente também leva pra vida. "Better than yesterday".*

*Agradeço ao pessoal da minha turma de faculdade (**XXXVIII Bio**), sinto muita falta de tudo, os melhores momentos da minha vida com certeza, foram ao lado de vocês: as viagens, os churrascos, as baladas, as risadas. Foram cinco anos muito felizes de convivência diária!*

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, porque ninguém consegue sobreviver sozinho neste mundo. Sei que posso me considerar uma pessoa privilegiada por ter no meu caminho pessoas maravilhosas que me ajudam a fazer da vida uma eterna celebração. Que algum dia eu possa retribuir em dobro tudo o que vocês me proporcionaram.

RESUMO

Os acidentes ofídicos constituem um relevante problema de saúde pública, a qual deve receber cuidados rápidos e eficientes. Em relação ao ofidismo, no Brasil, somente há poucos anos foi definida uma política abrangente que enfocasse as múltiplas questões relacionadas aos acidentes humanos provocados por animais peçonhentos. Os venenos de serpentes apresentam uma mistura de compostos inorgânicos (íons metálicos) e orgânicos, sendo ricos em moléculas biologicamente ativas. Dentre essas moléculas, peptídeos, proteínas e compostos de baixa massa molecular são frequentemente estudados por apresentarem grande potencial terapêutico. Essas moléculas, se bem conhecidas, podem ser utilizadas na investigação de mecanismo moleculares e celulares. Além disso, estabelecem interessantes modelos moleculares para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas aplicáveis na criação de ferramentas experimentais e/ou agentes terapêuticos para a pesquisa básica e aplicada. Diante disso, a elucidação dos peptídeos hipotensores presentes no veneno crotálico da subespécie *Crotalus durissus terrificus* é o objetivo do presente trabalho. Este estudo poderá promover a identificação de outras moléculas hipotensoras podendo conter princípios ativos mais eficientes para o tratamento de quadros clínicos de hipertensão, doença esta que acomete milhares de pessoas no mundo todo. No presente trabalho, a porção peptídica do veneno da serpente *C.d.t.*, apresentou rendimento médio de 12,8% em relação ao veneno bruto, sob condições de precipitação das proteínas totais na presença de ácido trifluoracético à 0,1% (v/v) e, quando submetida à estratégia de purificação por cromatografia líquida de fase reversa, 13 frações foram separadas. Por meio de ensaios de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica), evidenciou-se que a fração I e a fração V apresentaram efeitos hipotensor e hipertensor, respectivamente. A fração I foi identificada com a sequência QHILYVGVHD e massa molecular 1274,67 Da. Atualmente, esta molécula hipotensora identificada no presente trabalho foi submetida à síntese peptídica para posteriormente, avaliar-se este peptídeo hipotensor na sua forma sintética, seu efeito hipotensor por meio do ensaio de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso em relação ao fármaco Captopril.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, veneno de serpente, peptídeos hipotensores.

ABSTRACT

The snakebites are an important public health problem, which must receive quick and efficient care. Regarding the ophidism, in Brazil, only a few years ago a comprehensive policy was defined that emphasized multiple issues related to human accidents caused by venomous animals. The snake venoms present a mixture of inorganic and organic compounds, being rich in biologically active molecules. Among these molecules, peptides, proteins and low molecular weight compounds are often studied by their ability therapeutic. Those molecules, when well known, may be used in the investigation of cellular and molecular mechanism. In addition, it provides interesting molecular models for the development of biotechnological strategies applicable in the creation of experimental tools and / or therapeutic agents for basic and applied research. Therefore, the elucidation of hypotensive peptides present in the venom of *Crotalus durissus terrificus* subspecies is the aim of this study, once this study may promote the identification of other hypotensive molecules may contain more effective active ingredients for the treatment of clinical conditions hypertension, this disease affecting millions of people in the world. In this study, the peptide portion of the venom of the snake Cdt, performed with an average yield of 12.8% compared to the venom under total protein precipitation conditions in the presence of trifluoro acetic acid to 0.1% (v / v) and, when subjected to purification strategy for reversed-phase liquid chromatography, 13 fractions were separated. Using isolated tissue contractility *in vitro* smooth muscle (mesenteric artery), was evidenced that the fraction I and fraction V showed hypotensive and hypertensive effects, respectively. Fraction I was identified with the QHILYVGVHD sequence and molecular mass 1274.67 Da. Currently, this hypotensive molecule identified in this study was submitted to the peptide synthesis to subsequently evaluate this hypotensive peptide in its synthetic form, its hypotensive effect through tissue contractility assay isolated *in vitro* smooth muscle compared to Captopril medicine.

Key words: *Crotalus durissus terrificus*, snake venom, hypotension peptides

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNOMOS

PLA = Fosfolipase

PPBs = Peptídeos Potenciadores de Bradicinina

CRISPs = Proteínas secretadas ricas em cisteínas

svVEGF = Snake Venom Vascular Endothelium Growth

svNGF = Snake Venom Nerve Growth Factor

Cdt = *Crotalus durissus terrificus*

NGFs = Fator de crescimento de nervos

α = Alfa

MTx1/MTx2/MTx3/MTx7 = Neurotoxinas muscarínicas

m1/m2 = Receptores muscarínicos

Ca²⁺ = Cálcio

DNP = Peptídeo natriurético dendroaspis

ANP-A = Receptores

GNP = guanosina monofosfato cíclico

BNP = Peptídeo natriurético cerebral

CNP = Peptídeo natriurético tipo C

ANP = Peptídeo natriurético natural

BJ = *Bothrops jararaca*

pHpG = Peptídeo natriurético tipo C rico em histidina e glicina

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina

SRAA = Sistema renina angiotensina-aldosterona

ADH = Hormônio antidiurético

B. asper = *Bothrops asper*

B. atrox = *Bothrops atrox*

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

UniProtKB = *Universal Protein Resource Knowledgebase*

HPLC = Cromatografia líquida de alta resolução

F-moc = Síntese peptídica em fase sólida

HOBt = hydroxibenzotriazol

PyBOP = benzotriazol-1il-oxitripirrolidino-fosfonium hexafluorofosfato

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

RP-HPLC = Cromatografia líquida de fase reversa

LC-MS/MS-IT-TOF = Espectrometria de massas

kg = kilograma

mg = miligrama

CO₂ = gás carbônico

TFA = Ácido trifluoroacético

Rpm = rotações por minuto

rcf (*rotate centrifugal force*) = rotação com relação entre a força g

mL = mililitro

ACN = Acetonitrila

nm = nanometro

μL = micrograma

μL = microlitro

mM = milimolar

BSC = benzenosulfonila

μM = micromolar

Phe = fenilefrina

Ach = acetilcolina

m/z = relação massa/carga

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	Código de 3 LETRAS	Código de 1 LETRA
ALANINA	<i>Ala</i>	A
ASPARGINA	<i>Asn</i>	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	<i>Asp</i>	D
ARGININA	<i>Arg</i>	R
CISTEÍNA	<i>Cys</i>	C
FENILALANINA	<i>Phe</i>	F
GLICINA	<i>Gly</i>	G
GLUTAMINA	<i>Gln</i>	Q
ÁCIDO GLUTÂMICO	<i>Glu</i>	E
HISTIDINA	<i>His</i>	H
ISOLEUCINA	<i>Ile</i>	I
LEUCINA	<i>Leu</i>	L
LISINA	<i>Lys</i>	K
METIONINA	<i>Met</i>	M
PROLINA	<i>Pro</i>	P
SERINA	<i>Ser</i>	S
TIROSINA	<i>Tyr</i>	Y
TREONINA	<i>Thr</i>	T
TRIPTOFANO	<i>Trp</i>	W
VALINA	<i>Val</i>	V

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Envenenamento por serpentes: uma problemática de saúde pública.....	17
1.2	Venenos de serpentes.....	18
1.3.	A composição dos venenos de serpentes.....	20
1.4.	Técnicas analíticas empregadas ao estudo de Proteômica.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1.	MATERIAIS.....	28
4.1.1	Animais.....	28
4.1.2	Venenos de serpentes.....	29
4.2.	MÉTODOS.....	29
4.2.1	Extração dos peptídeos de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	29
4.2.2	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	30
4.2.3	Avaliação da contratilidade de tecido isolado <i>in vitro</i> de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	30
4.2.4	Sequenciamento dos peptídeos por Química Degradativa de Edman	32
4.2.5	Síntese manual de peptídeos em fase sólida	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1.	Obtenção dos peptídeos a partir do veneno bruto da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	34
5.2.	Cromatografia Líquida de Alta Performance (RP- HPLC).....	34
5.3.	Avaliação da contratilidade de tecido isolado <i>in vitro</i> de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	36
5.4	Recromatografia da fração biologicamente ativa.....	41
5.5	Sequenciamento dos peptídeos por Química de Edman.....	42
5.6	Síntese peptídica do peptídeo alvo deste estudo.....	43

5.7	Avaliação da contratilidade de tecido isolado <i>in vitro</i> de músculo liso (artéria mesentérica em ratos Wistar na presença do peptídeo sintético	45
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
8	REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamento por serpentes: uma problemática de saúde pública

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública, que acomete muitos países da América do Sul e Central, Ásia, África e uma parte da Europa, principalmente o Sudeste e a área Central do continente. Há uma estimativa de que no mundo ocorram mais de quinhentos mil casos de envenenamentos por serpentes e cerca de cento e trinta mil óbitos por ano¹.

Muitos destes óbitos ocorrem pela falta de antiveneno específico, pelo retardo em sua administração ou pelo uso incorreto. O Brasil possui uma estrutura desenvolvida na distribuição de antivenenos, no entanto, a grande maioria dos profissionais de saúde desconhecem os aspectos biológicos, clínicos e epidemiológicos envolvidos na gravidade dos envenenamentos².

O quadro clínico em geral de um envenenamento por serpente é caracterizado por inchaço, bolhas, hemorragia e necrose do músculo esquelético. Esses efeitos locais se desenvolvem rapidamente após a picada e o atraso no acesso ao serviço de saúde, o qual resulta em danos teciduais graves e invalidez permanente³.

As espécies mais importantes, em relação à saúde pública, são do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. Diante disso, as manifestações clínicas advindas de acidentes crotálicos podem ser divididas em cinco subtipos:

* Manifestações locais: não há dor. Quando essa existe, é de pequena intensidade. Geralmente não ocorre reação local, apesar de que um pequeno edema possa estar presente⁴.

* Manifestações sistêmicas: mal-estar, náuseas, vômitos, sudorese, prostração, sonolência ou inquietação e secura da boca⁵.

* Neurológicas: causadas pela ação neurotóxica do veneno, caracterizada pela fácies miastênica (fácies neurotóxica de Rosenfeld) com ptose palpebral uni ou bilateral,

midríase, oftalmoplegia, flacidez da musculatura da face, podendo ainda haver diplopia e/ou visão turva^{6; 7; 8}.

* Musculares: Há intensa mialgia, podendo ser acompanhada de discreto edema muscular. A lesão das fibras musculares esqueléticas (rabdmiólise) causa liberação de mioglobina que é excretada pela urina (mioglobinúria), evidenciada por alterações na sua cor^{9; 10; 11; 12}.

* Hematológicas: Pode ocorrer aumento no tempo de coagulação ou incoagulabilidade sangüínea^{13; 14}. Manifestações clínicas pouco frequentes: paralisia de grupos musculares, insuficiência respiratória aguda, muito embora não se constituam comumente o quadro clínico do paciente vítima de ofidismo crotálico. Provavelmente tais fenômenos são decorrentes da ação miotóxica e/ou neurotóxica do veneno¹⁵.

Ao longo da evolução, as serpentes peçonhentas se especializaram na produção de uma série de toxinas, e dessa forma, na desorganização dos níveis fisiológicos de hormônios, e perturbação da atividade das enzimas, receptores, ou canais de íons, além de prejudicarem os sistemas cardiovascular e nervoso de suas vítimas. Devido ao seu alto grau de especificidade, as toxinas do veneno de serpentes têm sido cada vez mais utilizadas como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de drogas¹⁶.

1.2. Venenos de serpentes

Os venenos para as serpentes têm importante papel fisiológico: inicia e auxilia a digestão de presas, constitui um mecanismo de defesa contra predadores/agressores e, é o fator responsável pelo domínio das presas^{17; 18; 19}. Assim, os venenos contêm componentes que agem de modo simultâneo, destinados a afetar processos vitais, atuando no sistema nervoso, cardiovascular, locomotor, afetando a coagulação do sangue, e a permeabilidade de membranas²⁰. As células secretoras da glândula de veneno são o principal componente do epitélio glandular e compõem mais de 80% da população total de células. Este epitélio é extremamente especializado na

produção, estocagem e secreção de um produto de composição principalmente proteico (aproximadamente 90% do peso seco dos venenos), que desempenham as mais variadas atividades biológicas^{17; 21; 22; 23}. Acredita-se que a glândula de veneno represente uma modificação de glândulas salivares e que o seu aparecimento tenha sido fator crucial na radiação adaptativa e consequente sucesso ecológico das serpentes^{21; 18}. Fry e colaboradores²⁴ estimaram que o aparato venenífero surgiu pela primeira vez há cerca de 200 milhões de anos na evolução dos membros da ordem Squamata, constituindo um dos principais fatores norteadores da diversidade ecológica em serpentes e lagartos.

