

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Lais Gomes da Silva

Análise dos constituintes de baixa massa molecular no veneno de
Lachesis muta

São Paulo
2020

Lais Gomes da Silva

**Análise dos constituintes de baixa massa molecular no veneno de
*Lachesis muta***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientador (a): Dra. Giselle Pidde

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Silva, Lais Gomes da.

Análise dos constituintes de baixa massa molecular no veneno de *Lachesis muta*/ Lais Gomes da Silva; orientadora Dra. Giselle Pidde. – São Paulo, 2020.

31 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPP). 2. Viperidae. 3. Toxinas. 4. Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA). 5. Hipotensão. I. Pidde, Giselle. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Análise dos constituintes de baixa massa molecular no veneno de *Lachesis muta*.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Lais Gomes da Silva, aluna do curso Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de janeiro de 2020

Lais Gomes da Silva
.....
Aluno (a): Lais Gomes da Silva

De acordo: *gis PWS Porto*
.....
Orientador (a): Dra. Giselle Pidde

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Giselle Pidde, por todo o esforço em me orientar, pela paciência, compreensão e principalmente por me apoiar e incentivar durante este tempo.

À Dra. Fernanda Portaro por aceitar colaborar com a realização deste projeto, pelos ensinamentos, apoio e incentivo. E aos seus alunos Roberto e a Cristiane pela paciência em me ensinar e ajudar com os experimentos e sempre estando dispostos a esclarecer minhas dúvidas.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Imunoquímica, em especial ao Osmair e a Cinthya por me ajudarem e principalmente ensinarem os cálculos. E a Dra. Carla, Carol e Joel que permitiram que eu acompanhasse alguns experimentos e me ensinaram diversas coisas que contribuíram para a minha formação.

Aos meus amigos do “interior” Gabriel, Giu e Kimberlly, pelas companhias nos trens e metrô da vida, pelas risadas e conversas estranhas em momentos aleatórios e a Carolaine, por ser minha dupla nas aulas teóricas.

Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio e incentivo. E aos meus incríveis companheiros: Hermione, a senhorinha mais fofo e inteligente do mundo, Bolinha (*in memoriam*), o ser mais gentil e doidinho que conheci e a Milly, por ter trago a alegria de volta a minha casa.

A Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo – CEFOR/SUS-SP pela bolsa.

Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, Lais Gomes da. **Análise dos constituintes de baixa massa molecular no veneno de *Lachesis muta***. 2020. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Os acidentes ofídicos são um grave problema de saúde pública negligenciado em países tropicais. No Brasil, a Região Norte apresenta o maior número de casos e as serpentes do gênero *Lachesis* são responsáveis pelos acidentes mais graves e com maior número de óbitos. Vítimas do envenenamento por *Lachesis* apresentam danos no local da picada, hemorragias e em casos graves apresentam hipotensão arterial. Estudos proteômicos e transcritômicos descrevem a presença de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) no veneno de *Lachesis muta*, porém não há dados na literatura descrevendo o isolamento e/ou suas identificações. O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) na porção de baixa massa molecular do veneno de *Lachesis muta*. Para isso o veneno liofilizado de *Lachesis muta* foi dissolvido em tampão acetato de amônio e filtrado por centrifugação para o fracionamento de tamanho, usando uma membrana de corte de 10 kDa. A porção de baixa massa molecular foi fracionada por RP-HPLC usando uma coluna C-18. Doze frações foram coletadas e quatro foram testadas em ensaios fluorimétricos utilizando a ECA como enzima e o Abz-FRK(Dnp)P-OH como substrato. Das quatro frações selecionadas, duas se destacaram devido à alta intensidade dos picos, um em 13,65 minutos de retenção e outro em 14 minutos de retenção, com 44% e 45% concentração de solução B, respectivamente. As frações de interesse apresentam picos eluídos nos mesmos tempos de retenção que os BPPs de outros venenos de serpentes, sugerindo, juntamente com dados da literatura, que eles podem conter BPPs semelhantes. As quatro frações inibiram em 100% a atividade catalítica da ECA sobre o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH. Por essas razões e devido outros dados na literatura descreverem a presença BPPs no veneno de *L. muta*, acreditamos que as quatro frações selecionadas contenham BPPs. Para a confirmação o próximo passo será realizar a análise por espectrometria de massas.

Palavras-chave: Toxina. Viperidae. Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPP). Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA). Hipotensão.

ABSTRACT

SILVA, Lais Gomes da. **Analysis of the low molecular weight constituents in the *Lachesis muta* venom**. 2020. 31 p. Monograph (Specialization in Toxins of Interest in Health) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Snakebite accidents are a serious public health problem neglected in tropical countries. In Brazil, the Northern Region has the largest number of cases and snakes from *Lachesis* genus are responsible for the most serious accidents and the highest number of deaths. Victims of *Lachesis* envenoming have bite site damage, bleeding and, in severe cases, hypotension. Proteomic and transcriptomic studies report the presence of bradykinin potentiating peptide (BPPs) in *L. muta* venom, however, there are no data in the literature describing their purifications and identifications. The objective of this work is to identify and characterize angiotensin-converting enzyme inhibitors in the low molecular weight portion of *Lachesis muta* venom. For this lyophilized *L. muta* venom was dissolved in ammonium acetate buffer and filtered by centrifugation for size fractionating, using a 10 kDa centrifugal filter unit. The low molecular weight fraction was then chromatographed by RP-HPLC using a C18 column. Twelve fractions were collected and four were tested in fluorimetric assays using ACE as an enzyme and Abz-FRK(Dnp)P-OH as substrate. These fractions present peaks with retention time similar to the peaks that contained BPPs of other snake venoms. In addition, four fractions presented 100% inhibition of the catalytic activity of ACE over the FRET substrate. Based on these results, and due to other data in the literature describing the presence of BPPs in *L. muta* venom, is possible that it may contain BPPs. For confirmation of this hypothesis, the next step will be to perform analysis by mass spectrometry aiming to determine the primary sequences of the peptides present in each fraction.

