

Alexandre Kazuo Kuniyoshi

Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: neutralização de diferentes classes de enzimas proteolíticas do veneno total da *Bothrops jararaca*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador:

Profa. Dra Fernanda Calheta Vieira Portaro

SÃO PAULO

2013

Alexandre Kazuo Kuniyoshi

Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: neutralização de diferentes classes de enzimas proteolíticas do veneno total da *Bothrops jararaca*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador:

Profa. Dra Fernanda Calheta Vieira Portaro

SÃO PAULO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Kuniyoshi, Alexandre Kazuo

Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan:
neutralização de diferentes classes de enzimas proteolíticas do veneno total
da *Bothrops jararaca* / Alexandre Kazuo Kuniyoshi - São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde
de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Fernanda Calheta V. Portaro

1. *Bothrops* 2. Venenos de serpentes 3. Soro 4. Serino proteases
5. Metaloproteases 6. Peptídeos

SES/CCD/CD-275/13

Dedicatória

Aos meus pais Luiz Antonio Kuniyoshi e Emília Shizue Shudo Kuniyoshi que sempre me apoiaram e me amaram incondicionalmente.

À mulher da minha vida Nadia Yuri Suzuki por sempre estar ao meu lado em todos os momentos frente a todas as dificuldades.

À minha irmã Laurie Midori Kuniyoshi, a quem sempre faço todas as vontades.

Ao meu tio Yuzi Shudo e tias Juria Yuriço Shudo e Janete Takij Shudo que sempre acreditaram e contribuíram com a minha formação.

Em memória ao meu irmão Douglas Yukio Kuniyoshi, você definiu a minha vida.

Agradecimentos

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

À minha colega de laboratório Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho pela amizade e parceria em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu colega Bruno Duzzi pelo apoio nos experimentos sempre que precisei.

Ao Dr. Oswaldo Augusto Sant'anna pelos ensinamentos em Imunologia

À Dra. Denise Vilarinho Tambourgi pelas críticas e suporte neste trabalho.

À Dra. Danielle Paixão Cavalcante pelos ensinamentos nas técnicas de western blot e análise dos resultados.

À Dra Solange M. T. Serrano e a Mestranda Luciana Bertholim Nasciben pela colaboração nas análises de espectrometria de massas.

À Dra Marisa Maria Teixeira da Rocha pela colaboração na obtenção dos venenos botrópicos.

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

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

*“Eu gosto do impossível porque
lá a concorrência é menor.”
Walt Disney*

Lista de Aminoácidos

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

Lista de Abreviaturas

Abz	Radical fluorescente ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina de Soro bovino
DEAE	Diethylaminoethyl
EDDnp	Grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FRET	Free Ressonance Energy Transfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Performance
kcat	Constante catalítica
Ki	Constante de Inibição
Km	Constante de <u>Michaelis–Menten</u>
MHC	Complexo principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloprotease de Matriz
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
PBS	Tampão Fostato Salino
PMSF	Fluoreto de fenil metil sufonil
Q-TOF	Quadrupole-time of flight
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SVMP	Snake venom metaloproteinase
SVSP	Snake venom serineproteinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
UF/min	Unidade de Fluorescência por minuto
VBj	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>

Resumo

Kuniyoshi, AK. **Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: neutralização de diferentes classes de enzimas proteolíticas do veneno total da *Bothrops jararaca***. 2013. Tese (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo.

Palavras chave: *Bothrops jararaca*, veneno, soro anti botrópico, serinopeptidases, metalopeptidases, peptídeos.

O envenenamento ofídico representa uma questão de saúde para vários países do mundo e alguns fatores importantes devem ser levados em consideração a fim de minimizar este problema como, por exemplo, atendimento médico de qualidade e um melhor registro de acidentes. O gênero *Bothrops* é considerado o mais importante nos casos de envenenamento ofídico no Brasil e, como outras serpentes, seu veneno é uma mistura complexa de componentes que agem em diferentes alvos na presa/vítima. Considerando que as enzimas proteolíticas das classes das metalopeptidases e as serinopeptidases (cerca de 65 % da composição do veneno) são as principais toxinas do veneno da *B. jararaca*, as mesmas foram escolhidas no presente estudo para se determinar o nível de neutralização das suas atividades pelo soro produzido pelo Instituto Butantan, o qual é amplamente utilizado no Brasil. Para isso dois substratos FRETs foram selecionados, a partir de uma biblioteca de peptídeos, que se comportaram como alvos seletivos para as serino- e metalopeptidases. Desta maneira, observamos que o soro é ineficiente no bloqueio da atividade de duas serinopeptidases e, este fato nos levou à busca dos motivos pelos quais o soro antibotrópico comercial estaria apresentando esta falha. Assim, estas duas serinopeptidases ainda inéditas no veneno de *Bothrops jararaca* e não neutralizadas pelo soro comercial foram purificadas e identificadas e verificamos que a razão na falha do soro comercial em bloquear estas atividades é ausência de anticorpos específicos contra estas enzimas já que as mesmas não eram reconhecidas pelo soro no ensaio de *western blot*. Assim, nossos resultados indicam uma possível falha na composição do soro antibotrópico, portanto fomos levados a estudar mais profundamente o papel destas serinopeptidases e buscamos novos substratos para estas enzimas, como os peptídeos angiotensina I, bradicinina, dinorfina e neurotensina. Observamos uma atividade quimotripsina-símile sobre a angiotensina I ainda não descrita para estas serinopeptidases, também não bloqueada totalmente pelo soro anti botrópico.

Abstract

Title: Efficacy of bothropic antivenom produced by Butantan Insitute: neutralization of different classes of proteolytic enzymes from the venom of *Bothrops jararaca*

Keywords: *Bothrops jararaca*, snake venom, antivenom, serine peptidases, metallopeptidases, peptides.

Snake venom poisoning is a public health issue for many countries in the world and some important factors must be taking in account to minimize this problem such as, good medical assistant and a better record of these accidents. The *Bothrops* genus is considered the most relevant regarding snake bites in Brazil, and like all other serpents their poison is a complex mixture of substances that act in different targets on the prey/victim. Considering that proteolytic enzymes from metallopeptidase and serine peptidase classes are the main components of the venom of *Bothrops jararaca* (about 65% of composition), they were chosen in this study to attempt to be neutralized by the *Bothrops* antivenom from Butantan Institute which is utilized nationwide. For that, two substrates were selected to be used as specific tools for metallopeptidases and the serine peptidases from a library of FRETs peptides. Using the *Bothrops* antivenom and both substrates we observed a weak neutralization of two serine peptidases present in this venom and a strong neutralization of metallopeptidases. These facts led us to investigate the reasons why the antivenom presented that flaw. To achieve this goal, two, still not described yet, serine peptidases that could not be neutralized by the antivenom were purified and identified in order to determine the reason for the neutralizing flaw by the commercial antivenom and we concluded that it was due the lack of specific antibodies against these enzymes since they were not recognized by the antivenom on western blot assay. Therefore our results led us to search for new substrates for serine peptidases from the venom of *Bothrops jararaca*, like the bioactive peptides angiotensin I, bradykinin, dynorphin 1-13 and neurotensin 1-13. Among these new substrates we observed a chymotrypsin like activity upon angiotensin I never described for serine peptidases from this venom, partially blocked by the commercial antivenom.

Sumário

Introdução	1
1.1- Envenenamento e saúde pública	
1.2- Caracterização do gênero <i>Bothrops</i>	1
1.3- Enzimologia	3
1.4- Proteases e peptidases	5
1.5- Substratos fluorescentes - Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	13
1.6- Peptídeos biologicamente ativos.	15
2) Objetivos	18
3 - Metodologia	19
3.1-Venenos e Reagentes	
3.2 - Testes de atividade enzimática	19
3.2.1 - Ensaio de atividade enzimática sobre peptídeos FRET	
3.2.2 - Ensaio de atividade enzimática sobre peptídeos biologicamente ativos	20
3.2.3 - Uso do EDTA, 1,10-fenantrolina e PMSF	21
3.3 - Uso do soro antibotrópico comercial	22
3.4 – Dosagem de proteínas	22
3.5- Purificações das serinopeptidases de interesse	22
3.6 Eletroforese SDS-PAGE	24
3.7 Espectrometria de massas	25
3.7.1 Determinação dos pontos de clivagens obtidos nos peptídeos biologicamente ativos	
3.7.2 - Identificação das serinopeptidases	26
3.8 – <i>Western Blot</i>	26
4) Resultados	27
4.1- Determinação dos substratos FRETs seletivos para as serinopeptidases e metalopeptidases do VBj	
4.2- Ensaio de soroneutralização	30
4.3- Hidrólise de peptídeos biologicamente ativos	34

4.4- Purificação de serinopeptidases com atividades não bloqueadas pelo soro antibotrópico.	37
4.5-Estudo do reconhecimento das serinopeptidases com atividade não bloqueada pelo soro	43
5) Discussão Estudos com veneno total de <i>Bothrops jararaca</i>: Atividade sobre Peptídeos FRETs	45
Estudos com serinopeptidases purificadas de <i>Bothrops jararaca</i> Serinopeptidases não neutralizadas pelo soro antibotrópico com atividade sobre Abz-Serine	51
Estudos com veneno total de <i>Bothrops jararaca</i>: Atividade sobre Peptídeos Biologicamente Ativos	53
Conclusões	56
Bibliografia	57
Anexo – Trabalho publicado referente a este projeto	64

1 - Introdução

1.1 Envenenamento e Saúde Pública:

O envenenamento ofídico representa uma questão de saúde pública para vários países do mundo e, apesar da grande dificuldade de se levantar os dados reais desses acidentes, alguns estudos mostram que ocorrem de 5,4 a 5,5 milhões de acidentes, mais de 400.000 amputações e cerca de 20.000 a 125.000 mortes por ano no mundo. Estes números superam várias outras doenças tropicais negligenciadas em número de ocorrência e fatalidades, as quais possuem um maior destaque relacionado com problemas de saúde pública, como, leishmaniose, dengue, esquistossomose, cólera e doença de Chagas (Williams et al., 2010). Além disso, o envenenamento ofídico só entrou para esta lista de doenças tropicais negligenciadas recentemente em abril de 2009, mostrando que não era visto como uma questão importante de saúde pública (World Health Organization, 2013).

O problema do envenenamento ofídico é que ele existe em meio a vários fatores que dificultam sua resolução, entre muitos podemos salientar: perfil da vítima; atendimento médico qualificado; registro dos acidentes; produção, armazenamento e distribuição de soros; qualidade e segurança dos soros produzidos.

1.2 Caracterizações do gênero *Bothrops*

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

O envenenamento botrópico é responsável por 73,5% dos acidentes ofídicos no Brasil (Ministério da Saúde, 2009) e nos casos atendidos pelo Hospital Vital Brazil (Instituto Butantan), onde a espécie foi identificada, este índice chega a 97,5 % (Ribeiro & Jorge, 1997).

Os venenos de serpentes são fonte abundante de material com atividade biológica, pois são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas (enzimas), porém outros constituintes como peptídeos, nucleosídeos e íons metálicos também estão presentes. Estas várias enzimas injetadas na presa podem gerar dois tipos de sintomatologia, danos locais e/ou sistêmicos. Dentre os efeitos locais é comum a ocorrência de edema, bolhas, hemorragia e necrose que, em alguns casos, pode ocasionar uma incapacidade permanente. Os efeitos sistêmicos são os principais responsáveis pela morte da presa/vítima devido às falhas respiratórias ou circulatórias causadas por vários fatores coagulantes e outros fatores que agem isoladamente ou sinergeticamente sobre os sistemas vitais como, neural, cardíaco, locomotor, cascata da coagulação, migração celular e permeabilidade de membrana (Karlsson, 1979).

O tratamento recomendado nos casos de acidentes botrópico é a soroterapia. O soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan é preparado pela imunização de cavalos com uma mistura de venenos das espécies: *B. alternatus* (12,5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). Porém no Brasil existem várias espécies do gênero *Bothrops*, que se diferenciam muito na composição de seus venenos e no que se refere à soroneutralização de seus componentes, como metalopeptidases, serinopeptidases, fosfolipase A2 e hialuronidases (Queiroz et al., 2008).

A grande variabilidade de componentes do veneno entre as espécies do gênero *Bothrops* dificulta a elaboração de um soro antibotrópico. Porém, sabe-se que enzimas

proteolíticas das classes das serino e metalopeptidases são reconhecidamente toxinas de grande relevância nos casos de acidentes botrópicos envolvendo humanos. Resultados de análises proteômicas realizados com o veneno da *B. jararaca* indicam que 51,5 % e 14 % dos componentes são metalo- e serinopeptidases, respectivamente (Fox & Serrano, 2008a).

Existem diversos trabalhos envolvendo o estudo da eficácia de antivenenos sobre venenos botrópicos. Muitos desses soros antibotrópicos apresentam resultados diferentes sobre o grau de proteção obtido, dependendo do tipo de ensaio, efeito estudado, dos venenos botrópicos utilizados entre outros fatores (Battellino et al., 2003; Picolo et al., 2002; Leon et al., 2000; Zamunér, 2004; Da Silva et al., 2007; Segura et al., 2010). A eficácia de diversos soros antibotrópicos sobre os venenos botrópicos será retomada mais profundamente na discussão deste trabalho.

1.3 Enzimologia

A catálise de reações químicas é fundamental para a vida de um organismo, pois o catalisador permite que estas reações ocorram de maneira mais rápida e eficiente. As enzimas são os catalisadores biológicos mais eficientes, por promoverem uma aceleração entre reações (diminuem a energia de ativação para que uma reação ocorra), por regularem de maneira harmoniosa vias metabólicas e por possuírem alta especificidade por seus substratos (Nelson e Cox, 2002).

Em estudos laboratoriais, a concentração de substrato disponível é um fator limitante para a atividade enzimática. Em baixas concentrações de substrato ($[S]$), a velocidade inicial aumenta proporcionalmente ao aumento de $[S]$. Contudo, quando a concentração de substrato é excessiva, a velocidade enzimática atinge um limite máximo ($V_{\text{máx}}$) e se mantém numa constante, pois neste caso a enzima está saturada.

Esse efeito pode ser demonstrado no gráfico da Figura 1.

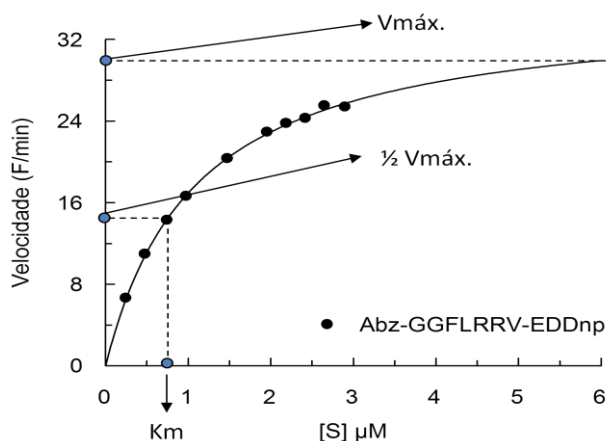


Figura 1. Gráfico: Velocidade x Concentração de Substrato. Cinética realizada no laboratório com a treonina peptidase hsp65 de *Mycobacterium leprae* e o substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp.

A partir do perfil cinético demonstrado acima, Victor Henri concluiu em 1903 que a combinação de uma enzima e seu substrato é fundamental para que ocorra uma catálise. A partir desta ideia, em 1913 o enzimologista Leonor Michaelis e a pediatra Maud Menten desenvolveram um modelo de cinética enzimática de uma reação com um único substrato:

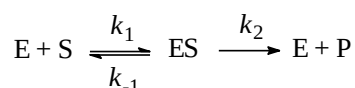


Figura 2. Esquema cinético postulado por Michaelis-Menten.

A enzima (E) em contato com substrato (S) resulta na formação do complexo Enzima-Substrato (ES) num primeiro momento. A segunda reação resulta num produto (P) e na liberação de E. A relação entre as constantes k_1 e k_{-1} é referente ao K_m (constante de Michaelis-Menten) e k_2 representa o k_{cat} , ou constante catalítica.

Como indica a Figura 2, existem dois parâmetros cinéticos que em conjunto ajudam a avaliar a eficiência catalítica das enzimas: O K_m , ou constante de Michaelis-Menten e o k_{cat} , constante de taxa catalítica. Por definição, a constante de Michaelis-Menten representa a concentração de substrato quando a Velocidade Inicial (V_o) é

equivalente a metade da Velocidade Máxima ($V_{\text{máx}}$), como mostrado na Figura 01. A constante de taxa catalítica (k_{cat}) é utilizada para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima em condições de saturação. É também referente à quantidade de substrato que é convertida em produto por uma única enzima durante um período quando a enzima está saturada pelo substrato (Nelson e Cox, 2002).

As seis classes de enzimas conhecidas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) são:

Oxidoredutases: São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução (Desidrogenases e Oxidases).

Transferases: Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. (Quinases e Transaminases).

Hidrolases: Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente (**peptidases**).

Liases: Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico (Dehidratases e Descarboxilases).

Isomerases: Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos (Epimerases)

Ligases: Catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre a custas de energia (ATP) (Sintetases).

1.4) Proteases e peptidases

As proteases estão incluídas na família das enzimas denominadas “hidrolases”. Por definição, proteases são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas (formadas pela ligação de dois aminoácidos). Atualmente, sabe-se que as oligopeptidases, por exemplo, são capazes de hidrolisar apenas ligações peptídicas de substratos com tamanho reduzido (peptídeos com até 20 resíduos de aminoácidos), não apresentando

atividade sobre substratos proteicos. Desta maneira, o termo “peptidases” tem sido mais utilizado do que o termo “proteases” por englobar todas as enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas, independente das limitações de tamanho de substrato (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular).

As peptidases encontram-se distribuídas em todos os tecidos e fluídos biológicos dos seres vivos e desenvolvem uma importante função no ciclo de vida das proteínas e peptídeos. Em mamíferos, a proteólise enzimática participa de processamento e organização molecular das cadeias polipeptídicas nascentes, como também dos processamentos de precursores de hormônios proteicos, receptores e fatores de crescimento, na ativação de proteases regulatórias envolvidas na coagulação sanguínea, fibrinólise, na reação do sistema complemento e em muitos outros processos proteolíticos importantes para as funções celulares (Neurath, 1989).

Em virtude da ampla diversidade de enzimas conhecidas, as peptidases foram agrupadas com base no mecanismo catalítico e em suas estruturas primárias e terciárias. Existem até o momento sete classes de enzimas proteolíticas: serinopeptidases, cisteínopeptidases, metalopeptidases, aspartilpeptidases, glutamilpeptidase, asparaginapeptidases, treoninapeptidases e as peptidases com mecanismo catalítico ainda não definido (Rawlings et al., 2013). Cada uma das classes de proteases é subdividida em famílias, de acordo com a similaridade de suas sequências primárias de aminoácidos, principalmente na região do centro ativo.

De acordo com o tipo de catálise, duas subclasses de peptidases são conhecidas: as exopeptidases que hidrolisam as ligações peptídicas nas porções N- ou C- terminal do substrato e as endopeptidases que hidrolisam ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica.

Uma vez que as principais toxinas do veneno da *Bothrops jararaca* são metalo e serinopeptidases, as mesmas serão descritas com maiores detalhes.

Metalopeptidases: as enzimas desta classe geralmente apresentam a sequência consenso (**H-E-X-X-H**) em sua sequência primária, onde a letra X indica qualquer resíduo de aminoácido. Nas metalopeptidases um cátion metal divalente, geralmente o zinco, mas algumas vezes o cobalto ou manganês, ativa a molécula de água promovendo a catálise. Esta classe está dividida em dois grandes grupos dependendo do número de íons requerido para a catálise. Em muitas metalopeptidases, somente um íon zinco é requerido, mas em algumas famílias há dois íons metálicos que atuam cataliticamente, este fator ocorre em todas as metalopeptidases que possuem o cobalto e o manganês, podendo ainda ocorrer com o zinco mais raramente.

Os resíduos ligantes de metais conhecidos são: His, Glu, Asp ou Lys. Além destes, pelo menos um outro resíduo é necessário para catálise, que é geralmente o resíduo Glu. As metalopeptidases estão envolvidas nas mais variadas atividades como: no desenvolvimento embrionário, na formação óssea, reprodução, artrite e câncer. Desta classe fazem parte neurotoxinas, como as toxinas tetânica e botulínica, e algumas toxinas de venenos de serpentes. As diversas famílias foram agrupadas em 16 clãs: MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP, MQ, MS e MT (Rawlings et al., 2013).