Em última instância, os venenos são resultado de um complexo processo evolutivo. A divergência e duplicação de genes são apontadas com uma das principais causas das substituições de nucleotídeos, sobretudo de substituições não-sinônimas, que levam ao aparecimento de isoformas de toxinas^{25; 26; 27, 28}. Conhecido por evolução acelerada é um dos principais fatores da diversificação do potencial biológico e da ação das toxinas em relação a diferentes alvos/presas^{25; 26; 27; 28}.

Dentre as famílias de serpentes conhecidas atualmente, a família *Viperidae* abriga espécies que possuem alto grau de especialização no aparato venenífero, caracterizado pela presença de complexos sistemas de produção e armazenamento de veneno, bem como por modificações morfológicas importantes, como: uma musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo próxima às glândulas de veneno, além de dentes móveis e canaliculados, implantados na parte anterior do maxilar móvel, que permite a ereção das presas para frente no momento do bote^{29; 18; 22}.

Ao longo da evolução, as serpentes peçonhentas se especificaram na produção de uma série de toxinas, e dessa forma, se tornaram responsáveis por desorganizarem os níveis fisiológicos de hormônios, por desequilibrar a atividade dos receptores ou canais de íons, das enzimas, além de prejudicarem os sistemas cardiovasculares e nervosos de suas vítimas.

1.3. A composição dos venenos de serpentes

Os venenos de serpentes são substâncias bastante complexas, compostas por enzimas, peptídeos, proteínas não-enzimáticas, dentre outros. Entre os componentes frequentemente encontrados nos venenos das serpentes viperídeas neotropicais estão: metaloproteinases, desintegrinas, serinoproteinases, fosfolipase A₂ (PLA₂), lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (PPBs), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs) e fatores de crescimento como os svVEGF e svNGF (*snake venom Vascular Endothelium Growth Factor* e *snake venom Nerve Growth Factor*, respectivamente).

O veneno crotálico é considerado o mais tóxico e possui letalidade aproximada de 72% em casos não tratados e de 5% nos tratados com soroterapia^{30; 31}. Algumas toxinas já foram identificadas, tais como, crotamina, crotoxina, giroxina, convulxina, crotapotina, inter-cro e fosfolipase A2. Destacando-se a crotoxina que participa em 50% na composição protéica do veneno^{32; 33}. Recentemente, novas proteínas foram identificadas no veneno de *C. d. Terrificus*, como 5'-nucleotidases, metaloproteinases, *nerve growth factors* (NGFs), fosfosdiesterases e glutaminil ciclases descritas pela primeira vez e elucidadas por meio de técnicas analíticas de alta resolução e sensibilidade da abordagem proteômica tradicional⁹.

Dentre os peptídeos isolados e caracterizados de venenos de serpentes no mundo todo, foram elucidados peptídeos com diferentes atividades farmacológicas. Peptídeos da classe das α -neurotoxinas foram encontrados em serpentes do gênero Elapidae, Hydrofiidae e Colubrídeos. Estes atuam paralisando o músculo esquelético e impedem que a acetilcolina se ligue e ative os receptores nicotínicos na junção neuromuscular. Muitos compostos encontrados em venenos de serpentes inibem a agregação plaquetária, a maioria são enzimas/proteínas, porém, alguns peptídeos, como as α -neurotoxinas com estrutura *three finger* semelhantes a desintegrina-like, também foram encontrados. Outro exemplo de neurotoxina é a muscarínica caracterizada primeiramente como MTx1 e MTx2. Esses peptídeos apresentam

relativa seletividade pelo receptor muscarínico subtipo m1 e, recentemente foi isolado o peptídeo BM14, o qual interage com o receptor muscarínico m2. Esses peptídeos melhoraram o aprendizado e processos da memória dos animais, já os peptídeos MTx3 e MTx7 atuam bloqueando o receptor muscarínico m1³⁴. Recentemente, toxinas com domínios *three fingers* denominados frontoxinas foram isolados do veneno de *Micrurus frontalis*, os quais são responsáveis por atuar em junções neuromusculares³⁶.

Dentre os colubrídeos, o veneno das serpentes *Dendroaspis viridis*, toxinas do tipo antiacetilcolinesterase possuem um poderoso efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase. Esse peptídeo causa fasciculações musculares e essa inibição pode prolongar a ação do neurotransmissor acetilcolina. Os bloqueadores de canais de Ca²⁺ do veneno da *Dendroaspis viridis* apresentam atividade isolada no músculo liso. Outro exemplo de neurotoxinas peptídicas presentes em venenos das serpentes *Dendroaspis viridis* são as cardiotoxinas, as quais despolarizam eletricamente as células excitáveis - neurônios e músculos - de maneira irreversível, mantendo a contratura dos músculos. As toxinas sinérgicas foram isoladas de uma fração do veneno de *Dendroaspis viridis* que apresentou pouca letalidade em ratos³⁶.

Sabe-se que as miotoxinas do tipo crotamina encontradas em venenos de cascavéis causam danos ao músculo esquelético. Paralelamente, pequenos peptídeos têm sido associados à atividade miotóxica. No veneno da víbora *Atractaspis engaddensis*, as saratoxinas foram identificadas por causarem parada cardíaca, sendo que sua principal atividade é a vasoconstrição mediada pela ação de receptores de endotelina³⁷.

Outra classe de peptídeos encontrados em venenos de serpentes são os peptídeos natriuréticos, os quais são vaso-relaxantes isolados do veneno de *Dendroaspis viridis*, denominados como peptídeo natriurético dendroaspis (DNP). Eles atuam em receptores ANP-A para ativar a guanilatociclase e aumentar os níveis GMP, causando o relaxamento muscular^{38; 39}. Outros tipos de peptídeos natriuréticos são: peptídeo natriurético cerebral (BNP), peptídeo natriurético tipo C (CNP) e peptídeo

natriurético atrial (ANP). Os peptídeos natriuréticos encontrados nos venenos de serpentes associam propriedades funcionais e estruturais com estes três tipos⁴⁰, e apresentam efeito sobre a vasodilatação, promovendo o aumento da permeabilidade capilar, e o relaxamento da musculatura lisa, contribuindo na rápida difusão das toxinas no local da picada²⁴.

A classe dos peptídeos do veneno de serpentes mais estudados são os peptídeos potenciadores de bradicinina. Estes são oligopeptídeos ricos em prolina, constituídos de 5 a 14 resíduos de aminoácidos⁴¹. As propriedades químicas e farmacológicas dos peptídeos potenciadores de bradicinina (PPBs) foram descobertos em 1949, no qual o plasma humano, quando incubado com o veneno de *B. jararaca*, gerou novo fator hipotensor e espasmogênico para a musculatura lisa, denominado de bradicinina⁴².

Os PPBs foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA) descritos na literatura. Estes por sua vez, foram isolados do veneno de *Bothrops jararaca*⁴³. A hipotensão frequentemente verificada após o envenenamento botrópico é em grande parte decorrente da ação inibitória destes peptídeos vasoativos (PPBs) sobre a ECA, característica que impede a geração do peptídeo vasoconstritor angiotensina II e inativação do peptídeo hipotensor, a bradicinina.

Os PPBs foram descritos como uma família de pequenos peptídeos, os quais especificamente potenciam as atividades biológicas da bradicinina, ou seja, apresentam efeitos hipotensores, edematogênicos, atividades espasmogênicas em músculo liso^{44; 15}. A atividade potenciadora dos PPBs *in vivo* foi correlacionada com a inibição de enzimas inativadoras da bradicinina^{44; 45; 46}.

A primeira demonstração de que um peptídeo potenciador de bradicinina apresentava efeito hipotensor foi realizada por Ferreira⁴³. Devido à intensa atividade do sistema renina-angiotensina, estudos em modelos de hipertensão em ratos foram realizados, para demonstrar o efeito deste peptídeo na diminuição da pressão

arterial⁴⁷. A partir daí, estudos propuseram o isolamento, a caracterização e a descrição de 9 peptídeos de pequena massa molecular extraídos do veneno da mesma serpente *Bothrops jararaca*. Os peptídeos isolados foram utilizados para demonstrar a correlação entre a inibição da conversão da angiotensina e potenciação da bradicinina. As estruturas moleculares foram confirmadas por síntese peptídica, seguido de ensaios biológicos para avaliar a capacidade dessas moléculas em inibir a conversão da angiotensina I e a inativação da bradicinina em pulmões de ratos³⁹.

Recentemente, realizou-se um estudo comparativo entre os venenos de serpentes recém-nascidas e adultas do gênero *Bothrops*, elucidando os perfis proteômico e peptídico. Muitos peptídeos foram detectados nestes venenos e sugerem que diferentes proteinases do veneno de recém-nascidos e adultos podem desempenhar um papel na proteólise desses peptídeos. PPBs foram identificados em *Bothrops* recém-nascidas e adultas, porém estes peptídeos foram identificados por análises de N- ou C-terminal, possibilitando a identificação de PPBs ou moléculas homólogas dos PPBs presentes nestes venenos. Esta análise peptídica comparativa dos venenos mostrou que não existem diferenças bruscas entre os perfis, como foi observado na análise proteômica⁴⁸.

Análise peptídica do veneno de *Bothrops* descreveu variações dos peptídeos entre animais irmãos (onze fêmeas e sete machos) e não-irmãos (cinco fêmeas e cinco machos). Esse estudo mostrou diferenças entre os BPPs; a variabilidade entre os dezoito venenos “irmãos” revelou que a variação não pode ser atribuída a condições ambientais, idade, ou dieta, uma vez que estes nasceram e cresceram sob as mesmas condições e as amostras foram coletadas igualmente, evitando assim variações sazonais e ontogênicas. Houve também variação ligada ao sexo, em que, animais do sexo feminino apresentaram quatro peptídeos diferentes; esse dimorfismo foi, inicialmente, associado à partição de nicho. A análise global mostrou a presença de onze BPPs conhecidos (9a, 10b, 10c, 11a, 11d, 11e, 12b, 12c, 13a, 13b e 14) distribuídos entre os venenos. O único peptídeo presente em todas as amostras

analisadas foi o BPP 13a. Porém, quatro peptídeos foram encontrados apenas em fêmeas, que correspondem aos PPBs conhecidos 9a, 10b, 10c e 11a, os quais haviam sido clivadas na ligação P-Q do peptídeo⁴⁹.

1.4. Técnicas Analíticas empregadas ao estudo de Proteômica

Nos últimos anos, diversos autores têm concentrado seus esforços na utilização de técnicas complementares em peptidômica e proteômica no intuito de se obter um panorama que melhor represente a composição dos venenos animais^{50; 51; 52; 53}. Embora os venenos de serpentes sejam compostos por poucas classes de toxinas, uma dificuldade técnica frequentemente reportada nos estudos proteômicos é a baixa quantidade de sequências de proteínas de venenos de serpentes no banco de dados atuais^{48;54}. O **Quadro 1** apresenta um levantamento recente do número de entradas (sequências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes e proteínas de veneno de serpentes disponíveis em dois dos bancos de dados mais utilizados em proteômica: o banco *non redundant (nr)* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos)* e o *Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB, uma colaboração entre institutos de pesquisa do Reino Unido, Suíça e Estados Unidos)*.

Quadro 1. Número de entradas (sequências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes ou veneno de serpentes presentes nos bancos de dados NCBI e UniProtKB.

Identificador ¹	Banco de Dados	
	NCBI ²	UniProtKB ³
Snake	90.183	40.945
Snake Venom	28.728	29.169

¹ Palavra chave utilizada na busca

² www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/

³ www.uniprot.org/downloads O UniProtKB compreende uma compilação de dois grandes bancos: o TrEMBL e o Swiss-Prot. Os valores representam o número de sequências cuja anotação é automática e não revisada (*TrEMBL database*); (Acesso em 07/01/2016).

De acordo com o **Quadro 1**, quando o identificador utilizado é a palavra “Snake” a maioria das informações presentes nos bancos de dados analisados não correspondem à toxinas e, sim à outras proteínas de serpentes como hemoglobina, citocromo c, proteínas envolvidas em processos metabólicos, entre outras. Um refinamento da busca utilizando a palavra “Snake Venom” resulta em mais de 28 mil entradas no NCBI e de um pouco mais de 29 mil no UniProtKB. Esse reduzido número, em comparação com aquele verificado para “espécies-modelo” da ciência como invertebrados (*Drosophila melanogaster*, 210.770 sequências NCBI; 143.147 sequências UniProtKB), camundongos (*Mus musculus*, 391.394 sequências NCBI; 81.782 sequências UniProtKB), associado ao desconhecimento do genoma completo de algumas espécies de serpentes, denota a importância de estudos referentes ao transcriptoma da glândula de veneno, bem como do proteoma dos correspondentes venenos.

O desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, o crescimento da indústria biotecnológica e os resultados iniciais obtidos pela genômica e proteômica desencadearam grandes avanços na medicina moderna. No entanto, o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas é necessário para a continuidade desses avanços de forma mais específica. Novas abordagens permitem uma resolução e caracterização de moléculas de modo eficiente e rápido e uma subsequente purificação de moléculas alvos. Dessa forma, técnicas analíticas como cromatografia líquida, sequenciamento peptídico por Química Degradativa de Edman e espectrometria de massas e, a síntese peptídica, estão entre as ferramentas analíticas mais utilizadas na área peptidômica.

A cromatografia líquida é uma técnica físico-química, considerada como ferramenta indispensável nas análises proteômicas e peptidômicas por permitir a separação de macromoléculas por meio de diferentes propriedades⁵⁵. A cromatografia líquida de fase reversa associada à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é uma das estratégias mais utilizadas nas abordagens analíticas de purificação de

macromoléculas, uma vez que, os compostos são fracionados com elevada seletividade, sensibilidade e resolução.

Já a síntese de peptídeos sempre foi o grande desafio para a área de química orgânica. Em meados de 1950, o isolamento, a elucidação estrutural e síntese do peptídeo oxitocina iniciaram uma nova era, promovendo a junção dos estudos de biologia e química⁵⁶. Desde então a síntese de peptídeos tem se tornado mais complexa, eficiente e amplamente utilizada⁵⁷.

A síntese peptídica em fase sólida foi primeiramente aplicada por Merrifield em 1963⁵⁸. Uma das estratégias de síntese peptídica em fase sólida é a F-moc, onde um resíduo de aminoácido ligado a uma matriz insolúvel é desprotegido para promover o acoplamento do próximo resíduo na presença de um ativador. Por exemplo, para cada ciclo da síntese, são adicionados à resina Fmoc-aminoácido-OH, HOBt (N-hydroxibenzotriazol) como agente ativador dos aminoácidos e PyBOP (benzotriazol-1-il-oxitripirrolidínio hexafluorofosfato) como agente acoplante. Além disso, para as lavagens da resina e desproteção da mesma, N-N-Dimetilformamida e Piperidina são utilizadas⁵⁷. Estudos demonstram que a estratégia F-moc é uma das abordagens mais acessíveis, apresentando aplicações bem sucedidas nas rotinas de síntese de peptídeos em muitos laboratórios⁵⁹.

Levando em consideração que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi intensamente estudado nos últimos setenta anos, poucas toxinas de origem peptídica foram caracterizadas. A análise venômica revelou muitas proteínas com possíveis atividades farmacológicas e de grande importância médica, mas pouco se sabe sobre os peptídeos presentes neste veneno.

Desta forma, venenos de serpentes foram amplamente conhecidos por apresentarem em sua composição moléculas biologicamente ativas. Porém, a partir de metodologias analíticas de maior sensibilidade e resolução e, principalmente por meio de ferramentas de bioinformática, tornou-se possível a caracterização das novas classes de peptídeos com grande potencial terapêutico⁶⁰.

2. JUSTIFICATIVA

Os venenos de serpentes representam uma mistura de compostos orgânicos e espécies inorgânicas, sendo ricos em moléculas biologicamente ativas, dentre elas, peptídeos, que apresentam grande potencial terapêutico. A elucidação dos peptídeos vasodilatadores presentes no veneno crotálico da subespécie *Crotalus durissus terrificus* possibilitará o isolamento de princípios ativos que podem atuar como medicamentos mais eficientes para o tratamento de quadros clínicos de hipertensão, doença esta que acomete milhares de pessoas no mundo todo. Uma vez que, o desenvolvimento de técnicas analíticas sofisticadas dotadas de alta sensibilidade e resolução, associadas com a estratégia de síntese peptídica, promoveram a obtenção de candidatos em potenciais para a formulação e desenvolvimento de medicamentos hipotensores, espera-se que novas moléculas possam substituir ou agir com os medicamentos hipotensores existentes atualmente no mercado, os quais, freqüentemente, evidenciam o desencadeamento de efeitos indesejados em seus usuários diretos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi a caracterização bioquímica, estrutural e funcional de um peptídeo vasodilatador que atua na contratilidade muscular presente no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Isolamento dos peptídeos presentes no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se a técnica de cromatografia de fase reversa (RP – HPLC);

- 2) Caracterização farmacológica dos peptídeos do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente ao ensaio de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica);
- 3) Sequenciamento peptídico dos compostos isolados por espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS-Q-TOF e por Química Degradativa de Edman;
- 4) Síntese peptídica do peptídeo hipotensor vasodilatador isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*;
- 5) Caracterização farmacológica do peptídeo hipotensor sintético do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente ao ensaio de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Animais

Vinte e dois ratos *Wistar* machos foram utilizados no presente trabalho, pesando de 200 a 250 gramas, oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de 20 ± 3°C e ciclo claro/escuro (12:12h), por um período mínimo de três dias antes dos experimentos, para prevenir os efeitos decorrentes da variação ambiental. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico de 30 a 50mg /kg, via intra-peritonal e em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Este Projeto de Pesquisa (CEUA 990-2013) foi submetido ao Comitê de Ética Experimental da UNESP de Botucatu, e aprovado em 28/02/2013. (anexo OK).

4.1.2. Venenos de serpentes

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (**Figura 1**) utilizado neste trabalho foi obtido a partir do “pool” extraído de serpentes adultas, microchipadas individualmente e de ambos os sexos, criadas e mantidas em cativeiro no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), localizado na Fazenda Experimental Lageado – UNESP, Campus de Botucatu.



Figura 1. Extração do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Extração dos peptídeos do veneno *Crotalus durissus terrificus*

A extração do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada segundo metodologia desenvolvida pela equipe técnica do Laboratório de Extração de Venenos do CEVAP. As serpentes foram anestesiadas com gás carbônico (CO₂) e o veneno coletado em microtubos tipo Eppendorf®, congelado a -20°C, liofilizado, pesado, aliquoteado, identificado e estocado em freezer a -20°C para posterior uso.

Para a extração dos peptídeos, pesou-se 1 (um) grama de veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*, após a pesagem misturou-se ao veneno 5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) à 0,1% (v/v). Agitou-se a mistura em um vórtex e, esta, foi dividida em cinco eppendorfs® de 2 mL. Os eppendorfs® foram colocados em uma centrífuga refrigerada Heal Force por 15 minutos a 4°C à uma rotação de 13.800 rpm (equivalente à 17.460 x g). Por sua vez, o sobrenadante foi transferido para um filtro

GE Vivaspin e este sistema submetido à centrifugação por 90 minutos à 4°C à uma rotação de 3.500 rpm. Este procedimento se repetiu até toda a amostra passar pelo filtro.

4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance sob fase reversa (RP-HPLC)

Uma vez extraídos os peptídeos do veneno bruto, estes foram submetidos à cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu, modelo LC-8^a, equipado com um detector ultravioleta do tipo arranjo de diodos, modelo SPD-20^a, constituído por duas bombas LC-8^a (bombas A e B), injetor Rheodyme, modelo 7725i com loop de 100 uL, um sistema controlador Shimadzu, modelo SCL-10^a e coluna semi-preparativa C-18 (Phenomenex). Para a fase móvel foram utilizados dois solventes, Solvente A [água contendo TFA 0,1% (v/v)] e Solvente B [Acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v)] com gradiente de 0 a 80% de Solução B em um fluxo de 10 mL/min. A eluição foi monitorada por medidas de absorvância em 214, 254 e 280 nm. O controle de aquisição de dados foi realizado por meio do Software LC Solution⁶¹, com modificações.

4.2.3. Avaliação da contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

As frações peptídicas naturais e/ou os peptídeos sintéticos foram submetidas aos ensaios de contratilidade de tecido isolado. O objetivo deste estudo foi verificar o perfil da atividade farmacológica em preparações isoladas de artéria mesentérica e analisar os efeitos dos peptídeos do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, avaliando o registro de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso em ratos. Foram utilizados vinte e dois ratos Wistar machos (200-250g) obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os

ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico de 30 a 50mg /kg, via intraperitoneal e em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Os tecidos foram montados em câmaras para órgão isolados contendo 5mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit, pH 7,4, mantida à 37°C com bomba de circulação Haake (Modelo FJ, Alemanha). Os tecidos foram atados a um ponto fixo na câmara e à unidade transdutora de força (Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass; EUA) apropriada para registro isométrico das contrações. A tensão basal aplicada ao tecido foi de 0,5g para estabilização dos canais. Os sinais gerados pelo transdutor de força foram condicionados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (Dataq, PM-1000, WCE, USA). Após um período de equilíbrio, os tecidos foram expostos à solução despolarizante de alta concentração contendo K⁺ (60 mM) (60mmol L⁻¹), repetidas vezes até que duas respostas de mesma amplitude fossem obtidas. Após este processo, o protocolo de reversão foi realizado na presença das soluções de Phe 0,1uM (umol L⁻¹) e Ach 1uM (u mol L⁻¹), finalizando este protocolo com Phe 0,05uM (umol L⁻¹). A **Figura 2** representa esta etapa experimental. As curvas de concentração-efeito para o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e suas frações peptídicas e/ou os peptídeos sintéticos foram obtidas pela exposição da preparação à concentrações crescentes (0,01, 0,1, 1, 10, 100, 200, 300 ug/mL) à solução fisiológica de Krebs-Henseleit normal na câmara de banho, para avaliação de seus efeitos sobre o tônus basal da artéria mesentérica isolada de rato Wistar.

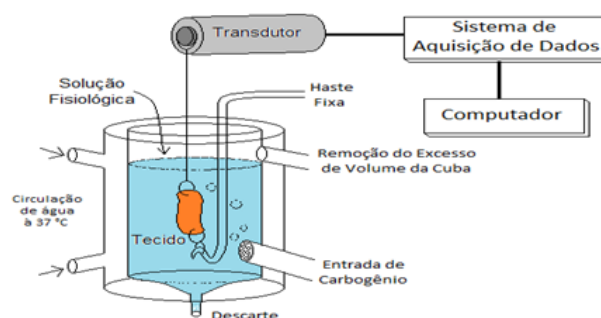


Figura 2. Representação esquemática do equipamento utilizado para estudo da contratilidade in vitro de preparações isoladas de músculo liso.

Após a realização da curva concentração-efeito, o tecido foi lavado com Verapamil à 25mM (25mmol L⁻¹), para avaliar a integridade do tecido. Foram analisados os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* na tensão basal de preparações de artéria mesentérica. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05uM) (umol L⁻¹). As quantificações e estatísticas foram realizadas pelos programas: Sigma Plot 11.0, Análise de variância (Anova Two-Way) e, pós teste de Holm-Sidak (p<0,05).

4.2.4. Sequenciamento dos Peptídeos por Química Degradativa de Edman

Os peptídeos purificados foram submetidos ao sequenciamento primário utilizando-se a técnica de Química Degradativa de Edman, para a confirmação das sequências primárias dos peptídeos. Foram colocadas amostras contendo 50-100 ug de peptídeo no sequenciador. Estas análises foram realizadas em um sequenciador automático de fase gasosa PPSQ-21^a (Shimadzu), onde os resíduos de aminoácidos ácidos formados a partir de uma sequência de reações químicas. A reação de degradação de Edman ocorre no lado N-terminal da cadeia peptídica liberando um resíduo por ciclo reativo. Os resíduos (PTH-aminoácidos) foram identificados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (Wako Chem), equipado com uma bomba, modelo LC-10AS (Shimadzu) e um detector de luz ultravioleta, modelo SPD-10^a, acoplados ao próprio sequenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foram realizados por meio do Software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10^a (Shimadzu), com modificações.

4.2.5. Síntese manual de peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos lineares será realizada por meio do método manual em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxycarbonil (estratégia Fmoc). Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo HOBt (NOVABIOCHEM) como agente ativador dos aminoácidos e PyBOP (ALDRICH) como agente acoplante.

Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado N-N- Dimetilformamida (SYNTH) e Piperidina (FLUKA), respectivamente. Todas as reações acima foram realizadas sob agitação mecânica em capela. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05). Após a secagem, foi feita a clivagem entre o peptídeo e a resina, utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v). Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-peptídeo foi centrifugada em uma centrífuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico para promover a precipitação do peptídeo. O peptídeo foi ressuspendido em água Milli-Q® (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754).