Keywords: Toxin. Viperidae. Bradykinin-potentiating peptide (BPP). Angiotensin-converting enzyme (ACE). Hypotension.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Envenenamento e Saúde pública.	9
1.2 O gênero <i>Lachesis</i>	9
1.3 Veneno.	11
1.4 Sistema caliceína-cinina e renina angiotensina.....	12
1.5 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).	13
1.6 Oligopeptídeos ricos em prolina.....	14
1.7 Justificativa.....	15
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Veneno e reagentes.....	16
3.2 Preparação das amostras – obtenção dos <i>Pools</i> Peptídicos (PPs).....	16
3.3 Determinação do perfil dos <i>Pools</i> Peptídicos e fracionamento do veneno em HPLC.	16
3.4 Teste de inibição da ECA pelos picos selecionados utilizando o substrato FRET.....	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Perfil cromatográfico do <i>pool</i> de peptídicos do veneno de <i>Lachesis muta</i> .18	
4.2 Atividade inibitória da ECA	19
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento e Saúde pública.

O envenenamento causado por serpentes, também conhecido como acidente ofídico, representa um grave problema de saúde pública principalmente em países de clima tropical. No mundo ocorrem aproximadamente 5,5 milhões de acidentes por ano, com cerca de 125.000 mortes. Além disso, os sobreviventes podem apresentar sequelas, como amputações, afetando seu modo de vida social e econômico. (WILLIAMS et al., 2010). Em 2017 a Organização Mundial da Saúde incluiu os acidentes por animais peçonhentos, principalmente os acidentes ofídicos, na lista de doenças tropicais negligenciadas, evidenciando que os envenenamentos não eram vistos como aspecto importante para a Saúde Pública (BERNARDE; MOTA-DASILVA; ABREU, 2015).

Segundo os dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificações) no Brasil foram registrados 310.859 casos de acidentes ofídicos no período de 2007 a 2017. A Região Norte foi a que apresentou o maior número de casos, com aproximadamente 99 mil acidentes e cerca de 430 mortes durante este período. Devido ao alto número de notificações e agravos, em 2010, os acidentes por animais peçonhentos foram incluídos na Lista de Notificação Compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. Essa medida ajuda a formular ações para prevenir os acidentes e ainda na distribuição dos soros específicos para o tratamento (BRASIL, 2019).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as responsáveis pelo maior número de casos na Região Norte, mas os acidentes causados por serpentes do gênero *Lachesis* apresentam o maior índice de mortalidade, embora os acidentes sejam pouco frequentes devidos aos hábitos da serpente (MOURA; MOURÃO; DOS-SANTOS, 2015; BRASIL, 2019).

1.2 O gênero *Lachesis*.

As serpentes pertencentes ao gênero *Lachesis* estão amplamente distribuídas em áreas de florestas tropicais primárias da América Central e Sul, atualmente são conhecidas quatro espécies neste gênero: a *Lachesis muta*, *Lachesis stenophrys*,

Lachesis acrochorda e *Lachesis melanocephala* (MADRIGAL et al., 2012; PINHEIRO-JUNIOR et al., 2018).

São consideradas as maiores serpentes peçonhentas do hemisfério ocidental, vivem na serapilheira das matas e se alimentam de ratos e outros mamíferos, possuem hábitos noturnos, período em que podem ser mais agressivas, e durante o dia costumam abrigar-se em buracos no chão da mata e ataca apenas se for tocada. É a única serpente peçonhenta que faz a postura de ovos (SÁ-NETO; SANTOS, 1995).

No Brasil é encontrada apenas uma espécie, a *Lachesis muta* (Figura 1), dentro desta espécie há duas subespécies, a *Lachesis muta muta* presente principalmente na Região Norte e a *Lachesis muta rhombeata* que pode ser encontrada em alguns remanescentes de Mata Atlântica e em algumas partes de florestas úmidas na Região Nordeste (PINHEIRO-JUNIOR, et al., 2018; PINHO; PEREIRA, 2001). Ambas são conhecidas popularmente como Surucucu-pico-de-jaca, devido as escamas do corpo serem acuminadas e pontiagudas (SÁ-NETO; SANTOS, 1995).

Figura 1 – Serpente *Lachesis muta*.



Fonte: Dr. Rafael M. Porto.

1.3 Veneno.

Os acidentes laquéticos, como são conhecidos os envenenamentos causados por *Lachesis*, são pouco frequentes quando comparados com os acidentes causados por outras espécies como *Bothrops* ssp. (acidente botrópico) e *Crotalus* ssp. (acidente crotálico), porém os acidentes laquéticos são associados a casos de moderados a graves. Devido ao tamanho da serpente acredita-se que a quantidade de veneno injetada possa ser alta, o que pode agravar os casos (FUNASA, 2001; TAVARES, 2016)

Os sintomas dos acidentes laquéticos são bastante parecidos com os sintomas dos acidentes botrópicos, apresentando manifestações locais como dor, sangramento e edema no local da picada que pode evoluir por todo o membro, hemorragias (gengivorragia, hematúria, sangramentos em ferimentos recentes), equimose, abscesso, formação de bolhas e necrose, além de manifestações sistêmicas como a bradicardia e a hipotensão arterial. O veneno de *Lachesis* apresenta ação coagulante mais intensa e possui efeitos neurotóxicos, o que ajuda a diferenciar do acidente por *Bothrops* (BERNADE; MOTA-DA-SILVA; ABREU, 2015; BRASIL, 2019; SANTOS; BOECHAT, 1995).

As toxinas que compõe o veneno evoluíram como parte das estratégias defensivas e de captura de presas. A maioria dos venenos compreende uma mistura altamente complexa de peptídeos que desempenham diversas funções biológicas e agem sinergicamente durante o envenenamento (LEWIS; GARCIA, 2003).

Análises proteômicas realizadas com o veneno de *Lachesis muta rhombeata* mostram a presença de diversos componentes, principalmente peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP), serinoproteases, metaloproteases e fosfolipases A₂ (PLA₂), além de lectinas, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP), L – aminoácido oxidase (LAAO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fosfolipase B (PLA et al., 2013; WIEZEL et al., 2015).