As metalopeptidases de venenos de serpentes, também denominadas SVMPS (Snake Venom Metallo Proteases) pertencem à superfamília das Metzincinas, subfamília das reprotisinas (Clã MA, subfamília M12), que são peptidases dependentes de zinco e possuem a sequência consenso HExxHxxGxxH. O nome Metzincinas é utilizado devido à presença de um resíduo de metionina conservado, o qual se localiza em uma dobra beta, abaixo do motivo de ligação ao zinco. A denominação “reprotisina”

representa tanto metalopeptidases isoladas de venenos de serpentes (reptilia) quanto algumas proteínas reprodutivas de mamíferos, todas incluídas nesta subfamília. Estas peptidases apresentam semelhanças às metalopeptidases humanas que degradam componentes de matriz (MMPs) e com as adamlisinas (ADAM, A Disintegrin And Metaloproteinase). Interessante, as reprotisinas foram identificadas e purificadas antes da descoberta das moléculas humanas.

Várias SVMPs já foram descritas (mais de 150) e muitas possuem elevada atividade hemorrágica quando se consideram suas respectivas doses mínimas hemorrágicas. Particularmente, 51% dos constituintes totais do veneno da *B. jararaca* são SVMPs e são classificadas segundo sua estrutura: P-I (apenas o domínio de metalopeptidase); PIIa - P-IIe (domínio de metalopeptidase e domínio disintegrina, apresentam-se em forma de dímeros); P-IIIa-P-IIIc (domínio de metalopeptidase, domínio disintegrina e domínio rico em cisteínas, também podem formar dímeros) e PIIId, ou PIV (apresentam estrutura do tipo PIII e duas lectinas tipo-C conectadas por pontes dissulfeto) (Fox e Bjarnason, 1995; Fox e Serrano, 2008b). Embora substratos proteicos envolvidos no processo hemorrágico sejam conhecidos, nada se sabe sobre a atividade peptidásica destas SVMPs sobre peptídeos biologicamente ativos e como isso pode contribuir com o envenenamento.

Serinopeptidases: são enzimas cujo mecanismo catalítico depende de um resíduo de serina agindo como o nucleófilo para hidrolisar a ligação peptídica. São amplamente distribuídas e extremamente numerosas, estando presentes em bactérias, arqueobactérias, eucariotos, bacteriófagos e vírus. Esta classe pode ser exemplificada pela tripsina pancreática, elastase e calicreína, que apresentam uma tríade catalítica composta pelos resíduos Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ (numeração da quimotripsina).

Com base nas estruturas tridimensionais as 53 famílias de serinopeptidases foram agrupadas em treze clãs: SA, SB, SC, SE, SF, SH, SJ, SK, SQ, SP, SR, SS e ST (Rawlings et al., 2013).

As serinopeptidases de venenos de serpentes são classificadas no clã SA, família S1 da quimotripsina (Barrett et al., 1998). A tripsina de mamíferos e as enzimas de venenos apresentam “fold” semelhante e, acredita-se, evoluíram a partir de um ancestral comum (Itoh et al., 1988). Até o momento, sabe-se que as serinopeptidases de venenos interferem especificamente nos mecanismos hemostáticos e apresentam uma notável resistência à inibição por inibidores plasmáticos de serinopeptidases (serpinas) (Parry et al., 1998). Em contraste com a tripsina, que apresenta uma baixa especificidade para a hidrólise de substratos se limitando apenas por clivar após resíduos de aminoácidos carregados positivamente como arginina e lisina, as enzimas de venenos são caracterizadas pela alta especificidade pelos seus substratos, como é o caso das serinopeptidases de mamíferos que regulam a hemostasia (Lefebvre et al., 2001; Madhavan et al., 2002).

De forma geral as SVSPs afetam a cascata da coagulação através da ativação de componentes envolvidos no processo de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, através de mecanismos que mimetizam enzimas envolvidas nos processos. Algumas SVSPs por mimetizarem a ação da trombina foram denominadas enzimas tipo trombina (do inglês, Thrombin Like Enzymes, TLE) e estão presentes em diversos venenos de serpentes. Elas são no geral serinopeptidases de cadeia única e apresentam massa molecular relativa variando entre 26-33 kDa sendo que algumas apresentam glicosilação. De fato, em contraste com a trombina que é uma enzima multifuncional (Bode et al., 1992; Stubbs e Bode, 1993), as enzimas de venenos de serpentes classificadas como tipo-trombina apresentam geralmente apenas uma das atividades da

trombina. As SVSPs podem atuar especificamente através da clivagem do fibrinogênio podendo o converter em fibrina, e também agir sobre a fibrina em si. Em alguns casos as SVSPs atuam sobre estes dois substratos, porém, a maioria das SVSPs atuam somente sobre o fibrinogênio liberando o fibrinopeptídeo A ou B promovendo a formação de coágulos (Stocker, 1978; Nishida et al., 1994). Outra atividade tipo trombina presente nos venenos de serpentes é a capacidade de SVSPs em ativar o fator V, como por exemplo, a RVV-V (Kisiel, 1979; Tokunaga et al., 1988) e VLFVA (Siigur et al., 1998) presentes nos venenos da *Vipera russelli* e *Vipera lebetina* respectivamente. Podemos citar também a atividade tipo trombina na ativação da agregação plaquetária que algumas SVSPs são capazes de realizar, diversas enzimas com essa capacidade foram isoladas e caracterizadas nos venenos de serpentes. Entre outras, podemos citar a Thrombocytin (Niewiarowski et al., 1977) que foi a primeira toxina com esta atividade a ser descrita e também a MSP1 isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (Serrano et al., 1993). E finalmente, as SVSPs também podem mimetizar a trombina atuando sobre a proteína C que é uma glicoproteína dependente de vitamina K que é ativada por estas serinopeptidases atuando de forma anticoagulante e também estimulando a fibrinólise (Stoker et al., 1986).

Além da calicreína de mamíferos, algumas SVSPs podem liberar bradicinina ou calidina (Lys-bradicinina) pela clivagem do cininogênio, como a KN-BJ (Serrano et al., 1998), a Crotalase (Markland et al., 1976) e elegaxobin II (Oyama e Takahashi, 2003), estas enzimas são denominadas como *Kallikrein-like enzymes*. Em particular, os efeitos da bradicinina já foram bem descritos e são particularmente muito ativos sobre a musculatura vascular resultando em vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular (para mais detalhes sobre SVSP ver Serrano e Maroun, 2005; Kini, 2005).

Serinopeptidases caracterizadas do veneno de *Bothrops jararaca*

1- ***Bothrops* protease A (BPA)** é uma protease termo-resistente, com atividades esterolítica, amidolítica e mais recentemente foi atribuída a ela uma atividade fibrinogenolítica (Paes Leme et al., 2008). Apresenta atividade proteolítica sobre a gelatina e a protamina. Na cadeia β da insulina a BPA cliva as ligações peptídicas Arg22-Gly23, Phe25-Tyr26 e Tyr26-Thr27 (Mandelbaum e Henriques, 1964). BPA é uma proteína glicosilada que em gel de SDS-poliacrilamida migra como uma banda única de 67.400 Da (Reichl et al., 1983). Considerando-se sua massa molecular teórica derivada da sequência de aminoácidos como 25.409 Da, verifica-se que a diferença de ~41.990 Da observada em relação ao valor obtido por eletroforese, deve-se a presença de um alto conteúdo de carboidratos em sua estrutura.

2- **KN-Bj**, apresenta as atividades de liberação de bradicinina do cininogênio bovino de baixa massa molecular e conversão do fibrinogênio em fibrina, através da liberação do fibrinopeptídeo A (Serrano et al., 1998). Foram isoladas duas formas da enzima, KN-BJ 1 e KN-BJ 2, com massas moleculares respectivas 38.000 e 39.000 Da, e cujos valores de pI variam entre 4,3 e 4,7. Essas formas têm sequências de aminoácidos N-terminais e atividades específicas sobre substratos sintéticos semelhantes, e ambas liberam bradicinina do cininogênio bovino de baixa massa molecular. Suas atividades coagulantes sobre o fibrinogênio são também semelhantes (245 NIH U/mg e 219 NIH U/mg, respectivamente para KN-BJ 1 e KN-BJ 2).

3- **TL-Bj**, tem atividade coagulante tipo trombina. É uma glicoproteína ácida e ocorre sob pelo menos três formas eletroforeticamente distintas, TL-BJ 1, TL-BJ 2 e TL-BJ 3, com massas moleculares entre 30.000 e 32.000 Da. Os valores de pI dessas formas variam entre 3,9 a 4,1. As atividades coagulantes específicas das formas 1, 2 e 3 de TL-

BJ sobre fibrinogênio descritas são: 16,8 NIH U/mg, 16,7 NIH U/mg e 20,8 NIH U/mg, respectivamente (Serrano et al., 2000).

4- **PA-Bj**, uma enzima com atividade agregante sobre plasma rico em plaquetas, e suspensões de plaquetas lavadas. Essa enzima não apresenta atividade coagulante, como a trombina. O efeito da PA-BJ em plaquetas é mediado pelos receptores de trombina PAR1 e PAR4, que são receptores plaquetários do tipo “G-protein coupled”. A PA-BJ cliva *in vitro* o exodomínio recombinante do receptor PAR1 nas ligações Arg41-Ser42 e Arg46-Asn47, resultando na inativação do “tethered ligand” (Santos et al., 2000). Ainda, a PA-BJ promove a liberação de cálcio em fibroblastos transfectados com o receptor PAR4 e tornou estas células insensíveis à ação da trombina.

5- **Botrombina**, é uma serinopeptidase com atividade coagulante sobre o fibrinogênio que atua pela clivagem do fibrinopeptídeo A, sem afetar o fibrinopeptídeo B (Nishida et al., 1994). A botrombina também ativa, ainda que com potência muito menor que a trombina, o fator VIII da coagulação sanguínea. Essa enzima não ativa diretamente a agregação plaquetária, porém é capaz de desencadear a agregação de plaquetas lavadas quando fibrinogênio exógeno é adicionado. Sua estrutura primária foi determinada por técnicas de química de proteínas (Nishida et al., 1994). Botrombina e PA-BJ apresentam 65-67% de identidade de sequência de aminoácidos. Quando comparadas a enzimas de mamíferos elas mostram alguma semelhança com a calicreína glandular (~39 e 41% de identidade, respectivamente) e com a cadeia B da trombina (~44 e 41% de identidade, respectivamente).

1.5 Substratos fluorescentes - Fluorescence Resonance Energy

Transfer (FRET) peptides

Os substratos fluorescentes com apagamento intramolecular utilizados neste trabalho possuem no amino grupo N-terminal do peptídeo o radical fluorescente ácido *orto*-aminobenzóico (Abz) e no grupo carboxila terminal o grupo apagador da fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp), conforme mostra a Figura 03. Estes substratos permitem o monitoramento direto, em espectrofluorímetro, da velocidade de hidrólise dos substratos e aumentam a sensibilidade para a identificação em HPLC dos fragmentos gerados pela ação enzimática (Chagas e cols., 1991; Chagas e cols., 1995). Enquanto a cadeia peptídica estiver íntegra e estes dois grupos estiverem relativamente próximos, a fluorescência do composto será baixa. A partir do momento em que estes grupos são afastados, por exemplo, por uma clivagem enzimática em algum ponto da cadeia, a transferência de energia de um grupo ao outro deixa de ocorrer e a fluorescência da solução aumenta várias vezes.

Como se trata de um aumento proporcional ao número de moléculas peptídicas clivadas, este índice de variação de fluorescência da solução é uma medida direta da velocidade de hidrólise que pode ser utilizado para determinação das constantes cinéticas desta interação enzima-substrato.

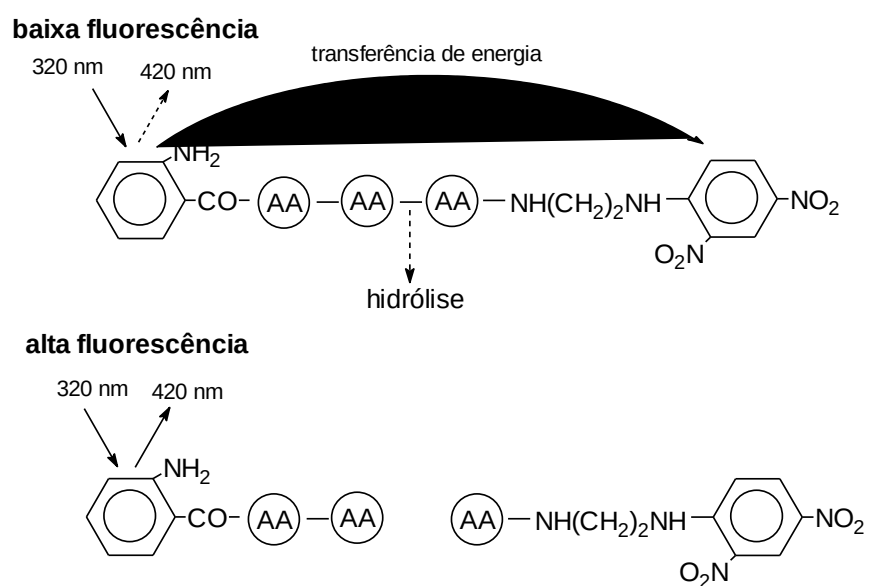


Figura 3 - Conceito de substratos fluorescentes com apagamento intramolecular.

1.6 Peptídeos biologicamente ativos.

Bayliss e Starling, em 1902, observaram que extrato de jejuno de cachorro era capaz de estimular a secreção de suco pancreático. Foi a primeira vez que um fenômeno de controle homeostático foi conferido a uma *substância* e não aos reflexos transmitidos ao longo do sistema nervoso. Primeiramente, o princípio ativo do tecido intestinal foi chamado de secretina e alguns anos depois se criou o nome “hormônio” para designar as substâncias mensageiras que carregavam informações de um órgão para outro. Após inúmeras tentativas e um grande esforço por parte de muitos laboratórios, a secretina enfim foi isolada e purificada por Jorpes e Mutt em 1973 e sua sequência peptídica determinada somente em 1991 por Wieland e Bodanszky.

Em 1931 foi descoberto em extratos alcoólicos de cérebro e intestino de cavalo um material que efetuava a diminuição da pressão sanguínea e era capaz de promover a contração do músculo liso e de causar dor, sendo por isso denominado de substância P (derivado de “pain” = dor), (von Euler e Gaddum, 1931).

Houve então uma aceleração na descoberta de novos peptídeos ativos e um número cada vez maior deles tem sido incluído na classe das moléculas de sinalização intercelular que regulam processos neurais, endócrinos e imunes (Hardie, 1992). O tipo de sinalização realizado por essas moléculas está diretamente relacionado à sua estrutura, sua localização e ao tipo celular onde atuam. Assim, ficou comprovado o fato que muitos peptídeos, originalmente encontrados no intestino, como a substância P, também podem ser produzidos no cérebro (Dickerson e Noël, 1991, Hallberg e Nyberg, 2003). Da mesma forma as encefalinas, importantes no controle fisiológico da dor, estão envolvidas na mobilidade intestinal.

Uma vez que os substratos proteicos das peptidases do VBJ já são conhecidos, achamos interessante verificar a possível atividade hidrolítica destas peptidases sobre a

angiotensina I, dinorfina 1-13, bradicinina e neurotensina em conjunto com a ação bloqueadora do soro comercial anti botrópico. Estes quatro substratos peptídicos foram selecionados por estarem relacionados a sistemas fisiológicos notavelmente afetados pelos venenos botrópicos e suas características serão melhores descritas a seguir.

A angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) é um peptídeo que faz parte do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). É formada a partir da ação da enzima renina sobre o angiotensinogênio e sofre ação dipeptidil-carboxipeptidásica da enzima conversora da angiotensina (ECA), gerando a angiotensina II. A angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) é um peptídeo que tem numerosas funções conhecidas na fisiologia humana, em especial no controle da pressão arterial, agindo como agente hipertensor através da vasoconstricção e agindo nos rins, onde, no túbulo contornado distal dos néfrons, estimulará a reabsorção de sódio e água aumentando assim a volemia, e, conseqüentemente a pressão. Simultaneamente, a angiotensina II também se dirige ao córtex das glândulas suprarrenais, estimulando a liberação do hormônio aldosterona, que se dirige aos rins, no túbulo contornado distal dos néfrons e estimula mais ainda a absorção de sódio e água, aumentando ainda mais a volemia e a pressão.

A bradicinina (Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe – Arg) foi descoberta quando se estudava o mecanismo do choque vascular produzido por veneno de *Bothrops jararaca* em cães por Rocha e Silva e colaboradores em 1949. Os autores observaram uma substância capaz de produzir uma contração lenta em íleo isolado de cobaia, determinando a denominação de bradicinina a esta molécula (do grego “brady” = lento e “kinin” = movimento). Além disso, este peptídeo é particularmente muito ativo sobre a musculatura vascular resultando em vasodilatação e aumento na

permeabilidade vascular, sendo um conhecido agente hipotensor. Além da vasodilatação a bradicinina contribui para a promoção de outros sintomas clássicos da inflamação como, hipertermia, edema e dor. (Maurer et al., 2011)

As dinorfinas são uma classe de peptídeos opioides gerados a partir de um precursor a prodinorfina através do processamento pela Protein Convertase 2 (PC2) liberando a dinorfina A e B (Day et al., 1998). As dinorfinas atuam em diversos processos fisiológicos e patológicos, como hiperalgesia, analgesia e processo inflamatório periférico (Hauser et al., 2005; Stanfa e Dickenson 1995). A dinorfina 1-13 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys) utilizada neste trabalho foi sintetizada pela primeira vez por Goldstein e colaboradores em 1979 quando tentavam isolar um potente peptídeo opioide do extrato da glândula pituitária de porcos. Este objetivo foi alcançado com êxito, e os seus 13 primeiros resíduos foram então sequenciados, após a síntese desse peptídeo ele foi comparado naquele momento com a Leu-encefalina e se mostrou muito mais potente quando testado em íleo de cobaia e por isso foi denominada dinorfina (do grego dynamis = poder).

A neurotensina (Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu, onde Glp é piraglutaminil) é um neuropeptídeo de 13 aminoácidos que tem uma grande interação com o sistema dopaminérgico e foi primeiramente isolada por Carraway e Leeman em 1973 a partir de hipotálamo bovino que apresentava propriedades vasodilatadoras, contração de íleo de cobaia além do útero de ratas.

Tendo em vista a composição de VBJ torna-se importante o estudo das atividades peptidásicas ainda desconhecidas desse veneno sobre componentes fisiológicos de mamíferos, e portanto os objetivos deste trabalho serão descritos a seguir.

2 - Objetivos

- Selecionar substratos de fluorescência apagada (FRET) que sejam hidrolisados majoritariamente pelas SVSPs e SVMs do veneno da *Bothrops jararaca* e dos outros 4 venenos do gênero *Bothrops* que compõe o pool de imunização para produção do soro;
- Estudar os peptídeos biologicamente ativos (angiotensina I, dinorfina 1-13, bradicinina e neurotensina) como substratos putativos para as SVSPs e SVMs do veneno da *Bothrops jararaca* e dos outros 4 venenos do gênero *Bothrops* que compõem o pool de imunização para produção do soro;
- Verificar o potencial neutralizante do soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan sobre as atividades peptidásicas das SVMs e SVSPs sobre os substratos descritos acima;
- Purificar e identificar as serinopeptidases não neutralizadas pelo soro.
- Verificar o reconhecimento das serinopeptidases purificadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan através da técnica de *western blot*.

3 - Metodologia

3.1-Venenos e Reagentes

O veneno da *B. jararaca* (50 mg) foi fornecido pela Comissão de Venenos do Instituto Butantan. Os venenos das outras 4 espécies (10 mg cada), *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni* e *B. alternatus*, foram fornecidos pela Dr. Marisa Rocha, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, colaboradora deste projeto. O soro antibotrópico (lote 506110, 1,8 g/dL) utilizado foi fornecido pela Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan sendo que, cada mililitro, é capaz de neutralizar 5,0 mg de VBj quando testado em camundongos.

Os peptídeos FRETs utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Prof. Luiz Juliano Neto, do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM. Estes substratos foram gerados pelo método de síntese em fase sólida utilizando o sintetizador automático da marca Shimadzu, modelo PSSM-8.

Dentre os principais reagentes, o TFA (Sigma) e a Acetonitrila (Carlo Erba) são importantes para a utilização do HPLC. Os inibidores sítio-dirigidos, EDTA, PMSF e 1,10-fenantrolina, e os peptídeos bradicinina, neurotensina 1-13, angiotensina I e dinorfina 1-13 foram adquiridos da Sigma.