Após a síntese, os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) segundo os parâmetros analíticos descritos anteriormente, e em seguida, submetidos à espectrometria de massas para avaliar suas respectivas massas moleculares e suas estruturas primárias, a fim de confirmar que os peptídeos sintéticos apresentam as mesmas propriedades bioquímicas que os naturais encontrados no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos peptídeos a partir do veneno bruto da serpente

Crotalus durissus terrificus

O veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizado foi obtido a partir do “pool” extraído de serpentes adultas da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, microchipadas individualmente e de ambos os sexos, criadas e mantidas em cativeiro no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), localizado na Fazenda Experimental Lageado – UNESP, Campus de Botucatu. Após a realização do protocolo experimental descrito anteriormente, o qual utilizou a solução TFA à 0,1% (v/v) juntamente com etapas de centrifugação por meio de filtros de poro de 3 kDa, a extração dos peptídeos propostos foi realizada, sendo que todo o material solubilizado contendo massa molecular menor que 3 kDa, foi coletado após sua passagem pelo filtro. Em seguida, o peso seco total deste material de origem peptídica foi quantificado, obtendo-se um rendimento médio de 128 mg (12,8%) em relação ao veneno bruto inicial que era de 1 (um) grama de veneno bruto. Portanto, a fração peptídica do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* neste trabalho foi submetida à cromatografia líquida de fase reversa para a purificação dos peptídeos presentes nesta amostra.

5.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance sob fase reversa (RP-HPLC)

Uma vez os peptídeos do veneno da serpente *C.d.t.* submetidos à cromatografia líquida sob fase reversa (RP-HPLC), treze frações peptídicas foram evidenciadas, sendo as mesmas enumeradas de I a XIII. A **Figura 3** representa o cromatograma da fração peptídica do veneno da serpente *C.d.t.* obtido neste trabalho.

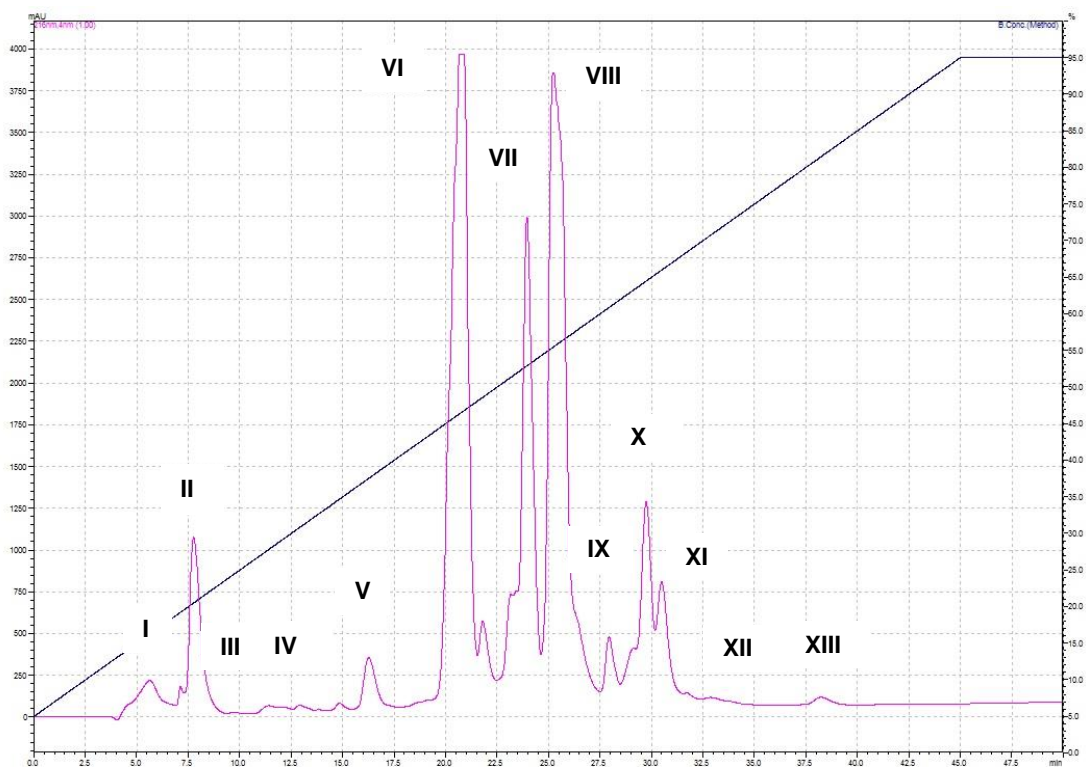


Figura 3. Perfil cromatográfico obtido da fração peptídica obtida a partir do veneno bruto de *C.d.t.* Fase móvel: tampões A (TFA 0,1% [v/v]) e tampão B (ACN 90% [v/v]/ TFA 0,1% [v/v]), fluxo de 0,7mL/min, absorvância de 214nm por 50 minutos.

Uma vez isoladas treze frações peptídicas, avaliou-se o rendimento peptídico por fração. O **Quadro 2** evidencia o rendimento individual de cada fração oriundo da extração de peptídeos a partir de 1 (um) grama de veneno bruto em fracionado sob RP-HPLC.

Quadro 2. Rendimento individual das frações peptídicas.

Fração	Amostra (mg)	Porcentagem (%)
I	85,59	66,8
II	6,22	4,86
III	1,59	1,24
IV	0,85	0,66
V	2,05	1,6
VI	12,37	9,66
VII	4,26	3,33
VIII	9,07	7,08
IX	1,42	1,11
X	3,07	2,4
XI	0,83	0,65
XII	0,83	0,65
XIII	0,7	0,54
Total	128mg	100%

5.3. Avaliação da contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

A partir das frações cromatográficas obtidas na etapa anterior, as treze frações peptídicas foram submetidas aos ensaios de contratilidade de tecido isolado. As frações peptídicas que apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) foram as frações I e V, sendo que o veneno total também apresentou atividade, comparadas ao controle (**Figura 4**). As frações II, III, IV, VI, XI, XII e XIII apresentaram quantidade de veneno suficiente apenas para um canal, o qual é o local em que a artéria mesentérica foi fixada junto a solução de Krebs-Henseleit para analisar a contratilidade do tecido, portanto, não foram analisadas estatisticamente (**Figuras 5, 6 e 7**). As frações VII, VIII, IX e X não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$).

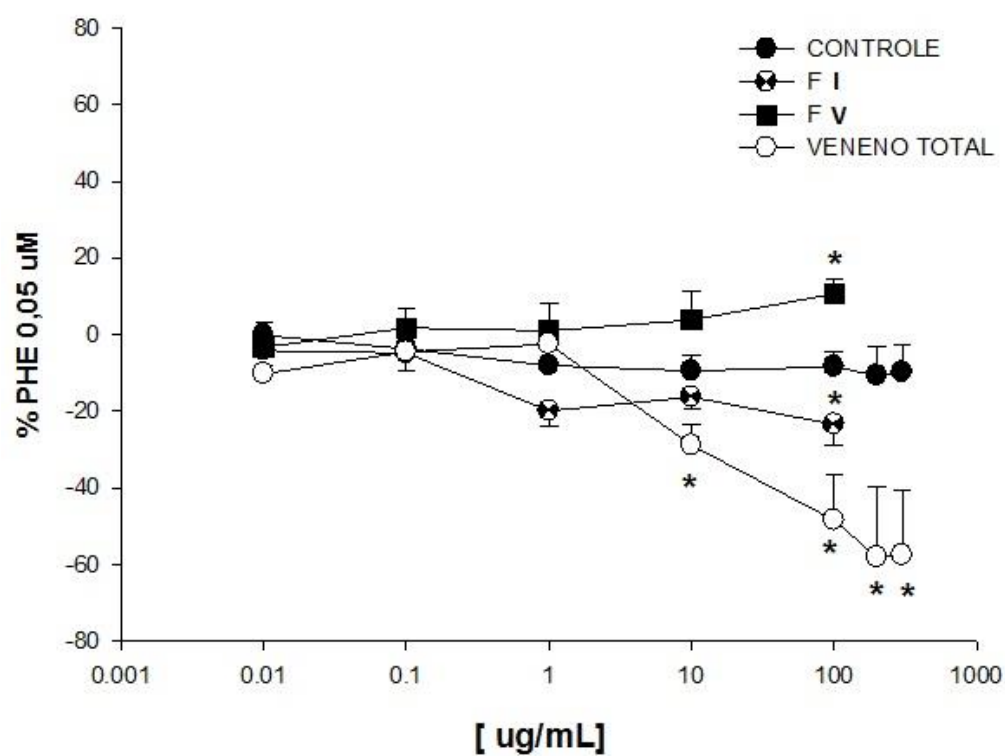


Figura 4. Efeito do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* e da fração I e V na tensão basal de preparações de artéria mesentérica de músculo liso. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05uM) (0,05umol L⁻¹). Frações que apresentaram significância estatística ($p > 0,05$).

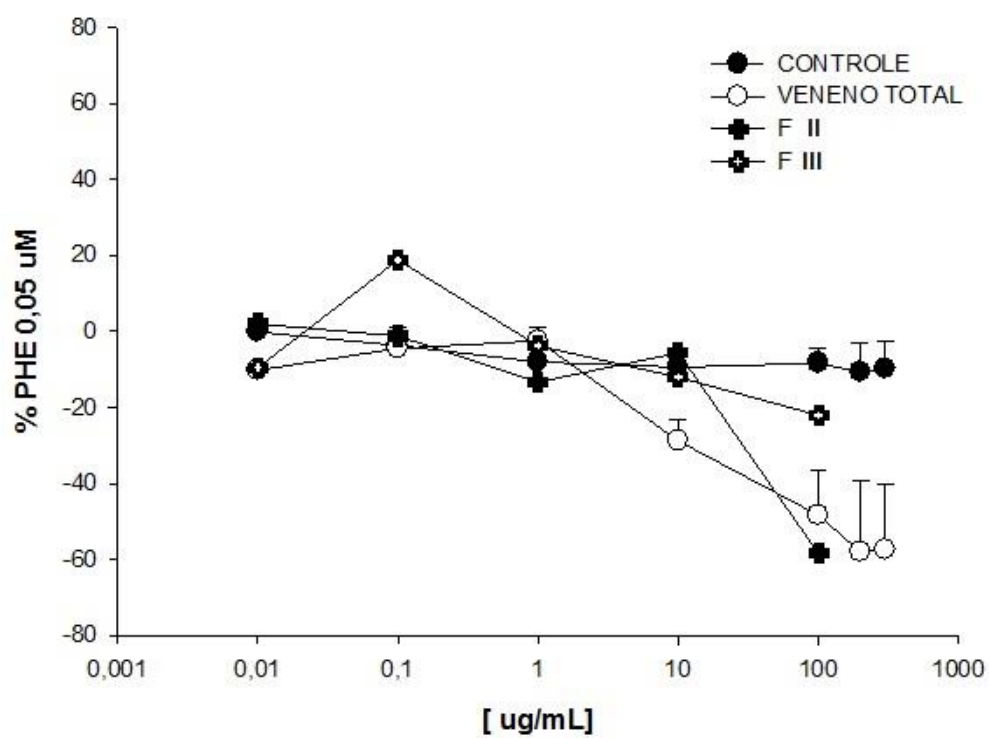


Figura 5. Efeito do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* e da fração II e III na tensão basal de preparações de artéria mesentérica de músculo liso. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05uM) (0,05umol L⁻¹).

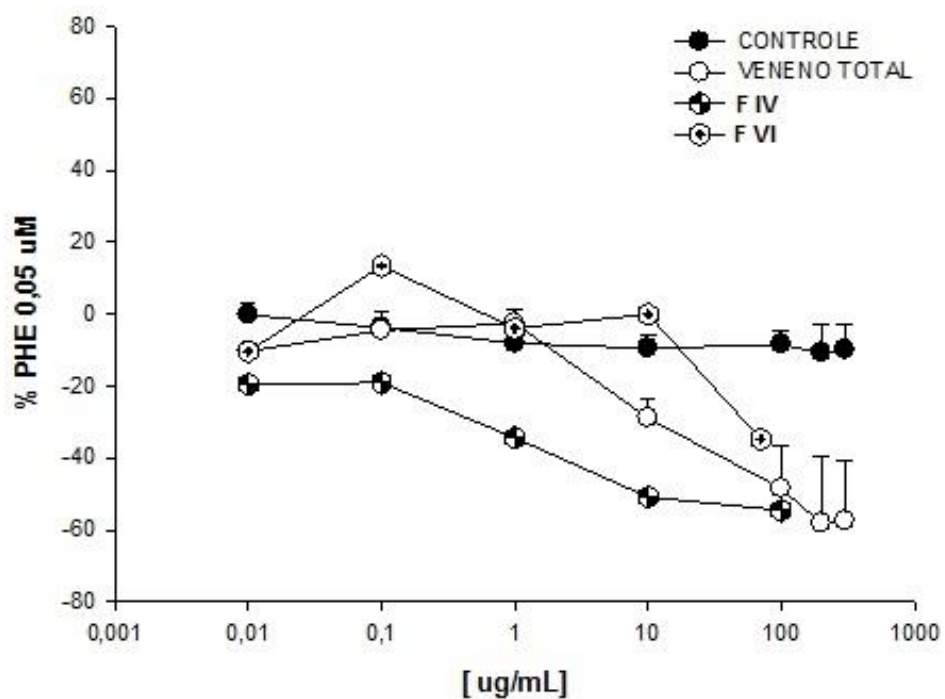


Figura 6. Efeito do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* e da fração IV e VI na tensão basal de preparações de artéria mesentérica de músculo liso. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05uM) (0,05umol L⁻¹). Frações que não apresentaram significância estatística ($p>0,05$).