As peculiaridades do habitat natural das serpentes *Lachesis muta* torna difícil manter essa espécie em cativeiro e conseqüentemente poucos componentes de seu veneno foram isolados e estudados (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002). No entanto, sabe-se que as serinoproteases com atividade calicreína-símile estão envolvidas na produção de bradicinina e na inativação da angiotensina I e, junto aos BPPs podem

atuar na redução da pressão sanguínea, levando ao quadro de hipotensão arterial (DINIZ; OLIVEIRA, 1992; PINHEIRO-JUNIOR et al., 2018; SILVEIRA et al., 1989).

1.4 Sistemas calicreína-cinina e renina angiotensina.

A descoberta da bradicinina (BK) por Rocha e Silva e colaboradores em 1949 motivou diversos cientistas de todo o mundo a estudar o papel deste nonapeptídeo na fisiologia e patologia cardiovascular, levando a compreensão do sistema calicreína-cinina. Esse sistema regula os níveis de bradicinina (BK) e outras cininas responsáveis por vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da pressão arterial (CAMARGO et al., 2012; SERRANO et al., 1998).

No sistema calicreína-cinina o cininogênio de alta massa molecular é clivado pela calicreína plasmática liberando a BK (Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) que interage com o receptor B2R e, que ao ser ativado, promove um efeito hipotensor. São rapidamente metabolizadas em peptídeos inativos por várias enzimas sendo uma delas a enzima conversora de angiotensina (ECA), que libera quatro aminoácidos da sua porção C-terminal, inicialmente Phe-Arg e, em seguida Ser-Pro (SU, 2013).

O sistema renina-angiotensina também é importante para regular a pressão arterial, nesse sistema o angiotensinogênio, uma glicoproteína de 60 kDa sintetizado e liberado pelo fígado, é clivado pela renina plasmática (secretada pelos rins) liberando o peptídeo inativo angiotensina I (Ang I) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) a partir de sua região N-terminal. A enzima conversora de angiotensina I libera os dois resíduos de aminoácidos da porção C-terminal (His-Leu) da Ang I, formando a Angiotensina II (Ang II) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (SKEGGS et al., 1981). A Ang II pode interagir com seu receptor específico AT1, que ao ser ativado promove uma série de efeitos fisiológicos, como a vasoconstrição, o aumento da pressão arterial, a secreção de vasopressina, aldosterona, estímulo da sede e retenção renal de sódio (SU, 2013). O receptor AT2 é também um alvo da Ang II e acredita-se que tenha um efeito cardioprotetor, pois ao ser ativado estimula a neutralização dos efeitos causados pelo AT1, porém suas funções são menos conhecidas (ANAVEKAR; SOLOMON, 2005; SU, 2013). A enzima conversora de angiotensina II, uma carboxipeptidase, converte a Ang II em Ang₍₁₋₇₎ pela remoção do resíduo Phe na porção C-terminal da Ang II. A Ang₍₁₋₇₎ é um peptídeo

vasodilatador, que promove um efeito contrário a hipertensão realizada pela Ang II (FERRAARIO; VARAGIG, 2013).

1.5 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

A enzima conversora de angiotensina I (ECA, EC 3.4.15.1) é uma zinco metalopeptidase, pertencente à família M2 do clã MA das metalopeptidases. Também é conhecida como cininase II, dipeptidil carboxipeptidase I, devido estar associada a clivagem de substratos de vários outros processos fisiológicos, além dos envolvidos na regulação da pressão arterial e no metabolismo de sais e água (EHLERS; RIORDAN, 1989; SOFFER, 1976). A ECA cliva substratos liberando dipeptídeos C-terminais de vários oligopeptídeos que possuem a carboxila C-terminal livre ou em sua forma amidada, com exceção de casos onde há presença de um penúltimo resíduo de prolina (BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 1998; CHEUNG; CUSHAMN, 1973). A principal função da ECA está relacionada com a regulação da pressão arterial, pois cliva o dipeptídeo C-terminal da angiotensina I para produzir a angiotensina II, um potente octapeptídeo vasopressor (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956), e remove a porção C-terminal da bradicinina, inibindo sua atividade vasodilatadora (YANG; ERDÖS; LEVON, 1970).

A ECA é composta por dois sítios homólogos N e C, que possuem atividades catalíticas semelhantes. Porém o sítio localizado mais próximo ao C-terminal, denominado sítio C, é o principal responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, já o sítio mais próximo ao N terminal, denominado sítio N, metaboliza um hormônio envolvido na regulação negativa da hematopoiese (WEI et al., 1990; AZIZI et al., 1996; BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 1998; RIEGER et al., 1993; ROUSSEAU et al., 1994). Ambos os sítios inativam a bradicinina de forma semelhante (WEI et al., 1990). A formação de angiotensina II e a inativação da bradicinina pela ECA ocorrem predominantemente no pulmão, ocasionando a hipertensão arterial (NG; VANE, 1967; RYAN et al., 1968).

Para a hidrólise da angiotensina I a ECA necessita de cloreto pois seu sítio C-terminal é altamente dependente deste ânion. No entanto, o sítio N-terminal é menos dependente de cloreto, permitindo que a bradicinina possa ser hidrolisada na ausência deste ânion. A ligação com o cloreto causa a alteração do sítio ativo, facilitando a ligação do substrato com a enzima (ACHARYA et al., 2003). Condições

diferentes de Cl⁻ e pH podem alterar as atividades relativas dos dois sítios da ECA, bem como a determinação de substratos específicos para cada um deles (BARRET; RAWLINGS; WOESSNER, 1998).

1.6 Oligopeptídeos ricos em prolina.

Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) são considerados os inibidores naturais mais potentes da ECA, muitos também possuem efeitos de potencializadores de bradicinina e por esse motivo são conhecidos como peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP). A maioria compartilha três características marcantes: 1) um resíduo de piroglutamil no N-terminal; 2) um grande número de resíduos de prolina em toda a extensão da cadeia peptídica e 3) dois resíduos de prolina (Pro-Pro) na porção C-terminal. Os PROs contendo 5 resíduos de aminoácidos não apresentam essas características (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965; ONDETTI et al., 1977).