3.2 - Testes de atividade enzimática

3.2.1 - Ensaio de atividade enzimática sobre peptídeos FRET

Os ensaios sobre a atividade enzimática com os peptídeos FRET foram realizados em espectrofluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. A escolha da concentração dos venenos foi ajustada experimentalmente, objetivando a obtenção de

cinéticas onde o consumo de substrato seja inferior a 10% (velocidades iniciais de hidrólise). Vários peptídeos FRETs foram utilizados, com sequências e tamanhos diferentes a fim favorecer a detecção de diferentes classes de peptidases, como por exemplo, Abz-FASSAQ-EDDnp, Abz-FRSSRQ-EDDnp, Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp, Abz-APGRVVGGQ-EDDnp, Abz-AARSAAQ-EDDnp, Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-LYENKPRRPYILQ-EDDnp e Abz-MISLMKRPQ-EDDnp. As reações ocorreram em tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4, a 37°C. O aumento da fluorescência foi monitorado no espectrofluorímetro de leitura em placas e os valores de fluorescência gerados foram quantificados a cada 60 segundos durante 15 minutos, sendo que a placa de leitura é agitada pelo espectrofluorímetro durante 2 segundos antes de cada leitura. Os resultados destes experimentos foram apresentados na forma de atividade específica sendo adquirido pela razão da variação da fluorescência (UF) pelo tempo (min) pela quantidade de proteína utilizada no ensaio (µg). Os inibidores sítio-dirigidos foram utilizados como descrito a seguir (item 3.2.3).

3.2.2 - Ensaio de atividade enzimática sobre peptídeos biologicamente ativos

As soluções de angiotensina I (65 µM), dinorfina 1-13 (31 µM), neurotensina 1-13 (12 µM) e bradicinina (50 µM) foram incubadas em tampão fosfato pH 7,4 (50 mM fosfato e 20 mM NaCl) com 5,5, 6,8, 13,7 e 8,2 µg de VBj para cada peptídeo respectivamente a 37°C por um período de 1 à 4 horas, com um período de pré-incubação de 30 minutos quando testados os inibidores e soro antibotrópico (item 3.2.3 e 3.3 respectivamente).

O sistema de HPLC utilizado em nosso laboratório é composto por um sistema binário onde existem duas bombas que trabalham com solventes diferentes (Solvente A e B, modelos LC 20AD); um desgaseificador, que é um módulo responsável por tirar eventuais bolhas da fase móvel através de vácuo (modelo DGU 20A3); um detector de

UV capaz de medir 2 comprimentos de onda simultaneamente (modelo SPD 20A) e um detector de fluorescência que também trabalha com 2 comprimentos de onda: uma de excitação e outra de emissão (modelo RF 10AXL). Também fazem parte do equipamento um injetor automático (SIL 20AC HT) e um módulo controlador, além de colunas C-4, C8 e C18. Trata-se de um sistema Shimadzu Prominence.

Para as análises peptídicas, foi utilizada coluna C-18 Shim-Pack (150 x 4,6 mm) e gradiente de 20%-60% B em 20 minutos [tampão A (H₂O/0,1%TFA) e tampão B (acetonitrila/tampão A 9:1)]. Os picos referentes aos produtos de hidrólises obtidos foram coletados manualmente e submetidos à análise por espectrometria de massas (item 3.7).

3.2.3 - Uso do EDTA, 1,10-fenantrolina e PMSF

Foram utilizados os inibidores sítio dirigidos EDTA (100 mM) e 1,10-fenantrolina (2 mM) como inibidores das metalopeptidases. Também utilizamos o PMSF (2 mM) para inibir as serinopeptidases, pois ele reage e modifica irreversivelmente os resíduos de serina presentes na enzima, incluindo o resíduo localizado no sítio ativo da enzima e responsável pela sua atividade catalítica.

As amostras inibidas por PMSF e 1,10-fenantrolina foram comparadas com controles contendo etanol no mesmo volume, já que o PMSF e a 1,10-fenantrolina são solubilizados com este solvente que por si só pode inibir uma enzima.

As amostras inibidas com EDTA foram comparadas com controles idênticos, com exceção do inibidor (que foi diluído em tampão PBS, pH 7,4).

A pré-incubação de VBj com 1,10-fenantrolina e PMSF ocorreu em temperatura ambiente por 30 minutos, enquanto o EDTA não foi pré-incubado com o VBj já que sua ação é imediata, indo diretamente para o ensaio de atividade enzimática.

3.3 - Uso do soro antibotrópico comercial

Inicialmente tentamos determinar a melhor concentração a ser utilizada a fim de neutralizar da melhor maneira o VBj, para isto determinamos uma curva de neutralização com diferentes volumes de soro (*i.e.*, 4 μ L, 8 μ L, 10 μ L, e 12 μ L) sobre 2 μ g de VBj, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e a 37°C e, em seguida, foram adicionados os substratos fluorescente e naturais previamente selecionados, depois, executado o ensaio de atividade enzimática no fluorímetro (substratos FRETs, item 3.2.1) ou em HPLC (peptídeos biologicamente ativos, item 3.2.2).

3.4 – Dosagem de proteínas

A estimativa da concentração proteica das amostras foi realizada pelo método de Smith (1985) utilizando o Kit “BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, EUA) e a BSA (Calbiochem, EUA) como padrão de referência. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Finlândia) e a absorbância foi determinada utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

3.5- Purificações das serinopeptidases de interesse

Inicialmente o VBj foi submetido a duas precipitações de suas proteínas utilizando-se sulfato de amônio em concentrações distintas, primeiramente utilizando 390 g/L deixando atuar por uma hora e, em seguida, a amostra foi centrifugada a 16000 G por 4 minutos a 4°C e coletado o sobrenadante. O sobrenadante foi então submetido a

segunda precipitação com concentração de 660 g/L de sulfato de amônio, desta vez a reação ocorreu por duas horas e novamente centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* desta segunda precipitação foi suspenso em 1 mL de água Milli-Q e adicionado EDTA (concentração final 100 mM) a fim de evitar degradação de serinopeptidases por metalopeptidases. Esta solução foi dialisada contra uma solução Tris 25 mM pH 7,4, contendo EDTA 100 mM, a fim de retirar o sulfato de amônio da amostra.

Para a purificação das serinopeptidases esta amostra dialisada foi submetida a cromatografia de troca iônica em uma coluna DEAE-Celulose utilizando como eluente soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,03M; 0,1M; 0,2M; 0,3M e 2,0 M) e monitorado por detector ajustado para leitura em 280 nm. As amostras obtidas em cada eluição foram submetidas ao ensaio de atividade enzimática junto aos substratos FRET e biologicamente ativo, como descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. Depois de selecionadas as frações de interesse, estas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C4 Asahipak C4P-50G utilizando os mesmo parâmetros descritos em 3.2.2 com modificações. Para as etapas de purificação um gradiente mais lento foi utilizado variando a solução B de 30-50 em 25 min. Os picos proteicos foram coletados manualmente, secos em sistema speed-vac e submetidos a análise por SDS-PAGE para verificação de pureza (item 3.6). Quando necessário, uma nova etapa de purificação em HPLC foi realizada a fim de obtermos a serinopeptidase em sua forma homogênea. Para isto, um novo gradiente foi estipulado (isocrático 30% de B por 5 min em seguida 30-35% de solução B em 20 min). A figura 4 esquematiza as etapas de purificação.

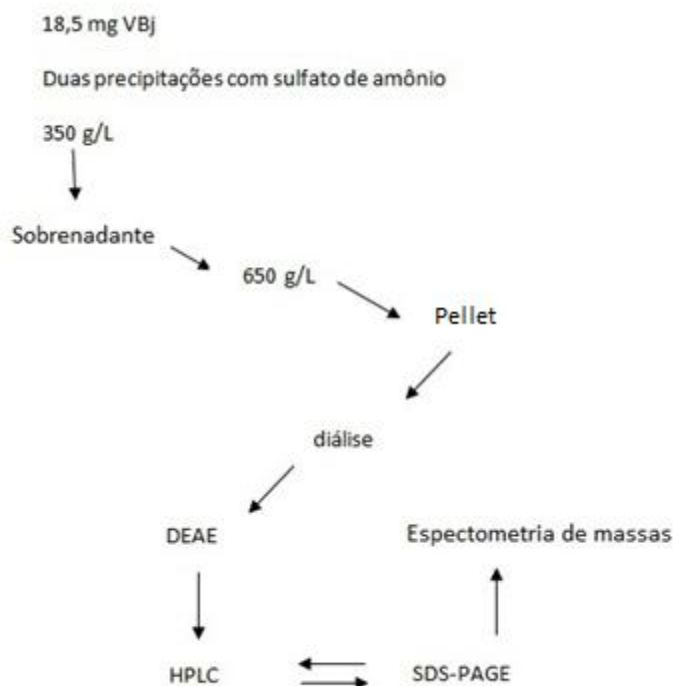


Figura 4 – esquema utilizado para a purificação das serinopeptidases

3.6 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% foi realizada, como descrito por Laemmli (1970). As amostras foram solubilizadas, em tampão de amostra, em condições não redutoras e não redutoras, e separadas eletroforicamente em gel de SDS-PAGE a 10% de acrilamida, e, para o empilhamento das amostras, gel a 4%, utilizando o marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa). A corrida foi realizada sob voltagem constante (100 V) e a 4° C no sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, CA, EUA). Após a corrida, o gel foi retirado do suporte e submetido à coloração.

Coloração com “Coomassie Blue”

Para esta coloração foi utilizada solução contendo 0,2 g de “Coomassie Blue R250”, metanol 40% e ácido acético 10%. Para a visualização das bandas, o gel foi imerso na solução descorante (metanol 40%, ácido acético 10%).

Coloração com nitrato de prata

Para esta coloração, os géis foram submetidos às seguintes etapas, respectivamente: 18 horas de incubação com solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,05%), lavagem com etanol 50%, três vezes por 20 minutos, 2 minutos de incubação com a solução sensibilizadora (tiosulfato de sódio 0,02%), lavagem com água destilada, três vezes por 5 minutos, 20 minutos de incubação com nitrato de prata 0,2% e formaldeído 0,076%, lavagem com água destilada, duas vezes durante 1 minuto, solução reveladora (carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05% e tiosulfato de sódio 0,0004%) até o aparecimento das bandas e em seguida, solução de metanol 50% e ácido acético 12% para parar a reação. Os géis foram estocados em solução de ácido acético 1%.

3.7 Espectrometria de massas

3.7.1 Determinação dos pontos de clivagens obtidos nos peptídeos biologicamente ativos

A determinação dos pontos de clivagem foi realizada através da determinação da massa molecular dos fragmentos coletados da hidrólise dos peptídeos. Como os peptídeos utilizados como substratos foram adquiridos comercialmente e tem massa molecular e sequência conhecidas, somente com a massa molecular do fragmento foi possível determinar o ponto de clivagem com ajuda do software PAWS@. A aquisição dos dados foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP, onde os fragmentos foram detectados de m/z 100 até m/z 1300 utilizando o espectrômetro Esquire 3000 Plus Ion trap (Bruker Daltonics, MA, USA).

3.7.2 Identificação das serinopeptidases

A análise destas serinopeptidases foi feita em colaboração com a Dra Solange M. T. Serrano do LETA (Laboratório Especial de Tecnologia Aplicada) do Instituto Butantan. A identificação das serinopeptidases se deu pelo método de *fingerprint* como descrito por Schevchenko et al., 1996, com modificações. Inicialmente as amostras foram purificadas em HPLC e submetidas a eletroforese em SDS-PAGE, as bandas foram então cortadas e submetidas à digestão por tripsina, DTT e iodoacetamida e por fim os fragmentos foram extraídos do gel. Os fragmentos foram analisados em Q-TOF Ultima API (MicroMass/Waters) e as sequências encontradas foram comparadas com o banco de dados *Serpentes* que contém exclusivamente proteínas destes animais (25210 sequências e 5627876 resíduos).

3.8 – Western Blot

As proteases não neutralizadas pelo soro antibotrópico obtidas como descrito no item 3.6 foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% (5 µg) e a seguir eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). As membranas foram bloqueadas com PBS-BSA 5% e incubadas o soro anti-botrópico comercial, em diluições 1:1000, durante 2 h à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com o tampão PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário específico marcado com fosfatase alcalina (Promega, Wisconsin, EUA), por 1 h à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas e a reação revelada pela adição de NBT e BCIP (Promega, Wisconsin, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Como controles negativos membranas com as enzimas também foram testadas junto ao soro anti *Naja sp* e também apenas com o anticorpo secundário.

4 - Resultados

4.1 Determinação dos substratos FRETs seletivos para as serinopeptidases e metalopeptidases do VBj

A primeira etapa deste trabalho foi encontrar uma forma de diferenciar as duas principais classes de proteases presentes no veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, as metalopeptidases e as serinopeptidases. Dentre todas as sequências testadas, observamos que a atividade do VBj sobre o substrato Abz-FASSAQ-EDDnp foi muito bem inibida pelos inibidores EDTA e 1,10-fenantrolina porém, em contrapartida, há uma baixa inibição por PMSF, mostrando que as enzimas responsáveis pela hidrólise deste substrato são metalopeptidases. O substrato Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp mostrou que as enzimas responsáveis pela sua hidrólise são serinopeptidases, pois os resultados da inibição foram opostos ao outro substrato, tanto EDTA e 1,10-fenantrolina inibiram muito pouco, em oposição ao PMSF que inibe quase completamente a atividade do VBj sobre este substrato (tabela 1) . Assim, a partir deste ponto, o substrato Abz-FASSAQ-EDDnp será denominado Abz-Metal e o Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp como Abz-Serine.

A preferência pelo substrato pelas classes de enzimas proteolíticas pode ser verificada também nas outras espécies do gênero *Bothrops* que compõe o pool de imunização em cavalos para a obtenção do soro comercial (Figura 5).

Tabela 1 – Inibição da hidrólise de Abz-Metal e Abz-Serine pelo VBj através de inibidores clássicos de metalopeptidases (EDTA e 1,10 fenantrolina) e serinopeptidases (PMSF).

Atividade específica (UF/min/μg) ^a		
	Abz-Metal	Abz-Serine
Controle	544,7	9716,16
EDTA	n.h. ^b	9428,72
1,10-Fenantrolina	n.h.	6179,48
PMSF	390,4	2791,78

Os ensaios ocorreram em 100 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 contendo 20 mM NaCl, a 37 °C, utilizando 5 μM de peptídeos Abz e 2,74 μg e 0,18 μg de VBj (para Abz-Metal e para Abz-Serine, respectivamente). Os resultados são uma média de três experimentos independentes e os desvios padrões sempre abaixo de 10%. a UF = Unidades de fluorescência, b nh = no hydrolysis .

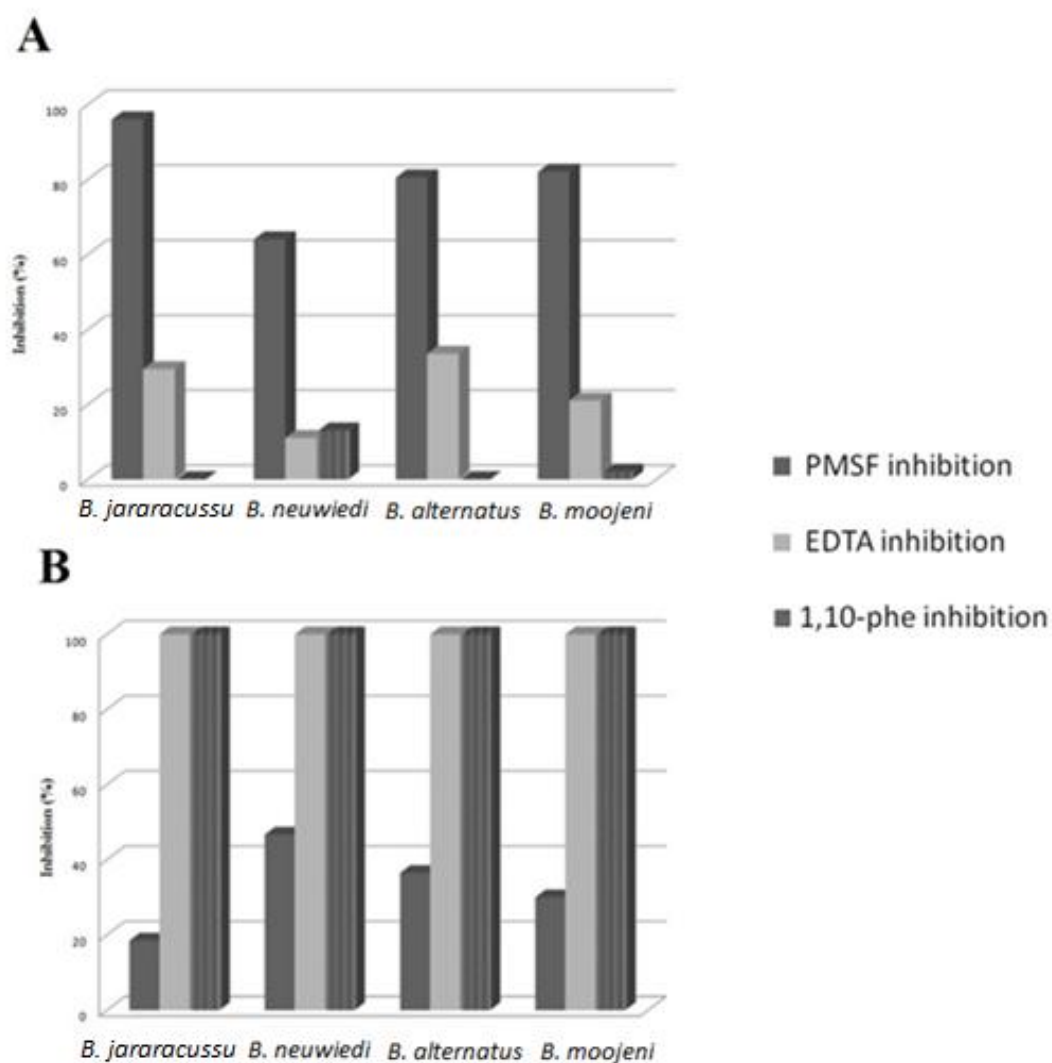


Figura 5- Verificação da hidrólise dos substratos FRETs pelos venenos botrópicos e a influência de inibidores clássicos de serino- e metalopeptidases. Efeito dos inibidores PMSF, EDTA e 1,10-fenantrolina sobre a hidrólise de Abz-Serine (painel A) e Abz-Metal (painel B) pelo veneno total de *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* e *B. moojeni*. Os ensaios ocorreram em 100 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo 20 mM NaCl, a 37 °C, utilizando 5 μ M dos substratos FRETs. Os resultados são uma média de três experimentos independentes e os desvios padrões sempre abaixo de 10%

4.2 Ensaios de soroneutralização

Os testes foram conduzidos utilizando a dose máxima de neutralização que foi encontrada (10 μ L de soro), e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos utilizando os dois substratos FRETs. Nos teste utilizando o VBj, pode-se observar uma boa neutralização da atividade proteolítica da(s) metalopeptidase(s) que atuam sobre Abz-Metal, alcançando níveis acima de 90% (Figura 6A), e uma baixa inibição da(s) serinopeptidase(s) que atuam sobre Abz-Serine, com níveis abaixo de 10% (Figura 6B).