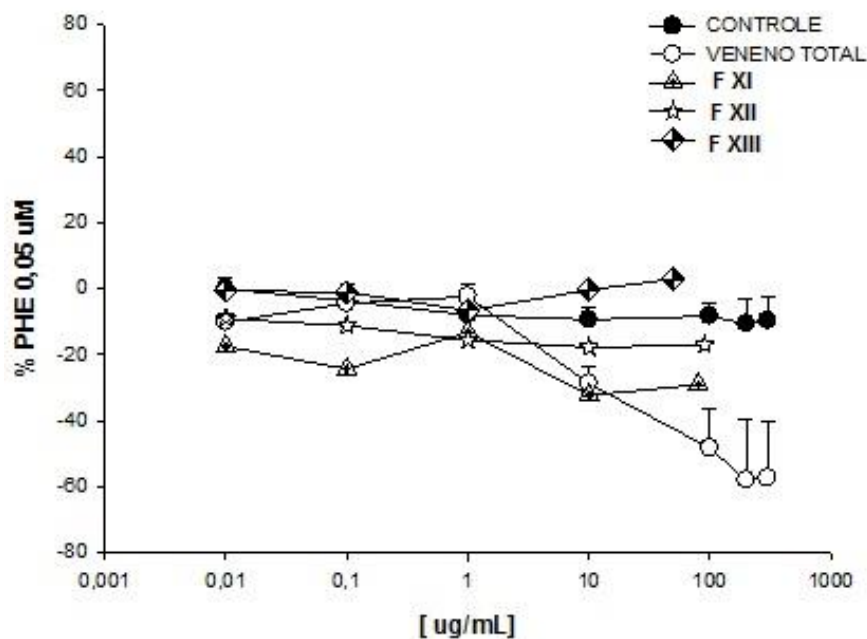


Figura 7. Efeito do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* e da fração XI, XII e XIII na tensão basal de preparações de artéria mesentérica de músculo liso. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05uM) (0,05umol L⁻¹).

Apesar das frações II, III, IV, VI e XI não terem sido analisadas estatisticamente, nota-se que as mesmas apresentaram tendências sobre a atividade hipotensora, sendo estas, frações em potenciais para estudos futuros nesta linha de pesquisa. As frações que apresentaram significância estatística evidenciaram um relaxamento do músculo liso (Fração I) e uma contração (Fração V) do músculo liso. Portanto, pode-se concluir que estas frações apresentadas e o veneno bruto apresentam um efeito hipotensor e hipertensor para a artéria mesentérica. Desta forma, os estudos sobre caracterização estrutural foram encaminhamos somente com o componente hipotensor contido na fração I.

5.4. Recromatografia da fração biologicamente ativa

Nesta etapa, a fração I foi submetida à etapa de recromatografia líquida. O novo cromatograma deste refração está evidenciado na **Figura 8**.

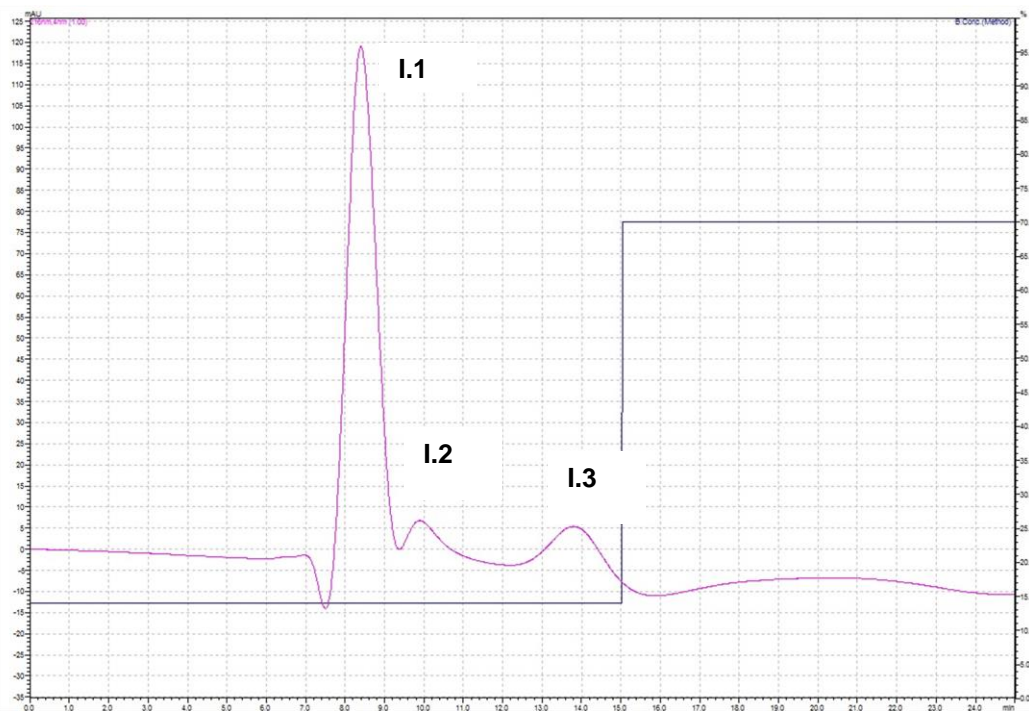


Figura 8. Perfil cromatográfico obtido da etapa de recromatografia da fração I obtida a partir do veneno bruto. Fase móvel: gradiente isocrático do tampão B (90%ACN/0,1%TFA), fluxo de 0,5mL/minuto, absorvância de 214 nm por 20 minutos.

Por sua vez, a fração I.1 foi submetida à análise de espectrometria de massas, a fim de avaliar a pureza do componente isolado. A **Figura 9** evidencia um único peptídeo nesta fração com massa molecular de 1295 Da.

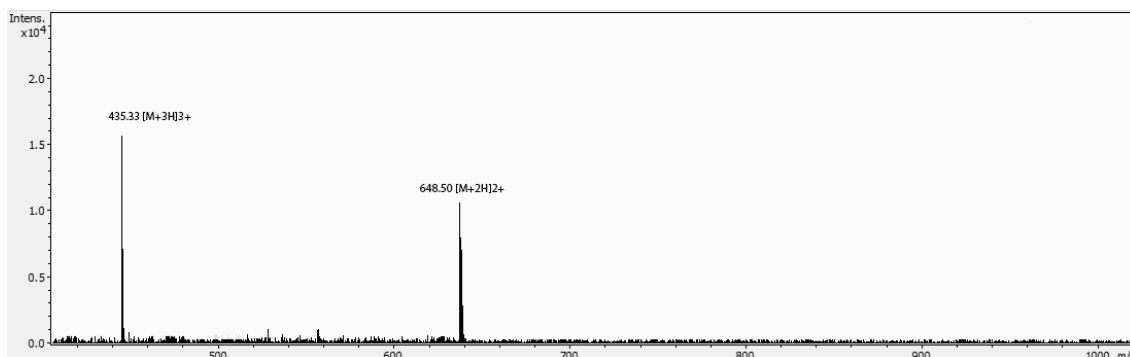


Figura 9. Espectro de massas do tipo ESI-MS do peptídeo natural isolado da fração I.1. $[M+3H]^{3+} = 435.33$ / $[M+2H]^{2+} = 648,50$ - Massa molecular: 1295 Da.

5.5 – Sequenciamento dos peptídeos por Química Degradativa de Edman

O peptídeo isolado na fração I.1 foi submetido ao sequenciamento peptídico utilizando-se a Química Degradativa de Edman, para a elucidação de sua sequência primária. A sequência de aminoácidos N-terminal identificada apresentou 11 resíduos de aminoácidos: QHILYVGVHD. Quando comparada esta sequência com outras sequências de proteínas e peptídeos presentes banco de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI nr), encontrou-se 100% de identidade com 10 resíduos de aminoácidos presentes na proteína *giroxin B2.1* (enzima *fibrinogen-clotting*) da espécie *Crotalus durissus terrificus*, código de acesso C58G94.1 e 100% de similaridade com 10 resíduos de aminoácidos da serinoprotease de *Crotalus adamanteus*, código de acesso F8S114.1. A comparação foi realizada por alinhamento utilizando-se o programa BLAST e a **Figura 10** evidenciam este alinhamento estrutural e identificação.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Thrombin-like enzyme gyroxin B2.1; Short=SVTLE gyroxin B2.1; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP [Crotalus durissus	36.7	36.7	90%	0.17	100%	Q58G94.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Thrombin-like enzyme crotalase; Short=SVTLE; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease 2; Short=SVSP; Flags: Precursor [Crotalus ad	36.7	36.7	90%	0.18	100%	F8S114.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Thrombin-like enzyme gyroxin B1.3; Short=SVTLE gyroxin B1.3; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP; Flags: Precu	36.7	36.7	90%	0.18	100%	B0FXM1.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=Thrombin-like enzyme gyroxin B1.4; Short=SVTLE gyroxin B1.4; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP; Flags: Precu	32.5	32.5	90%	4.4	90%	B0FXM2.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Histoplasma capsulatum H1431][Ajiellomyces capsulatus H143]	29.5	29.5	72%	39	100%	EER40544.1
<input type="checkbox"/>	predicted protein [Histoplasma capsulatum G186AR][Ajiellomyces capsulatus G186AR]	29.5	29.5	72%	39	100%	EEH02982.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Histoplasma capsulatum H881][Ajiellomyces capsulatus H88]	29.5	29.5	72%	40	100%	EGC48282.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	28.6	28.6	81%	78	89%	XP_001434022.1
<input type="checkbox"/>	glycoside hydrolase [Campylobacter mucosalis]	27.8	27.8	90%	147	80%	WP_034969864.1
<input type="checkbox"/>	transmembrane protein putative [Tetrahymena thermophila SB210]	27.4	27.4	63%	191	100%	EWST3285.1

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

RecName: Full=Thrombin-like enzyme gyroxin B2.1; Short=SVTLE gyroxin B2.1; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP [Crotalus durissus terrificus]

Sequence ID: sp|Q58G94.1|VSP21_CRODU Length: 238 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 48 to 57 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.7 bits(79)	0.17	10/10(100%)	10/10(100%)	0/10(0%)

Query 2 HILIVGVHD 11
 HILIVGVHD
 Sbjct 48 HILIVGVHD 57

Related Information

Identical Proteins - Identical proteins to Q58G94.1

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

RecName: Full=Thrombin-like enzyme crotalase; Short=SVTLE; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease 2; Short=SVSP; Flags: Precursor [Crotalus adamanteus]

Sequence ID: sp|F8S114.1|VSPCR_CROAD Length: 262 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 72 to 81 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.7 bits(79)	0.18	10/10(100%)	10/10(100%)	0/10(0%)

Query 2 HILIVGVHD 11
 HILIVGVHD
 Sbjct 72 HILIVGVHD 81

Related Information

Identical Proteins - Identical proteins to F8S114.1

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

RecName: Full=Thrombin-like enzyme gyroxin B1.3; Short=SVTLE gyroxin B1.3; AltName: Full=Fibrinogen-clotting enzyme; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP; Flags: Precursor [Crotalus durissus terrificus]

Sequence ID: sp|B0FXM1.1|VSP13_CRODU Length: 262 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 72 to 81 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.7 bits(79)	0.18	10/10(100%)	10/10(100%)	0/10(0%)

Query 2 HILIVGVHD 11
 HILIVGVHD
 Sbjct 72 HILIVGVHD 81

Related Information

Identical Proteins - Identical proteins to B0FXM1.1

Figura 10. Identificação do peptídeo presente na fração I pela ferramenta Blast do *National Center of Biotechnology Information (NCBI)*.

5.6. Síntese peptídica do peptídeo alvo deste estudo

Nesta etapa do trabalho, a sequência dos 11 resíduos de aminoácidos foram submetidas à síntese por meio da estratégia F-moc, sendo elaborada da seguinte maneira: [NH₂]-QHILIVGVHD-[OH]. O peptídeo sintético foi purificado por cromatografia líquida (**Figura 11**), a fim de avaliar a efetividade do processo de síntese orgânica. Análises de espectrometria de massas, avaliaram a pureza do peptídeo sintético (**Figura 12**).