Ferreira e Rocha e Silva (1965) descreveram o primeiro BPP isolado no veneno de *Bothrops jararaca*, o Bj-BPP-5a (<EKWAP) que inspirou o desenho de inibidores da ECA para o tratamento da hipertensão, como o captopril, o que motivou o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da hipertensão arterial através da inibição da ECA (CAMARGO et al., 2012).

Após a descrição do primeiro BPP no veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965) outros PROs foram observados neste mesmo veneno (FERREIRA et al., 1998; IANZER et al., 2004) e em venenos de outras serpentes do mesmo gênero (TASHIMA et al., 2012) e também em outros gêneros, como *Agkistrodon* (MURAYAMA et al., 2000), *Bitis* (CALVETE; ESCOLANO; SANZ, 2007; FRANCISCHETTI et al., 2004; KODAMA, 2015), *Crotalus* (GRAHAM et al., 2005), *Lachesis* (PLA et al., 2013; PINHEIRO-JUNIOR et al., 2018; SOARES et al., 2005) e *Naja* (EL-SAADANI; EL-SAYED, 2003). Também já foram descritos PROs em venenos de anfíbios, como a perereca *Phyllomedusa hypochondrialis* (CONCEIÇÃO et al., 2007) e até em artrópodes como escorpiões (FERREIRA; ALVEZ; HENRIQUES, 1993; ZENG et al., 2000) e aranhas (FERREIRA et al., 1996).

Alguns PROs apresentaram seletividade para o sítio C-terminal da ECA quando comparado ao sítio N-terminal da enzima (COTTON et al., 2002). Inibidores seletivos do sítio C são considerados mais benéficos, pois além de reduzir o efeito

vasoconstritor de Ang II, através da inibição da degradação da Ang I, possibilita que a atividade do sítio N seja preservada e que ocorra a degradação da bradicinina, reduzindo o acúmulo de bradicinina e conseqüentemente diminui os efeitos colaterais ocasionados por inibidores da ECA (MESSERLI; NUSSBERGER, 2000).

1.7 Justificativa.

Estudos transcriptômicos (SOARES et al., 2005) e proteômicos (PLA et al., 2013) relataram abundância de BPPs no veneno de *Lachesis muta*, porém pouco se sabe sobre esses BPPs, pois não há dados na literatura descrevendo suas purificações e identificações. A caracterização desses peptídeos irá contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia causada pelo envenenamento e poderá servir para o melhoramento ou desenvolvimento de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar e caracterizar inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) na porção de baixa massa molecular do veneno de *Lachesis muta*.

2.2 Específicos

- Fracionar o veneno bruto utilizando membranas de corte molecular, obtendo frações de baixa massa molecular (*Pools* Peptídicos, PP);
- Obter frações a partir dos *pools* peptídicos através do método de cromatografia de fase reversa (HPLC);
- Analisar o potencial inibitório das frações obtidas na etapa de HPLC sobre a enzima conversora de angiotensina I (ECA) em fluorímetro utilizando o substrato FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH.

3 METODOLOGIA

3.1 Veneno e reagentes.

O veneno de *Lachesis muta* foi fornecido, de forma liofilizada, pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, SP, Brasil e mantido a -20 °C. A permissão para acessar o veneno dessa serpente (permissão nº 01/2009) foi concedida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), um órgão de fiscalização do Ministério do Meio Ambiente do Brasil.

O substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Adriana K. Carmona do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM.

A enzima conversora de angiotensina I (Angiotensin I Converting Enzyme from rabbit lung) foi adquirido comercialmente (Sigma Aldrich).

A acetonitrila e o ácido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos da J.T. Baker (EUA).

3.2 Preparação das amostras – obtenção dos *Pools* Peptídicos (PPs).

5 mg do veneno de *Lachesis muta* foram diluídos em 5 mL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,2. Para a obtenção do material peptídico, foi utilizado membrana de corte molecular de 10 kDa (Amicon Ultra-10 Centrifugal Filter Devices), centrifugado por 45 minutos a 5000 rpm, a 4°C. A amostra foi aliquoteada e congelada.

3.3 Determinação do perfil dos *Pools* Peptídicos e fracionamento do veneno em HPLC.

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 (ácido trifluoroacético) e o solvente B (acetonitrila), (Modelos LC 20 AD); um degaseificador, que é um módulo responsável por tirar eventuais bolhas da fase móvel através do vácuo (modelo DGU 20 A₃); um detector de UV capaz de medir 2

comprimentos de ondas simultaneamente (modelo SPD 20 A) e um detector de fluorescência que também trabalha com 2 comprimentos de onda: um de excitação e outro de emissão (modelo RF 10 AXL). Também fazem parte do equipamento um injetor automático (SIL 20 AC HT) e um módulo controlador. Trata-se de um Shimadzu Proeminence. Foi utilizada a Coluna C-18 Shim-Pack (150x4,6 mm).

Após a obtenção dos *pools* peptídicos (PPs), foi determinado o perfil da amostra em coluna C-18 no HPLC e gradiente de 20% a 60% de solvente B em 20 minutos (1,25% B/min, fluxo 1mL/min, absorvância a 214 nm) e para tal, foram injetados 50 µL. Para a etapa de coleta, foram injetados 1 mL do PP. Todos os picos do veneno foram coletados manualmente na saída do sistema de HPLC e submetidos ao processo de secagem em *speed-vac*. Posteriormente, o perfil cromatográfico foi analisado e comparado com os dados presentes na literatura sobre inibidores da ECA, e quatro picos foram selecionados e ressuspensos em 100 µL de tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0 para os testes de inibição enzimática.