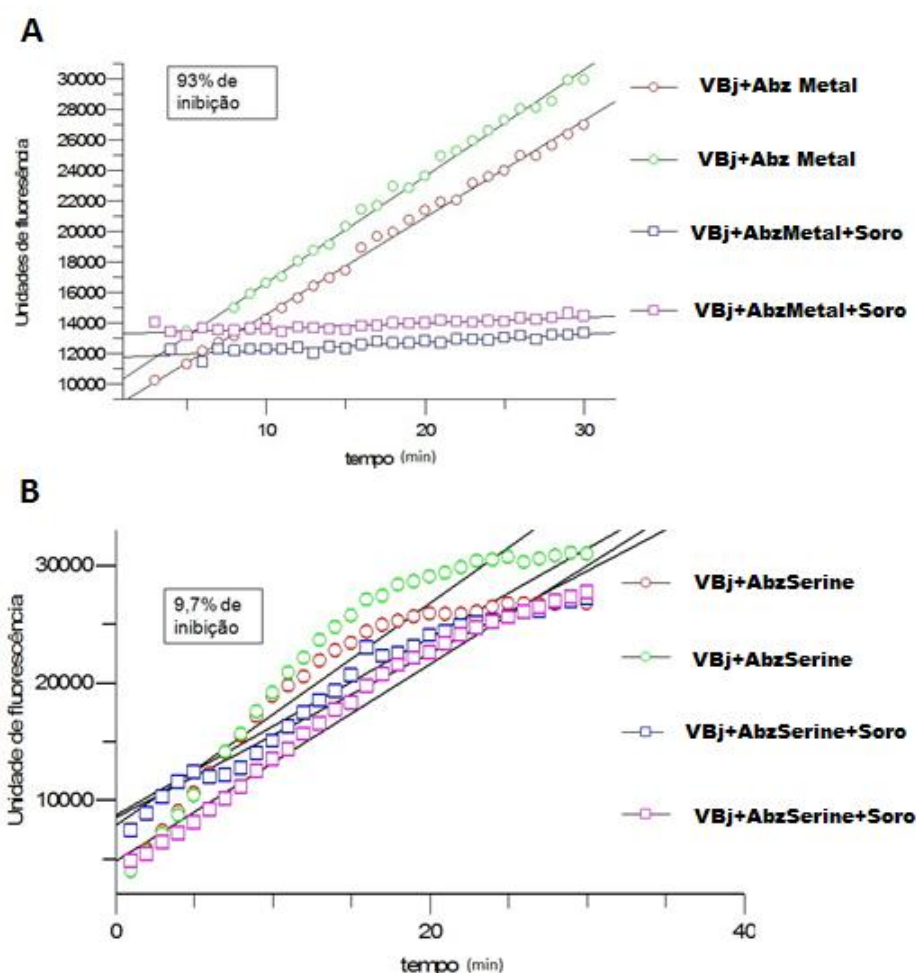


Figura 6 - Soroneutralização da hidrólise de Abz-Metal e Abz-Serine por VBj. A) Os ensaios foram conduzidos em 100 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4,contendo 20 mM NaCl, a 37 °C utilizando 5 μ M de Abz-Metal e 2,74 μ g de VBj tendo uma ótima inibição da atividade na presença de 10 μ L de soro antitropical Instituto Butantan . B) os ensaios fora conduzidos nas mesmas condições, porém utilizando 5 μ M de Abz-Serine e 0,18 μ g de VBj sendo pouco inibido pelo soro.

Após determinar as melhores condições de neutralização da atividade proteolítica de VBj, o mesmo protocolo foi aplicado na verificação do efeito bloqueador do soro sobre os outros venenos utilizados no pool de imunização: *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*.

A Figura 7 mostra que os outros venenos do gênero apresentaram o mesmo padrão observado no VBj. A hidrólise do Abz-Serine pelo veneno de *B. neuwiedi* não foi inibida pelo soro, em níveis um pouco superiores de inibição foram os venenos da *B. jararaca* e *B. moojeni*, em torno de 35%. A hidrólise do Abz-Metal quando incubado com o veneno da *B. alternatus*, foi inibida pelo soro em torno de 70%. Para os venenos das outras espécies, utilizando Abz-Metal, foram observadas neutralizações em níveis acima de 90%.

Em vista desse fenômeno observado tornou-se importante estabelecer ensaios controles a fim de fundamentar nossas observações. Na figura 8 pode-se observar que o substrato Abz-Metal é estável quando na presença do tampão utilizado em todos os experimentos e, também, pode-se observar que este substrato é estável na presença do soro antibotrópico do Instituto Butantan nas concentrações utilizadas nos ensaios de soroneutralização. Os mesmos ensaios foram empregados com o substrato Abz Serine principalmente porque a hidrólise deste substrato não foi neutralizada pelo soro comercial. Assim tornou-se muito importante demonstrar que o soro antibotrópico não é responsável pela a atividade peptidásica sobre este substrato, além da sua estabilidade junto ao tampão fosfato utilizado nos ensaios(Figura 9).

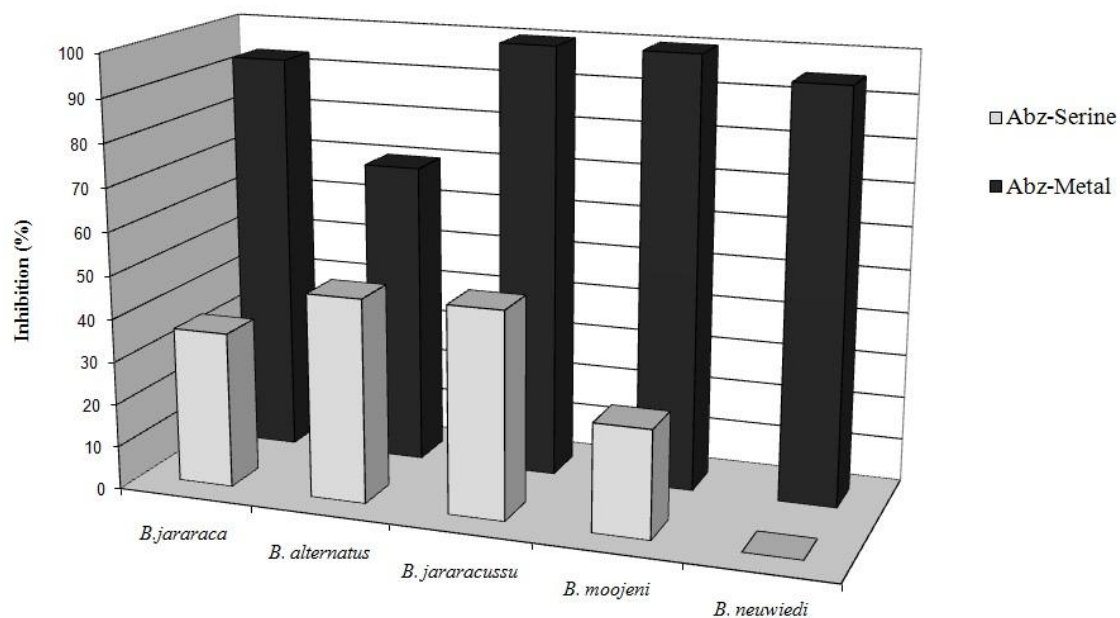


Figura 7 – Inibição de serino- e metalopeptidases presentes nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. Efeito bloqueador da atividade hidrolítica pelo soro antibotrópico comercial do Instituto Butantan, indicando uma boa neutralização das metalopeptidases que atuam sobre Abz Metal e uma fraca inibição das serinopeptidases que atuam sobre Abz Serine. Os resultados são uma média de três experimentos independentes e os desvios padrões sempre abaixo de 10%.

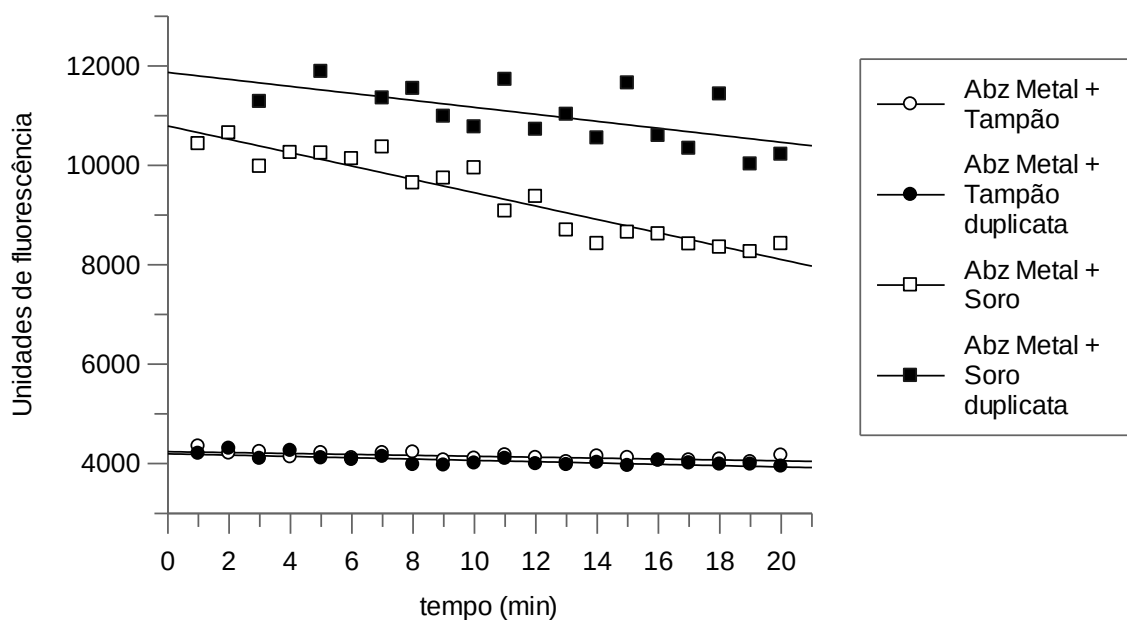


Figura 8. Ensaio de estabilidade do substrato Abz Metal (5 μ M) frente o soro antibotrópico do Instituto Butantan (10 μ L) e somente na presença de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo 20 mM NaCl, a 37 °C. Em ambas as condições não houve hidrólise do substrato.

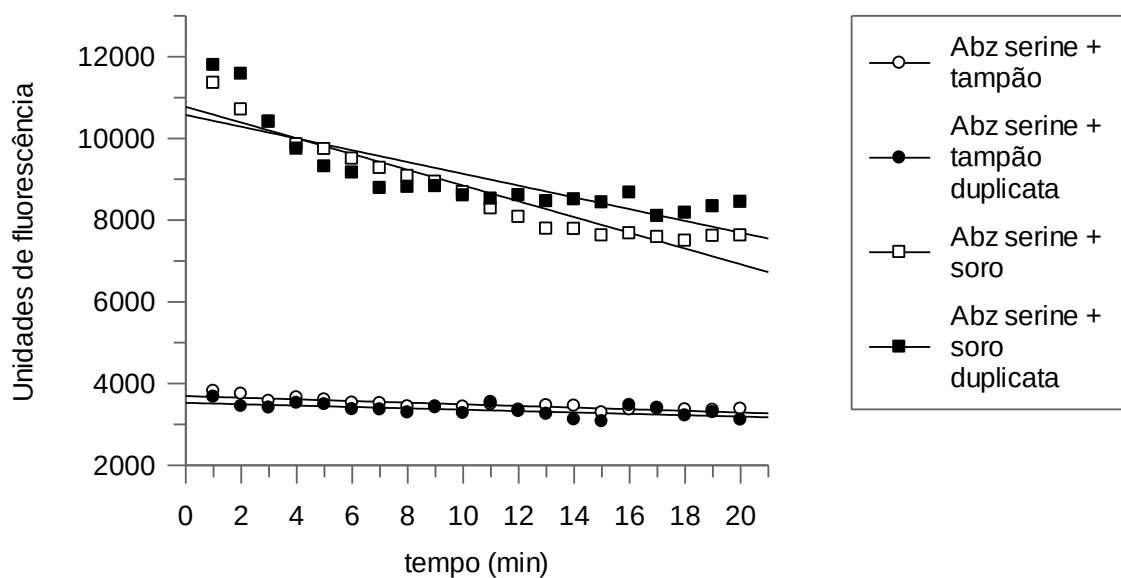


Figura 9. Ensaio de estabilidade do substrato Abz Metal (5 μ M) frente o soro antibotrópico do Instituto Butantan (10 μ L) e somente na presença de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo 20 mM NaCl, a 37 °C. Em ambas as condições não houve hidrólise do substrato.

4.3 Hidrólise de peptídeos biologicamente ativos

Um dos objetivos deste trabalho foi o de encontrar possíveis substratos peptídicos alvos da atividade do veneno botrópico e que pudessem explicar de uma maneira mais profunda os sintomas do envenenamento. Para isto, quatro peptídeos humanos biologicamente ativos que podem estar relacionados com os sintomas observados nas vítimas foram testados. A tabela 2 mostra a taxa de hidrólise da angiotensina I, dinorfina 1-13, neurotensina 1-13 e a bradisinina pelo VBj. Desses substratos somente a bradisinina não foi hidrolisada, enquanto isso pode-se destacar como mais acentuada a hidrólise da angiotensina I, seguido abaixo pela hidrólise da dinorfina 1-13, e por fim a neurotensina 1-13. A tabela 2 também destaca os pontos de clivagem da hidrólise da angiotensina I e da dinorfina 1-13, como podemos notar, a angiotensina I apresenta o ponto de clivagem entre os resíduos Tyr-Ile, e que esta atividade foi totalmente inibida na presença de PMSF e não foi afetada pelo EDTA ou 1,10-fenantrolina. E acima de tudo, o soro antibotrópico só foi capaz de reduzir 44% da hidrólise por VBj.

A dinorfina 1-13 apresenta dois pontos de clivagens, entre os resíduos Arg-Arg e Lys-Leu, que foram principalmente inibidas pelo PMSF (88%) e parcialmente bloqueada por EDTA (28%) e 1,10- fenantrolina (6%). O soro foi capaz de bloquear 48% da atividade proteolítica de VBj sobre este substrato (Tabela 2).

Tabela 2 – Hidrólise de peptídeos bioativos pelo veneno de *B. jararaca*

	Atividade específica (μM/min/μg)					Sítio de clivagem
	Control	EDTA	PMSF	1,10-Phe	Soro	
Angiotensina I	0,18	0,23	n.h. ^a	0,21	0,10	DRVY /// IHPFHL
Dyn 1-13	0,058	0,04	0,007	0,054	0,03	YGGFLR // RIRPK // LK
Neurotensina	0,0012	n.d. ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bradicinina	n.h.	-	-	-	-	-

Os ensaios ocorreram em tampão PBS contendo 50 mM fosfato de sódio, 7,4 pH e 20 mM NaCl, a 37°C, utilizando como substrato os peptídeos angiotensina I, dinorfina 1-13, neurotensina e bradicinina incubados junto ao VBJ, e as atividades encontradas foram testadas junto a inibidores de sítio dirigidos, e também utilizando o soro antiofídico do Instituto Butantan (para mais detalhes ver seção 3.2.2.). nd = not determined nh = no hydrolysis

Após observada que a clivagem da angiotensina I se deve principalmente pelas serinopeptidases e parcialmente bloqueado pelo soro, nós decidimos testar também os outros venenos botrópicos que compõem o pool de imunização. O mesmo padrão de hidrólise observado no VBJ pode ser constatado nos outros venenos, uma atividade tipo quimotripsina, mas com diferentes atividades específicas (Tabela 3). Os pontos de clivagem foram únicos, entre a ligação Tyr-Ile e foram determinados pela padronização interna do sistema de HPLC utilizando as mesmas condições do VBJ. A soroneutralização ocorreu em níveis diferentes para cada veneno, mostrando que existe uma variação entre os níveis de serinopeptidases entre eles. A hidrólise da angiotensina I pelo veneno da *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. jararaca* foi parcialmente bloqueada pelo soro. Em contraste, a degradação da angiotensina I foi totalmente inibida quando utilizado com *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (Tabela 3).

Tabela 3 – Soroneutralização dos venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* sobre a angiotensina I

Veneno	Atividade específica ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)		Inibição (%)
	Controle	Soro	
<i>B. jararaca</i>	0,18	0,10	44
<i>B. alternatus</i>	0,046	0,028	61
<i>B. moojeni</i>	0,15	0	100
<i>B. neuwiedi</i>	1,66	0,075	96
<i>B. jararacussu</i>	0,046	0,01	21

Os ensaios ocorreram em tampão PBS contendo 50 mM fosfato de sódio, pH 7.4 e 20 mM NaCl a 37°C, utilizando 65 μM de angiotensina I. A quantidade de veneno utilizado diferiu para cada espécie (para mais informações ver material e métodos). O volume de soro utilizado foi 10 μL com um tempo de pré incubação de 30 minutos a temperatura ambiente.

Os resultados apresentados até aqui já foram publicados e o manuscrito está em anexo no final desta dissertação (Anexo 1).

4.4 Purificação de serinopeptidases com atividades não bloqueadas pelo soro antibotrópico.

Foram realizadas duas etapas de cromatografia, a primeira sendo de troca iônica em uma coluna DEAE-Celulose e a segunda em uma coluna SHODEX C-4 para HPLC a fim de obter a(s) serinopeptidase(s) não neutralizada(s) pelo soro antibotrópico. Para isso, na cromatografia de troca iônica (Fig. 10) as amostras eluídas em cada concentração de NaCl (0,03M; 0,1M; 0,2M; 0,3M e 2,0 M) foram submetidas ao ensaio de atividade enzimática junto ao substrato Abz-Serine.

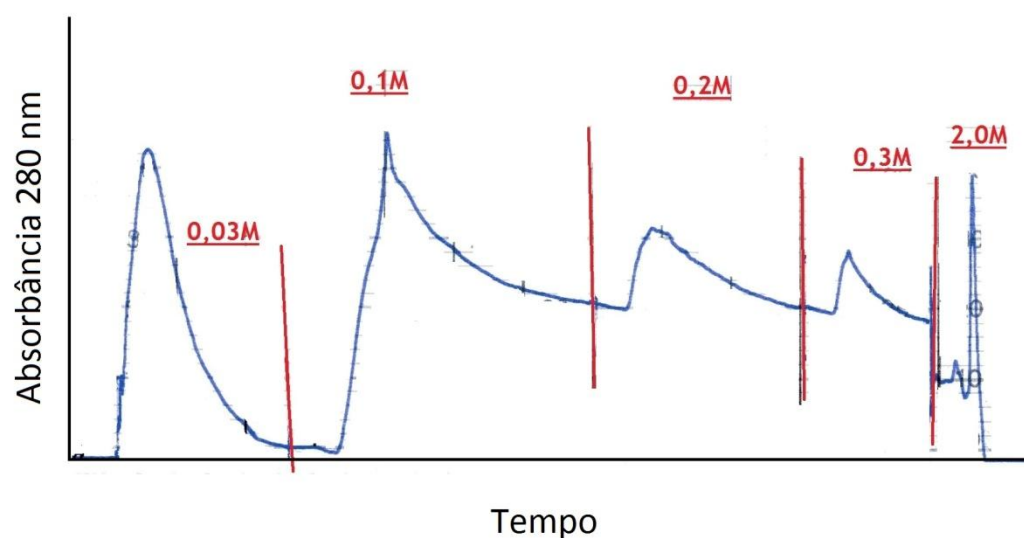


Figura 10. Cromatografia em coluna DEAE Celulose. O VBj foi eluído em soluções de NaCl em “stepwise” nas concentrações: 0,03M; 0,1M; 0,2; 0,3 e 2,0M. Utilizando-se um detector UV 280 nm e registro a pena. Todas as frações foram coletadas e submetidas ao ensaio de atividade enzimática utilizando Abz-Serine.

A fração eluída em 0,1M de NaCl se mostrou mais ativa frente a este substrato e portanto foi submetida ao ensaio de soroneutralização, não mostrando inibição (Fig 11).

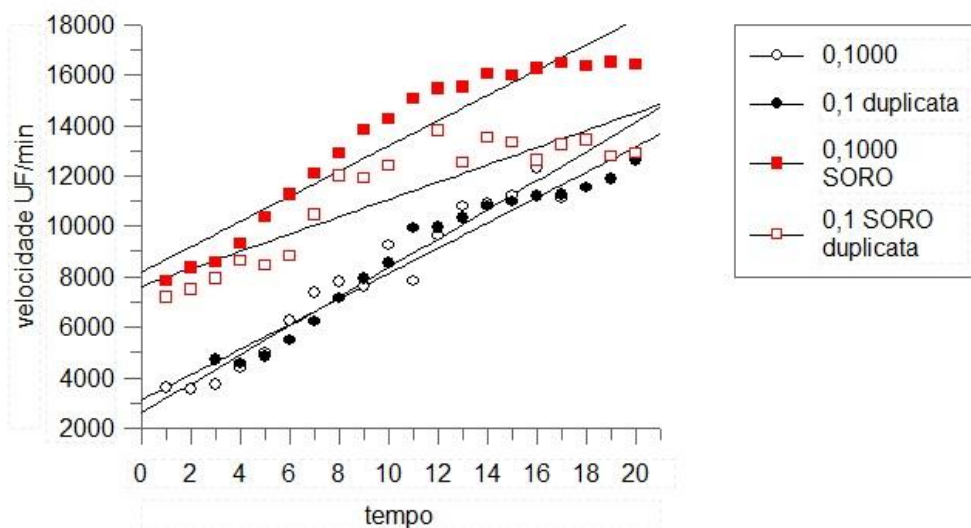


Figura 11. Ensaio de atividade enzimática da fração eluída em 0,1 M de NaCl da cromatografia de troca iônica utilizando o substrato Abz-Serine na ausência e na presença do soro antibotrópico.