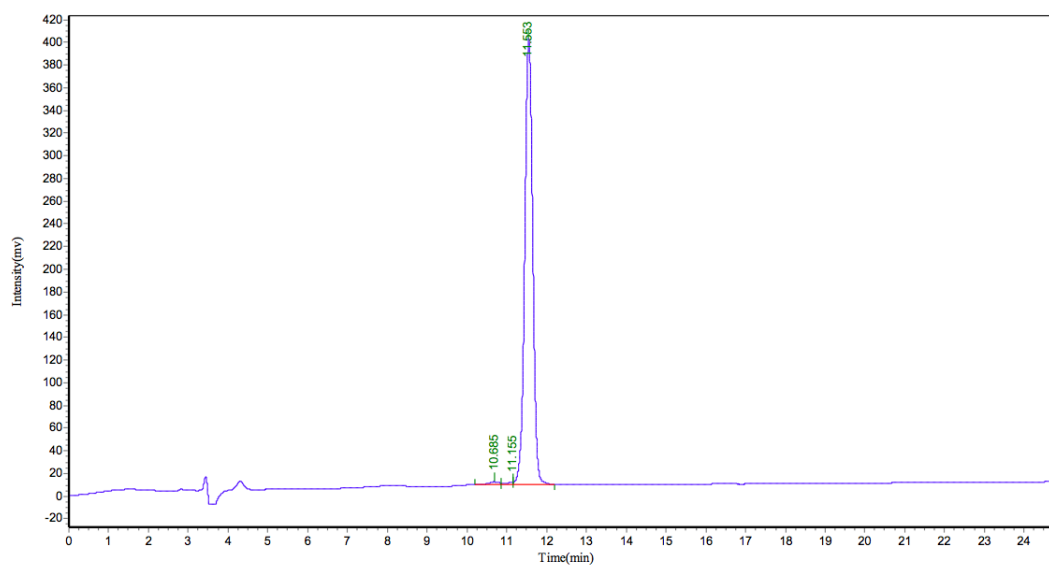


Figura 11. Perfil cromatográfico do peptídeo sintético QHILYVGVHD. Fase móvel: tampões A (TFA 0,1% [v/v]) e tampão B (ACN 100% [v/v]/ TFA 0,1% [v/v]), fluxo de 1.0 mL/min, absorvância de 220nm por 25 minutos.

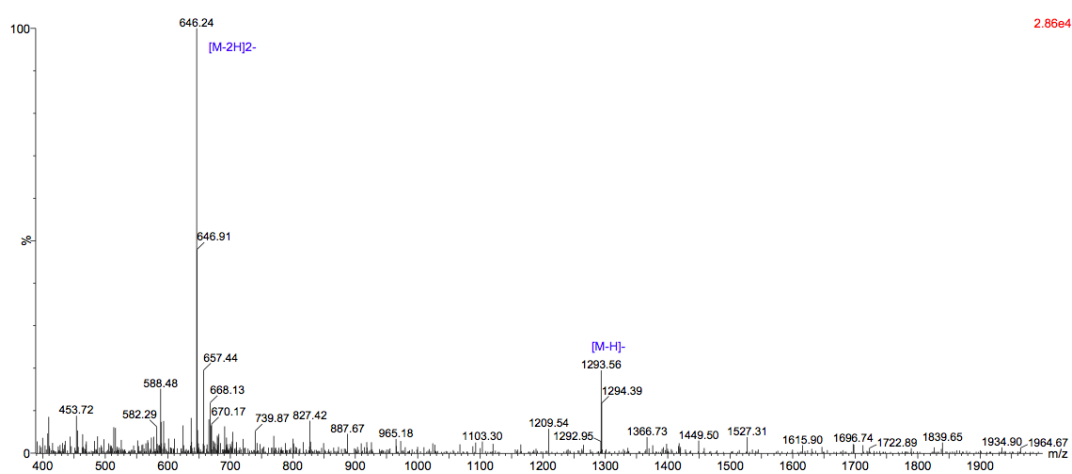


Figura 12. Espectro de massas do tipo ESI-MS do peptídeo sintético QHILYVGVHD. $[M-2H]^{2-} = 646.24$ / $[M+1H]^{1+} = 1293.56$ - Massa molecular: 1294 Da.

5.7. Avaliação da contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença do peptídeo sintético.

O resultado obtido nesta etapa experimental de contratilidade de músculo liso na presença do peptídeo sintético está evidenciado na **Figuras 14**, em comparação com o veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* e ao controle.

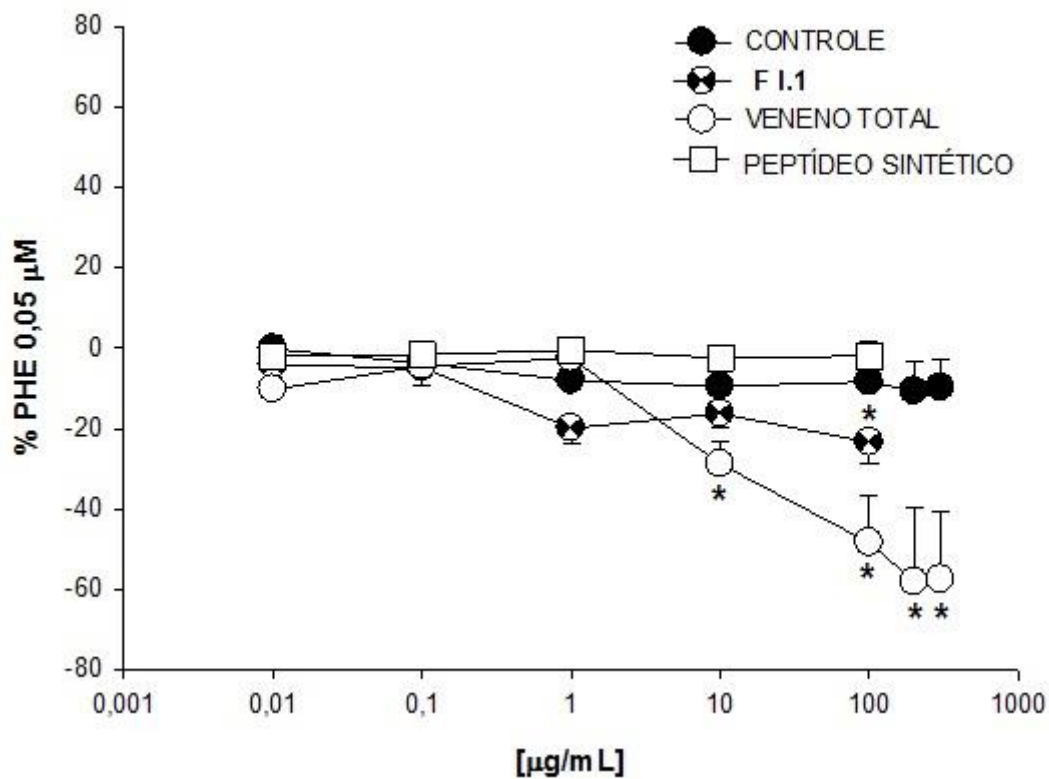


Figura 13. Efeito do peptídeo sintético QHILYVGVHD na tensão basal de preparações de artéria mesentérica de músculo liso. As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por PHE (0,05µM) (0,05umol L⁻¹). Frações que apresentaram significância estatística ($p > 0,05$).

Nota-se que, o peptídeo sintético não apresentou um efeito hipotensor para a artéria mesentérica, enquanto que a forma natural deste peptídeo isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* apresentou de forma positiva o efeito hipotensor.

6. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes apresentam uma composição química complexa de componentes que possuem diversas ações biológicas. Além disso, estes venenos podem ser considerados uma biblioteca de compostos bioativos com grande potencial terapêutico, o qual tem motivado pesquisadores na área de toxinologia em utilizar essas substâncias tóxicas como modelos em potenciais para o desenvolvimento de produtos de interesse biotecnológico e terapêutico. Estima-se que, cerca de 60% das drogas antitumorais e anti-infecciosas encontradas disponíveis comercialmente no mercado ou que estão em fase clínica de estudo, são de origem natural. Desta forma, as toxinas animais, das quais participam as toxinas ofídicas, também ganharam espaço notório no mercado farmacêutico⁶².

Inicialmente, os primeiros estudos sobre os venenos de serpentes no campo científico era compreender como combater os efeitos dos acidentes ofídicos e como estas toxinas atuavam. Estes venenos foram utilizados também na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, sendo que no início do século XX, a ideia de utilizar as toxinas purificadas como uma fonte terapêutica foi alvo de muitos estudos⁶³.

Com os modernos avanços das estratégias investigativas *Omics* (genômica, transcriptômica, proteômica) e as ferramentas de bioinformática, o número de peptídeos que estão sendo revelados utilizando diversas técnicas analíticas, têm aumentado exponencialmente⁶⁴. O uso de tecnologia de DNA recombinante para a

expressão de peptídeos em células eucarióticas como procarióticas tem sido muito utilizada⁷⁴. Porém, o desafio atual é revelar a localização celular, as funções biológicas, aprofundar nas caracterizações bioquímicas dos peptídeos preditos e identificar aqueles que podem servir como alvos para a intervenção terapêutica em diversas doenças⁶⁴.

O presente trabalho descreve uma abordagem metodológica para o isolamento e a identificação de peptídeos hipotensores presentes no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Novos peptídeos relacionados com princípios hipotensores e hipertensores foram encontrados, a partir da investigação das 13 frações peptídicas isoladas do veneno da serpente por cromatografia líquida por fase reversa. No presente trabalho, o protocolo de extração proposto promoveu um rendimento de 12,8% de compostos de baixa massa molecular em relação ao veneno bruto, dado este que corrobora com os da literatura, os quais exemplificam que venenos de serpentes são compostos por cerca de 90% proteínas^{65; 66; 21; 23}.

A técnica analítica utilizada neste trabalho para o isolamento e fracionamento dos peptídeos de *C.d.terrificus* foi a cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma coluna C_{18} . Muitos trabalhos na literatura que envolveu peptídeos de serpentes optaram por isolar peptídeos hipotensores por cromatografia líquida por filtração em gel a partir do veneno bruto e, posteriormente, se utilizar da estratégia de cromatografia líquida de fase reversa para repurificar os peptídeos alvo dos estudos, como por exemplo, Graham e colaboradores⁶⁷ frente aos venenos de três espécies de serpentes: *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus viridis viridis* e *Lachesis muta*. Paralelamente, Menin e colaboradores⁶⁸ isolaram peptídeos potenciadores de bradicinina do veneno de serpentes *Bothrops moojeni* por meio da cromatografia de fase reversa, promovendo uma extração prévia dos peptídeos na presença de TFA 0,1% (v/v). Dessa forma, o presente trabalho atuou da mesma forma de Menin e colaboradores⁶⁸, prevenindo prováveis interações de peptídeos e proteínas, os quais

podem formar complexos estáveis e não serem fracionados nas etapas de filtração em gel.

As abordagens toxicológicas e farmacológicas com venenos de serpentes são temas de estudo de grande relevância devido aos inúmeros casos de acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. A fisiopatologia dos envenenamentos por serpentes envolve uma série de eventos complexos que dependem da ação combinada dos componentes dos venenos⁶⁹.

Os efeitos do veneno do gênero *Crotalus* na função renal e contratilidade aórtica e mesentérica não possuem relatos na literatura, embora esteja descrito a capacidade dos venenos crotálicos de induzir neurotoxicidade, desordens na coagulação, miotoxicidade e falência renal aguda^{70; 71; 72}.

A partir das frações cromatográficas obtidas, as treze frações peptídicas foram submetidas aos ensaios de contratilidade de tecido isolado. A artéria mesentérica, sendo esta um músculo liso, foi escolhida por possuir uma maior contratilidade e resistência e poderá auxiliar nesta avaliação da atividade vascular destes componentes peptídicos presentes no veneno da serpente em questão. As frações peptídicas que apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) foram as frações I e V, sendo que o veneno total também apresentou atividade, comparadas ao controle. Estas frações evidenciaram um relaxamento do músculo liso (fração I) e uma contração do músculo liso (fração V). Portanto, pode-se concluir que estas frações apresentadas e o veneno bruto apresentam um efeito hipotensor (fração I) e hipertensor (fração V) para a artéria mesentérica. Pereira⁷³ realizou um estudo de perfusão de rim isolado para a espécie *Crotalus durissus cumanensis*, em que o grupo foi tratado com a mesma solução perfusora de Krebs-Henseleit, e não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de função renal durante os 120 minutos do experimento. Nos ensaios realizados com o veneno total (0,3µg/mL) não foram observadas alterações significativas dos parâmetros de função renal quando comparado ao controle interno. Com o aumento da concentração do veneno

(10µg/mL) houve um aumento significativo na pressão de perfusão e na resistência renal vascular.

Estudo dos efeitos renais com a crotoxina isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* não foi observada alterações significativas na pressão de perfusão e na resistência vascular renal⁷³.

No presente trabalho, a fração V apresentou uma ação vasoconstritora do músculo liso para a espécie *C.d.terrificus*, dado este que não corroborou aos achados de Pereira⁷³ que, ao investigar a hipótese de ação vasoconstritora do veneno bruto de uma espécie filogeneticamente próxima (*Crotalus durissus cumanensis*), os ensaios de atividade vascular demonstraram que o veneno bruto não alterou a contratilidade dos anéis de aorta mantidos sob tensão basal.