3.4 Teste de inibição da ECA pelos picos selecionados utilizando o substrato FRET.

As reações enzimáticas foram realizadas em fluorímetro (Hidex Sense, HIDEX, Software Plate Reader versão 0.5.57.0), utilizando placas de 96 poços, ajustado para a leitura de excitação e emissão 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termoestabilizado e sob agitação.

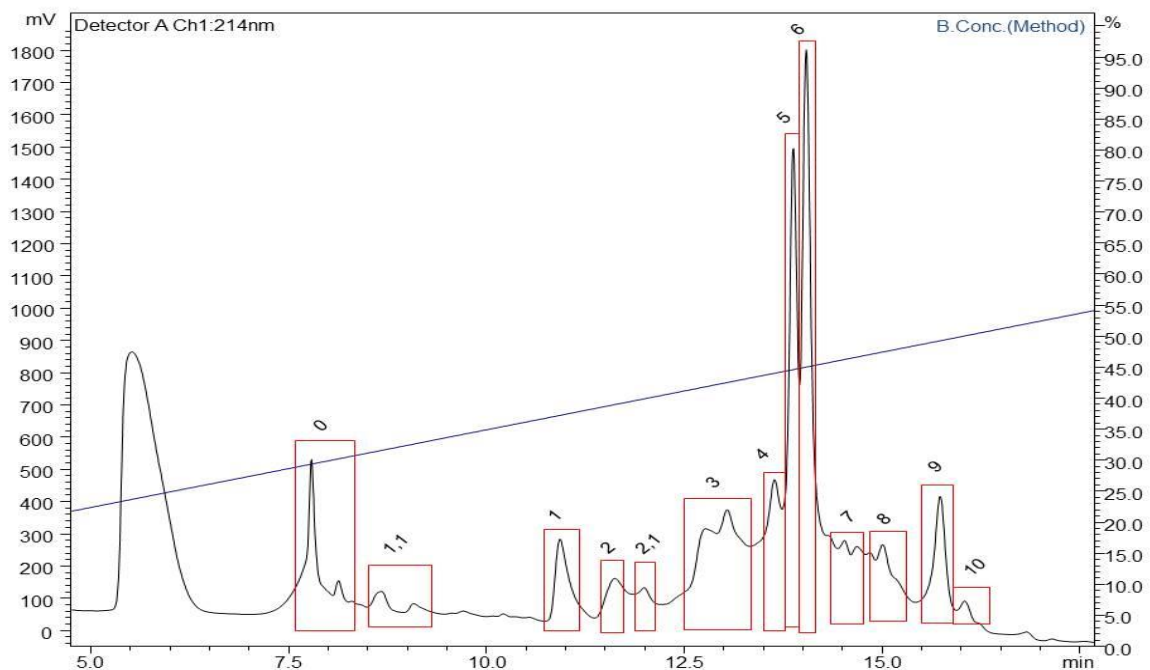
Foram realizados testes de atividade inibitória da ECA sobre a hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH. Para tal, 20 µL de cada pico selecionado na etapa de HPLC foram incubados com a ECA (75 ng) e o substrato FRET (4 µM) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos. Os testes foram realizados em duplicatas. Os dados foram analisados no programa GraFit (version 5.0.6; Copyright © 1989-2003; Erithacus Software Limited).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil cromatográfico do *pool* peptídico do veneno de *Lachesis muta*.

Após a centrifugação do veneno utilizando um filtro molecular de 10 kDa, as frações de baixa massa molecular, chamadas de *pools* de peptídicos (PP), foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa por HPLC utilizando uma coluna C-18. O perfil da amostra foi traçado e usado como guia para o fracionamento do PP. Na Figura 2 pode-se ver a ocorrência de cada pico coletado com o tempo de retenção e o gradiente de solução B (representado pela linha azul).

Figura 2 - Perfil cromatográfico das frações coletadas do PP do veneno de *L. muta*.



Fonte: Silva, Lais Gomes da.

Perfil cromatográfico do PP de *L.muta* em coluna C-18 (Shim-pack). Os retângulos vermelhos indicam as doze frações coletadas para os testes fluorimétricos. Solvente A: H₂O/TFA 0,1% e solvente B: ACN/solvente A 9:1. A linha azul representa gradiente de 20% a 60% de solvente B em 20 minutos, fluxo 1 mL/min, absorvância a 214 nm. Foram injetados 50 µL do PP para determinar o perfil da amostra e 1 mL para a etapa de coleta.

As frações coletadas no início da corrida apresentam uma baixa concentração da solução B, indicando uma característica hidrofílica dos componentes e as últimas

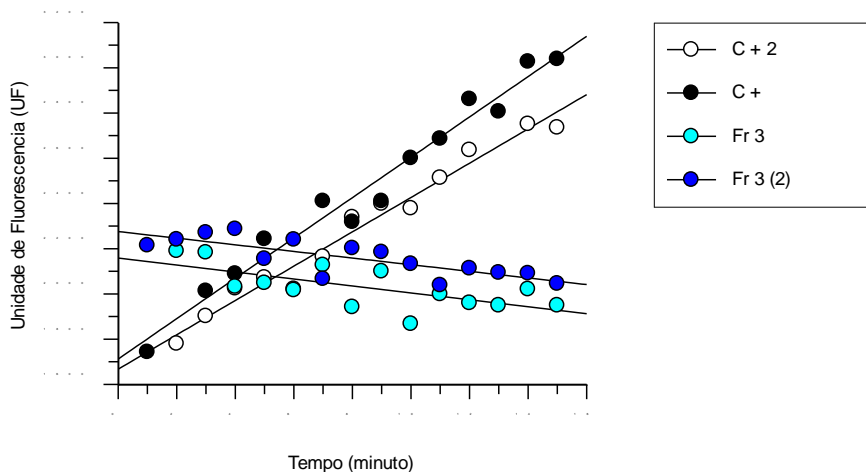
frações apresentam uma maior hidrofobicidade devido à alta concentração de solvente B.