Após a submissão desta fração à cromatografia em HPLC fase-reversa foram coletados dois picos (Fig 12). Estes por sua vez foram submetidos ao ensaio de soroneutralização, e P1 foi selecionado por não ser capaz de ser neutralizado pelo soro antibotrópico (Fig. 13). Pode-se observar que a amostra P1 aparece como um “*doublet*” em SDS-PAGE (Fig. 14) com massa molecular relativa de 33 kDa. Em seguida, cada uma das bandas referentes às serinopeptidases foram extraídas do gel, linearizadas, carboximetiladas e degradadas com tripsina e submetidas a análises por espectrometria de massas.

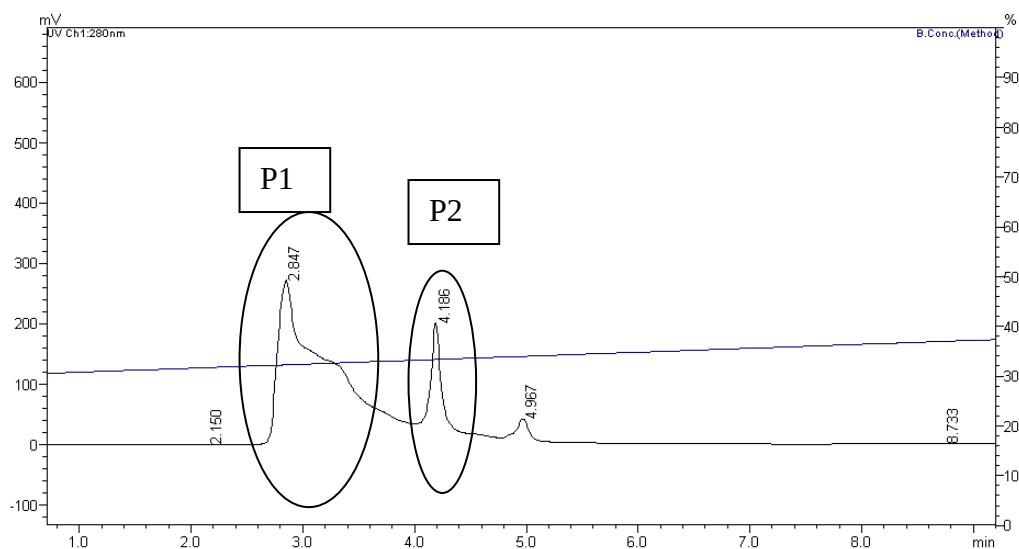


Figura 12 -. Perfil da fração eluída em 0,1 M de NaCl, proveniente da cromatografia de troca iônica, na cromatografia de fase reversa em coluna C4 Shodex. A purificação se deu em HPLC e monitorado com comprimento de onda de 280 nm. Nesta cromatografia foram coletados dois picos e submetidos ao ensaio enzimático com o Abz-Serine e o ensaio de soroneutralização

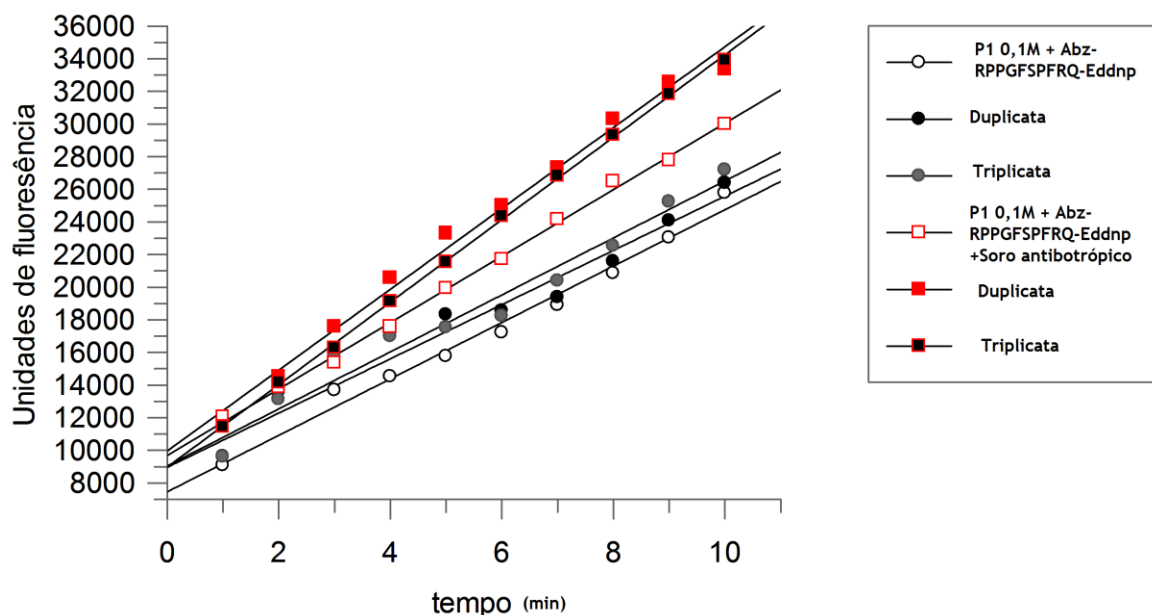


Figura 13. Ensaio de soroneutralização pelo soro antitropical do Pico 1 (P1 0,1M) obtido da cromatografia de fase reversa da fração eluída em 0,1M de NaCl da cromatografia de troca iônica, utilizando como substrato Abz-Serine, mostrando que a atividade das serinopeptidases presentes na amostra não foi neutralizada pelo soro quando comparado com o controle.

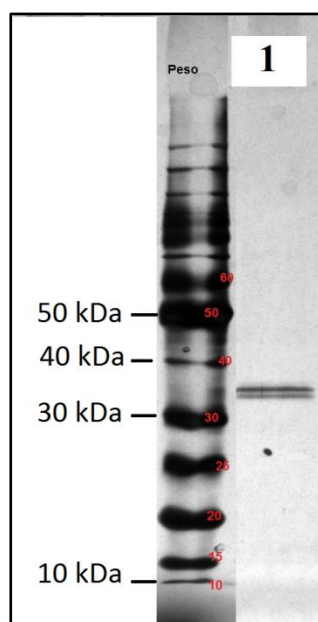


Figura 14. Gel SDS-PAGE 12 % corado por prata. 1) P101D isolada do veneno de VBj que não teve sua atividade neutralizada pelo soro do Instituto Butantan sobre Abz-Serine e foi obtida através da segunda etapa de cromatografia de fase reversa em HPLC utilizando uma coluna C4.

A identificação destas serinopeptidases foi feita em colaboração com a Dra Solange M. T. Serrano do LETA (Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada) do Instituto Butantan, e não foram encontradas correspondências dentre as serinopeptidases já caracterizadas no veneno de *Bothrops jararaca*. As duas serinopeptidases se apresentavam na forma de *dublet*, mas as bandas foram recortadas da melhor maneira possível separadamente e identificadas como banda A (Tabela 4) e banda B (Tabela 5) e processadas individualmente. A técnica de espectrometria de massas utilizada (LC-MS/MS) permitiu que três peptídeos referentes a cada serinopeptidase pudessem ser sequenciados. Analisando os resultados do sequenciamento e comparando com o banco de dados de proteínas de serpentes (*Serpentes*, composto por 25210 sequências e 5627876 resíduos), chegamos a duas serinopeptidases que continham os respectivos peptídeos sequenciados; a primeira é uma serinopeptidase tipo trombina do veneno de *Bothrops asper* (UniProtKB/Swiss-Prot: Q072L6.1) descrita por Pérez e colaboradores (2008) e a segunda é uma serinopeptidase de *Bothrops jararaca* cuja sequência foi obtida por Saguchi e colaboradores (2005) através de um “*screening*” utilizando uma sonda para KN-Bj 2 em uma biblioteca de cDNA de *Bothrops jararaca* (UniProtKB/Swiss-Prot: Q5W959.1).

Tabela 4- Identificação das serinopeptidases por espectrometria de massas Banda A

Nº Acesso	Descrição	Score
82233395	RecName: Full=Venom serine proteinase HS114; Flags: Precursor	410,40
Confiança dos peptídeos		Sequência
High		TLNQDEQTR
High		AAYPELPAEYR
High		NDDALDKDMLVR
123883733	RecName: Full=Venom serine proteinase-like; Flags: Precursor	87,70
Confiança dos peptídeos		Sequência
High		KVLNEDEQTR
High		VSDYTEWIK
High		VLNEDEQTR

Tabela 5- Identificação das serinopeptidases por espectrometria de massas Banda B

Nº Acesso	Descrição	Score
123883733	RecName: Full=Venom serine proteinase-like; Flags: Precursor	227,08
Confiança dos peptídeos		Sequência
High		KVLNEDEQTR
High		VLNEDEQTR
High		VSDYTEWIK
82233395	RecName: Full=Venom serine proteinase HS114; Flags: Precursor	151,91
Confiança dos peptídeos		Sequência
High		AAYPELPAEYR
High		TLNQDEQTR

4.5 Ensaio de reconhecimento das serinopeptidases com atividades não bloqueadas pelo soro antibotrópico.

Através de experimentos de *western blot* foi possível observar o reconhecimento das proteínas de VBj pelo soro antibotrópico com intensidades diferentes. Assim, observamos que o soro antibotrópico reconhece pelo menos 6 proteínas de VBj, 3 delas com massa molecular abaixo de 40 kDa e outras 3 com massa molecular relativa acima de 50 kDa. Porém o soro antibotrópico não foi capaz de reconhecer as proteases purificadas (P101D). Foram utilizados também como controle negativo o anticorpo secundário e um soro não relacionado (soro anti naja) e foi possível observar que o soro anti- naja reconheceu fracamente uma única banda de alta massa molecular e o anticorpo secundário não teve nenhuma reatividade cruzada com as proteínas do veneno (Fig. 15B).

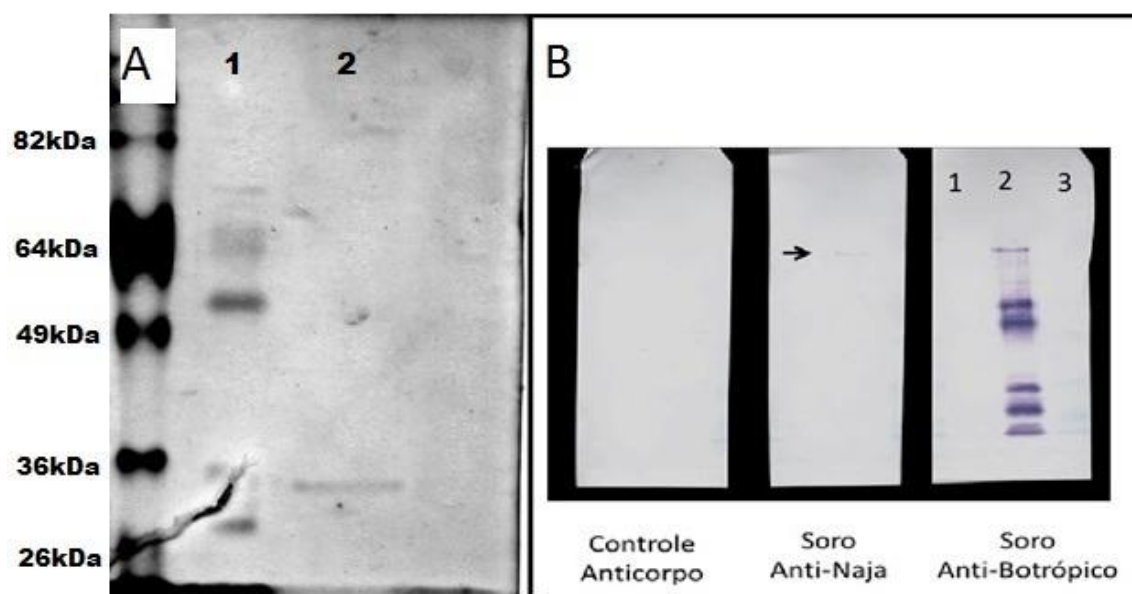


Figura 15. Painei A) Gel SDS-PAGE 12 % corado por prata. Linha 1) VBj ; Linha 2) P101D. O restante do gel foi submetido a transferência para membrana de nitrocelulose e submetido a ensaio de Western blot. **Painei B)** *Western blot* utilizando o soro antibotrópico no reconhecimento de VBj e P1 0,1D obtido da cromatografia de fase reversa da fração eluída em 0,1M de NaCl da cromatografia de troca iônica. Dois controles negativos foram utilizados, anticorpo secundário anti IgG de cavalo e soro anti *Naja* sp. Linha 1) Padrão de massa molecular, Linha 2) VBj e Linha 3) P101D

5 - Discussão

Estudos com veneno total de *Bothrops jararaca*: Atividade sobre Peptídeos FRETs

Apesar de ter sido proposto que as espécies *Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi* devessem estar inclusas no gênero *Bothropoides* e *B. alternatus* no gênero *Rhinocerophis*, não há consenso sobre a sistemática deste grupo (Bérnils e Costa, 2012). E como o envenenamento humano por estas espécies são tratados com o soro antibotrópico, este estudo considera estas serpentes como pertencentes ao gênero *Bothrops*.

Um dos objetivos do presente trabalho foi analisar a habilidade do antiveneno produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, de neutralizar as principais toxinas do veneno de *Bothrops jararaca*, e quando não foi possível, investigar a causa da falha na neutralização. No início do estudo, um conjunto de peptídeos FRET foi utilizado junto ao VBJ e inibidores classe específicos PMSF, EDTA e 1,10-fenantrolina. O resultado indicou que dois substratos podem ser utilizados como ferramentas específicas no estudo de metalopeptidase (Abz-FASSAQ-EDDnp) e serinopeptidases (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp).

Além disso, foi demonstrada uma fraca neutralização de duas serinopeptidases e uma ótima neutralização das metalopeptidases que hidrolisam Abz-Metal, estes resultados estão em desacordo com a literatura, já que os sintomas atribuídos as serinopeptidases são considerados controlados quando é administrado o soro antibotrópico. Na verdade, o soro é capaz de reduzir os efeitos sistêmicos causados pelo envenenamento botrópico tendo assim salvo muitas vidas no decorrer dos anos, porém, não é eficaz em reverter os efeitos locais observados nestes acidentes com humanos (Cardoso et al., 1993). Diversos trabalhos estudando a neutralização dos efeitos locais

produzidos pelos venenos botrópicos pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan estão disponíveis na literatura.

O soro do Instituto Butantan é um dos melhores da América Latina ele se mostrou efetivo da neutralização de diversas atividades de vários venenos botrópicos, como, atividade letal, hemorrágica e coagulante, porém não se mostrou muito efetivo na neutralização da atividade desfibrinogenante (Segura et al., 2010; Dias da Silva e Tambourgi, 2011).

A eficácia do soro do Instituto Butantan não se deve, provavelmente, a sua composição por fragmentos $F(ab')_2$, uma vez que Leon e colaboradores (2000) demonstraram não haver uma diferença significativa na eficácia entre IgG íntegras e fragmentos Fab em neutralizar efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*. Neste estudo foram utilizados diferentes esquemas de aplicação dos dois soros, com pré-incubação e aplicação dos mesmos nos animais após a aplicação do veneno em diferentes momentos. A ação hemorrágica foi totalmente neutralizada quando os antivenenos foram pré-incubados com o veneno 30 minutos antes da aplicação utilizando um volume de 500 μ L de antiveneno para neutralizar 1 mg de veneno. Porém quando aplicado o antiveneno logo após o envenenamento experimental somente 40% do efeito foi neutralizado. Ambos os antivenenos também foram eficientes em neutralizar o efeito mionecrótico quando utilizado o ensaio com pré-incubação, mas novamente quando utilizado o esquema de aplicação do antiveneno logo após o veneno somente parte do efeito foi neutralizado. Por fim foi também avaliado neste trabalho a formação de edema pelo veneno de *B. asper*, e estes resultados se mostraram muito interessantes, pois mesmo com uma pré-incubação de 30 minutos e utilizando doses de antiveneno chegando a 2000 μ L por 1 mg de veneno não foi possível neutralizar

totalmente o edema formado nos animais, restando ainda quase 40% do efeito do veneno.

A causa da baixa neutralização do soro antibotrópico mesmo com o tratamento dos animais antes ou imediatamente após a aplicação do veneno botrópico foi estudado por Battellino e colaboradores em 2003 onde diferentes esquemas de aplicação do soro antibotrópico foram estudados: antes (15 minutos), ao mesmo tempo e depois da aplicação do veneno de *B. jararaca*. Os autores concluíram que o fenômeno não ocorria pela falta de anticorpos específicos, mas sim pela baixa interação dos anticorpos com os componentes do veneno, provavelmente, pela dificuldade de distribuição dessas moléculas nos tecidos. Os autores chegaram a essa conclusão já que quando foi realizada a neutralização *in vitro* (pré-incubação) e depois injetada a solução, não foi possível ser observado a formação de coágulos de fibrina nem alteração na permeabilidade vascular, indicando não se tratar da falta de anticorpos específicos contra essas toxinas. Porém apesar dos autores afirmarem que não foi observada a formação de lesões hemorrágicas os resultados mostram que foram sim observadas lesões, mas com uma proporção quase seis vezes menor quando comparadas com o controle.

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

autores concluem que não havia uma falta de anticorpos específicos contra as enzimas, não discutindo mais profundamente essa atividade residual. Galvão Nascimento e colaboradores (2010) também observaram que, tanto com o procedimento de pré-incubação *in vitro* quanto no tratamento dos animais com o soro antes e após a aplicação do veneno, houve uma significativa redução na formação do edema pelo veneno de *B. moojeni*. Em todos os casos de tratamento com o antiveneno, pôde ser observado um efeito edematogênico, mesmo no caso da pré-incubação *in vitro*, que gerou leve edema e que só foi restaurado totalmente após 60 minutos após a aplicação da mistura. Os resultados deste trabalho também mostram que a eficácia do soro antibotrópico no tratamento do edema fica claramente comprometida com o aumento do intervalo entre a aplicação do soro e a aplicação do veneno, pois eles afirmam que os mediadores da cascata da inflamação na formação de edema já foram ativados. Além disso, os autores ressaltam que o soro por si não induziu edema nos camundongos testados.·.

Tanto o soro antibotrópico do Instituto Butantan quanto outros dois antivenenos (Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil) foram avaliados também por da Silva e colaboradores (2007), em ensaios cegos, quanto à neutralização dos os efeitos miotóxicos e hemorrágicos dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* utilizando dois protocolos, tanto o processo de pré-incubação do veneno com os soros, quanto o pré tratamento dos animais com o soro antes da injeção dos venenos. Este trabalho mostrou que após a pré-incubação do veneno de *B. jararacussu* com os diferentes soros houve uma significativa inibição da atividade miotóxica, mas somente quando foi utilizado a dose máxima de 4,0 mL/mg de veneno. As inibições variaram de 26% quando PAV C foi utilizado, 53% pelo PAV B e 67% com PAV A, e somente este último soro

promoveu uma inibição de 28% da atividade miotóxica quando utilizando a dose menor de 1,2 mL/mg.

Outro efeito analisado foi a hemorragia provocada por esses venenos, e novamente foram estudados os 3 antivenenos a fim de neutralizar esta atividade. Houve uma inibição significativa quando utilizado o protocolo de pré-incubação com 0,4 mL, mas não total. Mesmo quando foram usadas doses até 10 vezes maiores, o perfil de neutralização continuou sendo o mesmo, onde o mais eficiente foi PAV A (95%), seguido de PAV B (87%) e por último PAV C (74%), indicando que as atividades residuais desses venenos provavelmente se devem a falta de anticorpos específicos contra as enzimas responsáveis, já que o aumento da dose não altera a porcentagem de inibição. O pré-tratamento dos animais com os soro se mostrou eficaz na neutralização do efeito hemorrágico do veneno de *Bothrops jararaca*. Não é possível estabelecer qual soro foi mais eficiente ou até mesmo qual deles corresponde ao soro antibotrópico do Instituto Butantan, pois os testes foram realizados com os soros identificados através de códigos, e também vale ressaltar que a concentração de 4,0 mL/mg de veneno é 10 vezes mais alta do que a recomendação para uso clínico.