Vários mecanismos estão envolvidos na contração do tecido liso vascular. As células musculares lisas podem contrair de uma forma direta, através de seus receptores específicos para neurotransmissores, e de forma indireta, através da liberação de substâncias derivadas do endotélio. Além destes mecanismos, o influxo de cálcio através da membrana e a liberação dos estoques intracelulares têm papel fundamental na contração vascular⁷⁴.

Peptídeos vasoconstritores têm sido encontrados em alguns venenos de serpentes, tais como sarafotoxina e peptídeos inibidores de bradicinina⁸⁷. O isopeptídeo sarafotoxina, constituinte do veneno da serpente do gênero *Atractasips*, é estruturalmente e funcionalmente semelhante ao componente vasoconstritor endotelina⁷⁶. Estudos de Graham e colaboradores⁷⁵ evidenciaram a presença de peptídeos potenciadores de bradicinina nos venenos das serpentes *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus viridis viridis* e *Lachesis muta*, sendo que em seus ensaios biológicos, a artéria caudal de ratos Wistar foi utilizada para avaliar a ação vascular conforme este presente trabalho. O sistema de perfusão da artéria caudal em ratos é um modelo bem caracterizado para estudar o mecanismo utilizando vários compostos que conduzem à constrição e dilatação vascular em músculo liso. Uma das principais

vias que causam constrição envolve a fenilefrina, que estimula a abertura de canais voltagem-dependentes de Ca^{2+} . Essa estimulação da abertura de canais de Ca^{2+} ocorreu também para a artéria mesentérica, envolvendo a fenilefrina e utilizando a mesma solução de Krebs-Henseleit. O aumento intracelular de Ca^{2+} inicia uma cascata que conduz em última instância a constrição⁷⁷.

Ligado às membranas plasmáticas, podem-se encontrar a fosfolipase C, as quais são ativadas pela fenilefrina no músculo liso, gerando dois mensageiros, trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol⁹⁰. IP3 mobiliza íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, enquanto diacilglicerol ativa a proteína quinase C levando a constrição^{78; 79}. A bradicinina é um peptídeo vasodilatador e anti-proliferativa que exerce a sua ação vasodilatadora endotelial através da secreção de óxido nítrico em alguns vasos sanguíneos⁸⁰. Tanto a fenilefrina quanto a bradicinina são utilizadas nesta experiência para vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente⁷⁵.

Peptídeos vasoconstritores foram encontrados em outros viperídeos, alguns mais notáveis, como as sarafotoxinas. Estes peptídeos foram isolados a partir do veneno da serpente da espécie *Atractaspis engaddensis*⁸¹. As sarafotoxinas são um grupo de 21 resíduos de aminoácidos cardiotoxicos que induzem uma grave vasoconstrição coronariana, levando a bradicardia e vaso espasmos, e eles têm sido usados no desenvolvimento de Bosentan, um fármaco usado no tratamento da hipertensão arterial pulmonar⁸².

Estas toxinas constituem ferramentas exclusivas que auxiliam no estudo e identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de medicamentos com ações antagônicas associados com vaso espasmos, (infarto do miocárdio) aguda (hipertensão e doença cardíaca crônica) e vasoconstrição^{82; 83}.

De acordo com Evangelista et al.⁸⁴, peptídeos da família dos natriuréticos foram identificados no veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* com efeitos renais e vasculares. Já em 2011, Evangelista e colaboradores⁸⁵ estudaram o efeito hipotensor do veneno de *Crotalus durissus cascavella* relacionando a produção de óxido nítrico.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do veneno de *C. d. cascavella* na determinação da pressão arterial média e reatividade vascular mesentérica em ratos. O veneno desta serpente provocou uma diminuição dose dependente na pressão arterial média, frequência cardíaca e respiratória, com o aumento dos níveis de nitrito de plasma. Observaram-se também após a administração do veneno, a hipotensão e o aumento da produção de nitrito. Para investigar os efeitos de *C. d. cascavella* em vasos de resistência, a reatividade vascular mesentérica foi estudada e os resultados sugerem que o efeito hipotensor do veneno não é dependente de uma atividade vasodilatadora direta.

Muitos venenos de serpentes contêm toxinas que produzem efeitos cardiovasculares profundos. Os locais de ação destas toxinas incluem músculo cardíaco, músculo liso vascular e o leito vascular capilar. Alguns venenos de serpentes, por exemplo, contêm peptídeos que inibem a enzima conversora da angiotensina e potencializam as ações biológicas de bradicinina, os peptídeos potencializadores de bradicinina (PPBs). Por sua vez, outros peptídeos de venenos de serpentes também atuam como hipotensores, os quais são peptídeos natriuréticos e as sarafotoxinas. Sarafotoxinas são toxinas peptídicas encontradas em venenos de serpentes da espécie *Atractaspis sp.* e exibem propriedades de vasoconstrição potentes. Estes peptídeos compartilham elevado grau de identidade de sequência com endotelinas, reconhecem e ligam-se a seus receptores. Proteínas do veneno de serpente também podem aumentar a permeabilidade capilar, como por exemplo, a proteína (ICPP), que foi recentemente isolada a partir do veneno de *Vipera lebetina*. ICPP é um fator de permeabilidade extremamente potente com uma estrutura semelhante à do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Assim, existe uma vasta gama de toxinas de serpentes com potente atividade cardiovascular. Algumas destas proteínas e peptídeos são ferramentas altamente seletivas para o estudo de processos fisiológicos⁸⁷.

Estudos de Lopes e colaboradores⁸⁶ evidenciaram o peptídeo hipotensor Pro-Nle-Pro-Leu-Nle-Tyr-Leu-Gly-Ile-Pro-Pro (PNLPNYLGIPP) para a espécie *Crotalus durissus cascavella* (PPB-Cdc). Apesar de BPP-Cdc apresentar a típica sequência na extremidade C-terminal de forma similar aos PPBs, este peptídeo não apresenta um resíduo de aminoácido do tipo pyroglutamato em seu N-terminal, sugerindo que este resíduo não é essencial para a sua atividade. Neste mesmo estudo, os autores evidenciaram uma baixa similaridade do peptídeo BPP-Cdc com todos os PPBs descritos na literatura, onde BPP-Cdc apresenta homologia de apenas 36% com outros PPBs do mesmo gênero *Crotalus*, como BPP1Cdt e CDt1a, isolado a partir de *C. d. terrificus*⁸⁸ e uma homologia de 45,4% observada apenas com PeptB e PeptC do gênero *Agkistrodon*^{89; 90; 91; 92; 93}.

Diante da singularidade estrutural encontrada do peptídeo hipotensor contida na fração I do veneno de *Crotalus durissus terrificus* identificado neste trabalho, sugere-se que este peptídeo possa compartilhar domínios similares aos peptídeos natriuréticos, conforme Graham e colaboradores⁷⁵, que avaliaram uma molécula peptídica em comum dos venenos das serpentes *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus viridis viridis* e *Lachesis muta*, a qual se mostrou com uma ação antagonista da bradicinina no receptor B2 e vascular em ratos com um domínio que reside entre os peptídeos potenciadores de bradicinina e domínios do tipo C de peptídeos natriuréticos.

A fim de avaliar o compartilhamento estrutural primário deste peptídeo hipotensor identificado no presente trabalho com o maior banco de sequências de macromoléculas *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), o peptídeo da fração I se mostrou similar a uma sequência peptídica interna de uma serinoprotease presente nos venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus adamanteus*, a toxina giroxina com atividade coagulante.

A princípio, nosso grupo questionou se o veneno bruto tivesse sofrido algum processo de degradação devido à ausência de inibidores de proteases no momento da

extração do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Esta provável degradação poderia ter clivado a serinoprotease presente neste veneno, liberando assim, este peptídeo identificado neste estudo. Para se certificar a existência natural deste peptídeo, um novo pool de veneno foi coletado na presença de inibidores de proteases e cromatografado novamente sob as mesmas condições descritas anteriormente. O resultado obtido (dados não mostrados) foram exatamente os mesmos dos mostrados na seção de resultados no isolamento das trezes frações peptídicas. Desta forma, provou-se que este peptídeo identificado não é produto de um processo de degradação do veneno, mas um peptídeo geneticamente produzido pelo organismo, sendo liberado no veneno juntamente com as proteínas. Estudos na literatura com serinoproteases do veneno das serpentes *Trimeresurus mucrosquamatus* e *Crotalus viridis heleri* mostraram atividades hipotensoras em ensaios *in vitro* e *in vivo*, quando investigadas sob o ponto de vista das atividades fibrinogelítica e fibrinolítica^{94; 95; 96}. Desta forma, acredita-se que, a atividade hipotensora para estas serinoproteases estejam atreladas a sequência identificada neste peptídeo da fração I, por compartilharem uma estrutura primária semelhante.

Porém, quando a sequência peptídica do componente natural foi submetido à síntese peptídica pela estratégia F-moc, o composto sintético não apresentou atividade de contratilidade em relação ao composto natural. Alguns trabalhos na literatura evidenciaram este mesmo comportamento encontrado neste trabalho. Acredita-se que este ocorrido possa ter algumas ter sido devido às possíveis modificações pós-traducionais presentes nas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos do peptídeo natural, as quais não puderam ser reproduzidas na forma sintética devido ao estudo estrutural do presente trabalho ter sido realizado exclusivamente na ordem da estrutura primária. Paralelamente e de forma complementar, como a estrutura secundária do peptídeo natural não foi avaliada, acredita-se que a atividade de contratilidade do peptídeo sintético pode ter sido comprometida também. Uma vez que, estrutura molecular está diretamente

correlacionada à função molecular, a ausência de estudos estruturais mais aprofundados neste trabalho, puderam comprometer a atividade funcional do material sintético.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que o protocolo de extração de peptídeos do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* aplicado neste estudo foi eficaz e corroborou a literatura, no qual por meio da cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) os peptídeos foram isolados. O peso seco total deste material de origem peptídica foi quantificado, destacando-se um rendimento médio de 128 mg (12,8%) em relação ao veneno bruto (1 grama). Quando submetida à estratégia de purificação por cromatografia líquida de fase reversa, 13 frações foram isoladas. Por meio da caracterização farmacológica evidenciou-se que, uma fração apresentou efeito vasodilatador hipotensor e outra efeito hipertensor, estatisticamente. A fração hipotensora foi recromatografada e um único componente identificado com a sequência QHILYVGVHD e massa molecular 1295 Da. Por sua vez, esta molécula natural com atividade hipotensora foi submetida à síntese peptídica. A forma sintética deste peptídeo quando submetida aos ensaios de contratilidade de tecido isolado *in vitro* de músculo liso em relação ao fármaco Captopril, o resultado foi negativo.

Acredita-se que, a continuidade deste trabalho seja extremamente relevante, haja vista que, outras frações hipotensoras evidenciaram tendências para a atividade biológica vasoconstritora, alvo deste estudo. Além disso, estudos estruturais mais aprofundados poderão auxiliar na elucidação da conformação tridimensional dos compostos, a fim de dar um maior suporte na produção dos peptídeos sintéticos a serem revelados como potenciais candidatos à princípios vasoconstritores.

8. REFERÊNCIAS

1. Georgieva D, Arni RK, Betzel C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert Rev. Proteomics*. 2008; 5: 787-797.
2. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de controle de serpentes. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
3. Warrel DA, Theakston RDG, Wuster W. Destruction of the collection of reptiles and arthropods at Butantan Institute: a view from the United Kingdom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010; 16(4): 534-536.
4. Barraviera B. Animais peçonhentos de importância médica no Brasil/ Venomous animals with medical importance in Brasil. *J. Bras. Med*. 1995; 68(1/2): 121-126.
5. Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*. 1989; 25:1163-1168.
6. Barrio A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venoms. *Act Physiol Lat Am*. 1961; 11:224.
7. Vital BO, Franceschi JP, Waishich E. Pharmacology of crystalline crotoxin toxicity. *Mem Inst Butantan*. 1966; 33:973.
8. Vital BO. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Ass Med Brasil*. 1980; 26:212-218.
9. Georgieva D, Ohler M, Seifert J, Bergen MV, Arni RK, Genov N, Betzed C. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* correlation with pharmacological activities. *Journal of Proteome Research*. 2010; 9(5): 2302-2316.
10. CupoP, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 1988; 82:924-929.
11. Magalhães RA. Rbdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Inst Med Trop*. 1986; 28: 228-233.

12. Kurowaka K, Honda N. Acute renal failure and rhabdomyolysis. *Kidney Int.* 1983; 23:888-898.
13. Amaral CFS, Resende NA, Pedrosa TMG. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico. *Ins Med Trop.* 1988; 30:288.
14. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde - Brasil. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos – FUNASA, 1988.
15. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2003; 36:480-489.
16. Camargo ACM, Hayashi MA. The Bradikinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly specific inhibitors of the somatic angiotensin converting enzyme. *Toxicon.* 2005; 45:1163-1170.
17. Gans C, Elliot WB. Snake venoms: production, injection and action. *Advances in Oral Biology.* 1968; 3:45-81.
18. Thomas R C, Pough FH. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. *Toxicon.* 1979; 17:221-228.
19. Mackessy SP. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). *Comp Biochem Physiol.* 1993; 106 (1):181-189.
20. Karlsson E. Chemistry of proteins toxins in snake venom. In: Lee, C.Y (Ed). *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer-Verlag. 1979; 159-212.
21. Kochva E. Evolution and secretion of venom and its antidotes in snakes. *Period Biol.* 1978; 80(1):11-23.
22. Kochva E, Nakar O, Ovadia M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. *Amer Zool.* 1983; 23:427-430.