As frações 3, 4, 5 e 6 foram eluídas a uma concentração entre 40% a 46% do solvente B, sendo que as frações 5 e 6 foram as que apresentaram os picos mais intensos. Esses picos são semelhantes à de estudos realizados anteriormente com veneno de outras serpentes que tiveram a presença de BPPs confirmada. Por esse motivo, as frações 3, 4, 5 e 6 foram selecionadas para os testes de atividade inibitória com a ECA e o substrato FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH.

4.2 Atividade inibitória da ECA

As frações selecionadas foram submetidas a atividade inibitória da ECA sobre o substrato FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH conforme descrito no item 3.4. Todas as frações inibiram a atividade catalítica da ECA sobre o substrato em 100% (Figuras 3, 4, 5 e 6).

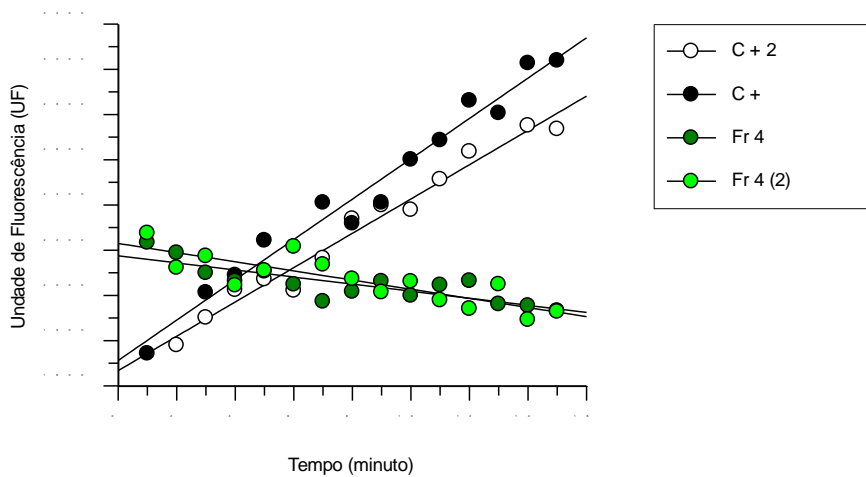
Figura 3 – Gráfico da inibição da ECA pela Fração 3 (Fr 3).



Fonte: Silva, Lais Gomes da.

Gráfico com as curvas de velocidade de hidrólise obtidas em ensaios fluorimétricos (HIDEX Sense) na ausência (C+, controle positivo) e presença da fração Fr 3 (20 μ L) proveniente do fracionamento do PP em HPLC. Foram incubados com a ECA (75 ng) e o substrato FRET (4 μ M) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos.

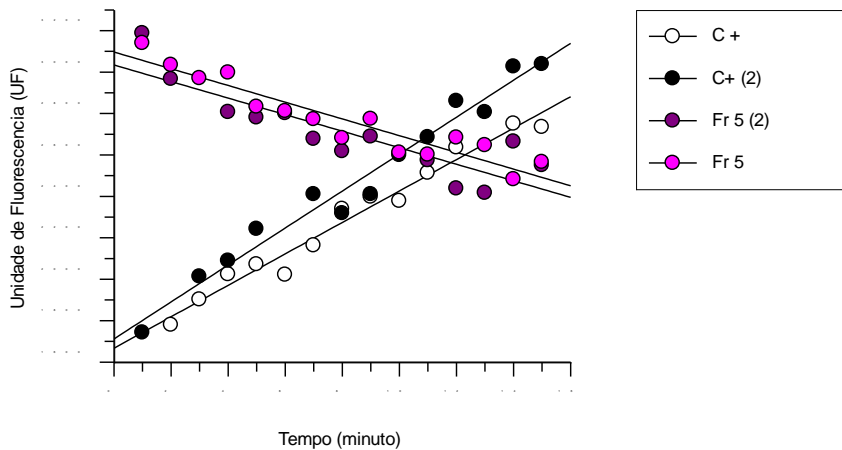
Figura 4 – Gráfico da inibição da ECA pela Fração 4 (Fr 4).



Fonte: Silva, Lais Gomes da.

Gráfico com as curvas de velocidade de hidrólise obtidas em ensaios fluorimétricos (HIDEX Sense) na ausência (C+, controle positivo) e presença da fração Fr 4 (20 μ L) proveniente do fracionamento do PP em HPLC. Foram incubados com a ECA (75 ng) e o substrato FRET (4 μ M) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos.

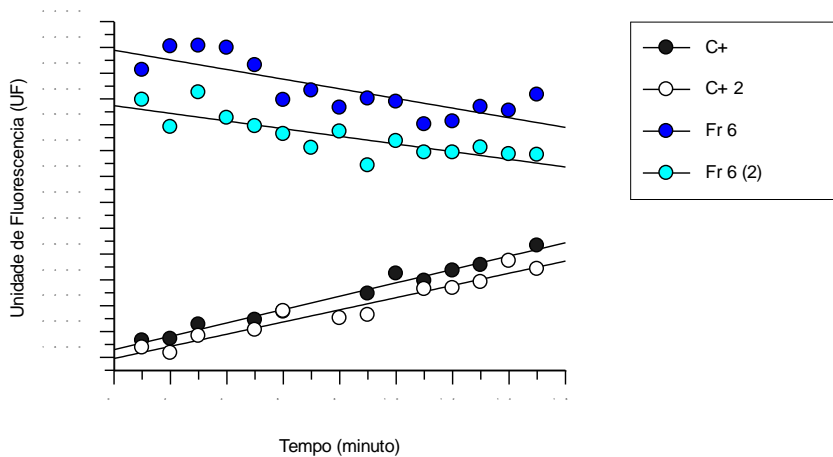
Figura 5 – Gráfico inibição da ECA pela Fração 5 (Fr 5).



Fonte: Silva, Lais Gomes da.

Gráfico com as curvas de velocidade de hidrólise obtidas em ensaios fluorimétricos (HIDEX Sense) na ausência (C+, controle positivo) e presença da fração Fr 5 (20 μ L) proveniente do fracionamento do PP em HPLC. Foram incubados com a ECA (75 ng) e o substrato FRET (4 μ M) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos.

Figura 6 - Inibição da ECA pela Fração 6 (Fr 6).



Fonte: Silva, Lais Gomes da.

Gráfico com as curvas de velocidade de hidrólise obtidas em ensaios fluorimétricos (HIDEX Sense) na ausência (C+, controle positivo) e presença da fração Fr 6 (20 μ L) proveniente do fracionamento do PP em HPLC. Foram incubados com a ECA (75 ng) e o substrato FRET (4 μ M) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos.

5 DISCUSSÃO

Casos de envenenamento confirmado por *Lachesis muta* são raros na literatura, porém são associados aos casos moderados e graves. Uma vez que a serpente em questão é de grande porte, acredita-se que a quantidade de veneno injetada possa ser alta o que pode agravar os casos (FUNASA, 2001; TAVARES, 2016). Em dois relatos comprovados na região sul do estado da Bahia, os acidentes foram causados por serpentes em cativeiro e ambos os pacientes apresentaram os sintomas locais como dor intensa, hemorragia, equimose local discreta e alterações sistêmicas, já na primeira meia hora pós-inoculação do veneno, com dor abdominal, vômito, diarreia, bradicardia e hipotensão (SOUZA, 2009).

A caracterização de toxinas responsáveis por causar esses sintomas é essencial para a melhoria do tratamento do envenenamento (PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2018). Estudos transcriptômicos (SOARES et al., 2005) e proteômicos (PLA et al., 2013) relataram a presença de BPPs no veneno de *Lachesis muta*, que podem estar relacionados ao quadro de hipotensão apresentado no envenenamento. Pouco se sabe sobre a ação desses BPPs, pois não há relatos na literatura sobre a caracterização e identificação desses peptídeos neste gênero.

O perfil cromatográfico do *pool* peptídico (PP) do veneno de *Lachesis muta* apresentou picos menos definidos na região mais hidrofóbica, e esses picos se assemelham aos dados obtidos anteriormente por nosso grupo, que confirmou a presença de BPPs no veneno da serpente africana *Bitis gabonica rhinoceros*, com os mesmos tempos de retenção (KODAMA, 2015).

Quatro frações que apresentaram maior similaridade com os dados obtidos por Kodama (2015) foram testadas como inibidores da atividade catalítica da ECA sobre o substrato FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH e todas impediram a atividade da ECA sobre o substrato, indicando que as frações podem conter moléculas que inibem 100% a atividade da enzima.

Kodama (2015) em seu estudo sobre os constituintes de baixa massa molecular dos venenos de quatro espécies do gênero *Bitis* (*B. arietans*, *B. gabonica*, *B. g. rhinocerus* e *B. nasicornis*) observou que todos os venenos apresentaram uma alta similaridade à peptídeos hipotensores já conhecidos e descritos no veneno de *Bothrops jararaca*, os chamados *Bj*-PROs, além de apresentar dois peptídeos idênticos, um no veneno de *Bitis nasicornis* e outro em *Bitis gabonica*. É importante ressaltar que os dois gêneros, *Bothrops* e *Bitis*, são distantes na filogenia de Viperidae e que a presença de peptídeos idênticos em seus venenos sugere uma conservação destas moléculas, mesmo em serpentes do novo e velho mundo, separadas geograficamente por cerca de 50 milhões de anos. O gênero *Lachesis* está mais próximo ao gênero *Bothrops* do que o gênero *Bitis* na filogenia da família Viperidae (WÜSTER et al., 2008). Assim, em adição aos resultados aqui apresentados, a conservação das moléculas nos dois gêneros distantes e as análises transcriptômicas e proteômicas do veneno de *L. muta* reforçam a hipótese que as frações selecionadas podem conter BPPs. Para verificar se as frações selecionadas contêm BPPs será necessário realizar a análise por espectrometria de massas.

6 CONCLUSÕES

As frações selecionadas da porção de baixa massa molecular apresentaram conter moléculas com alto potencial inibidor da ECA. Para verificar se esses inibidores são BPPs será necessário a análise por espectrometria de massas. A partir da determinação das sequências primárias dos possíveis BPPs presentes no veneno da *L. muta*, iremos providenciar a síntese químicas destas moléculas. Com os peptídeos sintéticos, iremos verificar de que formas essas moléculas agem sobre a ECA (determinação dos mecanismos de inibição) e as suas potências inibitórias (determinação dos valores das constantes de inibição, K_i).

Os resultados apresentados indicam que o estudo das moléculas presentes na porção de baixa massa molecular do veneno de serpentes *Lachesis* merece uma atenção especial, uma vez que obtivemos quatro frações que foram capazes de inibir totalmente a hidrólise do substrato FRET pela ECA. Não sabemos, no momento, qual é a composição peptídica destas frações e se elas são compostas por um ou mais peptídeos. É importante ressaltar que estes resultados foram mais promissores do que aqueles obtidos anteriormente pelo nosso grupo quando do estudo dos PPs de venenos de serpentes africanas do gênero *Bitis*. Assim, estamos aguardando os resultados de espectrometria de massas para darmos continuidade e finalizarmos o trabalho.

REFERÊNCIAS¹

ACHARYA, K. Ravi et al. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nature Reviews drug discovery**, v. 2, p. 891-902, 2003.

ANAVEKAR, N. S.; SOLOMON, S. D. Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodeling. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**, v. 6, p. 43-48, 2005.

AZIZI, M. et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline. **Journal of clinic investigation**, v. 97, n. 3, p. 839-844, 1996.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Peptidyl-dipeptidase A / angiotensin I converting enzyme. In: BARRET, A.J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. (eds.), **Handbook of Proteolytic Enzymes**. San Diego: Academic Press, 1998, p. 1066-1076.

BERNARDE, P.S., MOTA-DA-SILVA, A., ABREU, L.C. Ofidismo no estado do Acre – Brasil. **Journal of Amazon Health Science**, v. 1, n. 2, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A-Z. **Acidentes por animais peçonhentos**. 2019. Disponível em <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>.

CALVETE, J. J.; ESCOLANO. J.; SANZ, L. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 7, p.2732-2745, 2007.

CAMARGO, Antonio C.M et al. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, p. 516-523, 2012.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

CHEUNG, H. S.; CUSHMAN, D. W. Inhibitors of homogenous angiotensin-converting enzyme of rabbit by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 293, p. 451-463, 1973.

CONCEIÇÃO, K. et al. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*, **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 515-523, 2007.

COTTON, Joël et al. Selective Inhibition of the C-Domain of Angiotensin I Converting Enzyme by Bradykinin Potentiating Peptides. **Biochemistry**, v. 41, p. 6065-6071, 2002.

DINIZ; Marcelo R. V.; OLIVEIRA, Eduardo B. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster). **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 247-258, 1992.

EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. **Biochemistry**, v. 28, p. 5311-5318, 1989.

EL-SAADANI, M. A.; EL-SAYED, M. F. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 136, n. 4, p. 387-395, 2003.

FERRARIO, C. M.; VARAGIG, J. The Ang-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. **American Journal of Physiology, Renal Physiology**, v. 298, p. 297-305, 2013.

FERREIRA, L. A.; ALVEZ, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, n. 8, p. 941-947, 1993.

FERREIRA, L. A. et al. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoris* venom. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 599-603, 1996.

FERREIRA, L. A. et al. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 285-289, 1998.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin-potentiating factor) from *Bothrops jararaca*. **Experientia**, v. 15, p. 347-349, 1965.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55-69, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed., Brasília, 2001.

GRAHAM, Robert Leslie James et al. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World *Crotalinae* pit vipers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 1587-1592, 2005.

IANZER, D. et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, n. 7, p. 1085-1092, 2004.

KODAMA, Roberto Tadashi. **Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero *Bitis* e suas atividades biológicas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2015.

LEWIA, Richard J.; GARCIA, Maria L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 790-802, 2003.

MADRIGAL, Marvin et al. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomic of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 280-297, 2012.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A.R. Criação e Manejo de Serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R.S. (eds). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002, p. 175-199.

MESSERLI, Franz H.; NUSSBERGER, Jürg. Vasopeptidase inhibition and angioedema. **The Lancet**, v. 356, p. 608-609, 2000.

MOURA, Valéria Mourão de; MOURÃO, Rosa Helena Veras; DOS-SANTOS, Maria Cristina. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécie vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 73-84, 2015.

MURAYAMA, N. et al. cDNA cloning of bradykinin-potentiating peptides-C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 13, p. 4075-4080, 2000.

NG, K.K; VANE, J. R. Converting of angiotensin I to angiotensin II. **Nature**, v. 216, p.762-766, 1967.

ONDETTI, M. A. et al. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v. 196, p. 441-444, 1977.

PLA, Davinia et al. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms

evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 112-123, 2013.

PINHEIRO-JUNIOR, Ernesto Lopes et al. LmrBPP9: A synthetic bradykinin-potentiating peptide from *Lachesis muta rhombeata* venom that inhibits the angiotensin-converting enzyme activity in vitro and reduces the blood pressure of hypertensive rats. **Peptides**, v. 102, p. 1-7, 2018.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

RIEGGER, K.J. et al. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **Biochemical Journal**, v. 296, p. 373-378, 1993.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261-273, 1949.

RUSSEAU, M.F. et al. Effects of disoldipine therapy on myocardial perfusion and neurohormonal status in patients with severe ischaemic left ventricular dysfunction. **European Heart Journal**, v. 15, n. 7, p. 957-964, 1994.

RYAN, J.W. et al. Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation. **Biochemical Journal**, v. 100, n. 4, p. 795-797, 1968

SÁ-NETO, R.P., DOS-SANTOS, M.C. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), 1986-92: estudo retrospectivo. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 171, 1995.

SANTOS, Maria Cristina dos; BOECHAT, Antônio Luiz. Venenos. In: SANTOS, Maria Cristina dos et al. **Serpentes de Interesse Médico da Amazônia: Biologia, Venenos e Tratamento de Acidentes**, Manaus: UA/SESU, 1995. p.23.

SERRANO, Solange M. T. 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**, v. 251, 3 ed., p. 845-853, 1998.

SILVEIRA, A. M. et al. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. **Int. J. Biochem.**, v. 21, n. 8, p. 863-871, 1989.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Acidente por Animais Peçonhentos. **Ministério da Saúde**, 2019. Disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>.

SKEGGS, L. T. et al. Experimental renal hypertension: the discovery of the renin-angiotensin system. In: SOFFER, R. (Ed), **Biochemical Regulation of Blood Pressure**. Haboken: Wiley & Sons Inc., 1981, p. 3-38.

SKEGGS, L. T. Jr; KAHN, J.R.; SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, p. 295-299, 1956.

SOARES, Marcia Regina et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 31-38, 2005.

SOFFER, R. L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptide. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p.73-94, 1976.

SOUZA, R. C. G. Aspectos clínicos do acidente laquético. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**, 2 ed., São Paulo: Sarvier, 2009, p. 97-107.

SU, Jin Bo. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 319-328, 2013.

TASHIMA, A. K. et al. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes. **Molecular and cellular proteomics**, v. 11, p. 1245-1262, 2012.

TAVARES, Aluska Vieira. **Estudo epidemiológico e clínico dos casos de acidentes ofídicos no estado do Rio Grande do Norte**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia). Universidade Federal de Campina Grande. Cuité, PB. 2016.

WEI, L. et al. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **The journal of biological chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002-9008, 1990.

WIEZEL, Gisele A et al. Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4 a novel snake venom serine proteinase. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

WILLIAMS, D. A. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, 2010.

WÜSTER et al. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, p. 445-459, 2008.

YANG, H. Y. T.; ERDÖS, E.G.; LEVON, Y. A. Dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 214, p. 374-376, 1970.

ZENG, X. C. et al. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus mortensii* Karsh. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Life**, v. 49, n.3, p. 207-210, 2000.