Apesar dos estudos descritos acima não distinguirem os efeitos relacionados às SVMPs e SVSPs, nossos resultados destacam uma falha de neutralização das serinopeptidases pelo soro antibotrópico comercial. Assim, sugerimos que as atividades residuais observadas possam talvez ser de serinopeptidases. Estas serino peptidases podem estar atuando na atividade edematogênica como mostrado por Zychar e colaboradores (2010), onde constataram que a inibição por PMSF reduzia levemente esta atividade do VBj. E também já foi demonstrado por Pérez e colaboradores (2007) que a serinopeptidase BjussuSP-I do veneno da *Bothrops jararacussu* e sua capacidade em estimular a expressão de proMMP-9 mas que não era capaz de induzir a ativação de

proMMP-2 nem proMMP-9. Porém, Saravia-Otten e colaboradores (2004) demonstraram que serinopeptidases do veneno de *Bothrops asper* eram capazes de ativar proMMP-2 expressos por cultura de fibroblastos, mas não eram capazes de promover a sua expressão. Portanto, torna-se importante que no futuro seja investigado um possível papel destas duas serinopeptidases não neutralizadas pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan nos efeitos residuais mostrados nos trabalhos acima citados.

As serinopeptidases dos venenos de serpentes são classificadas no clã SA da família S1 das quimotripsinas (Rawlings et al., 2013). A tripsina dos mamíferos e as enzimas presentes nos venenos tem um “*fold*” similar e acredita-se que tenham evoluído de um ancestral em comum (Itoh et al., 1998). O veneno de *Bothrops jararaca* contém diversas serinopeptidases, e as mais bem caracterizadas são: Bothrops protease A (BPA), que recentemente foi descrita como um agente desfibrinogenante; KN-Bj é capaz de liberar bradicinina do cininogênio de baixo peso molecular; TL-Bj, uma protease tipo trombina com atividade coagulante; PA-Bj, uma enzima com atividade agregadora de plaquetas; Bothronbin é uma serinopeptidase que age através da clivagem do fibrinopeptídeo A sem afetar o fibrinopeptídeo B (Serrano e Maroun, 2005).

Apesar das SVSP descritas acima terem substratos proteicos definidos, até a publicação do nosso trabalho não havia dados indicando uma possível atividade destas enzimas sobre peptídeos biologicamente ativos. Na verdade a maioria dos métodos utilizados nos testes de atividade proteolítica de venenos animais não leva em consideração a possibilidade de atividade sobre peptídeos, que podem estar contribuindo direta ou indiretamente com o envenenamento.

Estudos com serinopeptidases purificadas de *Bothrops jararaca* não neutralizadas pelo soro antibotrópico com atividade sobre Abz-Serine

Outro objetivo importante deste trabalho foi o estudo da causa da não neutralização das serinopeptidases do veneno de *Bothrops jararaca* que estariam atuando sobre Abz Serine, e para isto foram efetuadas diversas etapas de purificação chegando a duas serinopeptidases nunca antes purificadas no veneno desta espécie. Ambas tem uma massa molecular relativa em torno de 33 kDa, mas, apesar de apresentarem massas quase idênticas foram recortadas ao máximo separadamente do gel, e a digestão das proteases por tripsina mostrou diferentes fragmentos peptídicos que foram sequenciados e possibilitaram a diferenciação das mesmas. Os resultados mostraram que a separação através do processamento individual de cada banda foi bem sucedida, pois em ambas as bandas foram encontrados os mesmos fragmentos peptídicos, porém em cada banda a serinopeptidase identificada com maior *score* foi diferente. Apesar de todas as serinopeptidases já caracterizadas do VBj apresentam similaridade de sequências primárias muito alta, acreditamos que tenhamos purificados duas moléculas ainda inéditas, uma vez que cada uma delas tiveram três peptídeos internos sequenciados pela técnica de “*fingerfrint*” únicos a estas proteínas. Assim, a serinopeptidase HS114 obtida por Saguchi e colaboradores (2005) através de um “*screening*” utilizando uma sonda para KN-Bj 2 em uma biblioteca de cDNA de *Bothrops jararaca* e a serinopeptidase já caracterizada no veneno da *B. asper* (asperase) com atividade trombina-símile são duas das peptidases cujas atividades não são bloqueadas pelo soro antibotrópico.

A falha na neutralização destas duas serinopeptidases por parte do soro antibotrópico do Instituto Butantan se deve aparentemente à falta de anticorpos específicos contra estas enzimas como foi mostrado no ensaio de *western blot*. Uma

falha no reconhecimento de toxinas de venenos botrópicos foi descrito por Lira e colaboradores (2007) que constataram que o soro antibotrópico do Instituto Butantan não era capaz de reconhecer algumas das toxinas de baixa massa molecular encontradas no veneno de *Bothrops insularis* tanto quanto o soro experimental específico contra o veneno de *Bothrops insularis* produzido em coelhos. Ferreira e colaboradores (1992) também constataram um não reconhecimento por parte do soro antibotrópico do Instituto Butantan frente a diferentes venenos botrópicos, incluindo VBj, porém as proteínas não reconhecidas pelo soro apresentavam massa molecular relativa em torno de 15 kDa e, portanto, não se tratam das mesmas enzimas deste trabalho.

Acreditamos que esta falta de anticorpos pode indicar estar havendo a destruição dos epítomos destas enzimas por outras proteases antes do momento da imunização dos cavalos. Outra hipótese é a predominância das SVMs frente às SVSP, pois uma grande quantidade do pool de venenos é injetada em cada animal e talvez esta “inundação” de antígenos sobrecarregue o sistema imune dos animais, gerando anticorpos somente contra os componentes mais abundantes dos venenos que seriam as SVMs. Talvez simplesmente alterando-se o esquema de imunização, reduzindo-se as doses, possa ser possível a produção mais ampla de anticorpos pelos animais, contemplando tanto metalo- quanto serinopeptidases.

Estudos com veneno total de *Bothrops jararaca*: Atividade sobre Peptídeos Biologicamente Ativos

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o veneno total de *B. jararaca* foi capaz de clivar a angiotensina I, dinorfina 1-13 e, em um grau menor de hidrólise, a neurotensina 1-13. Surpreendentemente, a angiotensina I foi bem hidrolisada pelo VBj e a utilização da 1,10-fenantrolina e PMSF claramente mostraram

que serinopeptidases são responsáveis por esta atividade. A incubação com o soro antibotrópico mostrou novamente uma falha na neutralização de serinopeptidases.

O ponto de hidrólise da angiotensina I foi definido entre os resíduos Tyr- Ile através da análise de espectrometria de massas e se repetiu quando utilizado os outros venenos botrópicos. Este resultado está de acordo com outras atividades de serinopeptidases reportadas como sendo capazes também de hidrolisar a angiotensina I nos mesmo resíduos, como a “Kallikrein 1-related peptidase 3” (KLK3), também conhecida como antígeno prostático específico (PSA) (Andrade et al., 2010) e “rat chymase-1” (Sanker et al., 1997). Recentemente, foi reportada uma serinopeptidase purificada do veneno da serpente *Vipera lebetina* capaz de hidrolisar a angiotensina I no mesmo ponto de clivagem reportado aqui (Siigur et al., 2011).

O decapeptídeo Angiotensina I (DRVYIHPFHL) é o precursor do octapeptídeo Angiotensina II (DRVYIHPF), muito bem caracterizado como um peptídeo hipertensor. A principal peptidase relacionada com a conversão da Ang I em Ang II é a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA, peptidil dipeptidase A, EC 3.4.15.1) (Skeggs et al., 1956).

Levando em consideração esta observação, faz-se importante ressaltar também que uma família de peptídeos com atividade inibitória sobre a ECA, os BPPs (Bradykinin-Potentiating Peptides), está presente no veneno de *B. jararaca* (Ferreira e Rocha e Silva, 1965; Ferreira et al., 1970; Ondetti et al., 1971). Uma dessas moléculas, o BPP-5a serviu como protótipo para a formulação de um inibidor comercial da ECA, Captopril (Ondetti et al., 1977). Além disso, o VBJ contém uma serinopeptidase que é capaz de liberar a bradicinina do cininogênio de baixo peso molecular, a KN-BJ (Serrano et al., 1998). Já que os efeitos hipotensivos observados nos acidentes com humanos estão relacionados com a presença dos BPPs e, também pela presença da Kn-

Bj, a destruição da angiotensina I pode ser outra atividade atribuída ao VBj que pode estar contribuindo com este quadro. Outro resultado deste trabalho que corrobora com as nossas hipóteses é que a bradicinina, como mostrado aqui, se manteve estável frente ao VBj, mesmo após longos períodos de incubação. Levando todos estes fatores em consideração, ao que parece o VBj pode ser considerado um arsenal que leva a vítima/presa a um choque hipotensivo, e o mais alarmante é que, ao que parece, o soro antibotrópico do Instituto Butantan, que é utilizado nacionalmente, não bloqueia por completo estas atividades. Os outros venenos botrópicos também se mostraram ativos sobre a angiotensina I e os resultados de soroneutralização se mostraram muito distintos entre si, sendo que a menor inibição se apresentou sobre o veneno de *B. jararacussu* (21%) e a maior sobre o veneno de *B. moojeni* (100%), estas variações em ensaios de neutralização pelo soro antibotrópico quando utilizados diferentes espécies também foi observado por Zamunér e colaboradores (2004) quando analisou os efeitos neurotóxicos e miotóxicos dos venenos botrópicos sendo neutralizados pelo soro antibotrópico do Instituto Vital Brazil, neste trabalho foi demonstrado também uma variação muito grande no perfil de reconhecimento em ensaios de “*immunoblotting*”.

É importante ressaltar que apesar destes resultados, o soro produzido pelo Instituto Butantan apresenta uma alta taxa de neutralização específica contra a atividade letal de venenos botrópicos quando comparado com outros soros comerciais da América Latina (Dias da Silva e Tambourgi, 2011).

Analisando o ponto de clivagem da angiotensina I (Tyr-Ile), inicialmente acreditávamos que a serinopeptidase BPA seria a responsável por esta atividade já que ela foi capaz de clivar a cadeia beta da insulina justamente num resíduo de Tyr na posição P1 (Tyr26-Thr27) (Mandelbaum et al., 1964). Entrando no campo da especificidade enzima-substrato, é importante ressaltar um grande paradoxo no estudo

das SVSPs, já que estas moléculas apresentam uma grande similaridade estrutural entre si, porém possuem substratos específicos para cada uma. O menor grau de similaridade observado entre as SVSPs de *B. jararaca* é de 63,4% (KN-Bj e PA-Bj), e a maior, chega a 71,6% (BPA e PA-Bj), mas como descrito na Introdução, elas apresentam substratos proteicos diferentes. A serinopeptidase reportada por Siigur e colaboradores (2011) apresenta um grau de similaridade de 85% e 75 % de identidade com a BPA, incluindo a tríade catalítica. Até o momento ainda não foi isolada e identificada a enzima responsável pela degradação da angiotensina I, mas segue como uma das principais metas futuras do grupo alcançar este objetivo.

6 - Conclusões

De acordo com os resultados apresentados e discutidos podemos concluir que:

- Este trabalho contribui para um melhor entendimento do papel das serinopeptidases dos venenos botrópicos no envenenamento, e como o soro antibotrópico do Instituto Butantan atua sobre estas atividades.
- Observou-se uma falha do soro antibotrópico em neutralizar as atividades de duas serinopeptidases do VBj
- As duas serinopeptidases foram identificadas como HS114 e Asperase, ambas nunca antes purificadas no VBj
- A causa desta falha parece ocorrer pela ausência de anticorpos específicos contra estas enzimas no soro comercial.
- Este trabalho mostrou também pela primeira vez, a atividade das enzimas dos venenos botrópicos sobre peptídeos biologicamente ativos
- Ressaltando a atividade quimotripsina símile sobre a anigotensina I e também foi constatada uma atividade de serinopeptidases sobre a dinorfina 1-13,

7 - Bibliografia

Andrade D, Assis DM, Lima AR, Oliveira JR, Araujo MS, Blaber SI, Blaber M, Juliano MA, Juliano L, 2010. Substrate specificity and inhibition of human kallikrein-related peptidase 3 (KLK3 or PSA) activated with sodium citrate and glycosaminoglycans. *Arch. biochem. Biophys.* 498, 74–82.

Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, London. 1998

Battellino C, Piazza R, da Silva AM, Cury Y, Farsky SH. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 2003 Apr;41(5):583-93.

Bayliss WM e Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion *J Physiol*. 1902 September 12; 28(5): 325–353.

Bérnils RS e Costa HC. 2012. Brazilian reptiles: List of species. Version 2012.1. Available at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Downloaded on 2013 Jan 15.

Bode W, Turk D, Karshikov A. (1992). The refined 1.9 Å x-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone inhibited human alpha thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* 1: 426-471.

Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge M.T et al Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med* 86: 315–325. 1993

Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J Biol Chem*. 1973 Oct 10;248(19):6854-61.

Chagas JR, Juliano L, Prado ES. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal Biochem*. 1991 Feb 1; 192(2) : 419-25

Chagas JR, Portaro FC, Hirata IY, Almeida PC, Juliano MA, Juliano L, Prado ES. Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins. *Biochem J*. 1995 Feb 15;306 (Pt 1):63-9.

da Silva NM, Arruda EZ, Murakami YL, Moraes RA, El-Kik CZ, Tomaz MA, Fernandes FF, Oliveira CZ, Soares AM, Giglio JR, Melo PA. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon*. 2007 Aug;50(2):196-205. Epub 2007 Mar 24.

Day R, Lazure C, Basak A, Boudreault A, Limperis P, Dong W, Lindberg I. Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. J Biol Chem. 1998 Jan 9;273(2):829-36.

Dias da Silva, W., Tambourgi, D.V., 2011. Comment on "Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms". Toxicon 57, 1109–1110.

Dickerson IM, Noël G. Tissue-specific peptide processing. in Peptide Biosynthesis and Processing, 1991 ed Fricker LD (CRC Press, Boca Raton, FL), pp 71–109.

Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snakes by Bothrops jararaca antivenom. Toxicon. 1992 Dec;30(12):1591-602.

Ferreira, S.H., Rocha e Silva, M., 1965. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from Bothrops jararaca venom. Experientia 21, 347–349.

Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ, 1970. Isolation of bradykinin potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. Biochemistry 9,2583–2593.

Fox JW, Bjarnason JB. Atrolysins: metalloproteinases from Crotalus atrox venom. Methods Enzymol. 1995;248:368-87.

Fox JW, Serrano SM. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. Proteomics. 2008a Feb;8(4):909-20

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(12):3016–30.

Galvão Nascimento N, Sampaio MC, Amaral Olivo R, Teixeira C. Contribution of mast cells to the oedema induced by Bothrops moojeni snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. Toxicon. 2010 Feb-Mar;55(2-3):343-52. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.009. Epub 2009 Aug 22.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Dec;76(12):6666-70.

Gomes N. e Puerto G. Atlas anatómico de *Bothrops jararaca*. Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). Mem. Inst. Butantan, 55(1) : 69-100, 1993

Hallberg M, Nyberg F. Neuropeptide conversion to bioactive fragments--an important pathway in neuromodulation. Curr Protein Pept Sci. 2003 Feb;4(1):31-44.

Hardie, DG. (1992) Biochemical messengers. In: *Hormones, neurotransmitters and Growth factors* (London: Chapman and Hall), pp. 1-43.

Hauser KF, Aldrich JV, Anderson KJ, Bakalkin G, Christie MJ, Hall ED, Knapp PE, Scheff SW, Singh IN, Vissel B, Woods AS, Yakovleva T, Shippenberg TS. Pathobiology of dynorphins in trauma and disease. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:216-35. Print 2005 Jan 1.

Itoh N, Tanaka N, Funakoshi I, Kawasaki T, Mihashi S, Yamashina I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. *J. Bio.Chem.*, 263(16) : 7628-31, 1988

Jorpes JE e Mutt V. Secretin, Cholecystokinin, Pancreozymin and Gastrin 1 ed Springer 1973

Karlsson E. Snake venoms . Handbook of experimental pharmacology. Vol.52, Berlin, Springer-Verlag : 259-212, 1979

Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):200-4.

Kisiel W, Kondo S, Smith KJ, McMullen BA, Smith LF, 1987. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix* venom. *J. Biol. Chem*. 262, 12607–12613.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature. ;227(5259):680-5. 1970 Aug 15

Lefebvre JM, Qanadli SD, Kacher S, et al 2001. A new vascular sealant (Sealgel) to achieve rapid hemostasis after percutaneous angioplasty in anticoagulated patients: clinical feasibility and preliminary results. *Eur Radiol* 11: 454-459

León G, Valverde JM, Rojas G, Lomonte B, Gutiérrez JM. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 2000 Feb;38(2):233-44.

Lira MS, Furtado MF, Martins LM, Lopes-Ferreira M, Santoro ML, Barbaro KC. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. *Toxicon*. 2007 Jun 1;49(7):982-94. Epub 2007 Feb 1.

Madelbaum FR, Henriques OB. Purification and properties of *Bothrops* protease A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 104(3) : 369-74, 1964

Madhavan R, Jacobs BS, Levine SR. 2002 Stroke trials: what have we learned? *Neurol Res* 24: 27-32.

Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, Howarth P, Kaplan A, Kojda G, Leeb-Lundberg F, Lötvall J, Magerl M. New topics in bradykinin research. *Allergy*. 2011 Nov;66(11):1397-406. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02686.x. Epub 2011 Aug 22.

Markland Jr FS., 1976. Crotalase. *Methods Enzymol.* 45,223–236.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p

Neurath H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci.* 1989 Jul;14(7):268-71.

Niewiarowski S, Kirby EP, Stocker K, 1977. Throbocytin- a novel platelet activating enzyme from *Bothrops atrox* venom. *Thromb. Res.* 10, 863–869.

Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* . 1994 Feb 22;33(7):1843–9.

Ondetti, M.A., Williams, N.J., Sabo, E.F., Pluscec, J., Weaver, E.R., Kocy, O., 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry* 10, 4033–4039.

Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W., 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196, 441–444.

Oyama E e Takahashi H, 2003. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). *Toxicon* 41, 559–568.

Paes Leme AF, Prezoto BC, Yamashiro ET, Bertholim L, Tashima a K, Klitzke CF, et al. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2008 Aug;6(8):1363–72.

Parry M.A, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*. 6(9):1195-206. 1998 Sep 15

Pérez AV, Saravia P, Rucavado A, Sant'Ana CD, Soares AM, Gutiérrez JM. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology . 2007 Jun 1 ;49(7):1063–9.

Pérez AV, Rucavado A, Sanz L, Calvete JJ, Gutiérrez JM. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Jan;41(1):12-7.

Piccolo G, Chacur M, Gutiérrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Oct;35(10):1221-8. Epub 2002 Oct 13.

Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado MFD, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology . 2008 Dec 15;52(8):842–51.

Rawlings ND., Barrett, AJ. & Bateman A. (2012) *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40, D343-D350. Acessado em 2013 Jan 15. Disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/>

Reichl AP, Assakura MT, Madelbaum FR. Biophysical properties and amino acid composition of *Bothrops* protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. 21(3):421-7. 1983

Ribeiro LA e Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 30, n. 6, Dec. 1997 .

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949 Feb;156(2):261-73.

Saguchi K, Hagiwara-Saguchi Y, Murayama N, Ohi H, Fujita Y, Camargo ACM, et al. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology . 2005 Jul;46(1):72–83.

Santos BF, Serrao SM, Kuliopulos A, Niewiaroski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett*. 2000 Jul 21 477(3):199-202.

Sanker, S., Chandrasekharan, U.M., Wilk, D., Glynnias, M.J., Karnik, S.S., Husain, A., 1997. Distinct multisite synergistic interactions determine substrate specificities of human chymase and rat chymase-1 for angiotensin II formation and degradation. *J. Biol. Chem.* 272, 2963–2968

Saravia-Otten P, Frisan T, Thelestam M, Gutiérrez JM. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2004 Dec 1 ;44(7):749–64.

Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LRC, Villalta M, et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. Elsevier Ltd; 2010 Nov;56(6):980–9.

Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of Bothrops jararaca, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *European journal of biochemistry / FEBS* . 1998 Feb 1;251(3):845–53.

Serrano S.M, Matos MF, Mandelbaum FR, Sampaio CA,1993. Basic proteinases from Bothrops moojeni (caissaca) venom-I Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. *Toxicon* 31, 471–481.

Serrano SMT e Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* . 2005 Jun 15 ;45(8):1115–32.

Serrano SM, Sampaio CA, Mentele R, Camargo AC, Fink E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake Bothrops jararaca: purification and characterization. *Thrombosis and haemostasis*. 2000 Mar;83(3):438–44

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem*. 1996, 68, 850-858

Siigur E, Tõnismägi K, Trummal K, Samel M, Vija H, Aaspõllu A, et al. A new tyrosine-specific chymotrypsin-like and angiotensin-degrading serine proteinase from Vipera lebetina snake venom. *Biochimie. Elsevier Masson SAS*; 2011 Feb;93(2):321–30.

Siigur E, Samel M, Tonismagi K, Subbi J, Reintamm T, Siigur J, 1998. Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a factor V activator from Vipera lebetina (Levantine viper) snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1429, 239–248.

Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P., 1956. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med*. 103, 295–299.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.

Stanfa L, Dickenson A. Spinal opioid systems in inflammation. *Inflamm Res*. 1995 Jun;44(6):231-41.

Stocker, K. (1978) In: *Fibrinolytics and antifibrinolytics* (Markwardt, F. (ed) Springer, Berlin. 451-484.

Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. Protein C activators in snake venoms. *Behring Inst Mitt*. 1986 Feb;(79):37-47.

Stubbs MT, Bode W. (1993). A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res*. 69: 1-58.

Tokunaga F, Nagasawa K, Tamura S, Miyata T, Iwanaga S, Kisiel W, 1988. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem*. 263, 17471–17481.

Towbin H, Staehelin T e Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 September; 76(9): 4350–4354

Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*. 1931 Jun 6;72(1):74-87.

Wieland T e Bodanszky M. *The world of peptides: A brief history of peptide chemistry*. 1991 Springer-Verlag (Berlin and New York).

Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R, Warrell D a, White J, Winkel KD, et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet Elsevier Ltd*; 2010 Jan 2;375(9708):89–91.

World Health Organization [Internet] acesso em 2013 Jan 15. Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/diseases

Zamunér SR, da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*. 2004 Sep 1;44(3):259-71.

Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca crude venom in mice. *Toxicon*. 2010 Feb-Mar;55(2-3):227-34.



Angiotensin-degrading serine peptidase: A new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom

Alexandre Kazuo Kuniyoshi^a, Marisa Rocha^b, Daniela Cajado Carvalho^a,
Maria Aparecida Juliano^c, Luiz Juliano Neto^c, Denise Vilarinho Tambourgi^a,
Fernanda Calheta Vieira Portaro^{a,*}

^a Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Prof. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil

^b Herpetology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

^c Biophysics Department, Paulista Medical School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2011

Received in revised form 28 October 2011

Accepted 1 November 2011

Available online 10 November 2011

Keywords:

Bothrops jararaca

Angiotensin I

Serine peptidases

Antivenom

Neglected disease

ABSTRACT

Snakebite envenomation is considered a highly relevant public health hazard in South America, having an impact in terms of mortality and morbidity. In Brazil, *Bothrops (sensu lato)* poisoning is responsible for 90% of the snakebites and in patients treated at the Vital Brazil Hospital (Butantan Institute) this index reaches 97.5%. The objective of the present study was to analyze more specifically the ability of the antibothropic antivenom, produced by the Butantan Institute, São Paulo, Brazil, to neutralize metallo- and serine peptidases, known as the major toxins present in *Bothrops jararaca* venom. A set of FRET peptides (Free Resonance Energy Transfer) was studied using the BjV (*B. jararaca* venom) and site-directed inhibitors PMSF, EDTA and 1,10-phenanthroline. Two substrates were reached to be used as specific tools for studies with metallo peptidases, Abz-FASSAQ-EDDnp, and the serine peptidases, Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp. In disagreement with the literature, the use of both substrates and the antibothropic serum showed a weak neutralization of the serine peptidases present in this venom and a strong neutralization of the metallo peptidases. In order to investigate possible mechanisms of action that have not yet been described for the serine peptidases from the BjV, the present study shows for the first time a new tyrosine-specific chymotrypsin-like and angiotensin-degrading serine peptidase activity, that was partially blocked by the antibothropic serum. In conclusion, the antivenom presented a good neutralization of metallo peptidases but not of serine peptidases, indicating that further studies about serine peptidases immunogenicity are necessary to improve the antibothropic serum.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Snake venom poisoning is a public health issue for many countries and despite the great difficulty in raising the actual data of these accidents, some studies show that there are about 5.4 million to 5.5 million accidents, more

than 400,000 amputations and about 20,000 to 125,000 deaths per year worldwide. These numbers surpass several other neglected tropical diseases in occurrence and number of fatalities, such as leishmaniasis, dengue, schistosomiasis, cholera, and Chagas disease (Williams et al., 2010). In addition, snake bites only joined the list of neglected tropical diseases recently, in April 2009, showing that it was not seen as an important public health issue until recently (World Health Organization, 2011).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3726 7222x2106.

E-mail address: fcvportaro@butantan.gov.br (F.C.V. Portaro).

The problem of snake venom poisoning is that it exists in the midst of several factors which complicate its solution, such as: profile of the victim; lack of training programs for health staff; underreporting of accidents; improvement in the production, storage and distribution of sera; further studies on quality and safety of serums produced (World Health Organization, 2010).

The most recommended treatment in cases of snakebite accidents is serum therapy. The neutralizing ability is assessed by evaluating the capacity of the antivenom to inhibit the lethal action of the reference venom, i.e., from *Bothrops jararaca*, in a murine model (World Health Organization, 1981). The antivenom produced by the Butantan Institute is prepared by immunization of horses with a mixture of venoms of the species: *Bothrops alternatus* (12.5%), *Bothrops jararacussu* (12.5%), *Bothrops moojeni* (12.5%), *Bothrops neuwiedi* (12.5%) and *B. jararaca* (50%). But in Brazil, there are several species of the *Bothrops* genus (*sensu lato*) which differ widely in composition of venom and with regard to the neutralization of its components, such as metalloproteinase, PLA2 and hyaluronidases (Queiroz et al., 2008). Indeed, the interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from the *Bothrops* genus, poses a challenge to the provision of antivenom to be used in accidents caused by any one of the species. The antithrombotic serum produced by the Butantan Institute has saved many lives over the years, but it is known that in the case of *Bothrops* poisoning, even with the application of the serum in large quantities, it still does not address the local symptoms of the bite, although it does improve the systemic symptoms (Cardoso et al., 1993). The *Bothrops* genus is widely distributed in the Neotropics, occurring from Mexico to northern Argentina, being absent only in Chile. The *B. jararaca* species occurs from the South of Bahia to northern Argentina and Paraguay, being distributed in Brazil in the states of Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, eastern Mato Grosso do Sul, Paraná and Rio Grande do Sul (Gomes and Puerto, 1993). *Bothrops* poisoning is responsible for 90% of the snakebites in Brazil (Ministério da Saúde, 2001) and in patients treated at the Vital Brazil Hospital (Butantan Institute), where the species were identified, this index reaches 97.5% (Ribeiro and Jorge, 1997). Despite the great variety of components present in the venom from the *Bothrops* species, it is known that proteolytic enzymes of serine and metalloproteinase classes are the most relevant toxins in cases of human accidents. Also, results of proteomic analysis performed with the venom of *B. jararaca*, indicate that 51.5% and 14% of components are metallo- and serine peptidases, respectively (Fox and Serrano, 2008).

Snake venom metallo peptidases, also known as SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases), act mainly as hemorrhagic factors, degrading proteins such as laminin, fibronectin, collagen type IV and proteoglycans from the endothelial basal membrane (Fox and Serrano, 2005). SVMPs can also modulate the release of cytokines (Laing and Moura-da-Silva, 2005) and inhibit platelet aggregation (Schattner et al., 2005). Taken together, these two effects, associated with the proteolytic digestion of the basal membrane, are considered to be the major mechanism of SVMP-induced hemorrhage. On the other hand, SVSPs

(Snake Venom Serine Proteases) are enzymes which affect the hemostatic system. They act on a variety of components of the coagulation cascade, on the fibrinolytic and kallikrein–kinin systems and on cells to cause an imbalance of the hemostatic system of the prey (Pirkle, 1998).

Taking into account that snake venom poisoning is a public health issue and the major toxins present in the venoms from the *Bothrops* species are SVMPs and SVSPs, the main focus of this study was to verify the blocking potential of the antithrombotic serum produced by the Butantan Institute, on the peptidase activities from both classes (metallo peptidases and serine peptidases), using both FRETs and natural biological peptides.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, angiotensin I (ang I), dynorphin1–13 (dyn A), neurotensin1–13 and bradykinin were purchased from Sigma–Aldrich, acetonitrile from Carlo Erba and trifluoroacetic acid (TFA) from J.T. Baker. FRETs peptides, Abz-FASSAQ-EDDnp (Abz-Metal) and Abz-RPPGFSPFRQ –EDDnp (Abz-Serine), were provided by Prof. Luiz Juliano Neto, from the Department of Biophysics of UNIFESP-EPM. These peptides were synthesized using automated solid-phase synthesis (Hirata et al., 1994).

2.2. Venoms and antivenom

The venom of *B. jararaca* (50 mg), *Bothrops moojeni* (1.0 mg), *B. alternatus* (1.0 mg), *B. jararacussu* (1.0 mg) and *B. neuwiedi* (1.0 mg) were provided by the Herpetology Laboratory from the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. The venom of *B. jararaca* was pooled from 2500 specimens and lyophilized. The stock solutions were prepared in PBS buffer, containing 50 mM phosphate and 20 mM NaCl, pH 7.4 at 1.0 mg/mL. The antithrombotic serum produced by the hyperimmunization of horses with a pool of venoms from *B. alternatus* (12.5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%) and *B. neuwiedi* (12.5%) was obtained from the Hyperimmune Plasmas Processing Section, Butantan Institute, São Paulo, Brazil. The antivenom used (batch no. 0506110) had a protein concentration of 1.8 g/dL and each milliliter was able to neutralize 6.61 mg of *B. jararaca* venom (lethality test in mice).

2.3. Determination of protein concentration

This assay was executed according to Smith (1985), using a “BCA Protein Assay” Kit (Pierce Biotechnology, EUA) and serum albumin (BSA – Calbiochem, EUA) as reference in an Elisa reader (Multiskan EX, Labsystems, Finland).

2.4. Enzymatic assays

The peptidase activity assay was conducted in a 7.4 pH PBS buffer (final volume 100 µL) containing 50 mM

phosphate and 20 mM NaCl, using Corning® 96 well plates, and the peptide substrates in a final concentration of 5 μ M. The reactions occurred at 37 °C and were initiated by the addition of 1 μ L of BjV (2.74 μ g/ μ L with Abz-Metal and 0.18 μ g/ μ L with Abz-Serine). The reactions were monitored (fluorescence at λ_{EM} 420 nm and λ_{EX} 320 nm) in a fluorescence spectrophotometer (Victor 3™ Perkin–Elmer, Boston, MA, USA), as described by Araujo et al. (2000). Specific peptidase activity was expressed as units of free fluorescence of cleaved substrate *per* minute *per* μ g of venom. There was an incubation period of 30 min at room temperature when phenyl-methanesulfonylfluoride (1 mM, PMSF) and 1,10-phenantroline (5 mM) were tested. The EDTA (100 mM) was used without pre-incubation time. When necessary, control samples were made in the presence of the same volume of ethanol used in the preparation of inhibitors stock solutions (PMSF and 1,10-phenantroline). The experiments were made in triplicate.

2.5. HPLC analysis of peptides hydrolyzed by *Bothrops* spp venoms

The peptide solutions of angiotensin I (65 μ M), dynorphin1-13 (31 μ M) neurotensin 1-13 (12 μ M) and bradykinin (50 μ M) were incubated in 7.4 pH PBS buffer (50 mM phosphate and 20 mM NaCl) with 2.0, 2.5, 5.0 and 3 μ L of BjV (2.74 μ g/ μ L) for each substrate, respectively, at 37 °C for 1–4 h, with a pre-incubation period of 30 min at room temperature when tested with EDTA (100 mM), PMSF (1 mM) and 1,10-phenantroline (5 μ M). Hydrolysis products were separated by reverse-phase HPLC (Prominence, Shimadzu), collected manually, and submitted to mass spectrometry analysis. The HPLC conditions used for the analytical procedure were 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A), and acetonitrile and solvent A (9:1) as solvent B. The separations were performed at a flow rate of 1 mL/min using a Shim-pack VP-ODS C-18 column (4.6 $\times$ 150 mm) and a 20–60% gradient of solvent B over 20 min. In all cases, elution was followed by ultraviolet absorption (214 nm). The scissile bonds in the peptides were determined by mass spectrometry analyses. The peptide fragments were detected by scanning from *m/z* 100 to *m/z* 1300 using an Esquire 3000 Plus Ion trap Mass Spectrometer with ESI and esquire CONTROL software (Bruker Daltonics, MA, USA). Purified 18O-labeled or unlabeled oxidized W derivatives were dissolved in a mixture of 0.01% formic acid:acetonitrile (1:1) and infused into the mass (direct infusion pump) spectrometer at a flow rate of 240 μ L/h. The skimmer voltage of the capillary was 40 kV, the dry gas was kept at 5.0 L/min, and the source temperature was maintained at 300 °C.

After defining the natural peptides that were hydrolyzed by BjV, the ability of the other venoms to hydrolyze angiotensin I (65 μ M) was analyzed using 4 μ L of each one (*B. alternatus* [5.74 mg/mL], *B. jararacussu* [3.11 mg/mL], *B. moojeni* [0.86 mg/mL] and *B. neuwiedi* [0.11 mg/mL]). The scissile bonds found in angiotensin-I produced by these venoms were deduced by internal standardization of the HPLC system, using the results obtained with *B. jararaca* as reference.

2.6. Antithrotophic serum neutralization of the venoms

2.6.1. Fluorimetric assays

The ability of the antithrotophic serum to neutralize the venoms proteolytic activities was estimated by incubating it with *Bothrops* spp. venoms. Samples of *Bothrops* venoms were incubated, at room temperature, in the presence and absence of the antithrotophic serum. The residual proteolytic activities of the venoms were measured as described above, using both FRETs substrates. The volume of the antithrotophic serum and the pre-incubation time for serum neutralization of the proteolytic activities were established by using the *B. jararaca* venom. After establishing the best conditions to neutralize the metallo- and serine peptidases from the *B. jararaca* venom, the other *Bothrops* spp venoms were tested (*B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*). The venoms were used in volumes of 2.0 μ L when the Abz-Metal was utilized as substrate and 0.2 μ L for the kinetics with the Abz-Serine (see concentration on 2.5). For the maximum blocking effect of the proteolytic activity, the venoms were incubated with 10 μ L of the antithrotophic serum for 30 min at room temperature. After this period, 5 μ M of each substrate was added and the residual activity was measured as described above. The experiments were made in triplicate.

2.6.2. HPLC assays

The same concentrations of *Bothrops* spp venoms described in the angiotensin-I degrading assays were utilized to determine the neutralizing potential of the commercial serum. Thus, after a pre-incubation time (venoms and antivenom), 65 μ M of angiotensin I was added and after 1 h more samples were analyzed by HPLC reverse-phase.

3. Results

3.1. Search for specific substrates for the different classes of proteases

The first step in this study was to find ways to differentiate the major classes of proteolytic enzymes present in the *B. jararaca* venom, the serine peptidases and the metallo peptidases. For this, a set of FRETs substrates was tested and two substrates that are mostly hydrolyzed by each one of these classes were found. The metallo peptidases act mainly on Abz-FASSAQ-EDDnp and the serineproteases on Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp. Table 1 shows that Abz-FASSAQ-EDDnp hydrolysis was totally inhibited by both EDTA and 1,10-phenantroline and, thus, it was named here as Abz-Metal. This was unlike the hydrolysis of Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp peptide, that was strongly inhibited by PMSF (71%), and was thus named as Abz-Serine. It is important to mention that the rate of hydrolysis of Abz-Metal by the BjV is around 18 times lower when compared to that of Abz-Serine (Table 1).

The preference of both protease classes for these substrates was also found in venoms from other species of the *Bothrops* genus that comprise the pool used in the production of the antivenom (Fig. 1), with exception of the Abz-Serine hydrolysis by the *B. neuwiedi* venom which was inhibited by PMSF with lower potency.

Table 1

Inhibition of hydrolysis of the Abz-Metal and Abz-Serine by BjV using classical inhibitors of metallopeptidase (EDTA and 1,10-phenantroline) and serinepeptidase (PMSF).

Specific activity (UF/min/μg) ^a		
	Abz-Metal	Abz-Serine
Control	544.7	9716.16
EDTA	n.h. ^b	9428.72
1,10-Phenantroline	n.h.	6179.48
PMSF	390.4	2791.78

Assays were carried out in 100 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 20 mM NaCl, at 37 °C, using 5 μM of Abz-peptides and 2.74 μg and 0.18 μg of BjV (for Abz-Metal and Abz-Serine, respectively). The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained. The results were a mean of three independent experiments.

^a UF = Units of fluorescence.

^b n.h. no hydrolysis detected.

3.2. Antibothropic serum neutralization

The tests were conducted using the maximum dose of BjV neutralization that was found (10 iL of antibothropic serum), and incubated at room temperature for 30 min using the Abz-peptides. When the venom from *B. jararaca* was used, we observed a great neutralization of proteolytic activity of metallo peptidases that act on the substrate Abz-Metal, reaching levels above 90%, and a poor inhibition of serine peptidases that act on Abz-Serine, with levels below

40% (Table 2). After determining the best condition to neutralize the proteolytic activity of BjV, the same protocol was used to verify the blocking effect of the commercial serum upon the other venoms used to compose the immunization pool: *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*. Fig. 2 shows that the other *Bothrops* spp venoms studied here present the same pattern of activities that were observed when the *B. jararaca* venom was used. The hydrolysis of Abz-Serine by the *B. neuwiedi* venom was not inhibited through the use of the antivenom. The results obtained using *B. jararaca* and *B. moojeni* venoms showed inhibition levels of Abz-Serine hydrolysis of around 35%. The hydrolysis of Abz-Metal by the *B. alternatus* venom was blocked around 70% by the commercial serum. For the other species, the results obtained using the Abz-Metal as substrate always reached levels above 90%. Thus, the use of Abz-Metal and the antivenom reaching nearly 100% of inhibition in return got poor inhibition of serine peptidases that act on Abz-Serine with levels below 50%–0% inhibition (Fig. 2).

3.3. HPLC analysis of natural peptides hydrolyzed by BjV

One of our goals was to find new peptidic substrates that could be hydrolyzed by bothropic venoms and that could explain in greater depth the *Bothrops* venoms mechanism. For this, four human biologically active peptides, possibly related to any physiological change on the victim, were tested. Table 3 shows the rate of hydrolyzes of angiotensin I, dynorphin1-13, neurotensin1-13 and bradykinin, by the *B. jararaca* venom. In this set of putative substrates, only bradykinin was not hydrolyzed by the BjV and a good cleavage of angiotensin I was observed. Dynorphin1-13 was also well hydrolyzed by the *B. jararaca* crude venom, followed by the neurotensin1-13 degradation. Table 3 also shows the cleavage points determined in angiotensin I and dynorphin1-13. As can be observed, angiotensin I presents one cleavage point between the residues Tyr-Ile, that was totally blocked by PMSF and not affected by EDTA or 1,10-phenantroline. Moreover, the commercial serum produced by the Butantan Institute was able to reduce only 44% of the hydrolysis of angiotensin I by BjV.

Dynorphin1-13 presents two scissile bonds, between the residues Arg-Arg and Lys-Leu, that were principally blocked by PMSF (88%) and partially blocked by EDTA

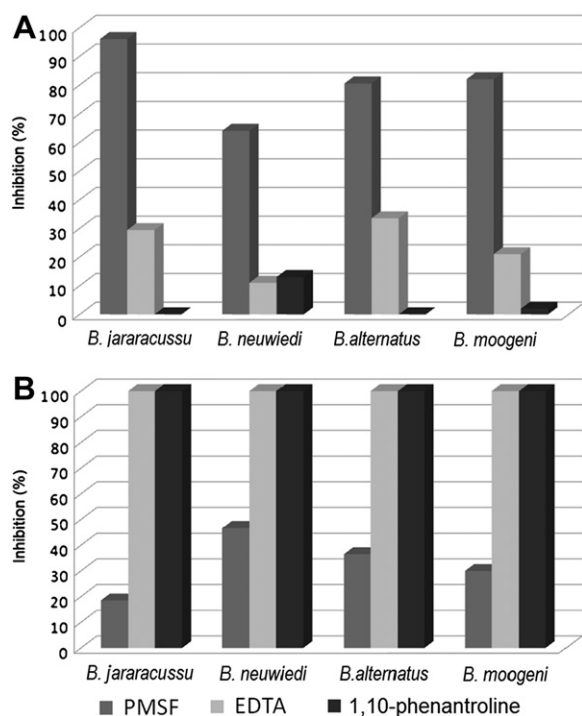


Fig. 1. Hydrolysis of FRETs substrates and the effect of classical inhibitors to serinepeptidases and metallopeptidases. Inhibition effect of PMSF, EDTA and 1,10-phenantroline upon the hydrolysis of Abz-Serine (Panel A) and Abz-Metal (Panel B), by venoms from *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* and *B. moojeni*. The experiments were made in triplicate. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained.

Table 2

Serum neutralization effect upon the proteolytic activity of *Bothrops jararaca* venom using Abz-Metal and Abz-Serine as substrates.

Substrate	Specific activity (UF/min/μg)		Inhibition (%)
	Control	Serum	
Abz-Metal	333.3	22.3	93.3
Abz-Serine	8362.81	5335.5	36.2

Assays were carried out in 100 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 20 mM NaCl, at 37 °C, using 5 μM of Abz-peptides and 2.74 μg and 0.18 μg of BjV (for Abz-Metal and Abz-Serine, respectively). The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained. The volume of serum was 10 μL with a pre-incubation of 30 min at room temperature.

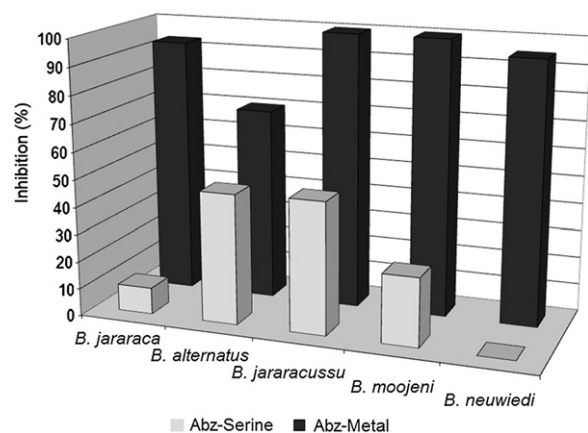


Fig. 2. Inhibition of serinepeptidases and metallopeptidases present in *Bothrops* spp venoms. Blocked effect of the antithrombotic serum on hydrolysis of Abz-Serine and Abz-Metal by venoms from *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* and *B. moojeni*. The experiments were made in triplicate. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained.

(28%), and 1,10-phenantroline (6%). Table 3 shows that the antithrombotic serum was able to block 48% of the hydrolytic activity of the venom on dynorphin A cleavage.

Since the observation of angiotensin I cleavage is mainly due by serine peptidases and partially blocked by the antivenom, we decided to test the other four bothropic venoms used to make the immunization pool.

The results obtained with the venoms used to compose the immunization pool, again showed the presence of a chymotrypsin-like activity in these venoms, although with distinct specific activities (Table 4). The cleavage points were unique between Tyr-Ile bonds (data not shown) and were determined by the internal standardization of the HPLC conditions using the BjV. The blocked effect of the antithrombotic serum was different for each venom, showing variations in their composition. The angiotensin-I hydrolyzes by the venom from *B. jararacussu* and *B. jararaca* were only partially blocked by the commercial antivenom (Table 4). In contrast, angiotensin I degradation was fully inhibited by using the antivenom when the venoms from *B. moojeni* and *B. neuwiedi* were used.

Table 3
Hydrolysis of bioactive peptides by *B. jararaca* venom.

	Specific activity ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)					Cleavage site
	Control	EDTA	PMSF	1,10-Phe	Serum	
Angiotensin I	0.18	0.23	n.h. ^a	0.21	0.10	DRVY///IHPFHL
Dyn 1-13	0.058	0.04	0.007	0.054	0.03	YGGFLR// RIRPK//LK
Neurotensin	0.0012	n.d. ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bradykinin	n.h.	–	–	–	–	–

The peptide solutions (12–65 μM) were incubated in 7.4 pH PBS buffer containing 50 mM phosphate and 20 mM NaCl with BjV, at 37 °C for 1–4 h, with a pre-incubation period of 30 min at room temperature when tested with EDTA, PMSF and 1,10-phenantroline. The volume of serum was 10 μL with a pre-incubation of 30 min at room temperature. The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained. The experiments were made in triplicate.

^a n.h. – no hydrolysis detected.

^b n.d. – not determined.

Table 4

Blocked effect of the antithrombotic serum on hydrolysis of angiotensin I by the venoms of *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* and *B. jararacussu*.

Venom	Specific activity ($\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$)		Inhibition (%)
	Control	Serum	
<i>B. jararaca</i>	0.18	0.10	44
<i>B. alternatus</i>	0.046	0.028	61
<i>B. moojeni</i>	0.15	0	100
<i>B. neuwiedi</i>	1.66	0.075	96
<i>B. jararacussu</i>	0.046	0.01	21

Assays were carried out in 500 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 20 mM NaCl, at 37 °C, using 65 μM of angiotensin I. The venoms were used in different concentrations (see materials and methods for details). The SD of kinetic results in each case was never greater than 5% of the value obtained. The volume of serum was 10 μL with a pre-incubation of 30 min at room temperature.

4. Discussion

Although it was proposed that *B. jararaca* and *Bothrops neuwiedi* should be included in the genus *Bothropoides*, and *B. alternatus* into genus *Rhinocerocephalus*, there is no clear consensus about the systematics of this group (SBH, 2007). Since human envenomations involving these species are treated with the antithrombotic serum, this study still considers these snake venoms as belonging to the genus *Bothrops*.

The objective of the present study was to analyze the ability of the antivenom produced by the Butantan Institute, São Paulo, Brazil, to neutralize *B. jararaca* major venom toxins. A set of FRET peptides (Free Resonance Energy Transfer) was studied using the BjV and site-directed inhibitors PMSF, EDTA and 1,10-phenanthroline. The results indicated that two substrates can be used as specific tools for studies with metallo peptidase, Abz-Metal (Abz-FASSAQ-EDDnp), and serine peptidases, Abz-Serine (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp). The use of both substrates and the antivenom produced by the Butantan Institute showed a weak neutralization of serine peptidases in this venom and a strong neutralization of the metallo peptidases. These results are in disagreement with the literature, since the symptoms attributed to the serine peptidases are considered to be controlled when the antithrombotic serum is administered (Cardoso et al., 1993).

Indeed, the antivenom is capable of reducing the systemic effects caused by poisoning from *Bothrops* snakes, but it is not effective to block the local effects observed in accidents with humans (Cardoso et al., 1993). This observation leads us to believe that some of the enzymes present in the snake venom are not neutralized by the antivenom - i.e.: that serine peptidases may be related to local effects through the activation of latent forms of human MMPs (Saravia-Otten et al., 2004).

The serine peptidases of snake venoms are classified in clan SA of S1 of the chymotrypsin family (Rawlings et al., 2010). The mammalian trypsin and enzymes present in poisons have similar “fold” and are believed to have evolved from a common ancestor (Itoh et al., 1988). The *B. jararaca* venom contains several serineproteases, and the best characterized are: Bothrops protease A (BPA), recently

described as a specific defibrinogenating agent; KN-Bj is able to release bradykinin from low molecular weight bovine kininogen; TL-Bj, a thrombin-like protease with clotting activity; PA-Bj, an enzyme with activity in aggregating platelet-rich plasma and suspensions of washed platelets; Bothrombin is a serine peptidase which acts by cleavage of fibrinopeptide A without affecting fibrinopeptide B (see *Serrano and Maroun* as review).

Although the SVSP described above have defined protein substrates, there are no published data indicating possible biologically active peptides as substrates for these enzymes. In fact, the majority of the methods used to screen the proteolytic activities of animal venoms have not considered the possibility of peptidase activities, which could contribute directly or indirectly to the envenomation. Peptidase activity can increase permeability to the venom toxin targets, and produces other peptides with different activities from the parent peptide and destruction of both epitopes MHC class I and II.

The results presented here show that the crude venom of *B. jararaca* was able to cleave angiotensin I, dynorphin1–13 and, to a lesser extent hydrolysis neurotensin1–13. Surprisingly, angiotensin I was well hydrolyzed by the BjV, and the use of 1,10-phenanthroline and PMSF clearly indicated that it is a serine protease-like activity. The use of the antithrombotic serum showed, again, a flaw in the action of the commercial antivenom to block serine peptidases.

The cleavage point in ang I was determined as Tyr–Ile by mass spectrometric analysis and was the same hydrolysis observed using the venoms from *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* and *B. moojeni*. These results are in accordance with other serine peptidases activities reported as being able to hydrolyze ang I between the Y–I bond, like human kallikrein 1-related peptidase 3 (KLK3), best known as “prostate-specific antigen” (PSA) (*Andrade et al., 2010*) and rat chymase-1 (*Sanker et al., 1997*). Recently, a serine protease purified from the venom of *Vipera libetina* showed the same angiotensin I scissile bond reported here (*Siigur et al., 2010*).

The decapeptide ang I (DRVYIHPFHL) is a precursor of the ang II (DRVYIHPF), well-known as an important hypertensive peptide. The most important peptidase responsible for the conversion of ang I to ang II is the Angiotensin Converting Enzyme (ACE, peptidyl dipeptidase A, EC 3.4.15.1) (*Skeggs et al., 1956*).

In this scenario, it is important to note that a family of peptides with ACE inhibitory activity, the BPPs (Bradykinin-Potentiating Peptides), is present in the venom of *B. jararaca* (*Ferreira and Rocha e Silva, 1965; Ferreira et al., 1970; Ondetti et al., 1971*). One of them, the BPP-5a, is a molecule that originally inspired the design of current commercial inhibitors of ACE (*Ondetti et al., 1977*). Since the hypotensive effects observed in accidents with humans are related to the presence of BPPs, the destruction of angiotensin I is another activity in this BjV that leads to *in vivo* hypotension. Moreover, BjV contains a serine peptidase able to release bradykinin from the low molecular weight kininogen (KN-Bj) (*Serrano et al., 1998*). Apart from the results of angiotensin I hydrolysis, we also show that the bradykinin was totally stable to the action of *B. jararaca* venom and no cleavage could be detected even after a long period of incubation. Taken together, it seems that the venom of *B. jararaca* can be considered an arsenal that leads the victim to hypotensive shock. Most critically, it is possible that these activities, caused by BPPs and serine peptidases, are not blocked by the antithrombotic serum. It is important to mention that the antithrombotic serum produced by the Butantan Institute presents high specific activity to neutralize the lethal activity of the *Bothrops* venoms, when compared with other commercial antivenoms (*Dias da Silva and Tambourgi, 2011*).

Taking into account the hydrolyzes on the Tyr–Leu bond in angiotensin I, it is possible to hypothesize that serine proteinase BPA (Bothrops Protease A) could be responsible for this activity, since it is able to cleave the insulin A chain with a Tyr residue in the P1 position (Tyr26–Thr27; *Mandelbaum et al., 1967*). Besides the same specificity to substrate hydrolyzes, it is important to note a high degree of similarity and identity between the serineproteases amino acid sequences. The least degree of similarity can be observed between KN-Bj × PA-Bj (63.4%) and the most degree of similarity was found between BPA × PA-Bj (71.6%). A recent report showing a serine protease from *Vipera lebetina* venom, capable to cleave angiotensin I, also shows a high degree of similarity (85%) and identity (75%) with BPA, including in the catalytic residues (*Fig. 3*).

Dynorphin1–13 (dyn A, YGGFLRRIRPKLK) was also hydrolyzed by the crude venom of *B. jararaca*, showing at least two cleavage points (YGGFLR–RIRPK–LK), since the fragment RIRPK was detected by mass spectrometry

VLCTLP	VIGGDECNINEHRSVLVLYLNDNSNFQCGGTLINQEWVLSAAHCDMENMEIYLGVHNLSLNP
BPA	VIGGDECNITEHRLVEIFNSSGLFCGGTLIDQEWVLSAAHCDMRNMRILYLGVHNEGVQH
	*****.* ** * : * . : *****:*****.*.*****. : :
VLCTLP	KDQKRDRPKKEFFCLSSKNYTKWDKDIMLIKLRNPVKTSHTIAPLSLSPSPSPSVGVCRI
BPA	ADQRRFAREKFCLSSRNKYTKWDKDIMLIRLRNPVNNSEHIAPLSLSPSPSPSVGVCRI
	* : * . : *****:*****:*****: * *****.*****
VLCTLP	MGWGTVTSNPTLLDVPFCANINILNYTVCAASPRLPQTQSRSLCAGILQGGIDACKGDS
BPA	MGWGTITSPNATFPDVPFCANINILFNYTVCRGAHAGLPATSRSLCAGVLQGGIDTCGGDS
	*****:***** * : *****:*****.*. : * : *****:*****: * **
VLCTLP	GGPLICNGQIQGIVSWGHPCAQPLKPGHYTHVFDYTDWIIQSIAGNTTATCPP
BPA	GGPLICNGTFQGIVSWGHPCAQPGEPALYTKVFDYLPWIIQSIAGNTTATCPP
	***** : *****.****** : * . ** : ***** *****

Fig. 3. Primary sequence comparison: VLCTLP (*Vipera lebetina* chymotrypsin-like protease) and BPA (*Bothrops* protease A). The catalytic triads are in bold and underlined, and asterisks (*) indicate identical amino acid residues. The symbols (:) and (.) represent conserved and non conserved substitutions, respectively.

analyses. Unlike angiotensin I, dyn A is hydrolyzed by both classes of proteases, metallo- and serine peptidases, so this activity was partially blocked by the commercial anti-bothropic serum. The pathophysiological mean of dyn A hydrolyzes is possibly correlated with pain sensation and inflammation (Parik et al., 2010; Luo et al., 2008).

Many factors, including phylogeny, sex, geographic origin, season, age and prey preference, may influence composition of the venoms (Chippaux et al., 1991; Mackessy et al., 2003; Furtado et al., 2006). In addition to these considerations, the genus *Bothrops* shows the greatest diversity when it comes to number of species, morphology and natural history characteristics (Campbell and Lamar, 2004). Given these characteristics, the development of a polyvalent antivenom against accidents involving this genus is an even greater challenge. Thus, the production of better antivenoms should take into consideration the quality of poisons, and what poisons should be used to compose the pool of immunization. Finally, the preclinical efficacy of the antivenom must be carefully evaluated. The inter specimen venom composition may be evidenced by the different levels of chymotrypsin-like activity and by the different potential blockers obtained with the antithrotopropic serum and the five different *Bothrops* venoms studied in this paper. These venom composition variations may be an important factor to explain the failure of the antithrotopropic serum and, additionally, three other factors also may be responsible for the overall presented result. The first factor suggests a lack of immunoglobulins acting against serine peptidases present in some venoms and the second factor may be related to the failure of blocking by the antibodies, although they may be present. The third and important factor may be related to degradation of the serine peptidases by the metallo peptidases before the inoculation of horses with the pool of venoms used for the production of antivenom, and this degradation could destroy the epitopes responsible for the production of immunoglobulins. These hypotheses are under investigation in our laboratories through new experiments, with the objective of developing strategies to obtain a more effective antithrotopropic serum.

The antithrotopropic serum produced by the Butantan Institute is one of the best in Latin America to reduce mortality by snake poisoning from this genus. However, this study showed a flaw in the action of antithrotopropic serum to neutralized serine peptidases and, to our knowledge, this is the first report on chymotrypsin-like activity in the venom of *B. jararaca*.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (Project 2008/028990-2) and INCTTOX-CNPq. A. Kuniyoshi was recipient of the Secretaria do Estado da Saude fellowship (PAP program).

Ethical statement

The authors guarantee that the works presented in this manuscript follow the rules of ethics and respect the duties

of authors presented in the Elsevier's Ethical Guidelines for Journal Publication.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Andrade, D., Assis, D.M., Lima, A.R., Oliveira, J.R., Araujo, M.S., Blaber, S.I., Blaber, M., Juliano, M.A., Juliano, L., 2010. Substrate specificity and inhibition of human kallikrein-related peptidase 3 (KLK3 or PSA) activated with sodium citrate and glycosaminoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 498, 74–82.
- Araujo, M., Melo, R., Cesari, M., Juliano, M., Juliano, L., Carmona, A., 2000. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 39, 8519–8525.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock, Ithaca/London.
- Cardoso, J.L.C., Fan, H.W., Franca, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S. A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A. M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Miranda, R.M.S., Theakston, R.D.G., Warrel, D.A., 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 86, 315–325.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279–1303.
- Dias da Silva, W., Tambourgi, D.V., 2011. Comment on "Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms". *Toxicon* 57, 1109–1110.
- Ferreira, S.H., Rocha e Silva, M., 1965. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 21, 347–349.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J., 1970. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9, 2583–2593.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016–3030.
- Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M., 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 48 (4), 401–410.
- Gomes, N., Puerto, G., 1993. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca*. Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). *Mem. Inst. Butantan* 55, 69–100.
- Hirata, I.Y., Cezari, M.H.S., Nakaie, C.R., Boschov, P., Ito, A.S., Juliano, M., Juliano, L., 1994. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett. Pept. Sci.* 1, 299–308.
- Itoh, N., Tanaka, N., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Mihashi, S., Yamashina, I., 1988. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. *J. Bio. Chem.* 263, 7628–7631.
- Laing, G.D., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 45, 987–996.
- Luo, M.C., Chen, Q., Ossipov, M.H., Rankin, D.R., Porreca, F., Lai, J., 2008. Spinal dynorphin and bradykinin receptors maintain inflammatory hyperalgesia. *J. Pain* 9, 1096–1105.
- Mackessy, S.P., Williams, K., Ashton, K.G., 2003. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *Copeia*, 769–782.
- Mandelbaum, F.R., Carrilio, M., Henriques, S.B., 1967. Proteolytic Activity of *Bothrops* protease A on the B Chain of Oxidized Insulin, vol. 132 508–510.
- Ministério da Saúde, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde/Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos, CENEPI, Brasília.

- Ondetti, M.A., Williams, N.J., Sabo, E.F., Pluscec, J., Weaver, E.R., Kocy, O., 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry* 10, 4033–4039.
- Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W., 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active anti-hypertensive agents. *Science* 196, 441–444.
- Parikh, D., Hamid, A., Friedman, T.C., Nguyen, K., Tseng, A., Marquez, P., Lutfy, K., 2010. Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress duration. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 563–567.
- Pirkle, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. *Thromb. Haemost.* 79, 675–683.
- Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C.V., Furtado, M.F., Tambourgi, D.V., 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 52, 842–851.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227–D233.
- Ribeiro, L.A., Jorge, M.T., 1997. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30 (6), 475–480.
- Sanker, S., Chandrasekharan, U.M., Wilk, D., Glynias, M.J., Karnik, S.S., Husain, A., 1997. Distinct multisite synergistic interactions determine substrate specificities of human chymase and rat chymase-1 for angiotensin II formation and degradation. *J. Biol. Chem.* 272, 2963–2968.
- Saravia-Otten, P., Frisan, T., Thelestam, M., Gutiérrez, J.M., 2004. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. *Toxicon* 44, 749–764.
- SBH, 2007. Brazilian Reptiles – List of Species. Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Schattner, M., Fritzen, M., Ventura J de, S., de Albuquerque Modesto, J.C., Pozner, R.G., Moura-da-Silva, A.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2005. The snake venom metalloproteases berythrinase and jararhagin activate endothelial cells. *Biol. Chem.* 386, 369–374.
- Serrano, S.M., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45 (8), 1115–1132.
- Serrano, S.M., Hagiwara, Y., Murayama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Fink, E., 1998. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.* 251, 845–853.
- Siigur, E., Tõnismägi, K., Trummel, K., Samel, M., Vija, H., Aaspõllu, A., Rõnnholm, G., Subbi, J., Kalkkinen, N., Siigur, J., 2010. A new tyrosine-specific chymotrypsin-like and angiotensin-degrading serine proteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochimie* 93, 321–323.
- Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P., 1956. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103, 295–299.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Williams, D., Gutiérrez, J.M., Harison, R., Warrel, D.A., White, J., Winkel, K. D., Fopalakrishnakone, P., 2010. The Global snake bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet* 375, 89–91.
- World Health Organization, 1981. In: Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. WHO Offset Publication, Geneva, p. 58.
- World Health Organization, 2010. In: Guidelines for the Production, Control and Regulation of Antivenom Immunoglobulins. WHO website, Geneva. www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms.
- World Health Organization, 2011. In: Neglected Diseases. WHO website. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.