23. Yamanoue N, Brito LR, Carneiro SM, Markus RP. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. J Exp Biol. 1997; 200:2457-2556.
24. Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF, Kuruppu S, et al. Early evolution of the venom system in lizards and snake. Nature. 2005; 439:584-588.
25. Moura-da-Silva AM, Theakston RGD, Crampton JM. Molecular evolution of phospholipase A2 and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. Symp Zool Soc Lond. 1997; 70:173-187.
26. Ohno M, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ogawa T, Hattori S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. Toxicon. 2003; 42(8):841-854.
27. Li M, Fry BG, KiniRM., Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aypisurus eydouxii* (marbled sea snake) phospholipase A2 toxins. Mol Biol Evol. 2005a; 22(4):934-941.
28. Li M, Fry BG, KiniRM. Eggs only diet: its implications for the toxins profile changes and ecology of the marbled sea snake *Aypisurus eydouxii*. J Mol Evol. 2005b; 60:81-89.
29. Gans C, Elliot WB. Snake venoms: production, injection, action. Adv Oral Biol. 1968; 3:45-81.
30. Burdmann EA. Acute interstitial nephritis after snake bite. Ren Fail. 1989; 11:51-52.
31. Cardoso JCL, Brando, RB. Acidentes por animais peçonhentos. São Paulo, Santos, 1982; 165-176.
32. Jorge MT, Ribeiro LA. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por Cascavel sul americana. Inst Med Trop. 1992; 34:347-54.
33. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a trombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durisus terrificus*. Braz.J Med Biol Res. 1986; 19(3):333-338.

34. Jerusalinsky D. Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actions. *Toxicon*. 1995; 33(4):389-97.
35. Moreira KG. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*. 2010; 56(1): 55–63.
36. Conti-Tronconi BM, Rafterf MA. Molecular Biology of Neuroreceptors and Ion Channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1986; 139:830-7.
37. Takasaki C, Sugama A, Yanagita A, Tamiya N, Rowan EG, Harvey A L. Effects of chemical modifications of Pa-11, a phospholipase A2 from the venom of australian king brown snake (*Pseudechis australis*), on its biological activities. *Toxicon*. 1988; 28(1): 107-117.
38. Williams J; Rucinski B; Holt J; Niewiarowski S. Elegantin and albolabrin purified peptides from viper venoms: homologies with the RGDS domain of fibrinogen and von Willebrand factor. *Biochim Biophys*. 1990; 1039:81-89.
39. Vink S, Jin AH, Poth KJ, Head, GA, Alewood, PF. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. *Toxicon*. 2010; 59:434-445.
40. Schweitz H, Vigne P, Moinier D. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem*. 1992; 267:13928-32.
41. Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Portaro FCV, Stoclin R, Camargo ACM, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*. 2004; 25:1085-1092.
42. Rocha e Silva, M. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949; 156(2):261-73.

43. Ferreira SH, Greene LH, Alabaster VA, Bakhle YN, Vane JR. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin converting enzyme. *Nature*. 1970; 225-239.
44. Warrel, DA. Snake bite. *Lancet*. 2010; 375(9708):77-88.
45. Cruz AH, Mendonça RZ, Petricevich VL. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediators Inflamm*. 2005; 6:349-59.
46. Hawgood SM, Poulain, F. Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1408:150-160.
47. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics: strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007; 42(11): 1405-1414.
48. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of Reveals Different Strategies to Deal with Prey. *J Proteome Res*. 2010; 9(5):2278-2291.
49. Pimenta DC, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Furtado MF, Camargo AC, et al. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007; 21(6):1034-42.
50. Chin AT, Rocha MM, Paes Leme AF, Pimenta DC, Furtado MF, Serrano SM et al. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Lett*. 2006; 580:4417-4422.
51. Valente RH, Guimarães PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AG, Soares MR, Chapeaurouge, A. et al. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *J Proteomics*. 2009; 72:241-255.
52. Chatrath ST, Chapeaurouge A, Lin Q, Lim TK, Dunstan N, Mirtschin P, Kumar PP. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides*

by a combined transcriptomics and proteomics approach. J Proteome Res. 2010; 10:739-750.

53. OmPraba G, Chapeaurouge A, Doley R, Devi KR, Padmanaban P, Venkatraman C. et al. Identification of a novel family of snake venom proteins from Cerberus rynchops using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. J Proteome Res. 2010; 9:1882-1993.

54. Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. The FEBS Journal. 2008b; 275:3016-3030.

55. Shy Y, Xiang, R, Horvath, C, Wilkins, JA. The role of liquid chromatography proteomics. J Chromatogr 2004; 1053:27-36.

56. Du Vigneaud V, Ressler C, Swna JM, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gordon S. The synthesis for octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. J Am Chem Soc. 1954; 75:4879-4880.

57. Tozzi MG, Camici M, Mascia L, Sgarrella, F. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. FEBS J. 2003; 273: 1089-1101.

58. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of Tetrapeptide. J Am Chem Soc. 1963; 85:2149-2154.

59. Smith, GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 1992; 228:1315-1317.

60. Harvey AL. Snake Venom Peptides. In: Kastin AJ, editor. Handbook of Biologically Active Peptides. Burlington: Academic Press. 2006; 355-62.

61. Souza BM, Marques MR, Tomazela DM, Eberlin MN, Mendes MA, Palma MS. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004; 18(10):1095-1102.

62. Craig W.J. Phytochemicals: guardians of our health. J Am Diet Assoc. 1997; 97:199-204.
63. Barros LC. Fragmentos peptídicos responsáveis pela atividade coagulante da Giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Tese de Doutorado; 2015.
64. Arnau J, Guerrero L, Casademont G, Gou P. Physical and chemical changes in diferentes zones of normal and PSE dry-cured hams during processing. Food Chemistry 2006; 52(1):63-69.
65. Gans C, Elliot WB. Snake venoms: production, injection, action. Adv Oral Biol. 1968; 3:45-81.
66. Kochva E, Nakar O, Ovadia M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. Amer Zool. 1983; 23:427-430.
67. Graham LRJ, Graham C, McClean S, Chen T, Rourke M, Hirst D. et al. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World *Crotalinae* pit vipers. Bioch Bioph Res Com. 2005; 338:1587-1592.
68. Menin LPA, Perchuc A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schoni R. et al. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. Toxicon. 2008; 51(7):1288-1302.
69. Chandrashekara KT, Nagaraju S, Usha Nondini S, Basavaiah S, Kemparaju K. Neutralization of local and systemic toxicity of *Daboia russeli* venom by *Morus alba* plant leaf extract. Phytotherapy Research. 2009.
70. Aguilar I, Guerrero B, Maria Salazar A, Girón ME, Pérez JC, Sánchez EE. Individual venom variability in South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. Toxicon. 2001; 5:214-224.
71. Girón ME, Aguilar I, Romero L, Sánchez EE, Pérez JC, Rodríguez-Costa A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* venom on kidney cell cultures. Revista Instituto de Medicina Tropical. 2003; 47(3).

72. Yoshida-Kanashiro E, Navarrete LF, Rodriguez-Costa A. The unusual hemorrhagic and necrotic activities caused by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) in a Venezuelan patient Rev Cubana Med Trop. 2003; 55(1):38-40.
73. Pereira TP. Estudos dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e crotoxina. Dissertação de mestrado. 2009.
74. Jackson WF. Ions channels and vascular tone. Journal of the American heart association. 2000.
75. Graham LRJ; Graham C; McClean S; Chen T; Rourke M; HirstD. et al. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World *Crotalinae* pit vipers. Bioch Bioph Res Com. 2005; 338:1587-1592.
76. Ducancel F. Endothelin-like peptides. Review. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005; 62:2828-2839.
77. Doyle VM, Ruegg UT. Vasopressin induced production of inositol triphosphate and calcium efflux in a smooth muscle cell line, Biochem Biophys Res Commun.1985; 131:469-476.
78. Burns DM, Ruddock MW, Walker JM, Allen, GD, Kennovin GD. Nicotinamide-inhibited vasoconstriction: lack of dependence on agonist signaling pathways. Eur J Pharmacol. 1999; 374:213-220.
79. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature.1987; 327:524-526.
80. Hirst DG, Kennovin GD, Flitney FW. The radio sensitizer nicotinamide inhibits arterial vasoconstriction. Br J Radiol. 1994; 67:795-799.
81. Kochva E, Viljoen CC, Botes DP. A new tipe of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (Atractaspidinae).Toxicon.1982; 20:581-592.
82. Hayashi MAF, Ligny-lemaireC, Wollberg Z, Weri M, Galat T, Ogawa BH.et al. Long-sarafotoxins: characterizations of a new family of endothelin-like peptides. Peptides. 2004; 25:1243-1251.

-
83. Gray GA, Webb DJ. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 1996; 72:109-148.
84. Evangelista JSAM, Martins, AMC, Nascimento, NRF, Sousa, CM, Alves RS, Toyama DO et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon.* 2008; 52:737-744.
85. Evangelista JSAM, Martins, AMC, Nascimento, NRF, Sousa, CM, Alves RS, Toyama DO et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon.* 2011; 52:737-744.
86. Lopes DM, Júnior NEG, Costa PPC, Martins PL, Santos CF, Carvalho EDF. et al. A new structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom (South American Rattlesnake). *Toxicon.* 2014; 90:36-44.
87. Joseph R, Pahari S, Hodgson WC, Kini RM. Hypotensive agents from snake venoms. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004; 4:437-59.
88. Gomes VM, Carvalho AO, Da Cunha M, Keller MN, Bloch C, Deolindo P. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* 2005; 45(7):817-827.
89. Kato H, Suzuki T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halysblom hoffi*. Isolation of the five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them potentiators B and C. *Biochemistry.* 1971; 10(6):972-980.
90. Kato H, Suzuki T, Okada K, Kimura T, Sakakibara T. Structure of potentiator A, one of the five bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halysblom hoffi*. *Experientia.* 1973; 29:574-575.
91. Ferreira LAF, Mollring T, Lebrun ZFLAS, Raida M, Znottko R, Habermehl GG. Structure and effects of a kinin potentiating fraction F (AppF) isolated from *Agkistrodon piscivorus* venom. *Toxicon.* 1995; 33:1313-1319.

92. Yanoshita R, Kasuga A, Inoue S, Ikeda K, Samejima Y. Blom-hotin: a novel peptide with smooth muscle contractile activity identified in the venom of *Agkistrodon halysblom hoffi*. *Toxicon*.1999; 37:1761-1770.
93. Murayama N, Michel GH, Yanoshita R, Samejima Y, Saguchi K, Ohi, H. et al. cDNA cloning of bradykinin-potentiating peptides-C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. *Eur J Biochem*. 2000; 267:4075-4080.
94. Hung CC, Chiou SH. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan Habu: Serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281:1012-1018.
95. Brinkhous K.M, Smith SV. In *Hematology, Haemostasis and animal venoms*. Marcel Dekker, New York. 1988; 7:363-375.
96. Tu AT. In *Rattlesnake Venoms: Their actions and treatment*. Marcel Dekker, New York. 1982; 247-312.



unesp



Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEEA 990/2012) Caracterização bioquímica, estrutural e funcional dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, a ser conduzido por Patrícia da Rocha Mendes, orientada pela Prof^ª Dr^ª Lucilene Delazari dos Santos, Co-orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Rui Junior, com a colaboração do Prof. Titular Benedito Barravieira, Letícia Gomes de Pontes, Mario Sergio Palma e Apoio Técnico de Airton Lourenço Junior, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 28/02/2013



Prof^ª Dr^ª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP 18.618-070 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608/3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 13 de maio de 2014.

Of. 011/14-CEUA

Ilustríssima Senhora

Prof^ª. Dr^ª. Lucilene Delazari dos Santos

Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP

Em relação ao Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 990-2013) "Caracterização bioquímica, estrutural e funcional dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*", conduzido por Patrícia da Rocha Mendes, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, com a colaboração de Benedito Barraviera, Letícia Gomes de Pontes, Mario Sérgio Palma, com o Apoio Técnico de Airton Lourenço Junior, aprovado em 28/02/2013, informo que foi AUTORIZADA a inclusão de nova metodologia no projeto.

Nova Metodologia: Avaliação da contratilidade de tecido isolado in vitro de músculo liso (artéria mesentérica) em ratos Wistar na presença dos peptídeos hipotensores do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Ao final do projeto é necessária a apresentação do Relatório Final de Atividades.

Atenciosamente,

Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA